

**Analisis Mutasi Protease HIV-1 (kode DY₁) dan Pengaruhnya
pada Resistensi Virus Terhadap Saquinavir Menggunakan
Metode Perhitungan Mekanika Kuantum dan *Molecular
Dynamics Simulations***

SKRIPSI

**Diajukan Untuk Melengkapi Persyaratan Memperoleh
Gelar Sarjana Fisika**

oleh

SUTARTO

0303027036



**DEPARTEMEN FISIKA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
2008**

LEMBAR PENGESAHAN

Analisis Mutasi Protease HIV-1 (kode DY₁) dan Pengaruhnya pada Resistensi
Virus Terhadap Saquinavir Menggunakan Metode Perhitungan Mekanika
Kuantum dan *Molecular Dynamics Simulations*

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh:

Pembimbing I

Prof. Dr. rer. nat. Rosari Saleh

Pembimbing II

Dr. Budiman Bela, Sp. MK

Penguji I

Prof. Dr. Djarwani S. Soejoko

Penguji II

Dr. Mussadiq Musbach

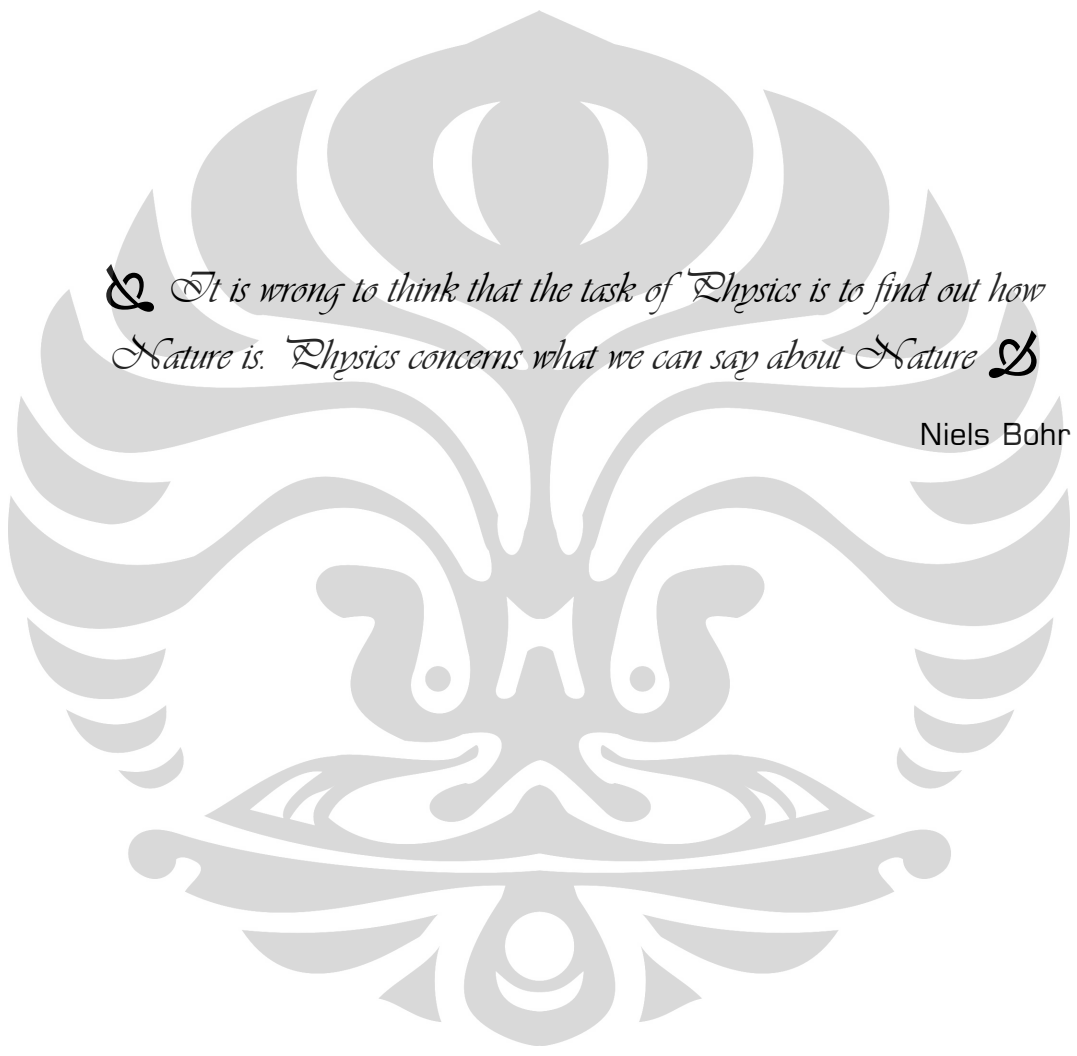
Penguji III

Dr. Fera Ibrahim, Sp.MK, Ph.D

Mengetahui:

Ketua Departemen Fisika FMIPA UI

Dr. Azwar Manaf



It is wrong to think that the task of Physics is to find out how Nature is. Physics concerns what we can say about Nature

Niels Bohr

Karya ini saya persembahkan untuk yang tercinta.

Bapak Gipto dan Ibu Rukinah

KATA PENGANTAR

Ucapan Terima kasih yang pertama dan utama tentunya saya haturkan kepada Allah ﷻ yang telah memberikan kemudahan–kemudahan dalam pelaksanaan apapun pekerjaan saya, termasuk dalam penyusunan skripsi ini. Juga kepada Muhammad ﷺ yang selalu menjadi teladan. Tak lupa pula ucapan terima kasih yang sebesar–besarnya saya haturkan kepada anggota keluarga besar saya, khususnya Bapak Cipto dan Ibu Rukinah, yang senantiasa memberikan dukungan, semangat dan inspirasi yang tak terbatas.

Skripsi ini adalah pembahasan atas sebuah permasalahan yang sangat asing dan tidak terbayangkan sebelumnya bagi saya, akan tetapi atas kesabaran, dedikasi dan perhatian besar yang diberikan dua orang pembimbing saya, menjadikan bahasan ini menjadi bagian dari hal yang wajib ditemukan masalah dan penyelesaiannya. Oleh karenanya, saya menghaturkan ucapan terima kasih yang sebesar–besarnya kepada Prof. Dr. rer. nat. Rosari Saleh dan Dr. Budiman Bela, Sp.MK yang telah membimbing dan mengarahkan saya selama proses penelitian. Dan juga atas nasehat–nasehat dan pengalaman hidup yang sangat berharga yang makin membuka wawasan saya untuk dapat berkarya dan membantu orang lain.

Selama hampir 1½ tahun melakukan penelitian dan studi pustaka tentang protease HIV–1 ternyata memberi kesan tersendiri bagi saya, manakala apa yang diidam–idamkan ternyata belum mencapai tujuan yang semestinya, sehingga perlu ada pengkajian lebih dalam atas masalah yang dihadapi. Untuk kesediaannya membuka wawasan saya tentang ke–Biokimia–an, saya ucapkan terima kasih

kepada Dra. Sri Handayani, M.Si, Iman, S.Si, Emil, dan Nur Hidayat (Departemen Kimia UI) yang telah bersedia memberikan “kuliah gratis” tentang asam amino, ikatan kimia, dan reaksi kimia. Ucapan terima kasih saya haturkan kepada Santi Nurbaiti, M.Si (ITB) atas diskusi dan masukannya selama mengikuti *International Conference on Computational Science* di ITB tahun 2007, Dr. Harno Dwi Pramono, M.Sc (AICCC–UGM) dan Parsaoran, M.Si (ITB) atas diskusi yang menarik di sela-sela acara *International Conference on Chemical Science* di UGM tahun 2006 yang telah memberikan pemahaman yang benar tentang teori simulasi kedinamisan molekuler.

Dalam kesempatan ini, saya juga mengucapkan terima kasih kepada keluarga besar ESIS, penerbit Erlangga, khususnya Pak Bambang, S.Si, Pak Syarief, S.Si, Mas Heru, S.Si, Mbak Pida, S.Si, Mbak Tutik, S.Si, Mala, S.Si, Kang Amir, S.Si, dan Bu Nenden, S.Pd atas diskusi dan “Have Fun”nya selama ini. Selain itu saya juga mengucapkan terima kasih yang sebesar–besarnya kepada Pak Iman Subekti dan keluarga atas bimbingan yang tak ternilai selama ini, Ibu Sri Kuswati dan keluarga yang telah membantu kelancaran penelitian.

Secara khusus saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar–besarnya kepada keluarga besar *Goodwill International Foundation* khususnya Mr. Yasuo Hara, Mrs. Mizue Hara, Mizuho Hara (Singapura), Chisato Hara, Ny. Rosfia Rasyid dan Michael Gonzalez (*The American Chamber of Commerce in Indonesia*) atas training kepemimpinan, beasiswa, dan *sharing* pengalaman yang sangat luar biasa. Juga kepada Lany Wijaya (kimia UI) untuk software HyperChem–nya dan Sandra Young (Wavefun, California, USA) atas kiriman software Trident–nya dari Amerika.

Saya sangat menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Atas kesediannya memberikan evaluasi, kritik, serta “ujian” yang mendalam dan komprehensif saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Djarwani S. Soejoko, Dr. Mussadiq Musbach, dan Dr. Fera Ibrahim, Sp.MK, Ph.D selaku penguji pada sidang skripsi saya. Juga kepada Dr. Terry Mart selaku pembimbing akademik sekaligus ketua sidang dan Pak Andi Yasmon atas data *genotyping*-nya.

Khusus untuk Mbak Ratna, terima kasih atas kesabaran dan pengertiannya selama pengumpulan syarat-syarat sidang yang selalu mepet. Untuk teman-teman Fisika angkatan 2003 khususnya Lukman, Lindu “Nanang” Taufany, Hasanul “Batosmaul” Arifin serta tim peneliti 103A Devi, Kiat, Mela, Apis, Andes, Daniel, Lisa, “Dr. Budi”, Sigit, dan Ira semoga kenangan indah (walaupun kadang tidak jelas) tetap terpatri di benak kita. We are friends forever! Untuk anak-anak Farmasi 2007, terima kasih atas kebersamaan dan keceriaan selama ini (lengkap dengan segala ke’gokil’an dan keanehannya). Secara khusus saya ingin menghaturkan terima kasih kepada Siti Masitoh atas nasehat dan kalimat-kalimat yang membangkitkan semangat saya serta kepada Rr. Chryсна Winandha K atas pinjaman DELLnya.

Akhir kata, walaupun tidak sempurna saya berharap secuil karya ini dapat memberikan manfaat kepada masyarakat banyak. Oleh karena tidak sempurna maka kritik, saran, dan masukan sangat diharapkan demi karya yang lebih baik di masa depan.

Jakarta Selatan, 22 Mei 2008

Sutarto

Analisis Mutasi Protease HIV-1 (kode DY₁) dan Pengaruhnya pada Resistensi Virus Terhadap Saquinavir Menggunakan Metode Perhitungan Mekanika Kuantum dan *Molecular Dynamics Simulations*

Sutarto

Fisika Medis, Departemen Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

Abstrak

Penyebaran HIV/AIDS semakin meningkat dari tahun ke tahun dan telah menjadi salah satu jenis penyakit terburuk yang pernah diketahui. Data *genotyping* protease HIV-1 dari pengidap HIV/AIDS (kode DY₁) menunjukkan bahwa telah terjadi beberapa mutasi yang muncul pada DY₁. Simulasi dilakukan terhadap kompleks HXB2-saquinavir dan DY₁-saquinavir untuk mempelajari sistem kompleks secara struktural dan energetik. Simulasi MDS yang digabung dengan perhitungan energi menggunakan metode mekanika kuantum menunjukkan bahwa keadaan terprotonasi protease HIV-1 terjadi pada residu Asp25 yaitu pada atom OD₁.

Struktur dan pola interaksi obat terhadap enzim antara HXB2 dan DY₁ memiliki tingkat kemiripan yang cukup baik dengan RMSD 0,83 Å. Namun demikian, telah terjadi perubahan struktur 3D yang cukup signifikan terutama pada tempat-tempat terjadinya mutasi. Konformasi yang terjadi pada sisi aktif dan *ring flaps* menyebabkan penurunan energi ikatan hidrogen antara saquinavir dan residu Asp25 dan Asp29. Konformasi pada sisi aktif yang letaknya relatif jauh dari tempat-tempat mutasi dihipotesiskan sebagai akibat yang bersifat akumulatif dari perubahan medan gaya yang menginduksi perubahan struktur sistem secara global. Konformasi tersebut juga menyebabkan perubahan orientasi sub site P1 dan P3 pada saquinavir.

Perhitungan menggunakan metode DFT (B3LYP/6-31G) yang dikombinasi dengan metode semi-empirik menunjukkan bahwa energi kompleks DY₁-saquinavir menurun relatif terhadap kompleks HXB2-saquinavir. Secara keseluruhan, dalam batasan akurasi metode dan parameter yang digunakan dalam penelitian ini, mutasi pada DY₁ menyebabkan penurunan energi ikat kompleks PR-saquinavir dalam orde yang cukup signifikan dan berpengaruh langsung terhadap resistensi DY₁ pada treatment saquinavir.

Kata Kunci: HIV/AIDS, Protease HIV-1, *Molecular Dynamics Simulations*, Mekanika Kuantum, Protonasi, Medan Gaya, DFT, B3LYP/6-31G, Saquinavir.

xix + 107 hlm; gbr; tab; lamp.
Daftar Pustaka: 46 (1964 – 2008)

Abstract

The spread of HIV/AIDS has increased every year and became one of the worst diseases ever known. Genotyping data of HIV-1 protease (DY₁) from HIV/AIDS patient showed that there were mutations on DY₁. Molecular dynamics simulations of HXB2 and DY₁ protease complex with saquinavir were carried out to explore structure and interactions of the drug resistance. The molecular dynamics result combined with quantum mechanics based calculations showed that a monoproteination took place on Asp25, i.e. on inner oxygen atom (OD₁).

The overall structures and pattern of inhibitor bindings on HXB2 and DY₁ were similar with RMSD 0,83 Å. However, there are conformational changes that occur on mutation sites in DY₁ because of local interaction effect due to substitutions of mutated residues. Conformational changes on active sites and ring flaps disrupt hydrogen bonding between saquinavir and Asp29 and Asp25 residues. This conformational change was hypothesized as consequences of force field change that induced structural conformations due to the overall mutations that occur on DY₁. The structural changes on active site also causing conformational change on saquinavir especially on P3 and P1 sub sites.

High level quantum mechanics calculations (DFT, B3LYP/6-31G) combined with semi-empirical method showed that the energy of DY₁-saquinavir complex has decreased in significant order relative to HXB2-saquinavir complex. According to the results of all simulations of HXB2 and DY₁, the mutations that occur on DY₁ have potent in decreasing the binding energy between DY₁ and saquinavir.

Keywords: HIV/AIDS, HIV-1 Protease, Molecular Dynamics Simulations, Quantum Mechanics, Protonation, Force Field, DFT, B3LYP/6-31G, Semi-empirical, Saquinavir.

xix + 107 pages; fig; tab; app.
References: 46 (1964 – 2008)

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	vi
DAFTAR ISI	viii
TERMINOLOGI DAN SINGKATAN	x
DAFTAR GAMBAR DAN TABEL	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS Type 1 (HIV-1)	10
2.1 Struktur Virus HIV-1	10
2.2 Daur Hidup HIV-1	12
2.3 Protease HIV-1	14
2.4 Mekanisme Proteolisis	15
2.5 Protease Inhibitor	19
2.6 Resistensi HIV-1 Terhadap Obat ARV	20
BAB III TEORI	23
3.1 Metode Mekanika Kuantum	26
3.1.1 Persamaan Schrodinger	26
3.1.2 <i>Density Functional Theory</i> (DFT)	28
3.1.3 Basis Set	32
3.2 Metode Semi-Empirik: <i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i> <i>Parametric Number 3</i> (MNDO – PM3)	34
3.3 Mekanika Molekuler	35

BAB IV PENGOLAHAN DATA, ANALISIS DAN DISKUSI

4.1 Analisis Mutasi PR HIV-1	43
4.2 Penyiapan Data Input Simulasi Model PR HIV-1	46
4.3 Detail Perhitungan Model PR HIV-1	49
4.4 Hasil dan Analisis Model PR HIV-1	51
4.5 Metode MDS	63
4.5.1 Analisis Hasil Minimisasi Struktur	66
4.5.2 Analisis Hasil Simulasi MDS	89
4.5.3 Diskusi	99

BAB V KESIMPULAN	104
------------------	-----

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

TERMINOLOGI DAN SINGKATAN

1. *Ab Inito*

Dari bahasa Latin yang berarti “from beginning”, yaitu metode pendekatan teoretis terhadap suatu sistem tanpa menyertakan parameter eksperimen apapun.

2. ACF

Adiabatic Connection Formula.

3. AIDS

Acquired Immunodeficiency Syndrome.

4. *Alignment*

Dalam konteks ilmu biologi dapat didefinisikan sebagai metode yang digunakan untuk menentukan karakter organisme dengan cara mencari kemiripan struktur melalui kode DNA suatu organisme tersebut relatif terhadap organisme yang lain.

5. AMBER 99

Nama salah satu jenis *empirical force field* yang digunakan untuk analisis sistem molekuler khususnya untuk sistem protein dan DNA.

6. ARV

Anti-retroviral, secara umum didefinisikan sebagai obat yang digunakan untuk melumpuhkan virus. Dalam konteks penelitian ini, ARV didefinisikan sebagai obat yang digunakan untuk melumpuhkan virus HIV-1. Terdapat beberapa jenis ARV antara lain *amprenavir* (AMP), *squinavir* (SQV), *darunavir* dan lain sebagainya.

7. *Back bone*

Alur ikatan peptida antara satu asam amino dengan asam amino yang lain membentuk satu kluster molekul yang besar.

8. *Bad Contact*

Interaksi yang bersifat *tidak* rasional yang muncul pada sistem molekuler dengan mengacu pada keadaan riil suatu sistem tertentu.

9. B3LYP

Persamaan energi *exchange–correlation* yang terdiri dari komponen energi *exchange* Hartree–Fock (HF), koreksi energi *exchange* Becke (B3), komponen energi *correlation* Lee–Yang–Parr (LYP) dan Vosko–Wilk–Nusair (VWN).

10. DFT

Density functional theory.

11. DPA

Direct proteolytic attack yaitu mekanisme proteolisis substrat oleh PR HIV–1 tanpa bantuan molekul H₂O. Substrat dipotong secara langsung oleh sisi aktif enzim protease HIV–1.

12. Eksak

Energi atau keadaan yang sesuai dengan kondisi nyata dari suatu sistem fisis tertentu.

13. *Force field*

Medan gaya yang berisi persamaan–persamaan fisika klasik yang digunakan untuk menganalisis sistem pada level molekuler.

14. *Genotyping*

Metode yang digunakan untuk melakukan pemindaian kode DNA terhadap segmen organ tertentu dari suatu organisme.

15. GGA

General gradient Approximation.

16. GTO

Gaussian Type Orbitals yaitu jenis basis set yang digunakan untuk memecahkan persamaan Schrodinger pada sistem banyak partikel.

17. HIV-1

Human immunodeficiency virus tipe 1.

18. *Hybrid Theory*

Sub metode Density Functional Theory (DFT) yang menggabungkan komponen energi *exchange-correlation* eksak/HF ke dalam persamaan *exchange-correlation* yang sebagian parameternya ditentukan berdasarkan fitting terhadap eksperimen.

19. Inhibitor

Senyawa atau molekul yang digunakan untuk menghambat kerja suatu enzim.

20. IPA

Indirect proteolytic attack yaitu mekanisme proteolisis substrat oleh PR HIV-1 dengan perantara molekul H₂O yang berperan sebagai pemotong substrat melalui mekanisme reaksi kimia tertentu.

21. Konformasi

Perubahan yang muncul pada struktur 3D protein yang disebabkan salah satunya oleh substitusi asam amino pada bagian-bagian tertentu.

22. LSDA

Local spin density approximation

23. MNDO

Modified Neglect of Diatomic Overlap. Dalam penelitian ini digunakan metode semi empirik MNDO *Parametric Number 3* (MNDO-PM3) atau biasa disebut PM3 saja.

24. Mutasi → contoh V35I

Asam amino valin pada posisi 35 berubah menjadi asam amino isoleusin.

25. PDB

Protein Data Bank, .pdb menunjukkan ekstensi file topologi struktur sinar-X suatu molekul tertentu.

26. *Phenotyping*

Metode eksperimen yang digunakan untuk mengetahui tingkat replikasi virus pada medium kultur terhadap konsentrasi obat ARV tertentu.

27. PR HIV-1

Kependekan dari protease HIV-1 yaitu salah satu enzim yang dimiliki virus HIV yang berfungsi untuk memecah poliprotein membentuk sub unit fungsional selama proses maturasi.

28. Proteolisis

Mekanisme pemecahan poliprotein yang dilakukan oleh enzim protease. Terdapat dua mekanisme yang diusulkan yaitu *indirect proteolytic attack* (IPA) dan *direct proteolytic attac* (DPA).

29. Protonasi

Penambahan atau transfer proton dari satu molekul ke molekul yang lain. Dapat diartikan juga keadaan dimana suatu atom mengikat atom hidrogen.

30. Resistensi

Suatu keadaan dimana virus tidak bisa dilumpuhkan dengan obat ARV tertentu.

31. *Saquinavir* (SQV)

Jenis obat yang digunakan untuk menghambat kerja enzim PR HIV-1 yang disusun berdasarkan keadaan transisi dan meniru substrat alamiah PR HIV-1.

32. Semi empirik

Model teoretik sistem yang sebagian variabel-variabel dalam persamaan fisiknya ditentukan secara eksperimentatif.

33. Sensitivitas

Suatu keadaan dimana virus masih dapat dilumpuhkan oleh obat ARV tertentu.

34. STO

Slater Type Orbitals yaitu salah satu jenis fungsi basis yang digunakan untuk memecahkan persamaan Schrodinger pada sistem banyak partikel.

35. *Sub site*

Daerah atau asam amino yang berinteraksi dengan antara satu molekul dengan molekul yang lain. Simbol $P_{n/n'}$ menunjukkan sub site pada substrat sedangkan $S_{n/n'}$ menunjukkan sub site pada enzim.

36. Topologi

Data molekul yang berisi informasi tentang jenis atom yang menyusun molekul, jenis ikatan yang terjadi antar atom, jarak antar atom, jenis asam amino dan informasi fisika dan kimia lainnya.

DAFTAR GAMBAR DAN TABEL

Daftar Gambar

Bab II Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1)

1. Gambar 2.1 Struktur Virus HIV-1	10
2. Gambar 2.2 Bagan struktur genomik HIV-1	11
3. Gambar 2.3 Skema replikasi HIV-1	13
4. Gambar 2.4 Protease HIV-1 kompleks dengan inhibitor SQV	14
5. Gambar 2.5 Penamaan sub site pada enzim PR HIV-1	15
6. Gambar 2.6 Penamaan sub site pada substrat	16
7. Gambar 2.7 Mekanisme reaksi proteolisis PR HIV-1 model <i>indirect proteolytic attack</i> (IPA)	17
8. Gambar 2.8 Mekanisme reaksi proteolisis PR HIV-1 model <i>direct proteolytic attack</i> (IPA)	18
9. Gambar 2.9 Struktur molekul SQV	20

Bab III Teori

10. Gambar 3.1 a). Sisi aktif PR HIV-1 dan b). PR HIV-1 (1HXB.pdb)	23
11. Gambar 3.2 Sisi aktif PR HIV-1, Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27' (1HXB)	24
12. Gambar 3.3 Kemungkinan keadaan terprotonasi pada PR HIV-1	25
13. Gambar 3.4 Empat kemungkinan keadaan protonasi PR HIV-1	25
14. Gambar 3.5 Alur analisis sub sistem kuantum	26
15. Gambar 3.6 Cara membaca notasi fungsi basis CGTO	33

16. Gambar 3.7 Teori dan metode pendekatan analisis sub sistem klasik	36
17. Gambar 3.8 Definisi sudut torsional, ω	37
18. Gambar 3.9 Definisi variabel–variabel E_{oop}	38
19. Gambar 3.10 Model reaksi enzimatik pada keadaan transisi	40
20. Gambar 3.11 Model reaksi proteolisis PR HIV-1 kompleks dengan SQV .	41

Bab IV Pengolahan Data, Analisis dan Diskusi

21. Gambar 4.1 Bagan analisis mutasi DY_1	43
22. Gambar 4.2 Konversi basa DNA menjadi asam amino dan <i>protein alignment</i> DY_1 relatif terhadap HXB2	44
23. Gambar 4.3 Mutasi PR HIV-1 kode DY_1 dalam struktur topologi HXB2	45
24. Gambar 4.4 Bagan penyiapan data input simulasi	46
25. Gambar 4.5 Fragmen PR HIV–1 Asp25/25'–Thr26/26'–Gly27/27'	47
26. Gambar 4.6 Molekul SQV	47
27. Gambar 4.7 a) Struktur virus HIV–1 subtipe B, b). Struktur DY_1	48
28. Gambar 4.8 Model reaksi enzimatik simulasi MDS	49
29. Gambar 4.9 Definisi variabel–variabel sistem	49
30. Gambar 4.10 Model protonasi PR HIV–1 dalam konfigurasi <i>unpro</i> (PR I), <i>monopro</i> (PR II, PR III, PR IV, dan PR V) dan <i>dipro</i> (PR VI, PR VII, PR VIII, dan PR IX)	50
31. Gambar 4.11 Bagan proses analisis model PR	51
32. Gambar 4.12 Konformasi struktur PR II sebelum dan sesudah diminimisasi	55
33. Gambar 4.13 Pergeseran sudut (a) Asp25 PR II relatif terhadap Asp25 eksperimen, (b) Asp25' PR II relatif terhadap Asp25' eksperimen	55

34.	Gambar 4.14 Ikatan hidrogen yang terbentuk pada model PR II	56
35.	Gambar 4.15 Grafik hasil simulasi PR II (energi total terhadap waktu) ...	58
36.	Gambar 4.16 Grafik energi kinetik sistem terhadap waktu	59
37.	Gambar 4.17 Grafik energi potensial sistem terhadap waktu	60
38.	Gambar 4.17 Struktur PR II setelah simulasi.....	60
39.	Gambar 4.18 Diagram simulasi AE + SQV dan DY ₁ + SQV	63
40.	Gambar 4.19 Struktur PR HIV-1 setelah minimisasi (a) HXB2 dan (b) DY ₁	66
41.	Gambar 4.20 <i>Fitting backbone</i> DY ₁ terhadap HXB2, warna hijau menunjukkan <i>backbone</i> HXB2 sedangkan warna kuning DY ₁	67
42.	Gambar 4.21 <i>Fitting</i> mutasi L10I dan I13V DY ₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai A.....	69
43.	Gambar 4.22 <i>Fitting</i> mutasi L10I DY ₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai B	70
44.	Gambar 4.23 <i>Fitting</i> mutasi G16E DY ₁ relatif terhadap HXB2 a) rantai A dan b) rantai B	71
45.	Gambar 4.24 <i>Fitting</i> mutasi K20R DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	72
46.	Gambar 4.25 <i>Fitting</i> mutasi E35D DY ₁ dan M36I relatif terhadap HXB2 rantai A	73
47.	Gambar 4.26 <i>Fitting</i> mutasi E35D DY ₁ dan M36I relatif terhadap HXB2 rantai B	74
48.	Gambar 4.27 <i>Fitting</i> mutasi R41K DY ₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai A	75
49.	Gambar 4.28 <i>Fitting</i> mutasi R41K DY ₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai B	76
50.	Gambar 4.29 <i>Fitting</i> residu nomor 41'±4' DY ₁ relatif terhadap HXB2	76

51. Gambar 4.30 <i>Fitting</i> mutasi I62V DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	77
52. Gambar 4.31 <i>Fitting</i> mutasi H69K DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	78
53. Gambar 4.32 <i>Fitting</i> mutasi V77I DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	79
54. Gambar 4.33 <i>Fitting</i> mutasi L89M DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	80
55. Gambar 4.34 <i>Fitting</i> mutasi V97I DY ₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B	81
56. Gambar 4.35 Konformasi interaksi SQV terhadap (a) HXB2 dan (b) DY ₁	84
57. Gambar 4.36 Konformasi pada sisi aktif DY ₁ relatif terhadap HXB2	85
58. Gambar 4.37 Konformasi pada ring flaps DY ₁ relatif terhadap HXB2	85
59. Gambar 4.38 Konformasi struktur SQV kompleks dengan HXB2 dan DY ₁	86
60. Gambar 4.39 Perubahan pola interaksi SQV terhadap Asp29 DY ₁ relatif terhadap HXB2	87
61. Gambar 4.40 Perubahan pola interaksi sub site P1 SQV terhadap asam amino Arg8'	87
62. Gambar 4.41 Perbandingan konformasi PR HIV – 1 kompleks dengan SQV pada a) HXB2 dan b) DY ₁	88
63. Gambar 4.42 Grafik energi potensial dan energi kinetik terhadap waktu selama 1.060 ps simulasi kompleks DY ₁ dan SQV	89
64. Gambar 4.43 Grafik energi potensial dan energi kinetik terhadap waktu selama 810 ps simulasi kompleks HXB2 dan SQV	90
65. Gambar 4.44 Konformasi struktur DY ₁ relatif terhadap HXB2	91

66. Gambar 4.45 Konformasi <i>ring flaps</i> PR DY ₁ relatif terhadap HXB2	91
67. Gambar 4.46 Konformasi interaksi SQV pada DY ₁ dan HXB2 (dilihat dari atas relatif terhadap Gambar 4.44)	92
68. Gambar 4.47 Konformasi struktur SQV, warna hijau menunjukkan SQV kompleks dengan HXB2. Gambar disajikan dalam sudut pandang berbeda untuk kemudahan analisis	93
69. Gambar 4.48 Pergeseran kedudukan gugus OH relatif terhadap OD ₁ residu Asp25. Untuk simplifikasi, atom hidrogen tidak ditunjukkan dalam gambar	94
70. Gambar 4.49 Pembentukan ikatan hidrogen antara residu Asp25–Ala28 pada aHXB2 dan Asp25–Ile85 pada DY ₁	95
71. Gambar 4.50 Konformasi struktur HXB2 dan DY ₁ secara global	96
72. Gambar 4.51 Konformasi residu Asp25 DY ₁ relatif terhadap Asp25 HXB2	97

Daftar Tabel

1. Tabel 2.1 Mutasi yang terjadi pada virus HIV–1 sub tipe B	22
2. Tabel 4.1 Hasil pengolahan data model <i>unpro</i> dan <i>monoprotonasi</i> PR HIV–1	52
3. Tabel 4.2 Hasil pengolahan data model <i>diprotonasi</i> PR HIV–1	54
4. Tabel 4.3 Data energi model protonasi PR HIV–1	57
5. Tabel 4.4 Mutasi asam amino beserta karakteristiknya	68
6. Tabel 4.5 Data perubahan energi ikat mutasi pada HXB2 dan DY ₁	83

BAB I

PENDAHULUAN

Human Immunodeficiency Virus (HIV) merupakan penyebab *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) [1]. HIV menginfeksi dan melumpuhkan sel-sel limfosit yang merupakan komponen utama sistem imun tubuh manusia. Menurut data terakhir UNAIDS/WHO jumlah penderita HIV/AIDS saat ini tidak kurang dari 39,5 juta jiwa yang menyebar di berbagai belahan dunia termasuk Indonesia [2]. Pada tahun 2006 jumlah penderita yang meninggal akibat HIV/AIDS mencapai 2,6 juta jiwa [2]. Dengan jumlah penderita yang begitu banyak, tingkat kematian yang cukup tinggi dan menyerang hampir seluruh ras manusia, HIV/AIDS merupakan penyakit terburuk sepanjang sejarah dan ditetapkan sebagai epidemik global yang sampai saat ini belum ditemukan solusi untuk mengatasinya [3]. HIV/AIDS merupakan salah satu dari delapan agenda besar *Millennium Development Goals* (MDG) yang dicanangkan sejak tahun 2000 oleh *United Nations* (UN) [4]. Di Indonesia, hingga akhir Maret 2008, jumlah penderita HIV/AIDS mencapai 210.998 orang dengan jumlah kematian mencapai 2.486 jiwa [5, 6].

Sejak ditemukannya struktur virus HIV tipe 1 (HIV-1) pada tahun 1983 [1, 7, 8] dan virus HIV tipe 2 (HIV-2) pada tahun 1986 [1, 9], penelitian dalam rangka membuat obat yang mampu melumpuhkan HIV gencar dilakukan [1]. Berbagai cara diupayakan untuk membuat obat dan vaksin anti-HIV tetapi sampai saat ini masih belum menuai hasil optimal [1, 10]. Salah satu penyebab utamanya

adalah virus menjadi resisten terhadap obat *Antiretroviral* (ARV). Resistensi disebabkan oleh mutasi genetik yang terjadi secara alamiah pada virus. Di samping itu, daya tahan dan tingkat kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap kondisi lingkungannya menjadikan virus HIV sulit untuk dilumpuhkan. Faktor internal ini dalam beberapa kasus justru memperkuat tingkat resistensi virus terhadap obat ARV [1]. Saat ini, mutasi genetik penyebab resistensi ARV merupakan masalah utama yang belum sepenuhnya terpecahkan. Dalam rangka mencari alternatif pemecahan masalah tersebut, pemahaman terhadap mekanisme resistensi virus menjadi salah satu faktor penting agar perancangan obat ARV yang mampu bekerja secara lebih efektif dan efisien dapat dilakukan secara lebih akurat [10, 11].

Secara umum terdapat dua jenis metode yang digunakan untuk mendeteksi mutasi dan resistensi virus yaitu metode *genotyping* dan *phenotyping*. Metode *genotyping* dilakukan dengan cara memindai DNA virus yang telah diisolasi dari pasien [12]. Untuk mengetahui mutasi yang muncul, data hasil analisis dibandingkan dengan urutan basa DNA strain-strain virus yang ada. Dengan mengacu pada data referensi yang tersedia maka pengaruh mutasi terhadap resistensi virus dapat diketahui. Sampai saat ini belum banyak penelitian yang secara khusus mengkarakterisasi galur-galur HIV-1 yang bersirkulasi di Indonesia. Satu-satunya publikasi yang meneliti karakter demografi dan genetik HIV-1 di Indonesia dengan jumlah sampel yang cukup besar (255 kasus) melaporkan terjadinya pergeseran dominasi sub tipe dari sub tipe B pada tahun 1993/1994 ke sub tipe E pada tahun 1996 [13]. Dilaporkan pula bahwa dominasi sub tipe tertentu bervariasi dari satu daerah ke daerah lainnya di Indonesia. Selain

itu terdapat indikasi bahwa galur–galur virus baru terus ditemukan. Tentu saja hal ini menimbulkan masalah tersendiri karena ditemukannya strain virus baru berarti data referensi yang digunakan sebagai rujukan tidak tersedia.

Metode *phenotyping* dilakukan dengan cara mengamati perkembangbiakan virus HIV dalam medium kultur yang mengandung obat ARV. Resistensi virus dapat diketahui berdasarkan tingkat replikasi virus pada berbagai konsentrasi ARV [12]. Salah satu kelemahan mendasar dari metode ini adalah dibutuhkan tingkat keahlian yang tinggi untuk melakukan pengujian dan secara teknis sangat rumit untuk dilakukan. Secara garis besar, dalam melakukan pengujian tersebut perlu dilaksanakan beberapa tahapan yang meliputi konversi RNA menjadi DNA (cDNA), transfeksi cDNA ke dalam sel mamalia untuk ekspresi virus rekombinan, dan selanjutnya uji replikasi virus rekombinan dalam medium kultur dengan berbagai konsentrasi obat ARV tertentu.

Secara umum, metode *genotyping* memberikan data hasil deteksi lebih cepat dibanding metode *phenotyping*. Namun demikian, data hasil *phenotyping* lebih mudah diinterpretasikan karena mempunyai nilai tunggal dan langsung merujuk pada tingkat suseptibilitas virus terhadap obat ARV sedangkan data hasil *genotyping* harus terlebih dahulu dikonfirmasi dampaknya terhadap resistensi virus melalui uji kultur virus karena data yang dihasilkan hanya berupa pola–pola mutasi yang tidak secara langsung berbicara mengenai resistensi virus terhadap obat ARV tertentu [12].

Di samping membutuhkan keahlian eksperimen tingkat tinggi, baik metode *genotyping* maupun *phenotyping* sangat beresiko karena sekali terjadi kesalahan, walaupun kecil, maka bisa jadi eksperimen diulang dari awal. Hal ini

tentu saja membutuhkan dana, waktu dan tenaga yang tidak sedikit sehingga dalam konteks tertentu kedua metode tersebut menjadi kurang efisien dan riskan. Untuk mengatasi berbagai permasalahan teknis pada metode *phenotyping* maka saat ini telah dilakukan usaha-usaha untuk mengembangkan metode alternatif yang dapat digunakan untuk melakukan prediksi efek mutasi terhadap resistensi yang belum terkarakterisasi yaitu simulasi protein berbasis teori fisika kuantum. Secara teknis, pengembangan metode simulasi ini dapat diharapkan untuk sewaktu-waktu menghasilkan sistem analisis yang dapat memprediksi resistensi virus terhadap obat ARV tanpa menimbulkan risiko yang bersifat eksperimentatif sehingga analisis dapat dilakukan secara lebih efektif, efisien dan aman.

Dalam konteks penelitian ini, simulasi protein, atau molekul secara umum, dapat didefinisikan sebagai pemodelan terhadap sistem biologis berdasarkan variabel-variabel fisika dan kimia yang dimiliki oleh sistem tersebut. Dalam sudut pandang fisika, pada dasarnya molekul, baik organik maupun anorganik, merupakan sebuah sistem yang terdiri dari banyak atom. Dengan demikian, sifat-sifat biologis dari molekul tersebut dapat dikarakterisasi berdasarkan geometri atom-atom yang menyusunnya, energi relatif yang dikandung, sifat intrinsik molekul (momen dipol, polarisabilitas, dan lain-lain), laju transformasi molekul dari keadaan satu ke keadaan yang lain, dan kebergantungan molekul secara struktural dan fungsional terhadap waktu.

Secara umum, setiap makhluk hidup melakukan metabolisme untuk mendukung kehidupannya. Demikian juga dengan virus HIV. Dalam skala atomik, metabolisme dapat dipahami sebagai pergerakan partikel-partikel atomik antar membran dan organ atau transformasi molekul dari satu bentuk ke bentuk

yang lain. Secara energetik, metabolisme dapat diterjemahkan sebagai suatu mekanisme transfer dan perubahan energi. Oleh karena itu metode simulasi berbasis fisika kuantum ini dapat digunakan untuk memprediksi proses-proses biologis berskala molekuler pada organisme hidup. Namun demikian, secara prinsip metode fisika kuantum dapat memberi deskripsi eksak **hanya** untuk sistem yang terdiri dari satu atau dua partikel [3, 14]. Untuk sistem yang terdiri dari banyak partikel metode ini disesuaikan dengan berbagai pendekatan agar dapat memberikan deskripsi yang representatif. Karena bersifat pendekatan, hasil pemodelan ini mempunyai tingkat validitas yang terbatas pada metode pendekatan dan parameter-parameter yang digunakan untuk mendefinisikan sistem dalam proses simulasi yang dilakukan.

Penelitian yang dilakukan Piana [15] telah berhasil mengamati mekanisme reaksi katalisis protease HIV-1 dan menganalisis konformasi yang terjadi pada sisi aktif enzim dengan menggunakan metode *ab initio* simulasi kedinamisan molekuler. Dengan mengaplikasikan metode yang sama, Wittayanarakul, dkk. [10] menganalisis mutasi G48V pada protease HIV-1 dan efeknya terhadap tingkat resistensi virus terhadap *saquinavir* (SQV). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari simulasi disimpulkan bahwa mutasi G48V memberikan pengaruh signifikan terhadap penurunan sensitivitas virus terhadap SQV. Hasil ini bersesuaian dengan data eksperimen. Studi yang pernah dilakukan oleh Meiselbach, dkk. [11], juga telah berhasil mengklarifikasi peran mutasi E35D pada protease HIV-1 dalam penurunan sensitivitas HIV-1 terhadap *amprenavir*. Dari sekian banyak penelitian yang telah dilakukan, metode simulasi yang berbasis pada teori fisika kuantum terbukti dapat diaplikasikan untuk

menganalisis sistem-sistem organik berskala atomik dengan hasil yang bersesuaian dengan hasil eksperimen.

Virus HIV-1 mempunyai suatu enzim yang berperan dalam proses maturasi yaitu *enzim protease*. Enzim ini bertugas untuk memecah poliprotein menjadi bagian-bagian yang membentuk struktur fungsional virus [16]. Jika kerja enzim ini dihambat maka virus akan kehilangan kemampuan untuk menginfeksi sel-sel limfosit yang masih sehat. Dengan demikian, enzim protease merupakan target penting dalam upaya untuk melumpuhkan virus HIV-1. Akan tetapi, permasalahan utama yang muncul adalah enzim protease virus HIV-1 secara alamiah mengalami mutasi genetik yang menyebabkan perubahan pada bagian-bagian asam amino tertentu yang mengakibatkan virus mengalami penurunan sensitivitas terhadap obat ARV tertentu sehingga kinerja obat menjadi tidak efektif.

Uji sampel secara random terhadap dua data *genotyping* virus HIV-1 di departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, ditemukan bahwa keduanya termasuk dalam strain sub tipe AE. Mengacu pada studi yang telah dilakukan di Indonesia [13], kemungkinan terjadinya evolusi virus HIV-1 di Indonesia sangat potensial mengingat kondisi demografi dan genetik berkorelasi secara langsung terhadap proses re-adaptasi virus HIV-1. Dalam batasan-batasan tertentu, secara statistik dapat dihipotesiskan bahwa terdapat kemungkinan dominasi HIV-1 strain E telah bergeser menjadi AE [17].

Studi dan penelitian terhadap kasus-kasus HIV/AIDS yang masih sangat minim di Indonesia turut memberikan andil terhadap sulitnya mencari pemecahan terhadap masalah terkait dengan interpretasi mutasi yang telah berhasil dideteksi

dari pasien pengidap HIV/AIDS. Untuk melakukan karakterisasi terhadap data-data mentah yang ada berarti harus melakukan uji *phenotyping* yang merupakan bukan pekerjaan gampang di samping membutuhkan dana yang besar.

Sebagai langkah awal untuk memperoleh pemahaman yang rasional terhadap karakter virus HIV-1 di Indonesia maka pada penelitian ini digunakan metode alternatif untuk menganalisis data *genotyping* virus HIV-1. Fokus utama penelitian ini adalah analisis komprehensif efek mutasi terhadap resistensi virus yang muncul pada protease HIV-1 yang berhasil dideteksi dari pasien pengidap HIV/AIDS di RS Cipto Mangunkusumo (kode DY₁) melalui pemindaian DNA virus menggunakan metode *genotyping* [17]. Tujuan dari penelitian ini antara lain:

1. Mempelajari pengaruh mutasi pada virus HIV-1 (kode DY₁) terhadap kompleks PR HIV-1 dan SQV.
2. Menentukan keadaan protonasi PR HIV-1 berdasarkan model proteolisis *Direct Proteolytic Attack* (DPA).
3. Mempelajari interaksi DY₁-SQV pada sisi aktif enzim secara energetik dan struktural.
4. Prediksi efek mutasi terhadap resistensi SQV pada DY₁.

Analisis dilakukan pada level atomik dan molekuler dengan mengadopsi beberapa metode simulasi antara lain metode *density functional theory* (DFT) dan semi-empirik yang digunakan untuk menganalisis sistem secara energetik pada level atomik dan metode *molecular dynamics simulations* (MDS) yang digunakan untuk menganalisis dinamika interaksi molekuler protease HIV-1 dengan obat ARV pada level molekuler. Diharapkan pemahaman terhadap mekanisme munculnya resistensi pada virus HIV-1 dapat membantu dalam upaya untuk

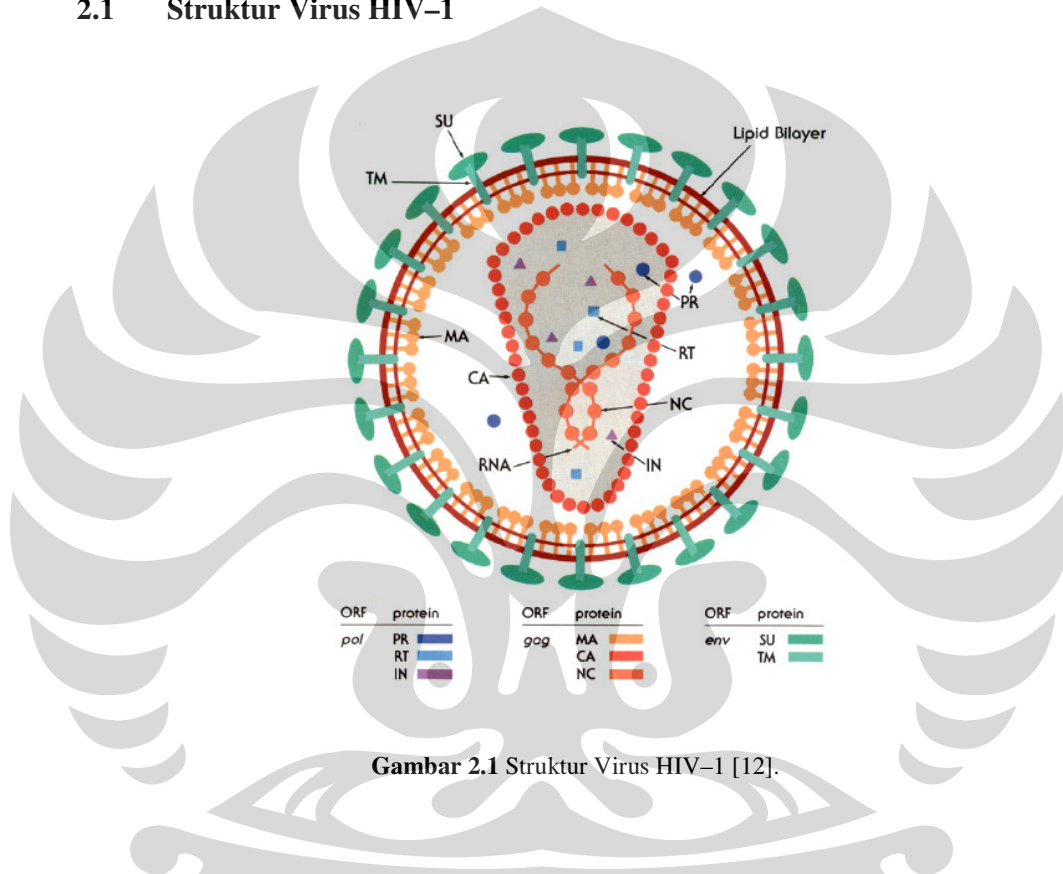
menanggulangi menyebarnya wabah HIV/AIDS. Di samping itu, pada tingkat klinis, penanganan yang tepat dan efektif dalam kaitannya dengan terapi AIDS terhadap pasien dapat dilakukan dengan baik.

Mengingat studi HIV/AIDS dari sudut pandang ilmu fisika masih sangat awal, khususnya di Indonesia, dan data referensi terkait dengan strain virus AE yang masih sangat minim maka dalam studi kali ini diasumsikan mutasi yang muncul pada DY_1 dianalisis dalam konteks strain virus B (HXB2). Diawali dengan Bab I Pendahuluan, berisi latar belakang masalah yang dibahas terkait dengan HIV/AIDS dan metode baru yang diusulkan sebagai cara alternatif untuk melakukan prediksi efek mutasi terhadap resistensi virus serta mempelajari mekanisme resistensi virus terhadap obat ARV tertentu. Penelitian ini melibatkan beberapa bidang disiplin ilmu yang berbeda sehingga pada Bab II secara khusus membahas tentang virus HIV-1 yang meliputi penjelasan struktur virus, proses replikasi, serta struktur dan fungsi protease virus HIV-1 sebagai modal pengetahuan dasar untuk memahami permasalahan yang sedang dikaji. Selama ini fisika dikenal sebagai bidang ilmu yang identik dengan benda-benda anorganik dan terkesan tidak dapat diterapkan terhadap sistem-sistem hidup. Oleh karena itu pada Bab III diketengahkan pembahasan mengenai asumsi-asumsi dasar dan pendekatan teoritik baik terhadap permasalahan yang sedang dikaji maupun model teori yang digunakan untuk mencapai tujuan utama dari penelitian ini. Hasil pengolahan data dan analisis secara komprehensif dibahas pada Bab IV yang disambung dengan penulisan kesimpulan akhir pada Bab V yang sekaligus merupakan bab penutup.

BAB II

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS Type 1 (HIV-1)

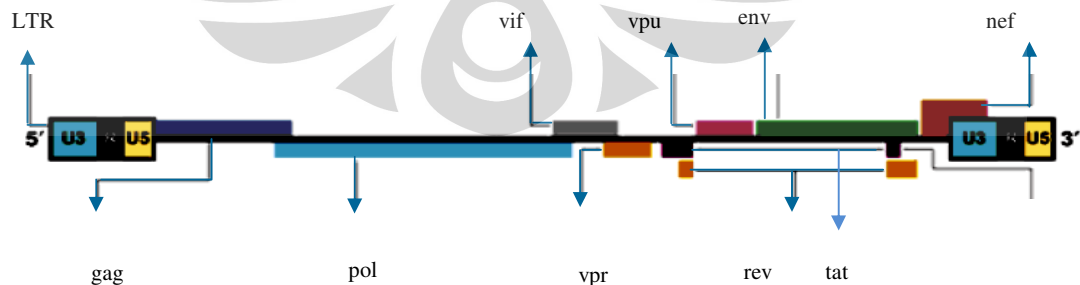
2.1 Struktur Virus HIV-1



Gambar 2.1 Struktur Virus HIV-1 [12].

Virus HIV-1 termasuk dalam keluarga *lentivirus* dan digolongkan dalam kelas *retrovirus*, yaitu jenis virus yang menyimpan kode-kode genetiknya dalam bentuk RNA [16]. Pada proses replikasi, virus HIV-1 melalui tahap transkripsi balik RNA menjadi DNA dengan bantuan enzim *reverse transcriptase*. Diameter virus yang sudah dewasa sekitar 10 nm. Bagian terluar virus dikelilingi oleh membran sel yang disebut *lipid bilayer* [3, 18]. Di bagian ini terdapat *surface unit* (SU), disebut *glikoprotein 120* (gp^{120}), yang terletak di bagian luar membran dan

glikoprotein 41 (gp^{41}) yang menembus struktur membran, disebut *trans membran* (TM). Di bagian lapisan dalam membran terdapat matriks protein 17 (p^{17}), disebut juga MA, yang berfungsi sebagai fasilitator *transport* material genetik virus ke dalam inti sel limfosit. Dua RNA untai tunggal yang merupakan kode genetik HIV-1 terletak di dalam *capsid* (CA) berbentuk kerucut yang disusun oleh protein 24 (p^{24}). Di samping material-material genetik, di dalam inti sel virus juga terdapat nukleokapsid (p^7 , NC) yang berperan aktif dalam proses transkripsi balik RNA menjadi DNA dan *negative effectors* (Nef, p^{24}) yang berfungsi untuk mencegah apoptosis sel target, meningkatkan daya infeksi virus dan berperan penting dalam proses interaksi dengan sel reseptor CD4 yang terdapat pada permukaan sel limfosit. Bagian penting lainnya adalah *viral infectivity factor* (Vif, p^{23}), *viral protein R* (Vpr, p^{15}), dan beberapa enzim yang berperan penting dalam daur hidup dan proses maturasi virus antara lain *protease* (PR), *reverse transcriptase* (RT), dan *integrase* (IN). Protein-protein pelengkap seperti *viral protein U* (Vpu), *transcription activator* (Tat), dan *regulator of viral* (Rev) disintesis dalam sel limfosit [3, 18, 19]. **Gambar 2.2** menunjukkan struktur genomik provirus HIV-1.



Gambar 2.2 Bagan struktur genomik provirus HIV-1 [19].

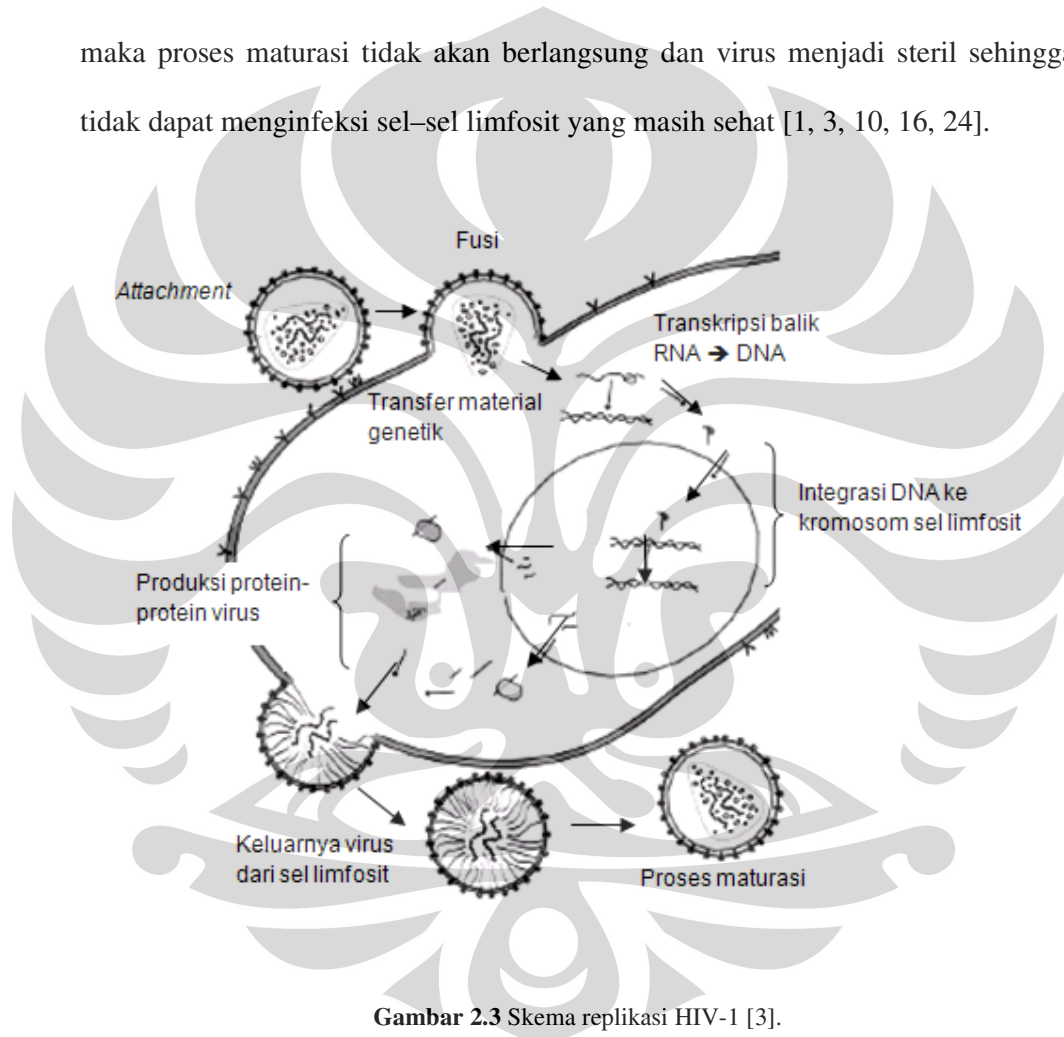
Pada diagram terdapat LTR (*long terminal repeated*) yaitu deretan basa DNA yang terdiri dari U3-R-U5 [17]. LTR berperan dalam proses transkripsi. Protease dan beberapa enzim lainnya dibentuk berdasarkan kode yang dibawa oleh *pol* (polymerase).

2.2 Daur Hidup HIV-1

HIV/AIDS menular melalui beberapa cara antara lain transfusi darah, hubungan seksual, dan menggunakan jarum suntik bersama [16]. Virus HIV-1 yang telah masuk ke tubuh kita menyerang dan menginfeksi sel-sel limfosit. Proses infeksi dimulai dengan terjadinya interaksi antara glikoprotein yang terdapat pada reseptor dan koreseptor membran virus dengan membran sel limfosit (disebut *attachment*) [3], seperti terlihat pada **Gambar 2.3**.

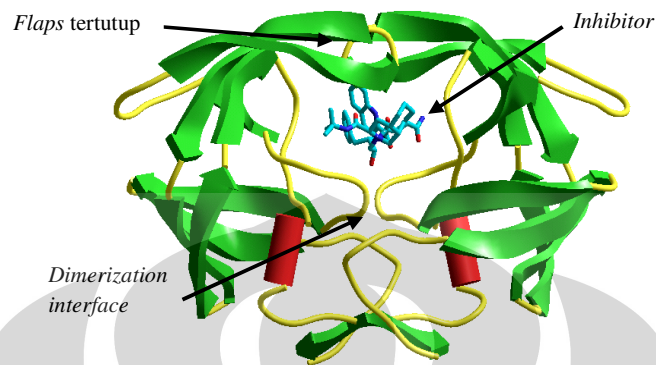
Interaksi ini menyebabkan konformasi struktur protein virus yang memicu masuknya material genetik virus ke dalam sel limfosit. Virus kemudian mengubah RNA menjadi DNA melalui mekanisme *transkripsi balik* dengan bantuan enzim *reverse transcriptase* [1, 20, 21]. Hasilnya adalah struktur kompleks DNA yang selanjutnya disisipkan ke kromosom sel limfosit dengan bantuan enzim *integrase*. Pada kondisi ini virus dapat bertahan dalam jangka waktu yang sangat lama sebelum mengalami proses replikasi [1]. Replikasi didahului oleh perubahan kembali DNA menjadi RNA oleh sel limfosit. Ketika proses replikasi berlangsung, sel limfosit membentuk protein-protein sesuai dengan kode genetik virus. Protein-protein ini kemudian disusun membentuk satu kesatuan organik yang disebut *virion*. Dengan memanfaatkan membran sel limfosit, virion

membentuk membrannya sendiri dan setelah itu keluar dari sel limfosit [20]. Pada tahap ini sel limfosit mati. Agar bersifat infeksi, virion harus membentuk struktur fungsional melalui mekanisme pemecahan poliprotein dengan bantuan enzim *protease* [10, 22–24]. Proses pembentukan struktur fungsional ini disebut *maturasi*. Jika kerja enzim *protease* untuk memecah poliprotein dapat dihambat maka proses maturasi tidak akan berlangsung dan virus menjadi steril sehingga tidak dapat menginfeksi sel–sel limfosit yang masih sehat [1, 3, 10, 16, 24].



Gambar 2.3 Skema replikasi HIV-1 [3].

2.3 HIV – 1 Protease



Gambar 2.4 Protease HIV-1 kompleks dengan inhibitor SQV [1HXB].

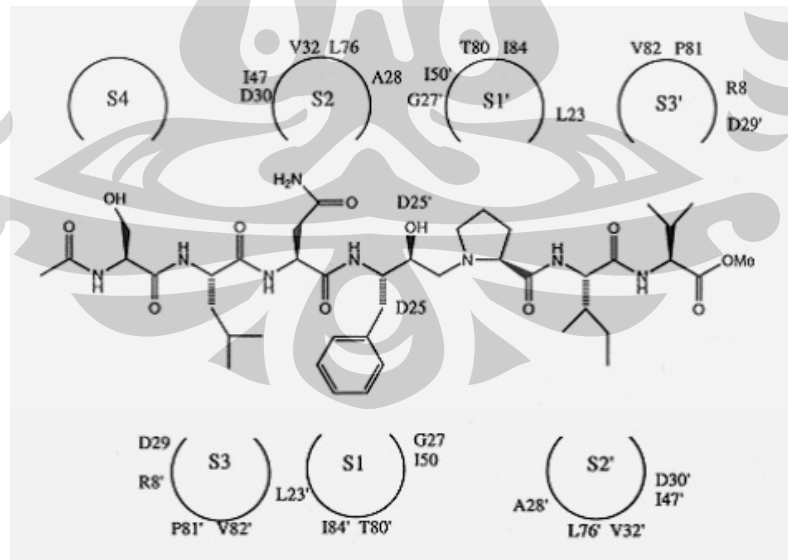
Protease merupakan salah satu bagian penting pada virus yang mempunyai fungsi utama sebagai pemecah poliprotein selama proses maturasi. Protease terdiri dari dua sub unit identik yang membentuk *dimer* [24], masing-masing monomer terdiri dari 99 residu [1].

Pada sisi aktif protease terdapat dua residu asam *aspartat*, Asp25 dan Asp25', masing-masing berasal dari sub unit monomer yang mempunyai peran utama dalam proses reaksi katalisis. Daerah ini dinamakan *dimerization interface*. Protease hanya aktif jika membentuk dimer [1]. Sisi aktif protease dikelilingi oleh dua buah *loop* yang disebut *ring flaps*. Pada kondisi di mana protease *bebas*, *flaps* akan terbuka. Ketika proses reaksi katalisis berlangsung, *flaps* tertutup dan akan terbuka kembali jika produk telah dihasilkan. Dengan demikian struktur protease sangat fleksibel dan perubahan yang bersifat struktural dapat muncul di tempat-tempat yang jauh dari sisi aktif selama proses katalisis [1]. Substrat natural

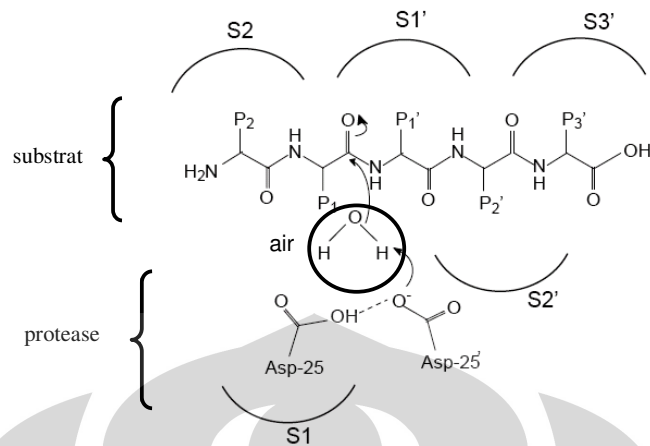
protease HIV-1 adalah poliprotein *gag* dan *gag-pol* [1, 19]. Poliprotein dipecah menjadi beberapa bagian yang akan membentuk struktur fungsional virus.

2.4 Mekanisme Proteolisis

Protease mengenali substratnya pada residu *phenylalanine-proline* dan *tyrosine-proline* [15, 16]. Pada substrat *gag-pol poliprotein*, P₁-P₃ menunjukkan residu pada terminal amino sedangkan P₁'-P₃' menunjukkan residu pada terminal karboksilat yang berinteraksi dengan subsite S₁-S₃ dan S₁'-S₄' pada protease [25], tata nama yang digunakan merujuk pada metode Schechter dan Berger. Huruf P digunakan untuk menandai substrat sedangkan huruf S digunakan untuk menandai sub site pada protease yang berinteraksi dengan substrat seperti terlihat pada **Gambar 2.5** dan **2.6**.

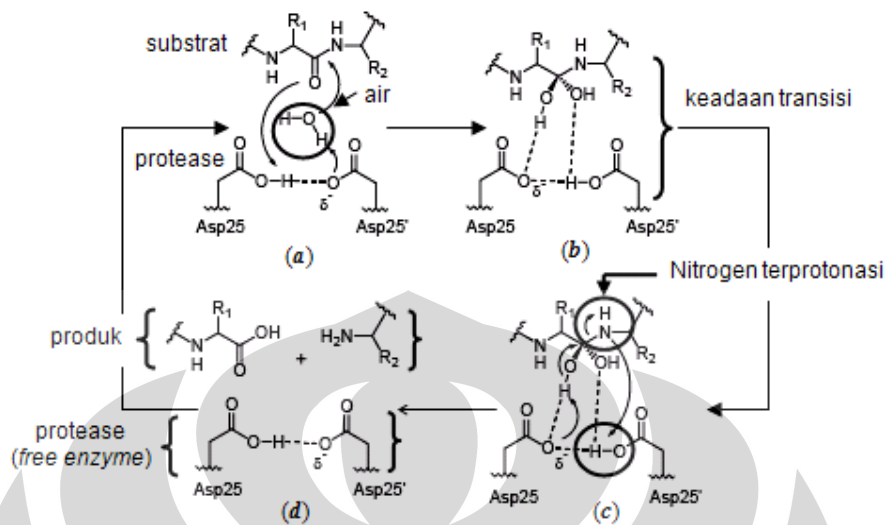


Gambar 2.5 Penamaan sub site pada enzim PR HIV-1 [12]



Gambar 2.6 Penamaan sub site pada substrat [25].

Substrat dipotong tepat pada sub site P₁-P₁'. Mekanisme reaksi pemecahan poliprotein oleh protease HIV-1 belum diketahui secara pasti. Beberapa model telah diusulkan untuk menjelaskan mekanisme reaksi tersebut. Berikut ini adalah model mekanisme reaksi proteolisis yang paling banyak diterima [1, 3, 15, 23, 25] yaitu *indirect nucleophilic attack* dan *direct nucleophilic attack*. Seperti terlihat pada **Gambar 2.7**, mekanisme *indirect nucleophilic attack* didahului dengan proses (a), molekul air terpolarisasi karena berinteraksi dengan gugus karboksilat yang terdapat pada salah satu monomer sisi aktif enzim. Molekul air terurai menjadi OH⁻ yang bereaksi dengan gugus karbonil pada substrat dan H⁺ yang bereaksi dengan gugus karboksilat pada residu Asp25/25', membentuk ikatan hidrogen antara protease dengan substrat, seperti terlihat pada gambar (b).

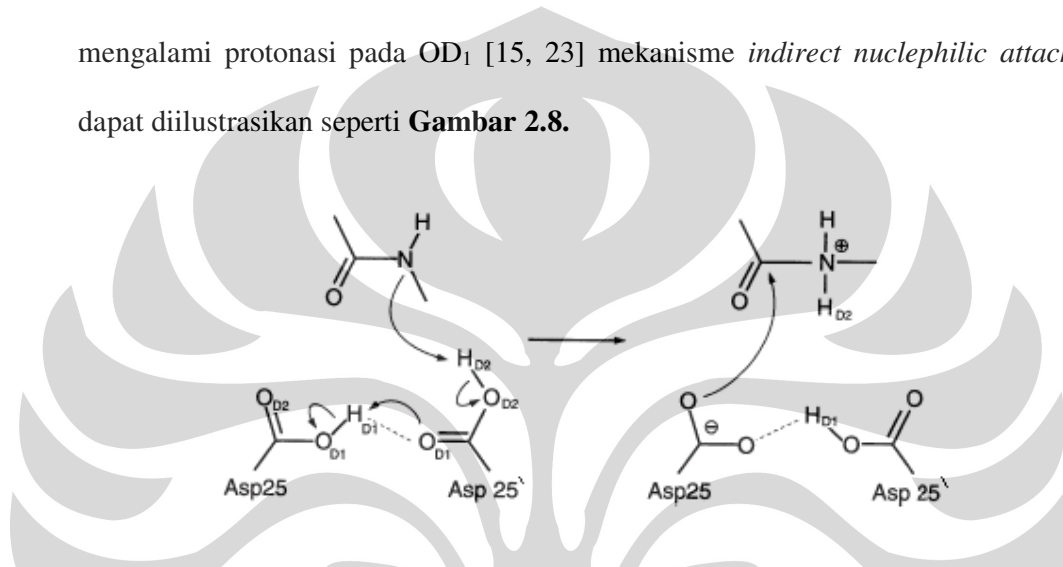


Gambar 2.7 Mekanisme proteolisis PR HIV-1 model *indirect nucleophilic attack* [3].

Pada proses (b) terjadi transfer proton dari Asp25/25' ke substrat dan dari molekul air ke Asp25/25' menghasilkan suatu keadaan transisi (*tetrahedral intermediate*) [15]. Pada tahap (c), atom nitrogen pada substrat terprotonasi sehingga ikatan dengan gugus karbonil terlepas. Pada keadaan ini atom nitrogen melepaskan satu proton yang kemudian ditangkap oleh residu Asp25/25'. Hasil pemecahan substrat adalah suatu produk dan setelah itu enzim kembali ke keadaan semula (*free enzyme*), gambar (d). Keadaan transisi merupakan keadaan yang secara struktural maupun energetik dapat digunakan sebagai media untuk mengetahui aktif atau tidak enzim tersebut ketika berinteraksi dengan suatu substrat tertentu.

Sebenarnya ada beberapa metode yang diajukan sebagai model mekanisme proteolisis oleh PR HIV-1. Secara garis besar mekanisme proteolisis digolongkan menjadi dua yaitu mekanisme *indirect nucleophilic attack* (IPA) dan *direct*

nucleophilic attack (DPA). Mekanisme *indirect nucleophilic attack* melibatkan molekul air pada proses pemutusan substrat seperti yang telah dijelaskan di atas. Lain halnya dengan mekanisme *direct nucleophilic attack*, mekanisme ini menghipotesiskan bahwa proses pemecahan poliprotein gag-pol oleh PR HIV-1 **tidak** melibatkan molekul air [25]. Dengan mengasumsikan residu Asp25 mengalami protonasi pada OD₁ [15, 23] mekanisme *indirect nucleophilic attack* dapat diilustrasikan seperti **Gambar 2.8**.



Gambar 2.8 Mekanisme proteolisis PR HIV-1 model *direct nucleophilic attack* [23]

Transfer proton (H_{D2}) ke atom nitrogen pada rantai peptida diikuti oleh transfer proton H_{D1} ke atom oksigen O_{D1} Asp25'. Rantai peptida berikatan dengan proton H_{D2} sedangkan gugus karboksilat Asp25 yang telah berubah muatan menjadi lebih negatif berinteraksi dengan atom oksigen pada gugus karboksilat rantai peptida dan membentuk keadaan transisi. Pada tahap ini, yang membedakan dengan mekanisme *indirect nucleophilic attack* adalah atom hidrogen H_{D1} tetap terikat pada atom oksigen O_{D1} residu Asp25' dan yang memfasilitasi pembentukan keadaan transisi adalah molekul H_2O yang sekaligus berperan sebagai pemutus ikatan antara gugus karbonil dan amida. Pada

mekanisme *direct nucleophilic attack* yang berperan sebagai *nucleophile* adalah Asp25. Walaupun demikian, tidak terjadi disosiasi pada atom-atom penyusun Asp25 khususnya gugus karbonil.

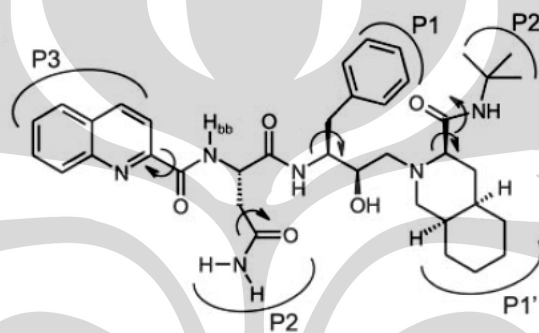
Hingga saat ini *belum* ada bukti ilmiah yang memberikan klarifikasi terhadap “*metode mana*” yang benar dan shahih. Mekanisme proteolisis merupakan salah satu bagian fundamental untuk memahami bagaimana PR HIV-1 bekerja membentuk struktur fungsional organ-organnya. Pada penelitian ini, mekanisme proteolisis yang digunakan mengadopsi mekanisme *direct nucleophilic attack* (DPA). Studi terhadap mekanisme DPA menggunakan metode simulasi menunjukkan bahwa mekanisme proteolisis DPA dapat berlangsung [23]. Metode DPA diadopsi karena sumber daya komputasi yang terbatas sehingga kompleks PR HIV-1 dengan SQV tidak memungkinkan untuk disimulasikan dalam larutan air.

2.5 Protease Inhibitor

Protease inhibitor biasanya dibuat berdasarkan/mengacu pada struktur peptida substrat alamiah protease (disebut *peptidomimetic inhibitors*) pada keadaan transisi [16, 26]. Walaupun demikian, inhibitor tersebut tidak terhidrolisis oleh protease. Saat ini terdapat beberapa protease inhibitor yang penggunaannya telah disahkan oleh FDA antara lain *saquinavir*, *nelfinavir*, *indinavir*, *atazanavir*, *lopinavir*, *amprenavir* dan *ritonavir*. Saquinavir (SQV) merupakan salah satu

inhibitor yang memberikan efek yang signifikan terhadap terapi AIDS (HAART, *Highly Active Antiviral Therapy*) [25].

SQV mempunyai nama kimia *N-tert-butyl-decahydro-2-[2(R)-hydroxy-4-phenyl-3(S)-[[N-(2-quinolilcarbonyl)-L-asparaginy]amino]butyl]-(4aS,8aS)-isoquinoline-3(S)-carboxamide*, dengan rumus $C_{38}H_{50}N_6O_5$ dan berat molekul 670,841 g/mol. SQV dikenal juga dengan nama Ro 31-8959 [25]. Struktur SQV dapat dilihat pada **Gambar 2.9**.



Gambar 2.9 Struktur molekul SQV [10].

$P_{1/1'}$ – $P_{3/2'}$ menunjukkan bagian yang berinteraksi dengan enzim protease pada subsite $S_{1/1'}$ – $S_{3/3'}$. SQV adalah salah satu jenis yang me-non-aktifkan kerja enzim protease pada HIV-1 yang dirancang berdasarkan keadaan transisi hidrolisis protein oleh protease HIV-1 pada residu asam amino prolin [26].

2.6 Resistensi HIV-1 Terhadap Obat ARV

HIV-1 mempunyai tingkat mutasi yang tinggi karena enzim yang bertugas untuk mentranskripsi balik RNA menjadi DNA, *reverse transcriptase*, secara

alamiah mengalami kesalahan pembacaan kode genetik pada RNA (tidak *proofreading*) [25] sehingga DNA yang dihasilkan mengandung kode-kode pembentuk protein yang berbeda. Kesalahan pembacaan kode genetik ini menghasilkan mutasi di beberapa bagian struktural virus. Mutasi yang muncul pada virus HIV-1 tergolong cukup istimewa karena walaupun terjadi perubahan pada bagian-bagian tertentu namun perubahan ini tidak berpengaruh pada fungsi utama bagian tersebut [25]. Virus-virus yang mengalami mutasi akan mengalami seleksi alam. PR HIV-1 yang resisten terhadap obat ARV tertentu dan masih memiliki fungsi untuk memecah poliprotein menghasilkan virus yang masih memiliki potensi untuk bertahan hidup dan melakukan replikasi.

Mutasi pada PR HIV-1 berkaitan dengan resistensi virus terhadap obat ARV. Mutasi yang berhubungan dengan resistensi terhadap inhibitor protease muncul pada enzim protease HIV-1. Mutasi ini menyebabkan penurunan kekuatan ikatan antara inhibitor dengan protease. Perubahan asam amino yang menyusun protease dapat muncul di berbagai tempat misalnya daerah sisi aktif atau *ring flaps*. Secara struktural, mutasi-mutasi tersebut dapat mengubah struktur protease secara global dan berpengaruh secara langsung terhadap dinamika energetik kompleks protease-inhibitor [25].

Reaksi enzimatik mempunyai karakter yang cukup unik karena reaksi ini tidak akan berlangsung jika tidak ada “kecocokan” antara substrat dan enzim. Secara energetik, kecocokan substrat dengan enzim dapat dilihat dari seberapa besar energi ikat antara substrat dan enzim tersebut. Dalam hal ini terdapat suatu rentang nilai energi ikat tertentu yang digunakan untuk mengidentifikasi kekuatan ikatan substrat terhadap enzim. Jika energi ikat berubah (menjadi lebih kecil)

berarti telah terjadi mutasi pada virus yang menyebabkan virus menjadi resisten, sebaliknya jika energi ikat besar maka disimpulkan virus masih sensitif atau mutasi yang muncul tidak menyebabkan virus menjadi resisten [1, 3, 25]. Daftar mutasi *protease* penyebab resistensi HIV-1 terhadap beberapa obat ARV dapat dilihat pada **Tabel 2.1**.

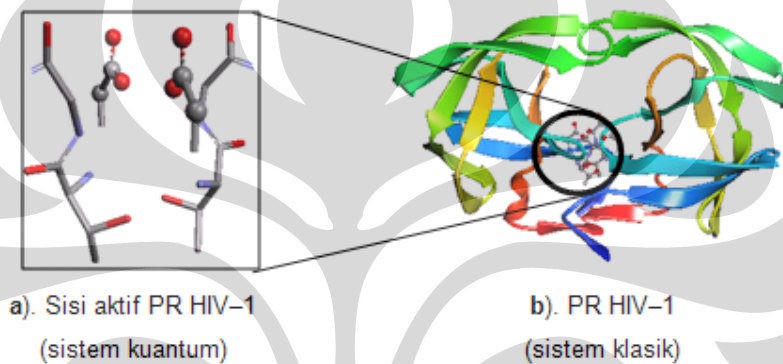
Tabel 2.1 Mutasi yang terjadi pada virus HIV-1 sub tipe B [25]

	Obat ARV	Mutasi Primer	Mutasi Sekunder
1	Saquinavir	G48V, L90M	I84V
2	Ritonavir	V82A/F/T(S), I84V	L90M
3	Indinavir	V82A/F/T, M46L/I	I84V, L90M
4	Nelfinavir	D30N, N88D/S, I84V, L90M	I84V, L90M
5	Amprenavir	I50V, M46L	I84V
6	Lopinavir-Ritonavir	K20M/R, F53L	V82A/F/T, I84V, L90M
7	Atazanavir	I50L, M46I	–

BAB III

TEORI

Secara keseluruhan PR HIV-1 terdiri dari 198 asam amino yang membentuk struktur *dimer*. Dari sudut pandang fisika, sistem PR HIV-1 dapat dibagi menjadi dua sub sistem yaitu *sistem kuantum* dan *sistem klasik*.



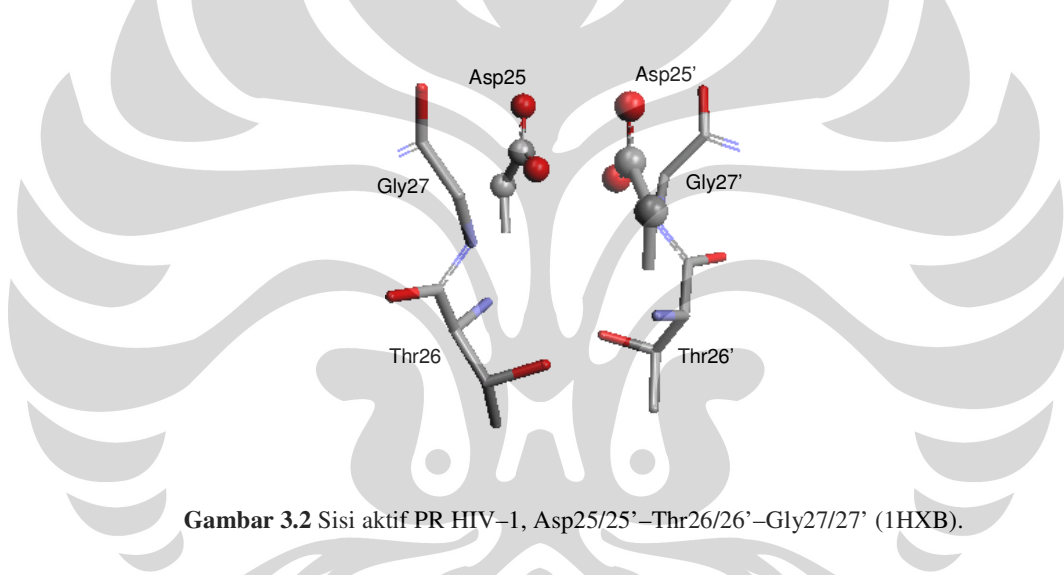
Gambar 3.1 a). Sisi aktif PR HIV-1 dan b). PR HIV-1 (1HXB.pdb)

PR HIV-1 merupakan target penting dalam terapi HIV/AIDS. Jika kerja enzim ini dapat dihambat maka virus akan menjadi steril. Menghambat kerja enzim berarti memblokir sisi aktif enzim dengan suatu molekul tertentu. Proses blokade ini melalui serangkaian reaksi tertentu yang secara fisika dapat dipahami sebagai proses interaksi pada level elektronik misalnya pertukaran elektron, *overlap* orbital elektron dan lain sebagainya. Sistem di mana elektron memegang peranan utama dalam suatu interaksi yang terjadi antar molekul diklasifikasikan sebagai *sistem kuantum*.

Sistem klasik mengacu pada keadaan di mana kontribusi elektron terhadap energi total sistem diabaikan. Sistem diasumsikan sebagai sekumpulan

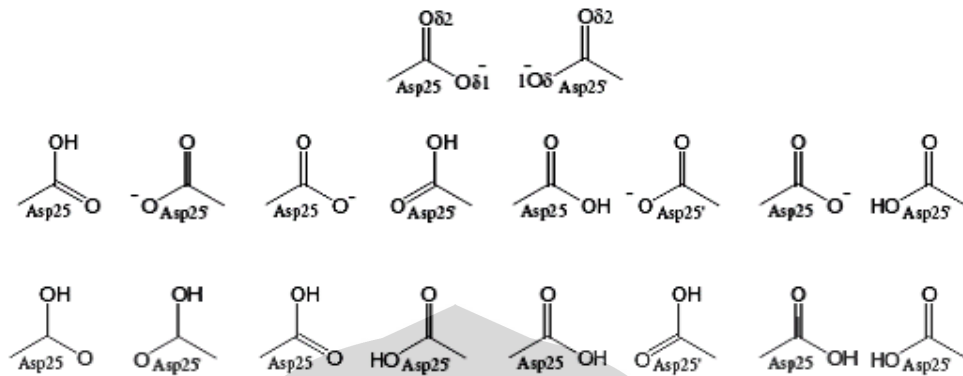
“bola-bola” yang terhubung satu sama lain dengan “pegas”. Dalam hal ini keadaan sistem didefinisikan sepenuhnya oleh variabel-variabel interaksi partikel yang bersifat klasik seperti *stretching*, *bending*, interaksi jarak jauh, dan lain-lain.

Setiap sub sistem memiliki level teori yang berbeda. Mekanika kuantum digunakan untuk menganalisis sub sistem kuantum sedangkan mekanika molekuler digunakan untuk menganalisis sub sistem klasik. Analisis sub sistem kuantum dilakukan terhadap sisi aktif PR HIV-1 yang terdiri dari residu *aspartat* (Asp), *glysin* (Gly), dan *threonin* (Thr) [10, 11, 15].



Gambar 3.2 Sisi aktif PR HIV-1, Asp25/25'–Thr26/26'–Gly27/27' (1HXB).

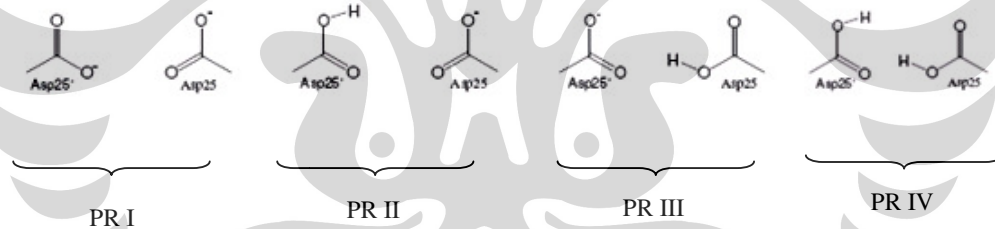
Tujuan dari analisis ini adalah menentukan keadaan terprotonasi PR HIV-1. Secara prinsip, pada pH optimal (5–6), PR HIV-1 dapat berada dalam tiga kondisi protonasi yang berbeda yaitu kedua residu Asp25/25' *tidak* terprotonasi (*unpro*, muatan total -2), salah satu residu terprotonasi (*monoprotonasi*, muatan total -1), dan kedua residu terprotonasi (*diprotonasi*, muatan total 0) [15]. Setiap residu Asp25/25' pada sisi aktif PR HIV-1 mempunyai dua atom oksigen yang saling beresonansi satu sama lain sehingga secara umum terdapat 9 kemungkinan keadaan protonasi, antara lain:



Gambar 3.3 Kemungkinan keadaan terprotonasi pada PR HIV-1 [15].

Namun, karena residu Asp25/25' bersifat simetri dan identik [15] maka hanya empat kemungkinan keadaan protonasi yang dianalisis, seperti terlihat pada

Gambar 3.4.

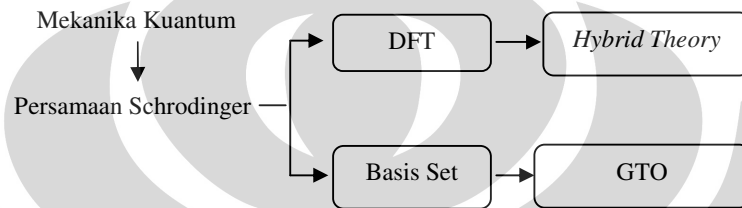


Gambar 3.4 Empat kemungkinan keadaan protonasi PR HIV-1 [15]

Pada **Gambar 3.4**, PR I adalah model yang merepresentasikan keadaan PR HIV-1 dalam keadaan *tidak* terprotonasi, PR II dan III dalam keadaan monoprotisasi, sedangkan PR IV menyatakan keadaan diprotisasi. Penentuan keadaan terprotonasi ini penting karena berpengaruh terhadap pola interaksi antara molekul SQV dan PR pada saat simulasi dilakukan. Dengan mengacu pada analisis

struktur ruang dan energi dari perhitungan yang dilakukan, dari ke empat model tersebut hanya satu model terbaik yang akan digunakan.

3.1 Metode Mekanika Kuantum



Gambar 3.5 Alur analisis sub sistem kuantum.

Metode *density functional theory* (DFT) dengan persamaan *exchange–correlation* B3LYP (*Hybrid Theory*, HT) dengan basis set *Gaussian Type Orbitals* (GTO) sub tipe *Contracted Gaussian Type Orbitals* (CGTO) digunakan untuk menghitung besar energi fragmen PR HIV–1.

3.1.1 Persamaan Schrödinger

Keadaan suatu sistem yang terdiri dari M atom dan N elektron yang berada dalam keadaan tetap (*stationery state*) dapat direpresentasikan dengan persamaan:

$$\mathbf{H}\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Dengan \mathbf{H} menyatakan operator Hamiltonian yang terdiri dari komponen energi kinetik dan potensial:

$$\mathbf{H} = \mathbf{V}_{\text{eks}} + \mathbf{T} + \mathbf{V}_{\text{ee}}$$

Potensial eksternal, \mathbf{V}_{eks} , dihasilkan dari interaksi elektron dengan inti atom:

$$\mathbf{V}_{\text{eks}} = - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}_i|}$$

\mathbf{T} merupakan operator energi kinetik elektron:

$$\mathbf{T} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2$$

\mathbf{V}_{ee} adalah operator interaksi inter-elektronik:

$$\mathbf{V}_{\text{ee}} = \sum_i^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|}$$

Ψ menyatakan persamaan gelombang elektron yang secara umum dapat dituliskan sebagai berikut:

$$\Psi = \Psi(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \mathbf{r}_3, \dots, \mathbf{r}_N)$$

Pada dasarnya Ψ juga merupakan fungsi dari koordinat spin elektron ($\mathbf{s}_1, \mathbf{s}_2, \dots, \mathbf{s}_N$).

Dalam melakukan simulasi, analisis biasanya dilakukan terhadap sistem yang berada dalam keadaan dasar (*ground state*). Pada keadaan dasar ini molekul memiliki konfigurasi *closhed shell system* yaitu keadaan spin elektron seluruhnya terisi penuh [14, 27]. Asumsi tersebut akan digunakan dalam penelitian ini. Dalam implementasinya, operator Hamiltonian yang digunakan bersifat independen terhadap variabel spin elektron.

3.1.2 Density Functional Theory (DFT)

DFT merupakan pendekatan teoritik terhadap struktur elektronik atom dan molekul berdasarkan asumsi bahwa energi pada keadaan dasar yang dimiliki oleh atom-atom atau molekul berkorelasi dengan densitas elektron, ρ [27–31].

Hamiltonian untuk sistem yang terdiri dari M atom dan N elektron dapat dituliskan sebagai:

$$\mathbf{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}_i|} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|} \quad (2)$$

Dengan Z , R , dan r masing-masing menunjukkan nomor atom, posisi inti atom, dan posisi elektron. Energi total sistem didefinisikan sebagai berikut:

$$E[\rho(\mathbf{r})] = \int V_{\text{ext}}(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r} + E_T[\rho(\mathbf{r})] \quad (3)$$

V_{ext} adalah energi interaksi elektron dengan inti atom sebagai fungsi densitas elektron pada keadaan dasar, $\rho(\mathbf{r})$ [14, 27, 29, 30]. E_T adalah energi kinetik total elektron yang terdiri dari energi kinetik elektron (E_{KE}), energi interaksi antar elektron (E_H), dan energi *exchange–correlation* (E_{XC}) [14, 27].

$$E_T = \sum_{i=1}^N \int \psi_i(\mathbf{r}) \left(-\frac{\nabla^2}{2} \right) \psi_i(\mathbf{r}) d(\mathbf{r}) + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r}-\mathbf{r}'|} d\mathbf{r}d\mathbf{r}' + E_{XC}[\rho(\mathbf{r})] - \sum_{A=1}^M \int \frac{Z_A \rho(\mathbf{r})}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}|} d\mathbf{r} \quad (4)$$

Pada prinsipnya persamaan (4) bersifat eksak, namun fungsi energi E_{XC} tidak diketahui. Untuk menentukan fungsi E_{XC} digunakan pendekatan *Local Spin Density Approximation* (LSDA) yang mengasumsikan densitas elektron pada

seluruh ruang adalah konstan sehingga untuk keseluruhan sistem, energi *exchange* (E_X) diberikan oleh persamaan *Thomas–Fermi–Dirac* (TFD) [14, 27]:

$$E_X^{\text{LSDA}} = -\frac{3}{2} \left(\frac{3}{4\pi} \right)^{1/3} \int \left(\rho_\alpha^{4/3}(\mathbf{r}) + \rho_\beta^{4/3}(\mathbf{r}) \right) d\mathbf{r} \quad (5)$$

Dengan α dan β menunjukkan keadaan spin elektron. Dalam implementasinya, metode LSDA memiliki tingkat akurasi sekitar 90%. Presentase *error* 10% muncul karena distribusi elektron pada kondisi riil tidaklah konstan, bertentangan dengan asumsi yang mendasari metode LSDA [14]. Pendekatan yang lebih realistis dikembangkan yaitu dengan mengasumsikan elektron–elektron sebagai sistem *non-uniform electron gas* sehingga E_{XC} tidak hanya bergantung pada densitas elektron tetapi juga gradien dari densitas elektron itu sendiri. Pendekatan ini sering disebut *General Gradient Approximation* (GGA). Axel D. Becke memberikan koreksi pada persamaan E_X berdasarkan pendekatan GGA sehingga persamaan E_X menjadi [28]:

$$E_X^{\text{B88}} = E_X^{\text{LSDA}} - \nabla \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \int \rho_\sigma^{4/3} \frac{x_\sigma^2}{(1 + 6\nabla x_\sigma \sinh^{-1} x_\sigma)} d\mathbf{r} \quad (6)$$

dengan, $x_\sigma = \frac{|\nabla \rho_\sigma|}{\rho_\sigma^{4/3}}$ dan $\nabla = 0.0042$ a.u. Persamaan (6) sering disebut persamaan

B atau B88. Komponen energi *correlation* pada keadaan *uniform electron gas*, E_C diberikan oleh persamaan E_C lokal Vosko–Wilk–Nusair (VWN) [14, 32]:

$$\varepsilon_c^{\text{VWN}} = \varepsilon_c(r_s, 0) + \varepsilon_a(r_s) \left[\frac{f(\zeta)}{f'(\zeta)} \right] [1 - \zeta^4] + [\varepsilon_c(r_s, 1) - \varepsilon_c(r_s, 0)] f(\zeta) \zeta^4 \quad (7)$$

dengan

$$f(\zeta) = \frac{(1 + \zeta)^{4/3} + (1 - \zeta)^{4/3} - 2}{2(2^{1/3} - 1)}$$

$$\varepsilon_{c/a}(x) = A \left\{ \ln \frac{x^2}{X(x)} + \frac{2b}{Q} \tan^{-1} \left(\frac{Q}{2x+b} \right) - \frac{bx_0}{X(x_0)} \left[\ln \frac{(x-x_0)^2}{X(x)} + \frac{2(b+2x_0)}{Q} \tan^{-1} \left(\frac{Q}{2x+b} \right) \right] \right\}$$

$$A = 0.0621814, x_0 = -0.409286, b = 13.0720, c = 42.7198, x = \sqrt{r_s},$$

$$X(x) = x^2 + bx + c, \text{ dan } Q = \sqrt{(4c - b^2)}$$

Pada sistem *non-uniform electron gas*, digunakan persamaan E_C Lee–Yang–Parr (LYP). Persamaan LYP menyertakan komponen *local* dan *non-local* sekaligus [27, 33]:

$$E_C^{\text{LYP}} = -a_0 \int \frac{1}{1 + d\rho^{-1/3}} \{r + a_x \rho^{-2/3} \hbar\} d\mathbf{r} \quad (8)$$

dengan

$$\hbar = \left[\frac{3}{10} (3\pi^2)^{3/2} \rho^{5/3} - 2t_W + \left(\frac{1}{9} t_W + \frac{1}{18} \nabla^2 \rho \right) e^{-cr^{-1/3}} \right]$$

$$t_W = \sum_{i=1}^N \frac{|\nabla \rho_i(\mathbf{r})|^2}{\rho_i(\mathbf{r})} - \frac{1}{8} \nabla^2 \rho$$

Dalam hal ini, t_W merupakan densitas energi kinetik lokal Weizsacker. Konstanta $a_0 = 0.049$, $a_x = 0.132$, $c = 0.349$, dan $d = 0.2533$ merupakan parameter yang diperoleh dari hasil eksperimen (*data fitting*).

Hybrid Theory (HT)

HT adalah metode pendekatan yang digunakan untuk merumuskan komponen energi *exchange–correlation* dengan memasukkan komponen E_X eksak (persamaan energi Hartree–Fock) pada persamaan E_{XC} [14]. Inti dari metode HT adalah menjelaskan dalam cara bagaimana komponen *exchange* dan *correlation*

memberikan pengaruh terhadap sistem elektronik molekuler. Metode yang digunakan untuk mengkorelasikan E_X dan E_C adalah metode *Adiabatic Connection Formula* (ACF) yang secara umum mempunyai bentuk persamaan:

$$E_{XC} = \int_0^1 \langle \Psi_\lambda | \mathbf{V}_{XC}(\lambda) | \Psi_\lambda \rangle d\lambda \quad (9)$$

λ disebut *parameter koping* yang mempunyai nilai $0 \leq \lambda \leq 1$. Pada saat $\lambda = 0$, artinya tidak ada interaksi inter-elektronik yang mengakibatkan tidak adanya E_C , yang muncul hanya E_X . Dengan bertambahnya nilai λ , interaksi inter-elektronik mulai muncul dan ketika $\lambda = 1$ sistem berada dalam pengaruh interaksi *exchange* dan *correlation*. Namun, metode ini tidak dapat diselesaikan secara analitik sehingga untuk memperoleh solusi eksaknya digunakan pendekatan interpolasi linier yang menghasilkan persamaan berikut:

$$E_{XC} \simeq \frac{1}{2} \langle \Psi_0 | \mathbf{V}_{XC}(0) | \Psi_0 \rangle + \frac{1}{2} \langle \Psi_1 | \mathbf{V}_{XC}(1) | \Psi_1 \rangle \quad (10)$$

Suku terakhir dari persamaan di atas belum diketahui. Dengan menggunakan pendekatan LSDA diperoleh persamaan berikut:

$$E_{XC}^{H+H} = \frac{1}{2} E_X^{\text{exact}} + \frac{1}{2} (E_X^{\text{LSDA}} + E_C^{\text{LSDA}}) \quad (11)$$

Persamaan di atas lebih dikenal dengan nama metode *Half - Half* (H+H). Terlihat bahwa komponen *exchange-correlation* merupakan penjumlahan dari E_X^{LSDA} dan E_C^{LSDA} [27]. Dengan mengaplikasikan pendekatan yang merupakan penyempurnaan metode LSDA, yaitu GGA, maka secara umum komponen *exchange-correlation* dapat dituliskan sebagai:

$$E_{XC} = E_{XC}^{\text{LSDA}} + a(E_X^{\text{HF}} - E_X^{\text{LSDA}}) + b\Delta E_X^{\text{GGA}} + c\Delta E_C^{\text{GGA}} \quad (12)$$

Dengan meramu persamaan energi E_X B88, persamaan E_C LYP dan VWN diperoleh persamaan E_{XC} sebagai berikut [14, 27]:

$$E_{XC}^{B3LYP} = aE_X^{LSDA} + a_0E_X^{exact/HF} + a_x\Delta E_X^{B88} + a_cE_C^{LYP} + c\Delta E_C^{VWN} \quad (13)$$

Dengan $a = 0,951$, $a_0 = 0,049$, $a_x = 0,132$, $a_c = 0,349$ dan $c = 0,651$.

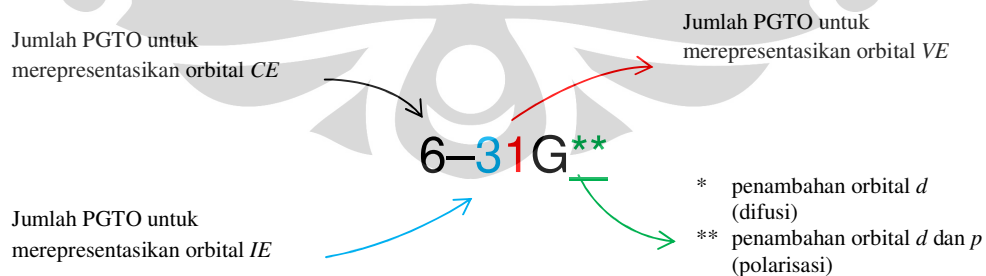
Secara prinsip persamaan (13), disebut persamaan B3LYP, merupakan “ramuan rumus” yang tidak lazim karena komponen energi E_C lokal dihitung dua kali dalam dua persamaan terpisah yaitu pada persamaan E^{VWN} dan persamaan E^{LYP} . Walaupun demikian, hasil perhitungan menggunakan persamaan B3LYP lebih sesuai dengan hasil eksperimen dibanding dengan persamaan-persamaan energi E_{XC} yang lain.

3.1.3 BASIS SET

Basis set merupakan sekumpulan fungsi orbital atomik yang digunakan untuk memecahkan persamaan Schrödinger pada sistem banyak partikel. Ada beberapa tipe *basis* yang digunakan antara lain tipe *eksponensial*, *Gaussian*, *polinomial*, *kubik*, *plane wave* dan lain-lain. Dalam penelitian ini digunakan basis set tipe *Gaussian Type Orbitals* (GTO) sub tipe *Contracted Gaussian Type Orbitals* (CGTO) yang secara umum mempunyai bentuk persamaan:

$$\left. \begin{aligned} \chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) &= NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{(2n-2-l)}e^{-\zeta r^2} \\ \chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x, y, z) &= Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\zeta r^2} \end{aligned} \right\} \quad (14)$$

Dengan l_x , l_y , dan l_z merupakan parameter yang menentukan tipe orbital elektron. CGTO merupakan gabungan dari beberapa fungsi *Primitive Gaussian Type Orbital* (PGTO). CGTO menggunakan asumsi dasar pada fakta bahwa sifat-sifat kimia dari suatu unsur lebih banyak ditentukan oleh elektron valensi suatu atom. CGTO membagi fungsi basis menjadi tiga berdasarkan letak orbital elektron yaitu *core electron* (CE), *inner electron* (IE) dan *valence electron* (VE). Secara energetik, penghitungan yang lengkap terhadap *basis set* CE memang penting namun dari sudut pandang kimia kontribusi energi CE tidak terlalu signifikan terhadap sifat-sifat kimia suatu molekul dan oleh karena itu *basis set* CE dikontraksi sehingga jumlah fungsi yang digunakan untuk merepresentasikan orbital elektron inti menjadi lebih sedikit. Kontraksi dilakukan dengan cara membuat kombinasi linier fungsi orbital elektron CE membentuk satu *cluster* CGTO. Secara sederhana, kontraksi dapat diinterpretasikan sebagai cara mengekspresikan orbital elektron dalam mode orbital s , p , d , atau f . *Basis set* yang digunakan pada penelitian ini antara lain STO-3G, 3-21G, 6-31G* dan 6-31G. Tiap-tiap basis set diaplikasikan pada sub sistem yang berbeda. Notasi *basis set* di atas dapat diterjemahkan sebagai berikut:



Gambar 3.6 Cara membaca notasi fungsi basis CGTO

3.2 Metode Semi-Empirik: *Modified Neglect of Diatomic Overlap, Parametric Number 3 (MNDO-PM3)*

Metode *semi-empirik* (MSE) memasukkan beberapa parameter hasil eksperimen untuk mendefinisikan variabel-variabel dalam persamaan yang digunakan sehingga secara teknis metode ini mudah dilakukan dan tidak membutuhkan sumber daya komputasi yang besar. MSE hanya memperhatikan elektron-elektron valensi dari suatu atom sedangkan elektron-elektron yang *bukan* elektron valensi dihitung berdasarkan interaksi elektrostatik antara inti atom dengan elektron-elektron tersebut. MNDO merupakan modifikasi dari metode *Neglect of Diatomic Differential Overlap* (NDDO) melalui penambahan parameter-parameter atomik dan interaksi interatomik. Metode ini melibatkan perhitungan orbital atom *s*- dan *p*-. Metode MNDO-PM3, biasa disebut PM3 saja, merupakan hasil dari parameterisasi fase ke-3 setelah metode *Austin Model 1* (AM1). Secara kualitatif, PM3 merupakan metode yang memberikan hasil perhitungan terbaik di antara sub metode semi-empirik lainnya. PM3 dipilih sebagai salah satu metode analisis mengingat PM3 telah diparameterisasi untuk atom-atom khususnya atom yang menyusun asam amino. Walau demikian, PM3 mempunyai beberapa kelemahan antara lain hampir semua orbital sp^3 -atom nitrogen dimodelkan dalam struktur orbital piramida, ikatan hidrogen antara dua atom dimodelkan dengan jarak yang sedikit lebih pendek yaitu hampir $\sim 0,1 \text{ \AA}$. Secara umum PM3 mempunyai persamaan sebagai berikut:

- Operator satu elektron $\mathbf{h} = -\frac{1}{2}\nabla^2 - \sum_a \mathbf{V}_a$
- Integral elektron ganda,

$$h_{\mu\nu} = \langle \mu_A | \mathbf{h} | \nu_A \rangle = \delta_{\mu\nu} U_{\mu} - \sum_{a \neq A} Z'_A \langle \mu_A s_a | \nu_A s_a \rangle$$

$$U_{\mu} = \left\langle \mu_A \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 - \mathbf{V}_A \right| \mu_A \right\rangle$$

μ_A dan ν_A masing-masing menyatakan fungsi orbital s - dan p - atom A.

- Fungsi *overlap integral* $S_{\mu\nu} = \delta_{\mu\nu} \delta_{AB}$, dengan S menyatakan matrik overlap integral antar atom.
- Pada dasarnya metode PM3 sama dengan model AM1, hanya cara memparameterisasi atom-atom saja yang berbeda. Interaksi interatomik dirumuskan sebagai:

$$V_{nn} = V_{nn}^{\text{MNDO}}(A, B) + \frac{Z'_A Z'_B}{R_{AB}} + \left(\sum_{A,B} \sum_k \alpha_{kA/B} \exp \left[-b_{kA/B} (R_{AB} - c_{kA/B})^2 \right] \right)$$

dengan,

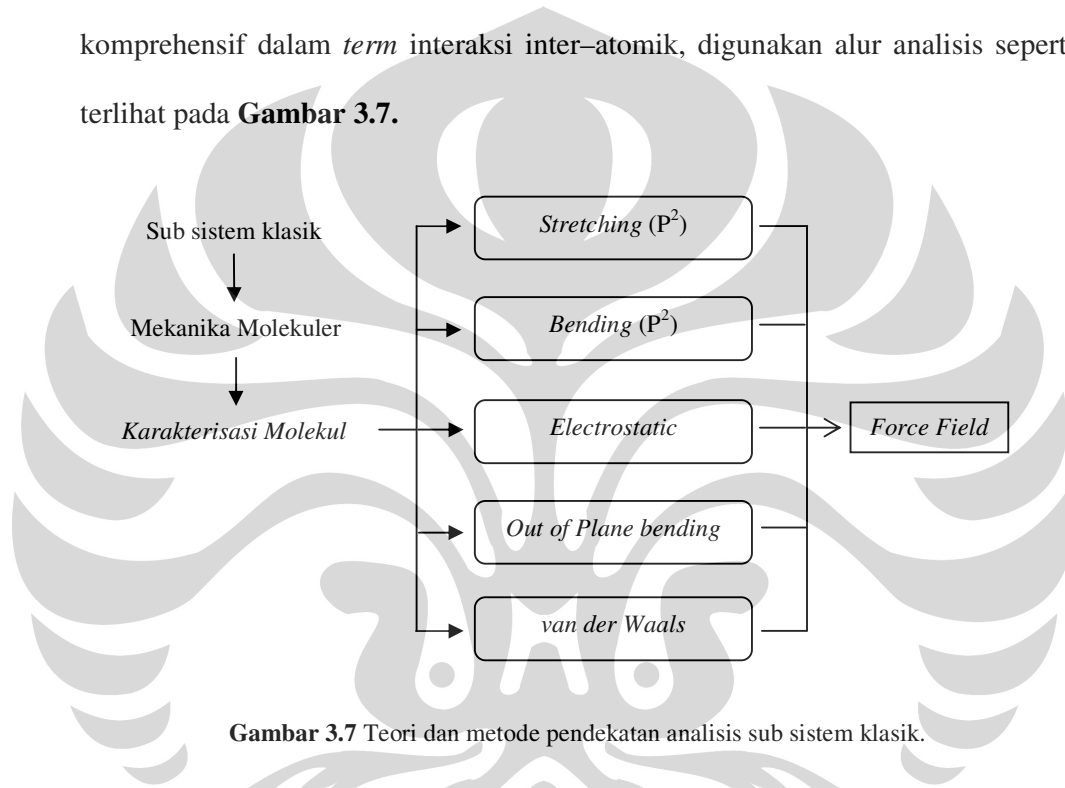
$$V_{nn}^{\text{MNDO}}(A, B) = Z'_A Z'_B \langle s_A s_B | s_A s_B \rangle (1 + \exp(-\alpha_A R_{AB}) + \exp(-\alpha_B R_{AB}))$$

Variabel a_k , b_k , c_k dan eksponen α merupakan konstanta yang diperoleh dari hasil *fitting* data eksperimen. Sedangkan k mempunyai nilai antara 2 dan 4, bergantung dari jenis atom yang dianalisis.

3.3 Mekanika Molekuler (MM)

Molekul secara sederhana dapat dipahami sebagai sekumpulan atom-atom yang membentuk satu kesatuan struktur fungsional. Molekul yang berbeda mempunyai sifat yang berbeda-beda karena komposisi dan geometri atom-atom yang menyusunnya berbeda. Sifat fisika dan kimia suatu molekul dapat dikarakterisasi

berdasarkan geometri atom–atom yang menyusunnya, energi relatif yang dikandung, interaksi inter–atomik yang muncul, sifat intrinsik molekul (momen dipol, polarisabilitas, dan lain–lain), laju transformasi molekul dari keadaan satu ke keadaan yang lain, dan kebergantungan molekul secara struktural dan fungsional terhadap waktu. Untuk melakukan analisis molekul secara komprehensif dalam *term* interaksi inter–atomik, digunakan alur analisis seperti terlihat pada **Gambar 3.7**.



Gambar 3.7 Teori dan metode pendekatan analisis sub sistem klasik.

MM menyederhanakan sistem molekul dengan mengabaikan gerak elektron sehingga sistem yang sebelumnya merupakan sistem “kuantum” kini menjadi sistem “klasik”. MM memodelkan atom-atom sebagai “bola” yang terhubung satu sama lain oleh “pegas”. Dengan demikian energi total molekul (disebut *force field*) dapat ditentukan berdasarkan hukum Hooke yang secara umum dapat dinyatakan sebagai:

$$E_T = E_{\text{str}} + E_{\text{bend}} + E_{\text{tor}} + E_{\text{oop}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{elec}} + \dots \quad (15)$$

Dengan E_T adalah energi total molekul, E_{str} merupakan energi *bond-stretching*, yaitu perubahan energi yang terjadi akibat vibrasi atom terhadap posisi kesetimbangannya. Diasumsikan bahwa gaya inter-atomik bersifat harmonik sehingga energi E_{str} dapat dihitung dengan persamaan:

$$E_{str} = \frac{1}{2} k_b (b - b_0)^2 \quad (16)$$

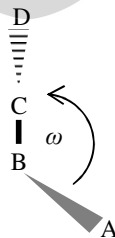
Dengan k_b merupakan konstanta *bond-stretching*, b_0 merupakan posisi kesetimbangan atom (*unstrained*) sedangkan b menunjukkan panjang ikatan aktual antar atom.

E_{bend} merupakan energi *angle-bending*, yaitu energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan tiga buah atom membentuk sudut θ . Besarnya energi E_{bend} ditentukan berdasarkan asumsi bahwa gaya yang bekerja pada atom-atom bersifat harmonik.

$$E_{str} = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (17)$$

Dengan k_θ merupakan konstanta gaya *angle-bending*, θ_0 merupakan sudut di mana atom-atom berada dalam kondisi setimbang sedangkan θ merupakan besar sudut aktual yang dibentuk oleh atom-atom.

E_{tor} merupakan energi *torsional*, yang dihasilkan karena rotasi molekul A-B-C-D terhadap B-C. Sebagai ilustrasi, sudut torsional dapat digambarkan pada **Gambar 3.8**.



Gambar 3.8 Definisi sudut torsional, ω .

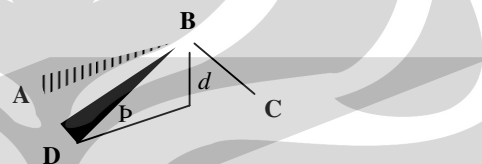
Besar E_{tor} adalah sebagai berikut:

$$E_{\text{tors}}(\omega) = \sum_{n=1} V_n \cos(n\omega) \quad (18)$$

Nilai $n = 1$ menunjukkan rotasi yang bersifat periodik pada sudut 360° , $n = 2$ pada sudut 180° , $n = 3$ pada sudut 120° dan seterusnya.

Konstanta V_n menunjukkan ukuran *barrier* rotasi pada ikatan A–B.

E_{oop} atau *the out of plane bending energy* merupakan koreksi energi yang muncul akibat terjadinya piramidalisasi pada struktur molekul [14]. **Gambar 3.9** menunjukkan ilustrasi sederhana piramidalisasi molekul.



Gambar 3.9 Definisi variabel–variabel E_{oop}

Energi pada saat $ABCD$ sebidang tentu saja berbeda dengan energi pada saat $ABCD$ membentuk struktur piramida, seperti pada gambar di atas. Baik secara energetik maupun struktural, memodelkan sistem “piramida” dengan sistem planar tentu saja tidak realistis. Jika pada sistem planar jumlah total sudut yang dibentuk oleh $ABCD = 360^\circ$ sedangkan pada sistem piramida jumlah sudut yang dibentuk *bukan* lagi 360° melainkan menjadi lebih kecil. Distorsi ini menyebabkan perbedaan energi pada kedua sistem dan oleh karenanya koreksi energi perlu diberikan agar sistem menjadi realistis.

Secara umum, E_{oop} dinyatakan sebagai fungsi harmonik (dalam variabel sudut \mathcal{D}) atau sebagai fungsi kuadrat dalam variabel d , sebagaimana persamaan berikut ini:

$$\left. \begin{aligned} E_{\text{oop}}(P^B) &= k^B (P^B)^2 \\ E_{\text{oop}}(d) &= k^B d^2 \end{aligned} \right\} \quad (19)$$

Dengan k^B merupakan konstanta gaya *out of plane*. E_{oop} disebut juga E_{inv} (energi inversi) karena E_{inv} sama dengan energi yang diperlukan untuk mengubah struktur piramida menjadi struktur planar.

E_{vdw} merupakan energi van der Waals, yaitu energi yang dihasilkan oleh interaksi antara atom-atom yang tidak terikat secara langsung. E_{vdw} termasuk dalam kategori interaksi jarak jauh. Pada keadaan di mana $R \rightarrow \infty$ maka $E_{\text{vdw}} \rightarrow 0$. Secara umum, persamaan E_{vdw} dapat dinyatakan dengan:

$$E_{\text{vdw}}(R^{AB}) = E_{\text{repulsif}}(R^{AB}) - \frac{C^{AB}}{(R^{AB})^6} \quad (20)$$

Untuk merepresentasikan interaksi jarak jauh ini digunakan persamaan Lennard-Jones (LJ $6-12$), yang secara umum dinyatakan sebagai:

$$E_{\text{LJ}}(R) = \epsilon \left[\left(\frac{R_0}{R} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \right] \quad (21)$$

R_0 menyatakan posisi ketika E_{LJ} mencapai minimum dan ϵ menyatakan koefisien “kedalaman” minimum yang dicapai. Untuk mengakomodasi munculnya ikatan hidrogen, dalam penelitian ini juga mengadopsi persamaan LJ $6-12$ yang dimodifikasi menjadi persamaan LJ $10-12$ [12, 24].

$$E_{\text{H-bond}}(R) = \epsilon \left[5 \left(\frac{R_0}{R} \right)^{12} - 6 \left(\frac{R_0}{R} \right)^{10} \right] \quad (22)$$

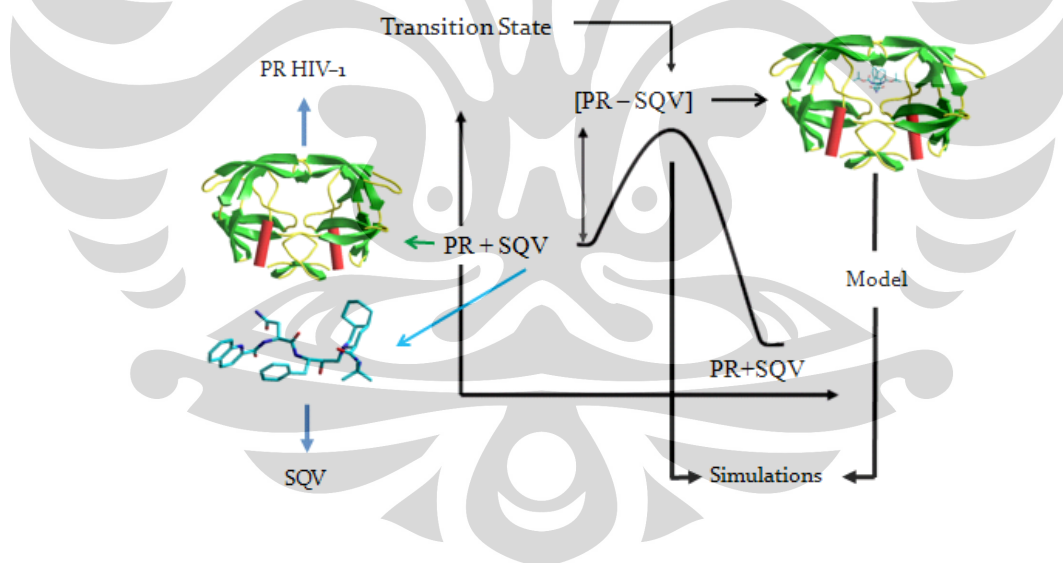
Persamaan terakhir adalah E_{elec} yang menyatakan energi interaksi elektrostatik. E_{elec} termasuk dalam kategori interaksi jarak jauh, seperti halnya interaksi LJ. Interaksi elektrostatik dimodelkan sebagai interaksi Coulomb yang secara umum dinyatakan sebagai:

(23)

Dengan Q^A dan Q^B adalah partikel bermuatan sedangkan ϵ menyatakan konstanta dielektrik.

3.4 Model Sistem

Simulasi dilakukan pada keadaan transisi yaitu keadaan dimana PR membentuk struktur kompleks dengan SQV sesuai dengan model reaksi enzimatik pada umumnya seperti terlihat pada **Gambar 3.10**.



Gambar 3.10 Model reaksi enzimatik pada keadaan transisi.

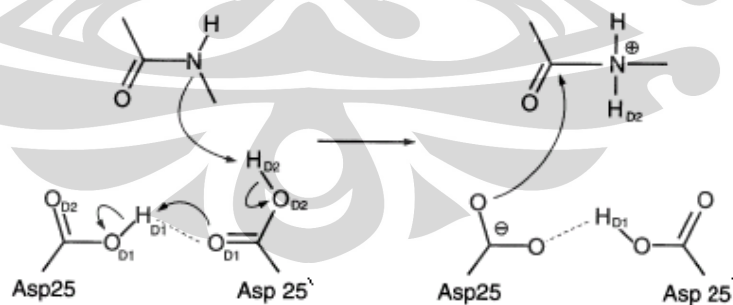
Simulasi dilakukan melalui tahap–tahap sebagai berikut:

1. Penentuan keadaan terprotonasi PR HIV–1

Kadaan terprotonasi PR HIV–1 ditentukan dengan mengacu pada dua keadaan yaitu bebas dan berinteraksi dengan substrat. Bagian PR yang digunakan sebagai model adalah residu Asp25/25'–Thr26/26'–Gly27/27' sedangkan substrat diambil pada residu *phenilalanine* dan *proline*. Mekanisme proteolisis mengacu pada model *direct nucleophilic attack* pada keadaan vakum dan tidak dilarutkan dalam air. Metode simulasi yang digunakan adalah simulasi klasik sedangkan untuk menghitung energi digunakan metode semi-empirik dan DFT.

2. Simulasi keadaan transisi

Simulasi pada tahap ini merupakan simulasi yang dilakukan terhadap kompleks PR–SQV. Simulasi dilakukan pada level teori klasik. Model sistem yang digunakan pada keadaan transisi seperti pada **Gambar 3.11**.



Gambar 3.11 Model reaksi proteolisis PR HIV-1 kompleks dengan SQV [23].

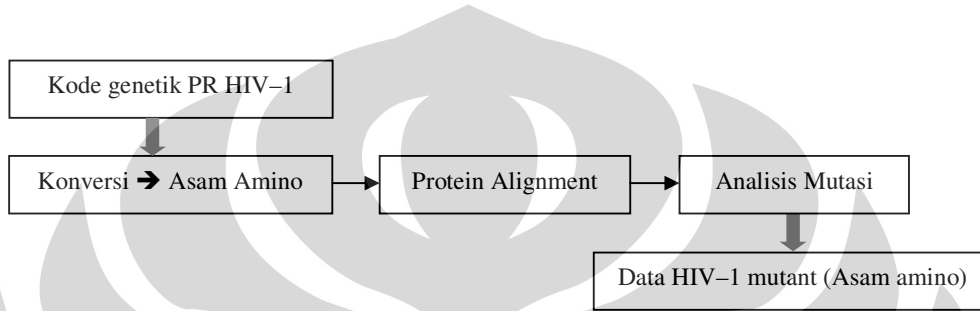
Molekul SQV membentuk ikatan hidrogen pada gugus OH terhadap gugus karboksil Asp25 secara langsung tanpa bantuan molekul air. Simulasi ini *hanya* pada keadaan transisi saja dan *tidak* memodelkan pembentukan produk atau pemutusan dan pembentukan ikatan karena keterbatasan sumber daya komputasi yang ada. Sistem PR HIV-1 kompleks dengan SQV terlalu besar untuk dianalisis pada level teori mekanika kuantum.



BAB IV

PENGOLAHAN DATA, ANALISIS DAN DISKUSI

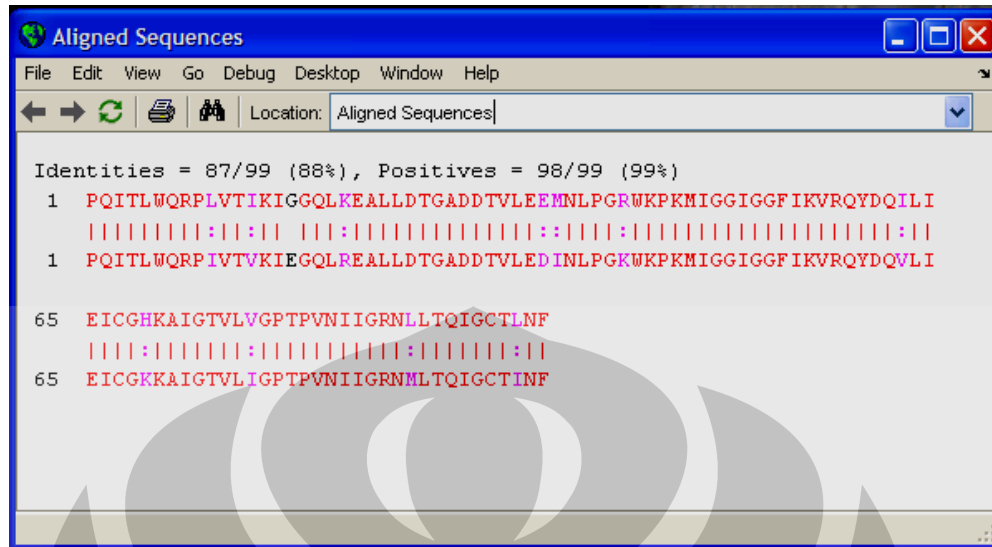
4.1 Analisis mutasi PR HIV-1 (DY₁)



Gambar 4.1 Bagan analisis mutasi DY₁.

Data primer yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, UI. Data tersebut berupa urutan basa DNA protease virus HIV-1 (selanjutnya disebut DY₁) hasil pemindaian terhadap virus yang diisolasi dari pasien penderita HIV/AIDS. Analisis terhadap DY₁ dibagi menjadi beberapa tahap antara lain konversi kode genetik DY₁ menjadi asam amino, *protein alignment*, dan karakterisasi mutasi yang muncul pada DY₁.

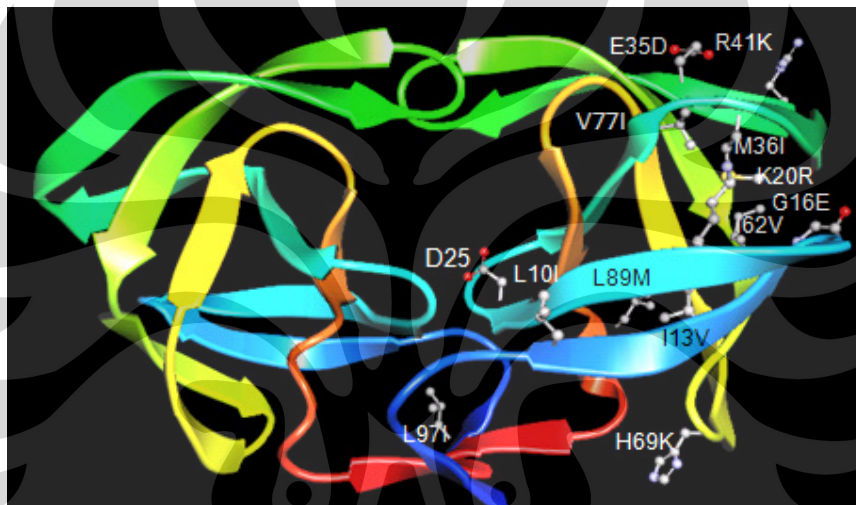
Basa DNA protease HIV-1 merupakan kode-kode pembentuk asam amino yang menyusun struktur fungsional enzim protease HIV-1 (PR). Kode genetik PR HIV-1 sendiri terletak pada posisi basa ke 2253 hingga 2549 (297 basa), membentuk 99 asam amino yang merupakan salah satu monomer PR HIV-1. Proses konversi dilakukan dengan program Matlab 7.0. Proses selanjutnya adalah melakukan *alignment* dengan mengacu pada PR virus HIV-1 sub tipe B (HXB2). Hasilnya adalah sebagai berikut:



Gambar 4.2 Konversi basa DNA menjadi asam amino dan *protein alignment* DY₁ relatif terhadap HXB2.

Baris pertama pada **Gambar 4.2** menunjukkan asam amino HXB2 sedangkan baris kedua menunjukkan asam amino DY₁. Terlihat bahwa terdapat 12 mutasi antara lain L10I, I13V, G16E, K20R, E35D, E36I, R41K, I62V, H69K, V77I, L89M, dan L97I. Berdasarkan hasil analisis HIVdb program (www.hivdb.stanford.edu), DY₁ termasuk dalam sub tipe AE. Secara umum mutasi pada I13V, K20R, M36I, dan H69K menyebabkan virus menjadi resisten terhadap *tipranavir* [34–36] sedangkan mutasi L10I selalu muncul pada *treatment* menggunakan hampir semua obat ARV. Mutasi L10I tidak muncul jika tidak ada *treatment* sehingga disimpulkan bahwa mutasi L10I mempunyai andil dalam proses terjadinya resistensi. Simulasi yang pernah dilakukan terhadap mutasi E35D memberikan kesimpulan bahwa mutasi E35D menyebabkan penurunan sensitivitas virus terhadap *amprenavir* [34–36]. Mutasi lainnya, seperti K20R dan M36I, hanya sedikit (bahkan *tidak*) memberikan efek terhadap resistensi virus dan

beberapa mutasi yang lain seperti I13V, G16E, I62V, H69K, dan V77I bersifat polimorfis dan walaupun sering muncul pada *treatment* dengan obat ARV tertentu namun efek terhadap resistensi virus tidak terlalu signifikan. Beberapa mutasi yang muncul pada *treatment* SQV telah diidentifikasi sebagai penyebab utama resistensi virus antara lain G48V, I84V, dan L90M. **Gambar 4.3** adalah representasi mutasi-mutasi yang muncul pada DY₁ dalam struktur topologi HXB2:

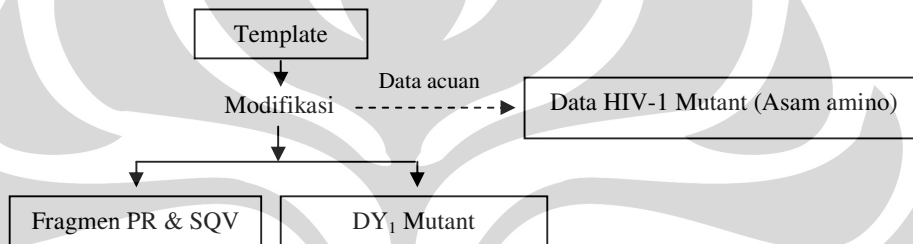


Gambar 4.3 Mutasi PR HIV-1 kode DY₁ dalam struktur topologi HXB2.

Data-data hasil penelitian dalam bidang *protein modeling* terhadap sub tipe AE agak sulit ditemukan dan saat ini data referensi yang digunakan sebagai rujukan dan pembandingan untuk melakukan analisis hasil simulasi juga terbatas. Oleh karena itu mutasi yang terjadi pada DY₁ tidak dianalisis dalam konteks HIV-1 strain AE. Mutasi-mutasi tersebut diasumsikan muncul pada virus HIV-1 strain B.

Untuk melakukan simulasi dibutuhkan data topologi molekul DY_1 akan tetapi karena data tersebut tidak tersedia maka sebagai alternatif digunakanlah data topologi HXB2 sebagai *template* untuk dimodifikasi struktur asam aminonya agar sesuai dengan struktur asam amino DY_1 .

4.2 Penyiapan data input simulasi Model PR HIV-1



Gambar 4.4 Bagan penyiapan data input simulasi.

Proses penyiapan data input simulasi meliputi tiga tahap yaitu penyiapan fragmen PR HIV-1, molekul SQV, dan HIV-1 mutant (DY_1). Data input simulasi berupa data topologi molekul dalam format *.pdb*.

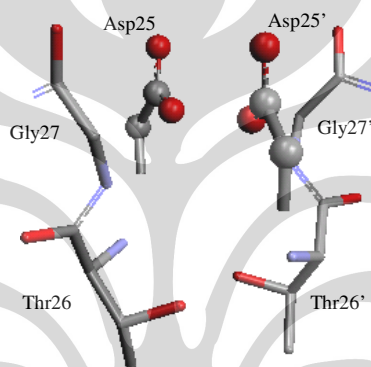
Fragmen PR HIV-1

Template yang digunakan adalah 1HXB.pdb kompleks dengan SQV [37, 38] dan beberapa file pendukung lainnya yang diperoleh dari www.rcsb.org [39]. Modifikasi dilakukan dengan cara mengganti asam amino pada struktur 1HXB dengan asam amino yang sesuai dengan struktur DY_1 . Hasilnya adalah struktur

DY₁ mutant. Data struktur 1HXB dan DY₁ mutant digunakan dalam simulasi kedinamisan molekuler.

Fragmen PR HIV-1 yang digunakan sebagai sampel adalah residu Gly27/27'-Thr26/26'-Asp25/25' (disebut *binding triad*). Dalam implementasinya dibuatlah model PR yang terdiri dari residu Gly27/27'-Thr26/26'-Asp25/25'.

Gambar 4.5 menunjukkan fragmen PR HIV-1. Atom-atom hidrogen tidak diperlihatkan sebagai simplifikasi.

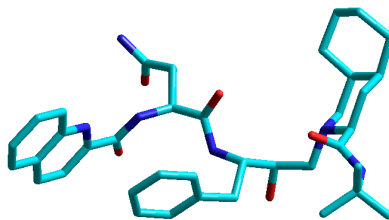


Gambar 4.5 Fragmen PR HIV-1 Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27'.

☞ Molekul SQV

Molekul SQV diperoleh dari <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/> [40].

Gambar 4.6 memperlihatkan struktur SQV, untuk simplifikasi atom hidrogen tidak diperlihatkan:

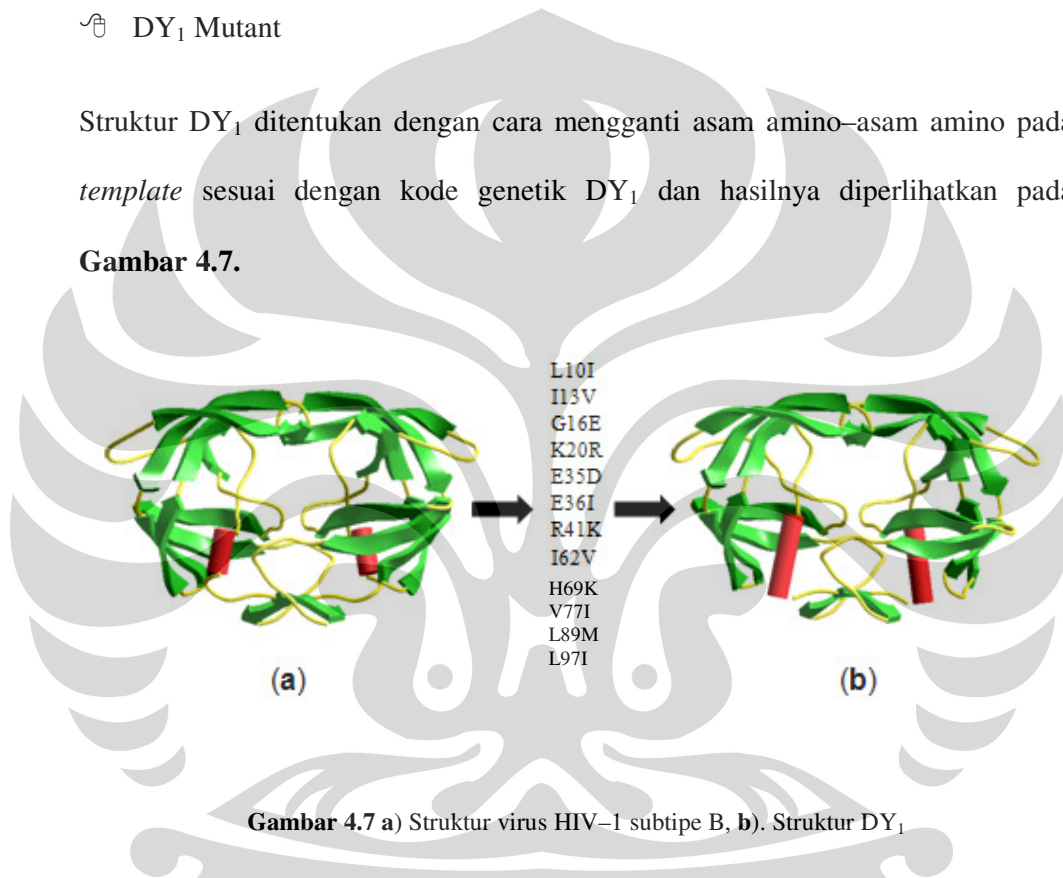


Gambar 4.6 Molekul SQV.

SQV termasuk jenis inhibitor yang disusun berdasarkan keadaan transisi. SQV adalah molekul asimetris yang berinteraksi langsung dengan sisi aktif enzim protease.

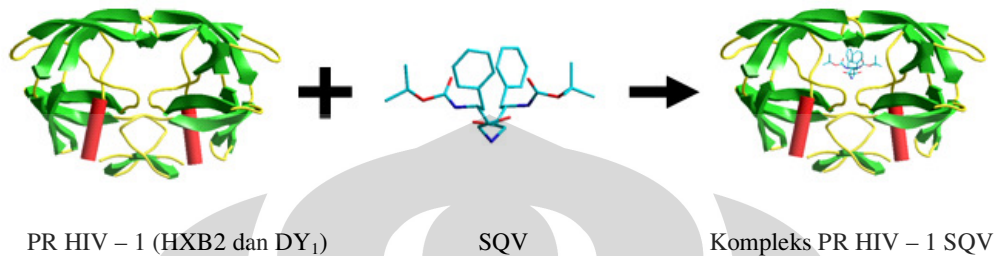
☞ DY₁ Mutant

Struktur DY₁ ditentukan dengan cara mengganti asam amino–asam amino pada *template* sesuai dengan kode genetik DY₁ dan hasilnya diperlihatkan pada **Gambar 4.7.**



Untuk keperluan praktis maka kedua struktur disajikan dalam mode yang sama, *cartoon ribbon*, yang berakibat seolah–olah struktur HXB2 dan DY₁ sama. Pada kenyataannya tidak demikian. Struktur HXB2 memiliki komposisi asam amino yang berbeda dengan DY₁ pada posisi 10, 13, 16, 20, 35, 36, 41, 62, 69, 77, 89, dan 97 pada tiap–tiap monomer. Simulasi dilakukan terhadap kompleks SQV–HXB2 dan SQV–DY₁. Analisis dilakukan dengan cara membandingkan

konformasi struktur dan kestabilan energi dari kedua kompleks tersebut. **Gambar 4.7** memperlihatkan model reaksi enzimatik yang digunakan dalam simulasi MDS.



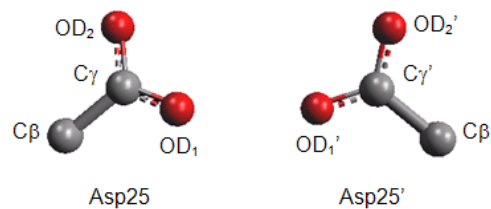
Gambar 4.8 Model reaksi enzimatik simulasi MDS.

4.3 Detail Perhitungan Model PR HIV-1

Keadaan Terprotonasi PR HIV-1 kompleks dengan SQV

Langkah pertama sebelum melakukan simulasi kedinamisan molekul adalah menentukan keadaan terprotonasi PR HIV-1. Analisis dilakukan terhadap tiga keadaan protonasi yaitu *unpro*, *monopro*, dan *dipro*. **Gambar 4.9** memperlihatkan detail model dan definisi parameter-parameter yang diukur dalam perhitungan.

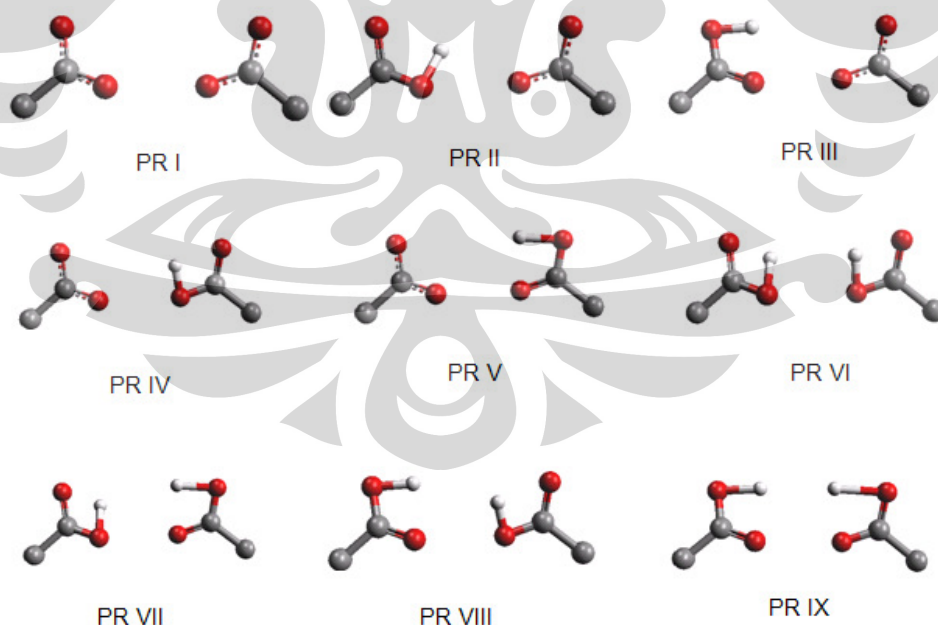
Definisi variabel perhitungan



Gambar 4.9 Definisi variabel-variabel sistem.

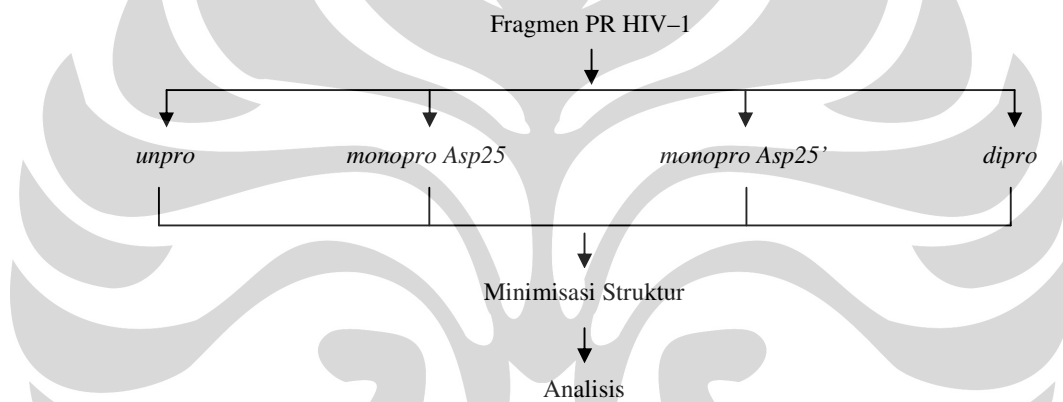
Residu Asp25/25' diperlihatkan hanya pada gugus aktifnya yang terdiri dari atom oksigen (warna merah, OD₁ dan OD₂) pada tiap-tiap residu. Atom OD_{1/1'} dan OD_{2/2'} membentuk ikatan yang saling beresonansi satu sama lain, ditunjukkan dengan gambar ikatan satu garis tegas dan satu garis putus-putus. Atom C_{β/β'} dan C_{γ/γ'} ditunjukkan dengan warna abu-abu yang membentuk ikatan rangkap satu sama lain. Komponen-komponen fisis yang akan diukur antara lain jarak OD₁-OD_{1'}, OD₂-OD_{2'}, rotasi OD_{1/1'}-OD_{2/2'}-C_{γ/γ'} relatif terhadap sumbu putar C_{β/β'}-C_{γ/γ'}. Selain melakukan analisis terhadap struktur ruang sisi aktif PR, juga dilakukan perhitungan energi setiap model untuk mengetahui model yang paling stabil baik secara struktur maupun energetik.

Model protonasi PR HIV-1



Gambar 4.10 Model protonasi PR HIV-1 dalam konfigurasi *unpro* (PR I), *monopro* (PR II, PR III, PR IV, dan PR V) dan *dipro* (PR VI, PR VII, PR VIII, dan PR IX) [15].

Data eksperimen yang digunakan sebagai acuan adalah 1HXB.pdb, yaitu PR HIV-1 kompleks dengan SQV hasil difraksi sinar-X. Karakterisasi dilakukan terhadap sisi aktif 1HXB yang meliputi pengukuran jarak antara OD_1-OD_1' , OD_2-OD_2' , sudut $OD_2-C\gamma-OD_1$, $OD_1'-C\gamma-OD_2'$, $OD_1-OD_1'-C\gamma$, $C\gamma-OD_1-OD_1'$, $OD_1-C\gamma-OD_1'$, kesebidangan antara Asp25 dan Asp25', jarak antara OD_1 terhadap atom N pada residu Glysin dan *Root Means Square* (RMS). Proses analisis terhadap model PR dilakukan sebagai berikut:



Gambar 4.11 Bagan proses analisis model PR.

4.4 Hasil dan Analisis Keadaan Terprotonasi PR HIV-1

Sebelum melakukan minimisasi struktur, interaksi-interaksi interatomik yang tidak rasional (*bad contact*) dihilangkan. Minimisasi struktur dilakukan dengan menggunakan metode PM3, *spin pairing* RHF, dan algoritma Polak-Ribiere. Sistem diminimisasi dalam ruang vakum dengan batas maksimum gradien energi

0,1 kcal/mol. Seluruh perhitungan pada tahap ini dilakukan dengan software ArgusLab 4.0.1 [41] dan HyperChem Professional versi 8.0.3. Data hasil perhitungan keadaan terprotonasi model PR HIV-1 tertera pada **Tabel 4.1**. Penambahan proton pada salah satu atom oksigen residu Asp25 dan Asp25' menyebabkan PR HIV-1 mengalami konformasi struktur.

Tabel 4.1 Hasil pengolahan data model *unpro* dan *monoprotonasi* PR HIV-1.

	Referensi (HXB2)	Model Protease				
		PR I	PR II	PR III	PR IV	PR V
Jarak (Å)						
$OD_1 - OD_1'$	2,782	17,817	2,509	5,895	5,845	3,916
$OD_2 - OD_2'$	5,336	18,063	4,447	8,748	8,915	7,166
$OD_1 - N (G27)$	4,198	2,786	4,794	5,202	2,764	3,096
$OD_1' - N (G27')$	3,135	2,766	2,799	2,796	4,847	2,884
Sudut						
$OD_2 - C - OD_1$	119,64 ^o	119,54 ^o	118,544 ^o	115,53 ^o	118,68 ^o	123,09 ^o
$OD_2' - C' - OD_1'$	119,99 ^o	121,19 ^o	118,755 ^o	118,87 ^o	116,16 ^o	120,22 ^o
Sudut Sebidang						
Asp25 - Asp25'	49,55 ^o	79,71 ^o	79,72 ^o	14,88 ^o	30,63 ^o	74,33 ^o
RMS	-	1,290	0,80	1,11	0,815	0,50

Seperti terlihat pada tabel, penambahan proton pada residu yang berbeda menyebabkan konformasi yang berbeda pula. Data di atas dihasilkan dari pengolahan struktur awal yang sama dan dengan metode simulasi yang sama pula. Selain model PR I dan II, pergeseran jarak $OD_1 - OD_1'$ saling menjauh satu sama lain dalam orde 1,134 Å hingga 3,113 Å. Demikian juga untuk jarak $OD_2 - OD_2'$,

telah terjadi pelebaran jarak sebesar 34,3% hingga 67,1%. Jarak yang makin melebar ini disebabkan karena repulsi antara atom oksigen pada Asp25 dan Asp25' lebih kuat dibanding ikatan hidrogen yang terbentuk sehingga mengakibatkan struktur menjadi kurang stabil.

Sudut yang dibentuk antara $OD_1-C\gamma-OD_2$ dan $OD_1'-C\gamma'-OD_2'$ pada tiap-tiap model mengalami perubahan yang tidak terlalu besar. Perubahan sudut ini lebih dipengaruhi oleh munculnya interaksi jarak jauh antara atom oksigen dengan atom lain membentuk ikatan hidrogen. Namun karena efek resonansi atom oksigen, pemekaran sudut yang terjadi tidak terlalu besar. Walaupun demikian, baik residu Asp25 dan Asp25' mengalami rotasi bidang yang cukup signifikan. Jika diperhatikan, sebagian besar rotasi gugus karboksil residu Asp terhadap poros atom $C\beta-C\gamma$ menyebabkan bidang yang dibentuk oleh $OD_1-C\gamma-OD_2$ dan $OD_1'-C\gamma'-OD_2'$ menjadi makin *tidak* planar. Kecuali model PR III dan IV, tingkat kesebidangan mengalami penurunan rata-rata 30° . Dari hasil pengolahan data dapat diamati bahwa dengan membandingkan keadaan molekul awal (PR hasil eksperimen), pada model PR II ternyata muncul ikatan hidrogen terutama pada $OD_{1/2}$ dan $OD_{1'/2}$, seperti terlihat pada **Gambar 4.12**.

Pada model PR *diprotonasi*, seluruh data yang diperoleh menunjukkan struktur PR yang divergen. Dari hasil minimisasi struktur teramati bahwa ikatan hidrogen yang notabeneanya berfungsi untuk menstabilkan struktur molekul hanya terbentuk rata-rata satu hingga tiga ikatan pada tiap model PR. Hal ini memberikan indikasi langsung bahwa repulsi antar atom lebih mendominasi sehingga masing-masing fragmen cenderung untuk saling menjauh satu sama

lain. Rotasi bidang $OD_1-C\gamma-OD_2$ dan $OD_1'-C\gamma'-OD_2'$ terhadap sumbu $C\beta-C\gamma$ rata-rata menjadi lebih planar kecuali model PR VII. **Tabel 4.2** menunjukkan data hasil perhitungan model PR *diprotonasi*:

Tabel 4.2 Hasil pengolahan data model *diprotonasi* PR HIV-1.

	Referensi (HXB2)	Model Protease			
		PR VI	PR VII	PR VIII	PR IX
Jarak (Å)					
$OD_1 - OD_1'$	2,782	6,899	5,795	6,554	5,600
$OD_2 - OD_2'$	5,336	7,741	8,777	10,287	9,205
$OD_1 - N (G27)$	4,198	5,772	3,784	2,894	2,847
$OD_1' - N (G27')$	3,135	4,653	2,849	4,186	2,836
Sudut					
OD_2-C-OD_1	119,64 ⁰	115,91 ⁰	115,59 ⁰	115,49 ⁰	115,72 ⁰
$OD_2'-C'-OD_1'$	119,99 ⁰	116,59 ⁰	116,06 ⁰	116,54 ⁰	115,90 ⁰
Sudut Sebidang					
$Asp25 - Asp25'$	49,55 ⁰	6,05 ⁰	74,49 ⁰	28,71 ⁰	10,46 ⁰
RMS	-	2,02	1,08	0,82	0,77

Dari keseluruhan data yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan bahwa model PR II merupakan model yang paling representatif. *Protonasi* pada OD_1 (model PR II) menyebabkan jarak antara OD_1-OD_1' bergeser sebesar 0,273 Å lebih dekat dibanding jarak referensi yaitu 2,782 Å. Demikian juga dengan jarak OD_2-OD_2' , yang sebelumnya berjarak 5,336 Å, setelah penambahan proton mengalami pergeseran jarak menjadi 4,447 Å. Pergeseran ini cukup konsisten terhadap struktur data referensi dengan RMS sebesar 0,80 walaupun sudut yang dibentuk

antara bidang Asp25 dan Asp25' menyempit sebesar $30,15^{\circ}$ dari sudut semula yaitu $130,45^{\circ}$. **Gambar 4.12** menunjukkan perbandingan struktur data referensi dengan struktur hasil simulasi pada model PR II.



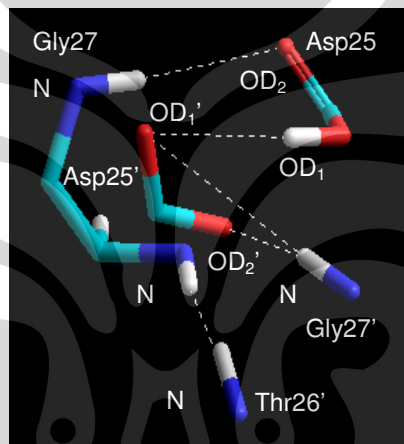
Gambar 4.12 Konformasi struktur PR II sebelum dan sesudah diminimisasi.

Pada Asp25 dan Asp25' model PR II muncul ikatan hidrogen antara OD₁ (terprotonasi) dengan OD₂' yang mempunyai elektronegativitas cukup besar. Interaksi ini menyebabkan Asp25 bergeser mendekati Asp25' sehingga jarak antara keduanya memendek. Munculnya ikatan hidrogen pada OD₂-N (Gly27) dengan panjang ikatan 2,524 Å dan OD₂'-N (Gly27') dengan panjang ikatan 3,162 Å menyebabkan sudut bidang OD₁-C γ -OD₂ berubah relatif terhadap OD₁'-C γ -OD₂' sebesar $30,15^{\circ}$, lebih sempit dari sebelumnya. Jika dibandingkan dengan struktur referensi pergeseran bidang Asp25 adalah sebesar $2,92^{\circ}$ sedangkan residu Asp25' berputar sebesar $22,17^{\circ}$ relatif terhadap kedudukan semula, seperti terlihat pada **Gambar 4.13**.



Gambar 4.13 Pergeseran sudut (a) Asp25 PR II relatif terhadap Asp25 referensi (b) Asp25' PR II relatif terhadap Asp25' referensi.

Selain menyebabkan perubahan bidang residu Asp25/25', munculnya ikatan hidrogen pada OD₁'-N (Gly27') juga mengakibatkan pergeseran kedudukan OD₁' terhadap atom N (Gly27') menjadi lebih dekat 0,336 Å dari jarak semula yaitu 3,135 Å. Namun demikian, ikatan hidrogen pada OD₁-N (Gly27) tidak cukup kuat untuk mendekatkan OD₁ ke N (Gly27). Ikatan hidrogen dengan kekuatan yang jauh lebih besar justru muncul pada OD₁-OD₁' yang menyebabkan atom OD₁ bergeser mendekat ke OD₁' sehingga jarak OD₁-N (Gly27) melebar sebesar 0,596 Å dari jarak semula yaitu 4,198 Å, seperti terlihat pada **Gambar 4.14**.



Gambar 4.14 Ikatan hidrogen yang terbentuk pada model PR II.

Ikatan hidrogen yang terbentuk antara N(Thr26) – N(Thr26'), tidak diperlihatkan dalam gambar, yang pada struktur awal sudah terbentuk, memberi andil pada pembentukan struktur PR yang stabil. Wittayarakul, dkk. [10], menganalisis keadaan terprotonasi PR HIV-1 dari sudut pandang energetik. Dengan menggunakan metode DFT, mereka memperoleh struktur stabil pada model monoprotisasi residu Asp25. Metode yang sama diadopsi untuk menentukan besar energi kestabilan struktur model PR dengan menggunakan metode semi-empirik dan *ab initio* (DFT/STO-3G). **Tabel 4.3** menunjukkan nilai kestabilan

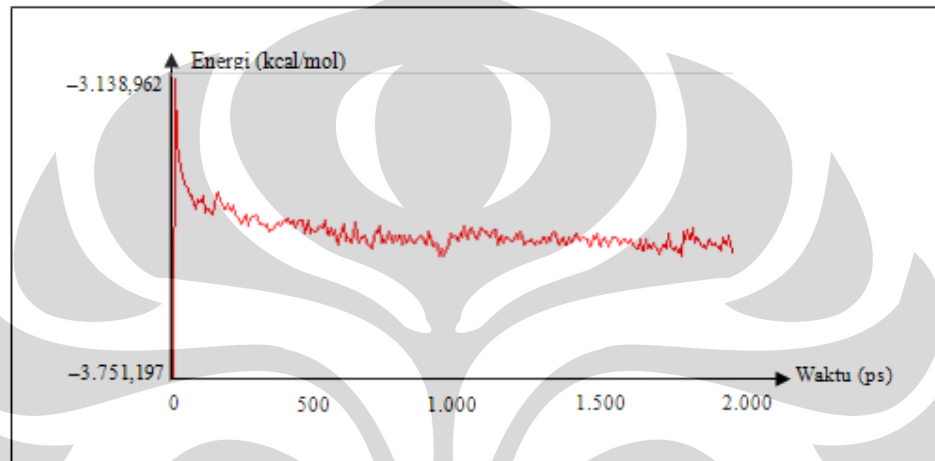
energi tiap–tiap model PR kompleks dengan fragmen substrat residu Pro dan Phe. Masing–masing model mempunyai tingkat kestabilan yang berbeda.

Tabel 4.3 Data energi model protonasi PR HIV–1

	$E_{\text{DFT/STO-3G}}$ (kcal/mol)	E_{PM3} (kcal/mol)
Unpro	–	–
Monopro (D25)	–702.383,92	–158.732,93
Monopro (D25')	–699.158,64	–158.694,01
Dipro (D25–25')	–575.716,85	–158.749,87

Data hasil analisis sebelumnya tidak mendukung keadaan unprotoasi sehingga pada tabel di atas nilai energi unpro tidak dihitung. Dari hasil perhitungan diperoleh bahwa model PR II mempunyai nilai energi kestabilan sebesar $-158.732,93$ kcal/mol pada level perhitungan semi–empirik dan sedangkan pada level perhitungan ab initio diperoleh nilai kestabilan energi sebesar $-702.383,92$ kcal/mol. Pada level perhitungan PM3 diperoleh nilai energi kestabilan paling besar pada model PR diprotonasi dengan selisih sekitar $-16,94$ kcal/mol relatif terhadap model PR monoprotisasi. Dengan mempergunakan level teori ab initio, diperoleh nilai kestabilan energi paling besar justru muncul pada model PR II yaitu sebesar $-702.383,92$ kcal/mol. Dengan mengacu pada data struktur pada **Tabel 4.1** dan **4.2**, model PR diprotonasi secara umum memiliki struktur yang kurang akurat dibanding struktur model PR monoprotisasi secara umum. Lagipula, dengan hasil perhitungan energi menggunakan metode ab initio model PR monoprotisasi ternyata memiliki nilai kestabilan energi yang paling

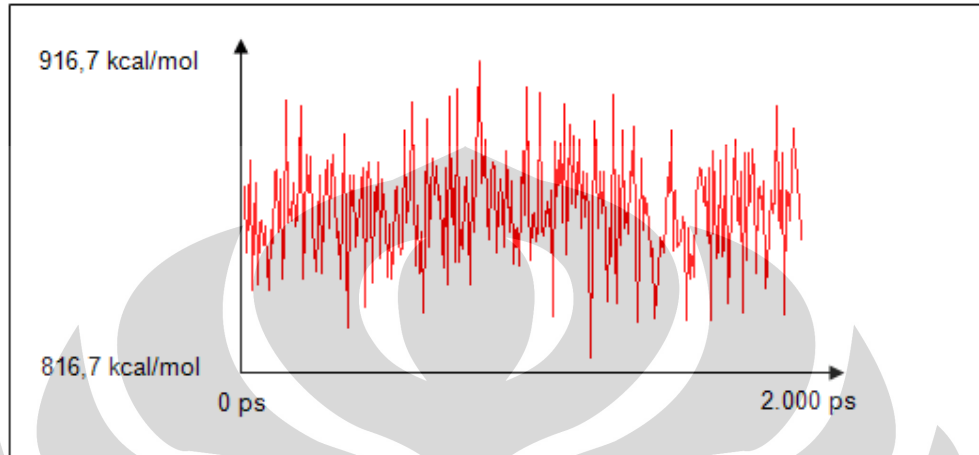
besar dan oleh karena itu disimpulkan bahwa model PR monoprotisasi adalah model yang paling mungkin terjadi pada PR HIV-1 kompleks dengan SQV. Untuk mengecek validitas model PR II, maka dilakukan simulasi kedinamisan molekuler pada kondisi di mana PR II dilarutkan dalam air. Simulasi dilakukan selama 2 ns pada suhu 300 K dengan parameter *force field* AMBER 99.



Gambar 4.15 Grafik hasil simulasi PR II (energi total terhadap waktu).

Grafik di atas menunjukkan fluktuasi energi total yang terdiri dari energi potensial dan energi kinetik terhadap waktu. Variasi energi total sistem tidak terlalu besar dari waktu ke waktu. Hal ini berkaitan dengan kestabilan struktur PR II. Sistem diminimisasi dari suhu 0 K dan ketika simulasi dilakukan PR II tidak dipanaskan terlebih dahulu sehingga pada grafik terlihat “loncatan” nilai yang cukup besar pada saat $t = 0$ ps. Pemanasan berpengaruh pada mobilitas sistem secara keseluruhan sehingga secara teoretik sistem akan menjadi tidak stabil apabila langsung disimulasikan pada temperatur 300 K. Namun demikian, untuk mengatasi ketidakstabilan struktur karena pengaruh suhu tersebut, sistem diasumsikan berada dalam keadaan rigid untuk menjaga pergerakan atom–atom

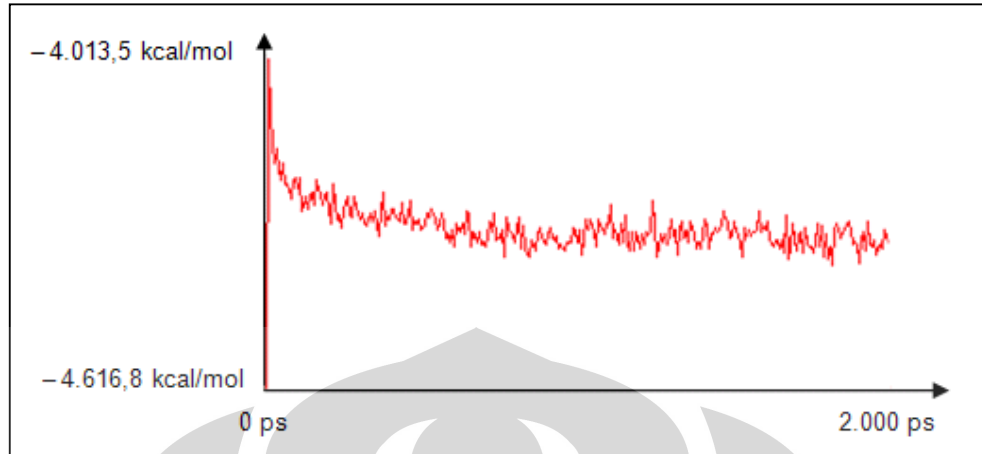
dalam molekul PR II tetap pada tempatnya. Hanya residu Asp25/25' saja yang dibiarkan bergerak bebas.



Gambar 4.16 Grafik energi kinetik sistem terhadap waktu.

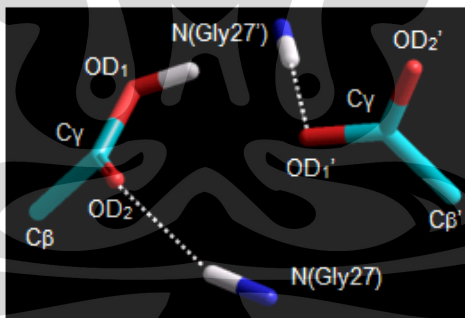
Seperti terlihat pada **Gambar 4.16**, fluktuasi energi kinetik terjadi dalam rentang nilai 100 kcal/mol. Pada rentang waktu antara 0 ps hingga 1.500 ps sistem berada dalam pergerakan yang cenderung stabil hanya saja pada sekitar 800 ps dan 1.300 ps sistem mengalami fluktuasi ekstrim yaitu pada nilai 916,7 kcal/mol dan 816,7 kcal/mol. Namun, jika grafik ini kita konfirmasi dengan grafik pada **Gambar 4.15** dan **4.17** terlihat bahwa energi total keseluruhan sistem stabil. Fluktuasi energi kinetik lebih didominasi oleh pergerakan molekul H₂O sedangkan molekul PR II, khususnya residu Asp25/25', tidak mengalami mobilitas yang berarti. Hal ini dapat dibuktikan dengan membandingkan struktur PR II pra dan pasca simulasi, lihat **Gambar 4.14** dan **4.18**.

Energi potensial mengalami perubahan dalam rentang nilai yang cukup kecil yaitu antara -4.013,5 kcal/mol hingga -4.616,8 kcal/mol dengan selisih maksimum -603,3 kcal/mol atau sekitar 13,98% dari energi potensial rata-rata.



Gambar 4.17 Grafik energi potensial sistem terhadap waktu.

Secara umum fluktuasi energi total sistem, energi potensial dan energi kinetik, cenderung konstan selama selang waktu simulasi 2 ns. Hal ini memberikan indikasi bahwa struktur global sistem, khususnya PR II, stabil pada temperatur 300 K. **Gambar 4.18** menunjukkan struktur PR II pasca simulasi.



Gambar 4.18 Struktur PR II setelah simulasi.

Jarak OD_1-OD_1' melebar menjadi 2,760 Å dari jarak semula yang hanya 2,509 Å. Walaupun demikian, jarak ini lebih mendekati struktur hasil eksperimen dengan selisih 0,022 Å. Pengamatan lebih lanjut menunjukkan bahwa pada struktur PR eksperimen tidak muncul ikatan hidrogen antara OD_1-OD_1' , demikian juga pada

struktur PR II. Bertambahnya jarak OD_1-OD_1' menyebabkan ikatan hidrogen lenyap. Sudut kesebidangan antara Asp25 relatif terhadap Asp25' berubah menjadi $84,33^0$, lebih menyempit $4,62^0$ dibanding ketika PR II dalam ruang vakum. Hal ini disebabkan oleh terjadinya deformasi ikatan hidrogen khususnya pada gugus karboksil masing-masing pada residu Asp25/25' (bandingkan **Gambar 4.14** dengan **Gambar 4.18**). Pemberian air pada molekul PR II juga menyebabkan peregangan jarak antara OD_2 terhadap OD_2' sebesar $0,421 \text{ \AA}$ dari jarak semula yaitu $4,447 \text{ \AA}$. Dibandingkan dengan struktur PR awal, jarak OD_2-OD_2' yang mengalami peregangan ini justru lebih mendekati struktur hasil eksperimen dengan selisih jarak sekitar $0,469 \text{ \AA}$.

Rotasi bidang $OD_{1/1'}-C_{\gamma/\gamma'}-OD_{2/2'}$ terhadap $C_{\gamma/\gamma'}-C_{\beta/\beta'}$ menyebabkan ikatan antara gugus karboksil Asp25 terhadap atom nitrogen residu Gly27 dan gugus karboksil Asp25' terhadap atom nitrogen residu Gly27' melemah sehingga jarak antara $OD_1-N(\text{Gly}27)$ dan $OD_1'-N(\text{Gly}27')$ melebar masing-masing sebesar $0,154 \text{ \AA}$ dan $0,402 \text{ \AA}$. Perubahan juga terjadi pada sudut $OD_{1/1'}-C_{\gamma/\gamma'}-OD_{2/2'}$ yang masing-masing melebar menjadi $125,09^0$ dan $120,75^0$. Secara energetik, perubahan-perubahan yang muncul setelah model PR II disimulasikan menyebabkan penurunan energi interaksi total antara residu Asp25/Thr26/Gly27 terhadap Asp25'/Thr26'/Gly27' sebesar 13 kcal/mol relatif terhadap model PR II pra simulasi.

Piana [15], dengan menggunakan metode ab initio menyimpulkan bahwa keadaan terprotonasi PR HIV-1 terjadi pada residu Asp25 atom OD_1 . Berangkat dari struktur awal PR HIV-1 kompleks dengan peptasin (kode PDB 3PHV dan 5HVP) Piana memperoleh data hasil perhitungan dengan deviasi yang sangat

kecil. Hasil simulasi yang dilakukan menunjukkan bahwa terjadi pergeseran pada atom OD₁-OD₁' sejauh 0,44 Å saling mendekat satu sama lain terhadap struktur hasil eksperimen. Dengan menggunakan metode semiempirik, didapatkan hasil pengukuran pergeseran yang terjadi pada OD₁-OD₁' sejauh 0,253 Å saling mendekat satu sama lain. Dalam model monoprotisasi yang diajukan Piana, ia memperoleh hasil pengukuran pada atom OD₂-OD₂' dengan akurasi 14,9% atau 1,7% lebih akurat relatif terhadap hasil simulasi yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 16,6%. Pada pengukuran terhadap OD₁-N(Gly27) diperoleh hasil dengan akurasi relatif terhadap hasil eksperimen sebesar 14,2% dan pada OD₁-N(Gly27') sebesar 10,2%. Hasil ini tidak lebih akurat dibanding hasil pengukuran yang dilakukan oleh Piana yang memperoleh akurasi masing-masing sebesar 10,1% untuk OD₁-N(Gly27) dan 12,5% untuk OD₁-N(Gly27'). Hal yang cukup menarik untuk didiskusikan adalah hasil yang diperoleh setelah simulasi dilakukan. Disebabkan oleh keterbatasan sumber daya komputasi yang ada maka simulasi dilakukan pada level molekuler dengan mengasumsikan bahwa residu Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27' pada PR HIV-1 sebagai molekul rigid yang memiliki tingkat mobilitas rendah pada keadaan di mana molekul diletakkan dalam air. Asumsi ini berdasarkan fakta bahwa dari sekian banyak struktur sinar-X PR HIV-1 kompleks dengan berbagai macam inhibitor, fragmen Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27' rata-rata mempunyai struktur yang identik dengan RMSD < 0,5. Nilai RMSD ini merupakan indikasi tidak langsung pada keadaan fragmen Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27' yang cenderung rigid [15]. Seperti yang telah dijelaskan pada **Gambar 4.18**, terjadi deformasi pada beberapa ikatan dan posisi atom dari keadaan semula. Dengan mengacu pada grafik **Gambar 4.14**, **4.15** dan

4.16, dapat disimpulkan bahwa model PR II mempunyai struktur yang stabil dan *reasonable*.

Secara keseluruhan, berdasarkan analisis struktural dan energetik yang telah dilakukan, hasil yang diperoleh dalam simulasi ini konsisten dengan kajian teoretik [15, 42] dan eksperimental [15, 43]. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa model PR II merupakan model yang valid untuk digunakan sebagai representasi dari model interaksi molekuler antara PR HIV-1 dengan SQV. Seluruh simulasi yang akan dilakukan pada tahap berikutnya akan mengadopsi model PR II sebagai platform utamanya.

4.5 Metode MDS

Untuk mengetahui efek mutasi yang muncul pada DY_1 maka simulasi dilakukan dalam dua tahap yaitu karakterisasi interaksi HXB2 terhadap SQV dan DY_1 terhadap SQV. **Gambar 4.19** menunjukkan diagram simulasi MDS.



Gambar 4.18 Diagram simulasi B + SQV dan DY_1 + SQV.

Simulasi dilakukan dengan software HyperChem 8.0.3 yang dijalankan pada *single computer* Intel Core™ 2 Duo, 3,73 GHz dengan RAM 2,43 GB. Tahap-tahap simulasi dilakukan dengan langkah berikut:

1. PR HIV-1 kompleks dengan SQV diambil dari www.rcsb.org kode 1HXB. Molekul H₂O dihilangkan dari struktur 1HXB menggunakan perangkat lunak HyperChem 8.0.3 Validasi hasil modifikasi dicek dengan perangkat lunak VMD 1.8.6 [44] dan GROMACS 3.3.1 [45] yang terinstal di laboratorium paralel komputer (inheren GRID Universitas Indonesia), Fakultas Ilmu Komputer, Universitas Indonesia.
2. Untuk memperoleh struktur virus DY₁ digunakan perbandingan hasil mutasi asam amino DY₁ yang diolah menggunakan program Matlab 7.0 dan HIVdb program Stanford University (www.hivdb.stanford.edu). Template 1HXB kemudian dimutasikan berdasarkan data protein DY₁. Seluruh asam amino diset dalam polarisasi *Levo*. Mutasi dilakukan dengan HyperChem 8.0.3 yang diikuti dengan pengecekan validasi struktur menggunakan perangkat lunak RasTop dan VMD 1.8.6.
3. Parameterisasi molekul SQV dilakukan di server Dundee University (www.davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/) [46]. Parameterisasi dilakukan dengan cara sebagai berikut:
 - Molekul SQV di"copot" dari PR HIV-1 (HXB2 dan DY₁). Data topologi SQV diedit menggunakan teks editor (dapat menggunakan Words atau notepad) untuk mengecek apakah terdapat data-data topologi yang *error* meliputi kode atom, ikatan antar atom, dan nama residu.
 - Data topologi SQV yang baru kemudian diolah di server.

- Data topologi SQV yang telah diparameterisasi kemudian di”pasang” kembali ke struktur topologi B dan SQV.

Setelah struktur data input diperbaiki kembali maka simulasi siap dijalankan.

Simulasi MDS dilakukan dengan parameter sebagai berikut:

☞ Minimisasi energi

Untuk menghilangkan *bad contact*, minimisasi energi mula-mula dilakukan dengan algoritma *steepest descent*, dengan jumlah step 32.767, dengan batas maksimum konvergensi 1 kJ/mol. Minimisasi dilanjutkan dengan algoritma Polak-Rieberre sebanyak 32.767 step. Batas nilai konvergensi diperkecil menjadi 0,1 kJ/mol. Parameter *Force Field* yang digunakan adalah AMBER 99 yang antara lain berisi:

- Interaksi *bond stretching* (E_{str}) orde 2.
- Interaksi *bending* (E_{bend}) orde 2.
- Interaksi *out of plane* (E_{oop}), improper torsional angle.
- Interaksi van der Waals (E_{vdw}), LJ^{12-6} dan LJ^{12-10} .
- Interaksi elektrostatik, (E_{el}).

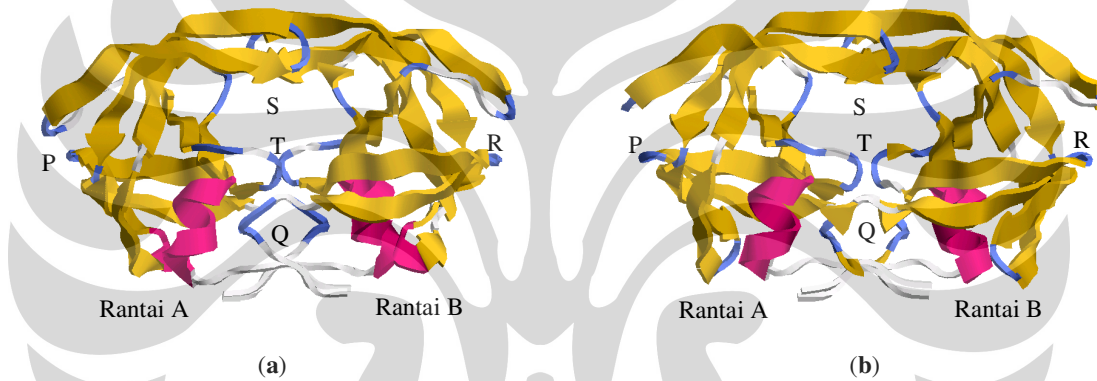
Model interaksi elektrostatik yang digunakan adalah *cut-off* dengan spesifikasi nilai $r_{in} = 10 \text{ \AA}$ dan $r_{out} = 14 \text{ \AA}$.

☞ Simulasi MDS

Algoritma yang digunakan adalah *Leap-frog* dengan periode 2 fs selama 1.060 ps. Sistem mula-mula dipanaskan dari suhu 0 K hingga suhu 300 K

selama 60 ps, selanjutnya sistem disimulasikan pada suhu konstan 300 K selama 1.000 ps (fase ekuilibrium). Model interaksi elektrostatik yang digunakan adalah *Cut-off* dengan batas nilai nilai $r_{in} = 10 \text{ \AA}$ dan $r_{out} = 14 \text{ \AA}$. Parameter *force field* yang digunakan adalah AMBER 99, seperti yang telah dijelaskan pada proses minimisasi energi.

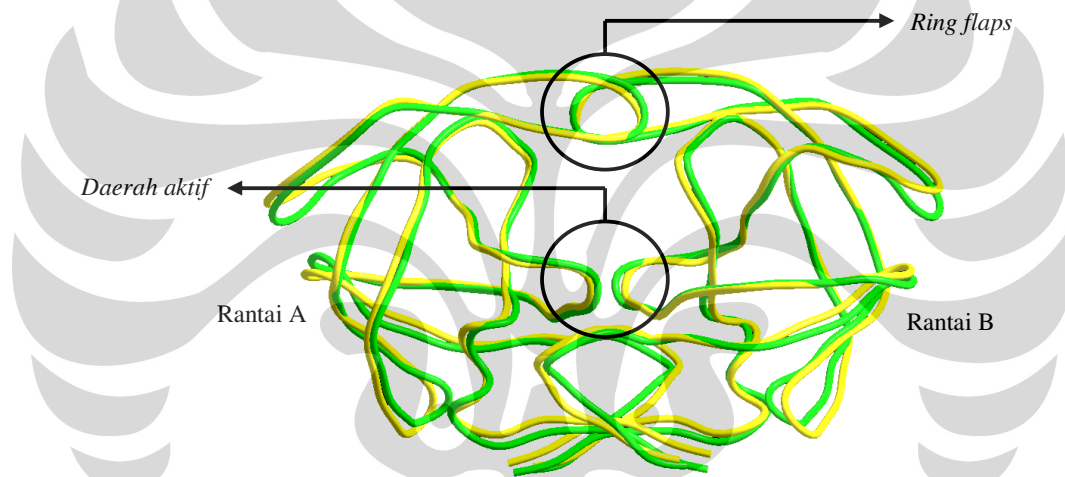
4.5.1 Analisis Hasil Minimisasi Struktur HXB2 dan DY₁



Gambar 4.19 Struktur PR HIV-1 setelah minimisasi (a) HXB2 dan (b) DY₁

Masing-masing struktur diminimisasi dalam keadaan kompleks dengan SQV dengan kondisi lingkungan vakum. Dengan membandingkan struktur (a) dan (b), secara sekilas tampak terjadi perubahan yang cukup signifikan di beberapa tempat khususnya pada daerah P, Q, R, S, dan T. Pada *backbone* P dan R DY₁ terjadi perubahan orientasi *backbone* menjadi sedikit lebih tinggi dibanding posisi sebelumnya. Demikian juga pada daerah T yang notabeneanya merupakan daerah aktif enzim, masing-masing *backbone* mengalami pergeseran saling menjauh satu sama lain yang menandakan telah terjadi konformasi yang memberikan pengaruh

signifikan terhadap aktivitas biologis daerah aktif tersebut. Daerah T pada DY_1 rantai B telah terjadi konformasi struktur tertier protein dari heliks menjadi sheet yang memberikan efek terhadap berkurangnya fleksibilitas struktur pada daerah tersebut. Demikian juga pada daerah Q walaupun secara struktural terletak cukup jauh dari daerah aktif enzim. Perubahan juga teramati pada *ring flaps* yaitu pada daerah S. Dengan membuat *fitting* kedua struktur di atas dapat diamati dengan lebih jelas perbedaan struktur antara HXB2 dan DY_1 seperti terlihat pada **Gambar 4.20**.



Gambar 4.20 *Fitting backbone* DY_1 terhadap HXB2, warna hijau menunjukkan *backbone* HXB2 sedangkan warna kuning menunjukkan DY_1 .

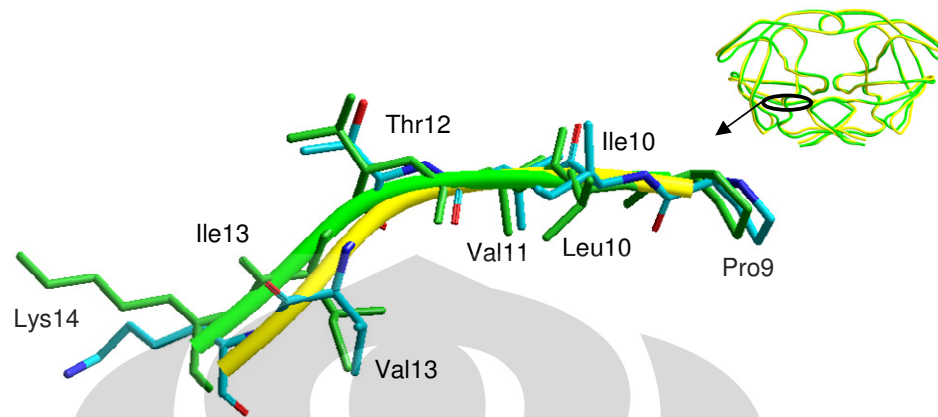
Asam amino–asam amino yang mengalami mutasi mempunyai karakteristik rantai samping yang berbeda–beda. Dari 12 mutasi yang terjadi hanya terdapat satu mutasi yang residu asam amino substituenya mengalami perubahan polaritas yaitu mutasi pada posisi 16, Gly yang bersifat non–polar berubah menjadi Glu yang bersifat polar. Perubahan polaritas rantai samping menyebabkan konformasi yang berpengaruh langsung terhadap struktur tertier

protein. Hal ini dikarenakan rantai samping dari asam amino pembentuk protein merupakan faktor penentu bentuk struktur tertier dari protein tersebut. Dari sudut pandang fisika, perubahan struktur tersebut dapat dipahami sebagai perubahan medan gaya yang muncul dalam sistem. Dalam level molekuler, medan gaya merupakan interaksi interatomik yang muncul antara satu residu dengan residu yang lain sehingga dalam konteks konformasi struktur tertier suatu protein konsep korelasi medan gaya dan struktur ruang dapat diterapkan yaitu medan gaya berpengaruh langsung terhadap struktur ruang yang terbentuk dan sebaliknya. Berikut ini adalah data–data mutasi asam amino beserta karakteristiknya:

Tabel 4.4 Mutasi asam amino beserta karakteristiknya.

Asam Amino	Posisi	Mutasi	Polaritas
Leusin (L)	10	Isoleusin (I)	Non Polar → Non Polar
Isoleusin (I)	13	Valin (V)	Non Polar → Non Polar
Glisin (G)	16	Glutamat (E)	Non Polar → Polar
Lisin (K)	20	Arginin (R)	Polar → Polar
Glutamat (E)	35	Aspartat (D)	Polar → Polar
Metionin (M)	36	Isoleusin (I)	Non Polar → Non Polar
Arginin (R)	41	Lisin (K)	Polar → Polar
Isoleusin (I)	62	Valin (V)	Non Polar → Non Polar
Histidin (H)	69	Lisin (K)	Polar → Polar
Valin (V)	77	Isoleusin (I)	Non Polar → Non Polar
Leusin (L)	89	Metionin (M)	Non Polar → Non Polar
Leusin (L)	97	Isoleusin (I)	Non Polar → Non Polar

1. L10I dan I13V



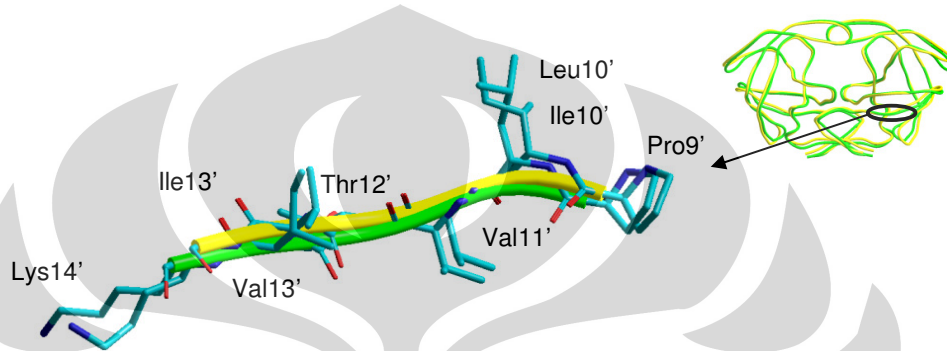
Gambar 4.21 *Fitting* mutasi L10I dan I13V DY_1 relatif terhadap HXB2 pada rantai A.

Mutasi yang muncul berada pada posisi 10 dan 13 yaitu L10I dan I13V. Pada mutasi L10I, terjadi perubahan asam amino dari leusin (non polar) menjadi isoleusin (non polar) sedangkan mutasi I13V terjadi perubahan asam amino isoleusin (non polar) berubah menjadi valin (non polar). Secara struktural, komposisi rantai samping leusin sama dengan isoleusin. Kedua asam amino tersebut memiliki berat molekul rata-rata yang sama yaitu 131,18 Da. Pada **Gambar 4.21** terlihat bahwa tidak terjadi perubahan yang signifikan pada *backbone* residu Pro9–Val11. Efek interaksi interatomik tidak cukup besar untuk mengubah stuktur sekunder protein. Rantai samping dari dua residu terdekat juga tidak mengalami perubahan posisi yang berarti sehingga dapat disimpulkan bahwa mutasi L10I tidak memberikan efek lokal yang signifikan.

Berbeda dengan mutasi yang terjadi pada posisi 13 yaitu isoleusin (non polar) yang disubstitusi dengan valin (non polar). Terlihat bahwa telah terjadi

pergeseran posisi *backbone* yang cukup signifikan sebesar 1,54 Å tepat pada ujung residu Lys14. Jarak diukur dari C_{α} Lys14_{DY₁} terhadap C_{α} Lys14_{HXB2}.

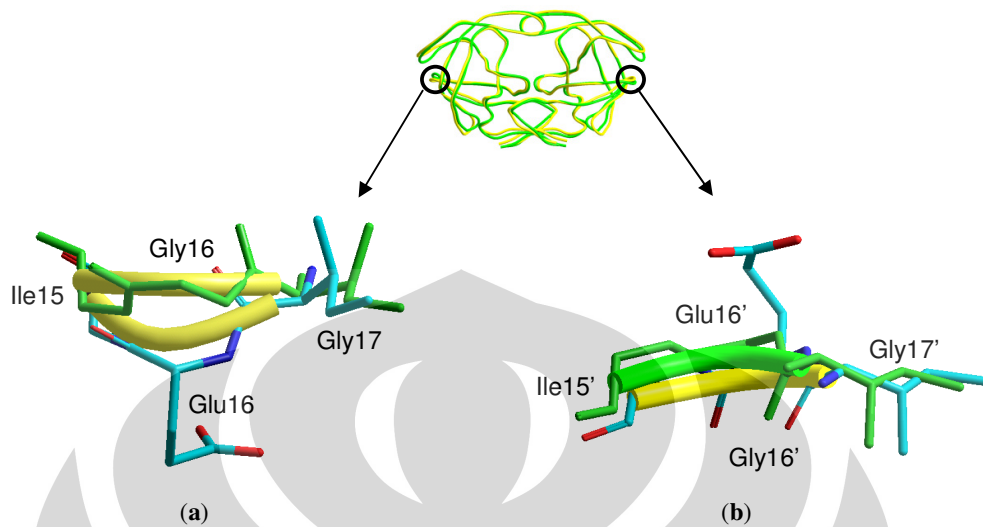
Pada rantai B konformasi yang terjadi pada DY₁ tidak terlalu berbeda dengan struktur pada HXB2 seperti terlihat pada **Gambar 4.22**.



Gambar 4.22 Fitting mutasi L10I DY₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai B.

Energi ikat total residu Pro9–Val11 DY₁ rantai A sebesar –9.609,012 kcal/mol atau 278 kcal/mol lebih tinggi dibanding energi ikat total residu Pro9–Val11 HXB2. Sedangkan pada rantai B energi ikat total residu sebesar –9.609,77 kcal/mol atau naik sebesar 2,8 % dari energi pada HXB2. Menurunnya energi ikat lokal pada tiap–tiap *triple* residu dikarenakan pergeseran residu Lys14 baik pada rantai A maupun rantai B dan munculnya mutasi yang menyebabkan konfigurasi rantai samping tiap–tiap residu berubah secara struktur dan energetik. selain itu, menurunnya energi ikat lokal rata–rata memberikan tanda bahwa struktur DY₁ lebih labil dibanding struktur HXB2.

2. G16E

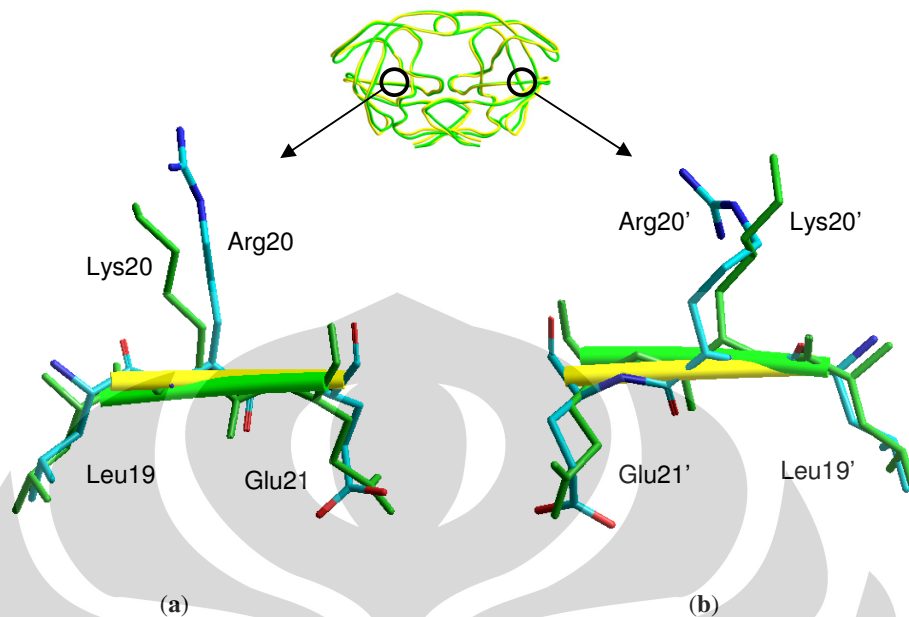


Gambar 4.23 *Fitting* mutasi G16E DY₁ relatif terhadap HXB2 **a)** rantai A dan **b)** rantai B.

Mutasi yang terjadi pada posisi 16 dan 16' tidak memberikan efek lokal yang signifikan khususnya pada rantai B. Pada rantai A teramati terjadi pergeseran alur *backbone* sejauh 2,34 Å relatif terhadap *backbone* mula-mula. Pergeseran diukur dengan acuan atom Ca dari tiap-tiap residu. Secara energetik, substitusi asam amino glisin menjadi glutamin menyebabkan penurunan energi ikat yang cukup besar yaitu -781,47 kcal/mol pada rantai A dan -780,45 kcal/mol pada rantai B, menjadikan struktur lokal menjadi lebih stabil dari sebelumnya.

3. K20R

Tidak terjadi konformasi struktur yang esensial akibat mutasi yang muncul pada posisi 20, seperti terlihat pada gambar berikut ini:



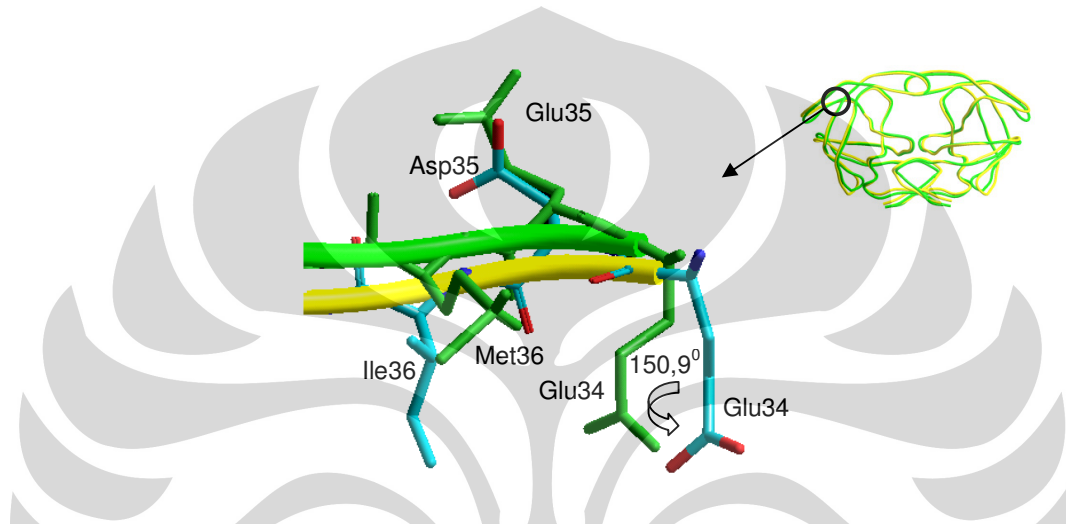
Gambar 4.24 *Fitting* mutasi K20R DY₁ relatif terhadap HXB2, **a)** Rantai A dan **b)** Rantai B.

Secara energetik, terjadi penurunan energi ikat yang terhitung cukup besar yaitu $-197,34$ kcal/mol pada rantai A dan $-201,41$ kcal/mol pada rantai B. Beda energi sebesar $4,07$ kcal/mol antara rantai A dan rantai B lebih dipengaruhi keadaan rantai samping pada residu Arg20 dan Arg20'. Pada residu Arg20 posisi rantai samping terlihat linier yang menyebabkan interaksi interatomik terhadap rantai samping residu tetangga (dua residu terdekat yang terletak pada satu alur *backbone*) menjadi kecil. Lain halnya dengan rantai samping pada residu Arg20' yang cenderung tidak linier, menyebabkan jarak antar atom relatif terhadap rantai samping residu tetangga menjadi lebih dekat sehingga interaksi interatomik menjadi lebih kuat.

Berdasarkan data dari HIVdb program, Stanford University, mutasi pada posisi 20 dari asam amino lisin menjadi arginin memberikan pengaruh yang

relatif kecil terhadap resistensi virus terhadap obat–obat ARV. Mutasi pada posisi ini lebih sering muncul pada virus sub tipe selain B dan biasanya muncul dalam berbagai variasi mutasi antara lain K20R/M/I/T [34].

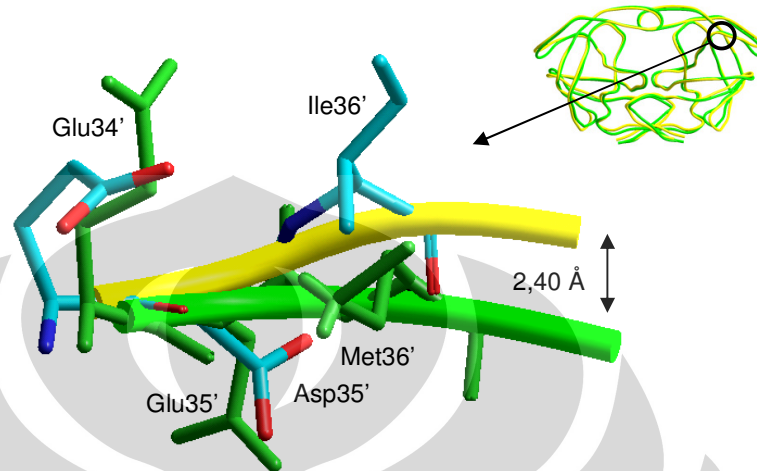
4. E35D dan M36I



Gambar 4.25 *Fitting* mutasi E35D DY₁ dan M36I relatif terhadap HXB2 rantai A.

Mutasi pada asam amino glutamat (polar) pada posisi 35 menjadi aspartat (polar) yang bersebelahan dengan asam amino metionin (non polar) pada posisi 36 menjadi isoleusin (non polar) menghasilkan konformasi struktur yang cukup signifikan seperti terlihat pada **Gambar 4.25**. Rantai samping asam amino glutamate pada posisi 34 mengalami rotasi sebesar $150,9^{\circ}$ yang menyebabkan perubahan mode *backbone* bergeser melebar dari posisi sebelumnya. Secara energetik, energi ikat lokal residu Glu34–Ile36 turun sebesar 0,01 kcal/mol dari energi ikat lokal sebelumnya yaitu $-6.175,63$ kcal/mol membentuk struktur yang lebih stabil. Pola interaksi antara residu Glu34 (polar), Asp35 (polar) dan Ile36 (non polar) tidak jauh berbeda dengan

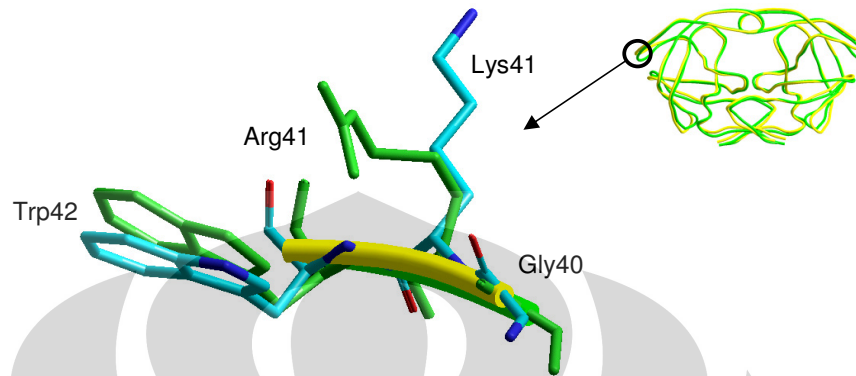
residu Glu34 (polar), Glu35 (polar) dan Met36 (non polar) yang sama-sama membentuk struktur heliks.



Gambar 4.26 *Fitting* mutasi E35D DY₁ dan M36I relatif terhadap HXB2 rantai B.

Pada rantai B DY₁ terjadi konformasi yang cukup mencolok pada residu Glu34 yaitu rotasi rantai samping sebesar $83,74^{\circ}$ relatif terhadap atom C–C dan mengalami perubahan bidang lebih dari 90° relatif terhadap posisi mula-mula. Efek mutasi yang lebih besar teramati pada residu Asp35–Asn37 yang menyebabkan perubahan *backbone* sehingga melebar dalam orde 2,40 Å. Namun demikian perubahan secara struktural baik pada rantai A maupun rantai B muncul secara koheren hanya saja perbedaan energi interaksi yang cukup besar terjadi pada rantai B. Energi ikat lokal rata-rata naik sebesar 401,34 kcal/mol. Dibandingkan dengan perubahan yang terjadi pada rantai A, beda energi yang cukup besar pada rantai B diperkirakan karena terjadi interaksi jarak jauh dengan residu–residu tetangganya. Untuk mengetahui konformasi lokal ini secara mendetail perlu dilakukan studi lebih lanjut.

5. R41K

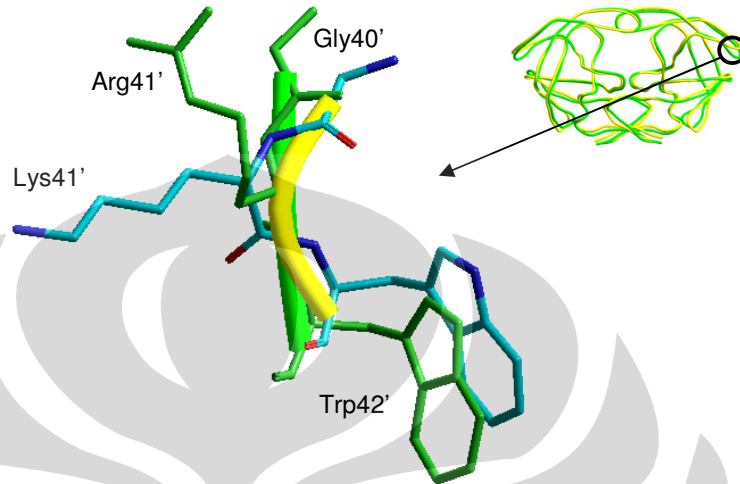


Gambar 4.27 *Fitting* mutasi R41K DY₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai A.

Asam amino arginin dan lisin merupakan asam amino yang sama-sama mempunyai rantai samping polar dan bersifat basa, bedanya adalah rantai samping arginin memiliki tingkat keasaman yang lebih rendah dibanding lisin. Massa residu arginin adalah sekitar 174,20 Da, 16,1% lebih berat dibanding massa residu lisin. Pengamatan terhadap struktur Gly40 dan Trp42 menunjukkan bahwa mutasi R41K tidak memberikan efek lokal yang besar walaupun secara energetik perubahan energi ikat *triple* residu Gly40–Arg41–Trp42 HXB2 relatif terhadap Gly40–Lys41–Trp42 DY₁ meningkat dalam orde yang cukup besar yaitu 192,34 kcal/mol. Secara struktural, efek intrinsik justru muncul pada rantai samping residu Lys41 yang cenderung bergeser menjauh relatif terhadap rantai samping dua residu tetangganya.

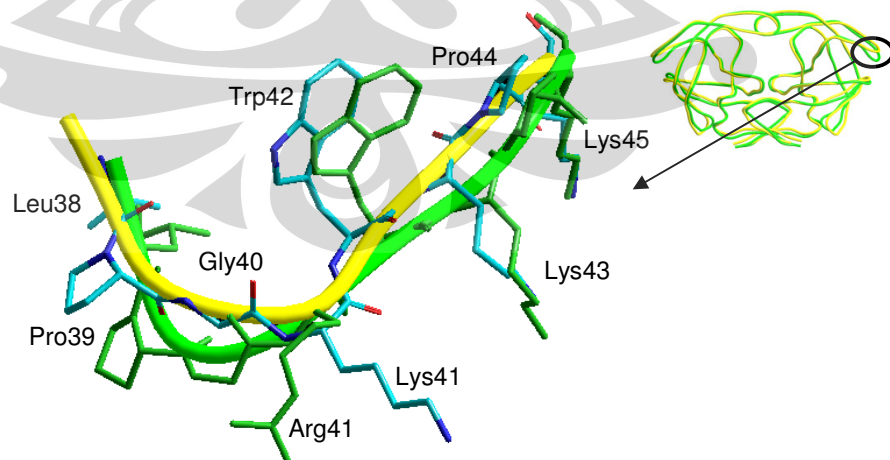
Pada rantai B terjadi perubahan alur *backbone* yang muncul pada residu Gly40'–Lys41'–Trp42' DY₁ relatif terhadap Gly40'–Arg41'–Trp42' HXB2.

Ujung–ujung residu Gly40' dan Trp42' bergeser masing–masing sejauh 1,23 Å dan 1,26 Å relatif terhadap masing masing atom Ca tiap–tiap residu.



Gambar 4.28 *Fitting* mutasi R41K DY₁ relatif terhadap HXB2 pada rantai B.

Seperti halnya pada rantai A, energi ikat lokal rata–rata pada DY₁ naik menjadi $-5.484,15$ kcal/mol dari energi ikat lokal mula–mula pada HXB2 sebesar $-5.677,18$ kcal/mol. Perubahan alur *backbone* diperkirakan karena pengaruh langsung dari mutasi pada posisi 41'.

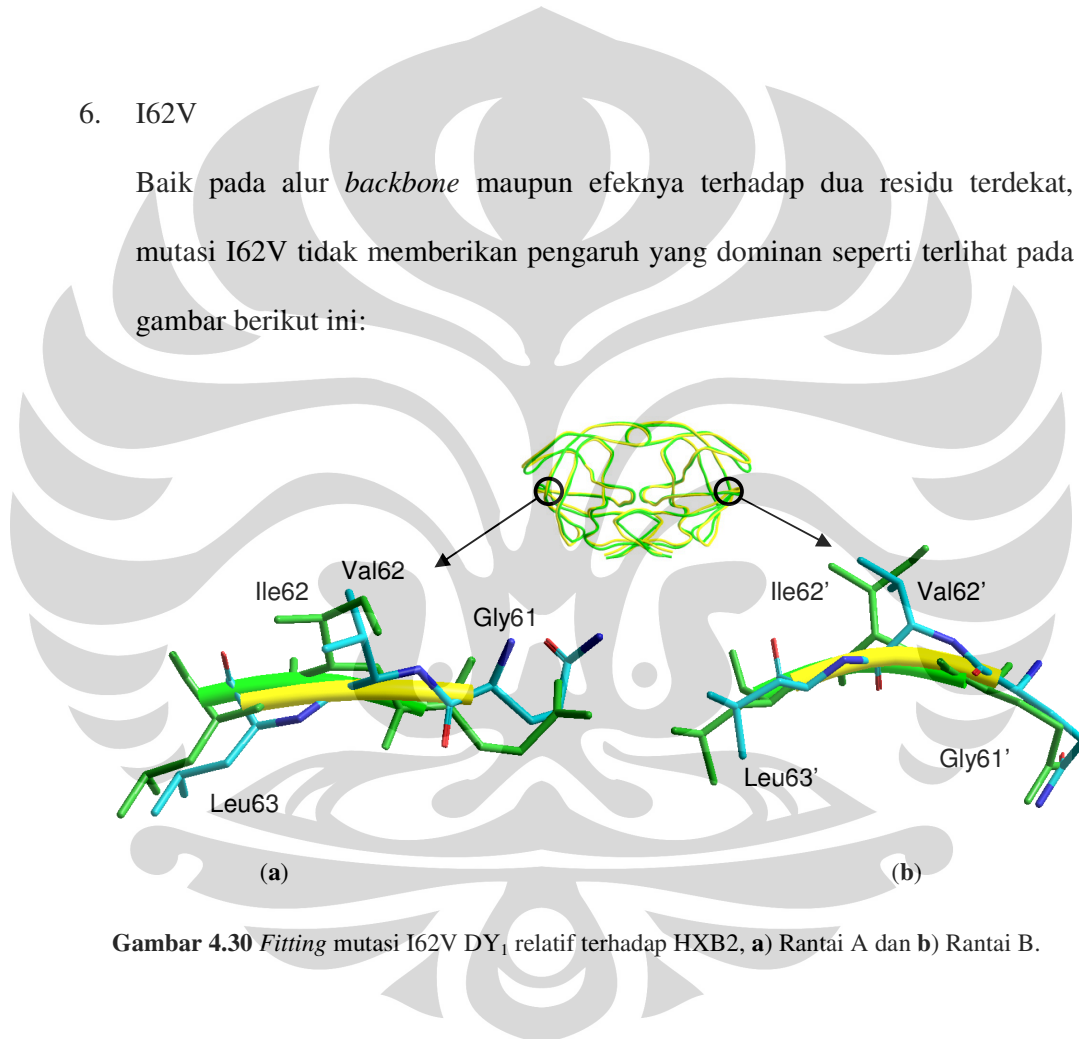


Gambar 4.29 *Fitting* residu nomor 41'±4' DY₁ relatif terhadap HXB2.

Seperti yang telah dijelaskan pada analisis mutasi R41K, residu arginin dan lisin mempunyai karakteristik kimiawi yang berbeda yang secara langsung berpengaruh terhadap struktur yang terbentuk. Sebenarnya efek mutasi pada posisi 41' juga muncul pada residu nomor 41'±4' seperti tampak pada **Gambar 4.29**.

6. I62V

Baik pada alur *backbone* maupun efeknya terhadap dua residu terdekat, mutasi I62V tidak memberikan pengaruh yang dominan seperti terlihat pada gambar berikut ini:



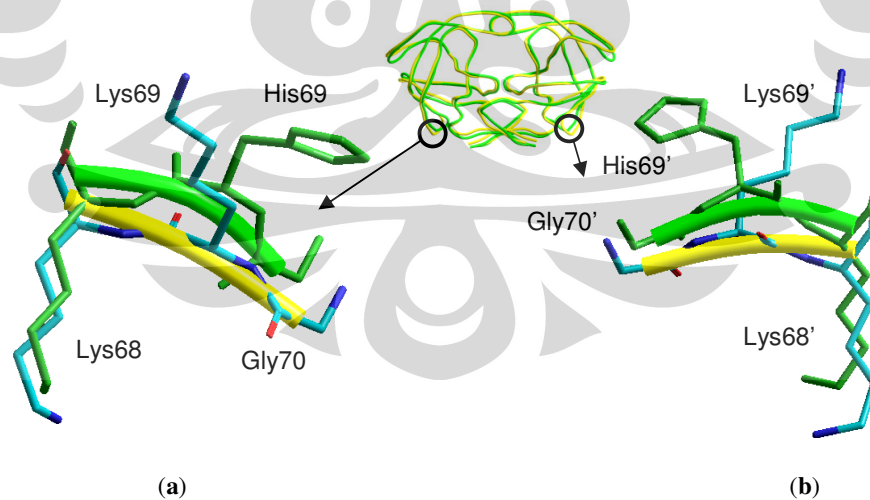
Gambar 4.30 *Fitting* mutasi I62V DY₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B.

Mutasi pada residu 62 ini cenderung bersifat polimorfis dan memberikan pengaruh terhadap penurunan sensitivitas virus terhadap obat ARV, terutama ATV, dalam orde yang sangat lemah. Secara energetik, substitusi isoleusin yang bersifat non polar dengan valin yang juga bersifat non polar

menyebabkan perubahan energi ikat lokal naik sebesar 112,80 kcal/mo pada rantai A sedangkan pada rantai B justru mengalami penurunan energi sebesar -278,86 kcal/mol. Beda energi ikat antara rantai A dan rantai B sebesar 391,66 kcal/mol disebabkan karena perbedaan konfigurasi interaksi gugus samping residu Gly61' relatif terhadap residu Gly61. Diperkirakan, efek residu-residu tetangga memberikan pengaruh yang cukup besar pada perubahan energi yang tidak simetris ini.

7. H69K

Dihadapkan pada treatment menggunakan TPV, mutasi pada posisi 69 tidak memberikan efek peningkatan resistensi virus terhadap TPV. Hasil simulasi kompleks dengan SQV menunjukkan bahwa mutasi pada posisi 69 menyebabkan konformasi lokal yang cukup signifikan seperti terlihat pada **Gambar 4.31**.

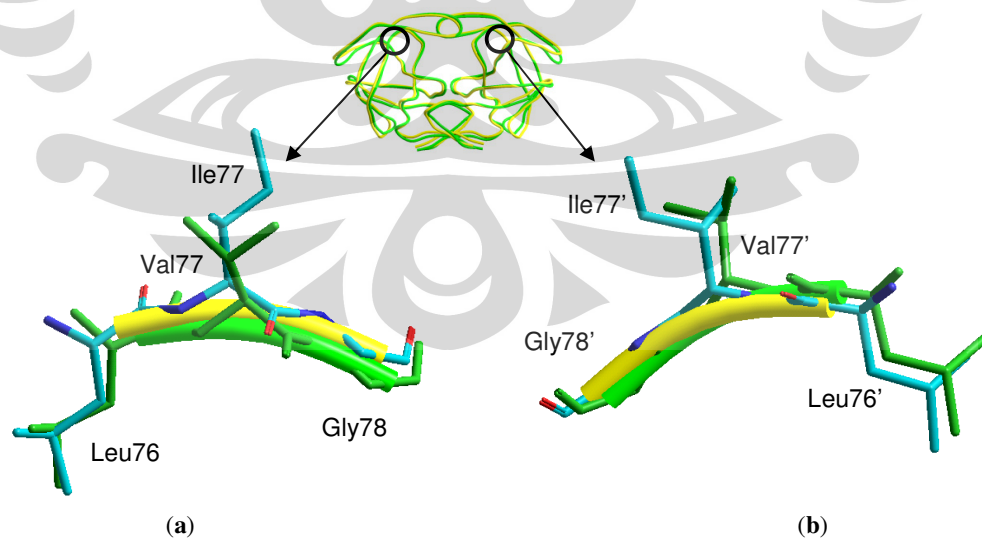


Gambar 4.31 *Fitting* mutasi H69K DY₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B.

Alur *backbone* tidak mengalami perubahan yang mencolok hanya saja telah terjadi pergeseran dalam orde yang cukup besar terutama pada rantai A. Pergeseran yang muncul diukur dari atom $C\alpha$ pada residu His69 relatif terhadap atom $C\alpha$ pada residu Lys69 sebesar 1,67 Å sedangkan pergeseran yang lebih kecil muncul pada rantai B sebesar 1,65 Å diukur dari $C\alpha'$ residu His69' terhadap $C\alpha'$ residu Lys69'. Energi ikat lokal rantai A dan B pada HXB2 masing-masing sebesar -4.630,60 kcal/mol atau 3,8% lebih rendah dibanding energi ikat lokal rata-rata rantai A DY_1 dan -4.439,79 kcal/mol atau 8,3% lebih rendah dibanding energi ikat lokal rata-rata rantai B DY_1 .

8. V77I

Mutasi pada posisi 77, V77I, dikenali sebagai mutasi yang bersifat polimorfis yang biasa muncul pada treatment menggunakan NFV. Berdasarkan studi yang pernah dilakukan, mutasi V77I tidak memberikan pengaruh sama sekali terhadap resistensi virus.

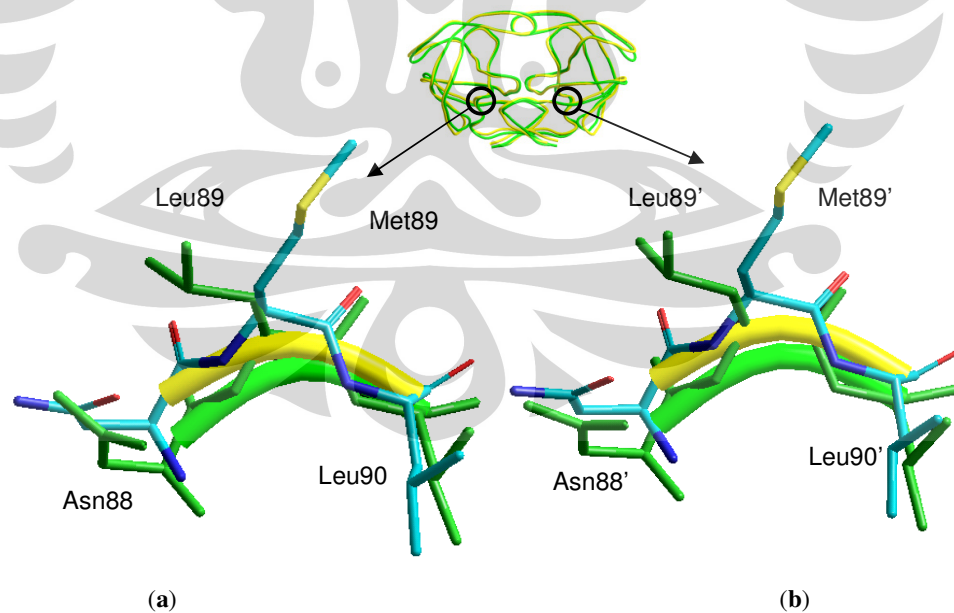


Gambar 4.32 *Fitting* mutasi V77I DY_1 relatif terhadap HXB2, **a)** Rantai A dan **b)** Rantai B.

Dilihat dari letaknya pada struktur global PR HIV-1, residu nomor 77 berada pada daerah yang dekat dengan *hot spot* ikatan antara inhibitor dengan sisi aktif enzim. Namun karena residu 77 membentuk struktur sheet yang cenderung “kaku” maka perubahan-perubahan yang terjadi akibat mutasi pun tidak terlalu esensial seperti terlihat pada **Gambar 4.32**.

Perubahan energi ikat lokal rata-rata akibat mutasi pada posisi 77 adalah sebesar $-276,26$ kcal/mol pada rantai A dan $-277,33$ kcal/mol. Perbedaan antara perubahan energi pada rantai A dan B yang cukup kecil, $1,07$ kcal/mol, memberikan indikasi tidak langsung bahwa konformasi yang muncul pada rantai A identik dengan rantai B.

9. L89M

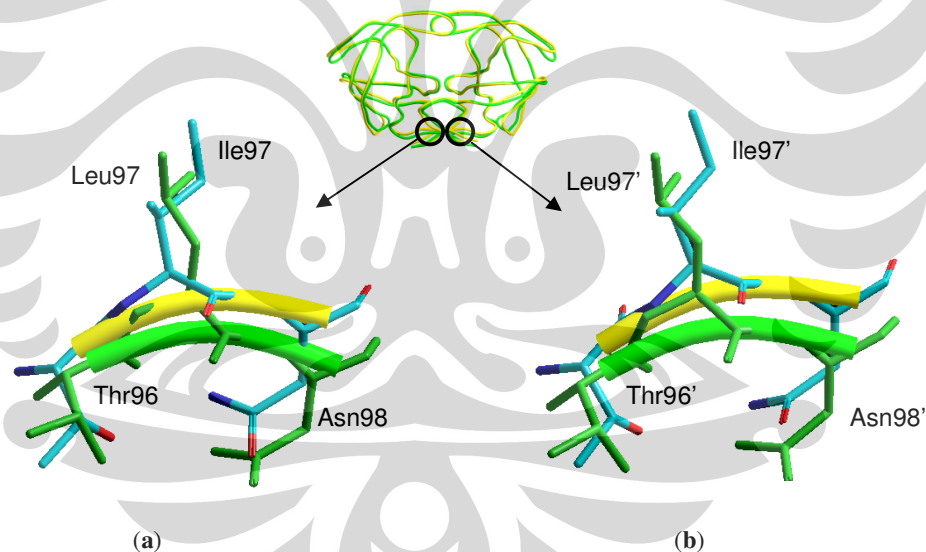


Gambar 4.33 *Fitting* mutasi L89M DY_1 relatif terhadap HXB2, **a)** Rantai A dan **b)** Rantai B.

Bersama–sama dengan 8 residu lainnya, nomor 85–93 pada masing–masing monomer, residu Leu89 membentuk struktur tertier α –silinder. Konformasi yang terjadi tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap khususnya struktur global α –silinder yang dibentuk.

Perubahan energi ikat antara triple residu pada rantai A dan B hanya berselisih 0,98 kcal/mol. Walau demikian, mutasi yang muncul pada posisi 89 menyebabkan energi ikat naik sebesar masing 226,65 kcal/mol pada rantai A dan 225,67 pada rantai B.

10. L97I



Gambar 4.34 *Fitting* mutasi V97I DY₁ relatif terhadap HXB2, a) Rantai A dan b) Rantai B.

Residu leusin yang bersifat non polar yang terletak pada posisi ke – 3 dari residu terakhir ini mengalami mutasi menjadi isoleusin yang juga bersifat non polar. Walaupun massa total residu leusin dan isoleusin sama namun

substitusi antara keduanya menyebabkan perubahan energi ikat yang cukup signifikan yaitu sebesar 9,21 kcal/mol pada rantai A dan 5,00 kcal/mol pada rantai B. Perbedaan perubahan energi pada kedua rantai menyebabkan konformasi struktur yaitu pergeseran posisi *backbone* pada rantai A sebesar 1,28 Å atau 0,02 Å lebih pendek dibanding pergeseran yang terjadi pada rantai B.

Secara keseluruhan, efek mutasi terhadap struktur global enzim sangat kompleks untuk dianalisis satu per satu. Asumsi yang digunakan pada analisis di atas adalah efek medan gaya terhadap struktur ruang molekul bersifat lokal. Definisi lokal sendiri adalah sistem yang menyertakan dua residu tetangga terdekat yang secara prinsip berinteraksi langsung dengan residu yang mengalami mutasi dan memberikan reaksi yang cenderung paling sensitif dibanding residu-residu di tempat lain. Untuk mengetahui secara komprehensif efek akumulatif dari mutasi yang terjadi diperlukan kajian lebih lanjut dengan pendekatan dan level teori yang lebih tinggi sehingga hasil yang diperoleh dapat memberikan prediksi aktivitas biologis enzim yang lebih representatif.

Tabel 4.5 menunjukkan data perubahan energi ikat lokal *triple* residu yang dihitung pada level teori semi-empirik dengan metode PM3 dan komponen *spin pairing* yang disesuaikan dengan keadaan sistem. Perhitungan dilakukan terhadap residu-residu yang mengalami mutasi dengan mengabaikan efek medan gaya total dari seluruh struktur global enzim.

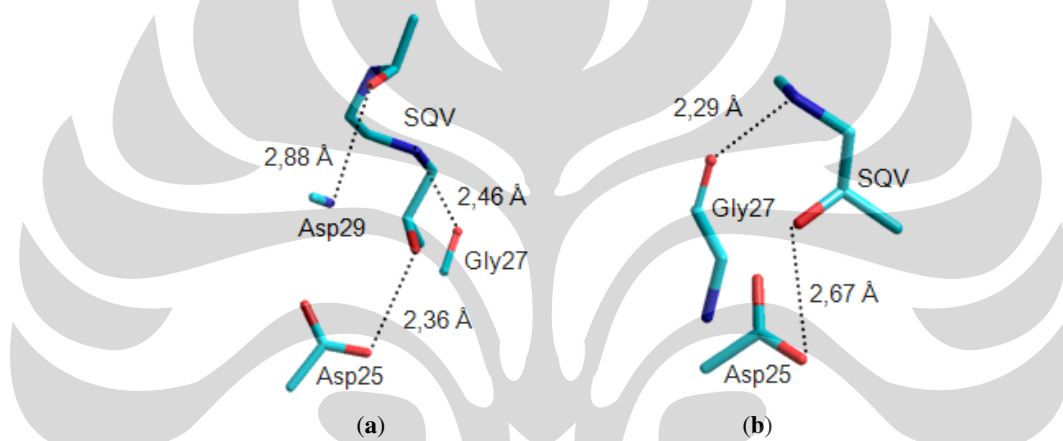
Tabel 4.5 Data perubahan energi ikat setiap mutasi pada HXB2 dan DY₁

Mutasi	Energi HXB2 (kcal/mol)		Energi DY ₁ (kcal/mol)		Δ Energi (kcal/mol)	
	A	B	A	B	A	B
L10I I13V	-9.887,12	-9.887,22	-9.609,02	-9.609,77	278,10	277,45
G16E	-3.334,52	-3.335,49	-4.115,99	-4.115,94	-781,47	-780,45
K20R	-5.455,67	-5.453,57	-5.653,01	-5.654,98	-197,34	-201,41
E35D M36I	-6.175,63	-6.174,22	-6.175,64	-5.774,30	-0,01	401,34
R41K	-5.679,12	-5.677,18	-5.486,78	-5.484,15	192,34	193,03
I62V	-5.272,54	-5.440,08	-5.159,74	-5.161,45	112,80	-278,86
H69K	-4.630,60	-4.439,79	-4.808,19	-4.806,42	-177,59	-366,63
V77I	-4.177,02	-4.174,91	-4.453,28	-4.452,24	-276,26	-277,33
L89M	-5.162,25	-5.162,63	-4.935,60	-4.936,96	226,65	225,67
L97I	-4.706,54	-4.706,25	-4.697,33	-4.701,25	9,21	5,00

Konformasi yang terjadi pada daerah aktif menyebabkan pola interaksi antara SQV dan protease berubah. Tiga ikatan hidrogen yang terbentuk antara SQV dengan residu Asp25, Gly27 dan Asp29 pada HXB2 menghasilkan kompleks yang cukup stabil dengan energi interaksi jarak jauh total keseluruhan molekul sebesar -1.044,4 kcal/mol. Pada DY₁ besar energi total interaksi jarak jauh menjadi -957,9 kcal/mol atau turun sebesar 8,28%. Penurunan ini disebabkan antara lain karena pergeseran atom-atom pada residu khususnya residu Asp25, Gly27 dan Asp29 yang mengakibatkan melebarnya jarak antara SQV dan residu-residu tersebut. Interaksi elektrostatik yang meningkat sebesar

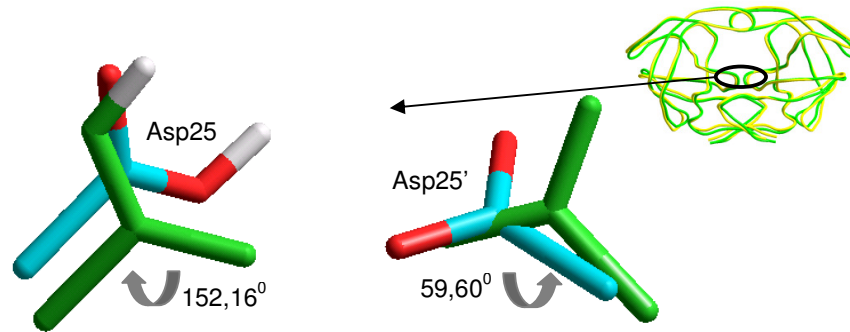
4,18% dari nilai semula yang hanya $-2.939,14$ kcal/mol ternyata lebih dominan sehingga ikatan hidrogen yang terbentuk antara SQV dan residu Asp25/Gly27/Asp29 berkurang dan menyisakan dua buah ikatan hidrogen saja pada residu Asp25 terprotonasi dan residu Gly27.

Dalam kaitannya dengan kestabilan struktur, HXB2 dan DY_1 yang masing-masing berikatan dengan SQV mempunyai tingkat kestabilan yang berbeda, seperti terlihat pada gambar berikut ini:



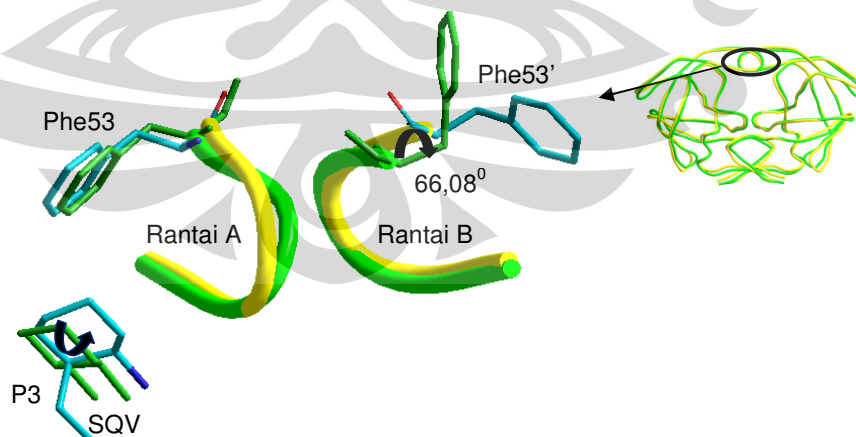
Gambar 4.35 Konformasi interaksi SQV terhadap (a) HXB2 dan (b) DY_1 .

Ikatan hidrogen yang terbentuk pada residu Asp25 dengan gugus OH SQV melebar sejauh $0,31$ Å menjadi $2,67$ Å. Perubahan jarak juga terjadi pada ikatan hidrogen antara residu Gly27 dengan atom NH SQV yang memendek sebesar $0,17$ Å dari jarak sebelumnya. Perubahan pola interaksi tersebut menyebabkan konformasi pada SQV dan Asp25/25'. Seperti terlihat pada **Gambar 4.36**, hasil *fitting* sisi aktif DY_1 relatif terhadap HXB2 menunjukkan bahwa residu Asp25 mengalami rotasi sebesar $152,16^\circ$ terhadap sumbu $C_\beta-C_\gamma$ sedangkan residu Asp25' berputar sebesar $59,60^\circ$ terhadap sumbu $C_\beta-C_\gamma$.



Gambar 4.36 Konformasi pada sisi aktif DY_1 relatif terhadap HXB2.

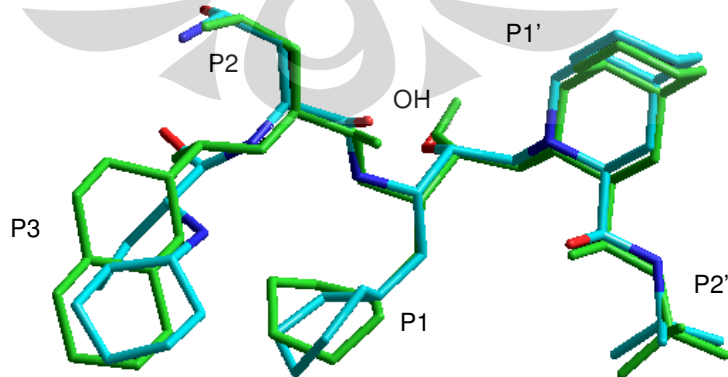
Normalnya, perubahan posisi yang terjadi pada rantai samping disebabkan karena interaksi terhadap rantai samping residu asam amino terdekat. Pada kasus konformasi yang muncul pada residu Asp25/25' DY_1 diperkirakan karena pengaruh akumulatif dari mutasi-mutasi yang terjadi, dengan kata lain mutasi-mutasi tersebut memberikan pengaruh yang bersifat tidak langsung terhadap konformasi pada residu Asp25/25'. Kesimpulan tersebut berdasarkan fakta bahwa residu-residu di sekitar Asp25/25' tidak mengalami mutasi. Residu yang mengalami mutasi justru berada di tempat-tempat yang jauh dari daerah aktif enzim.



Gambar 4.37 Konformasi pada ring flaps DY_1 relatif terhadap HXB2.

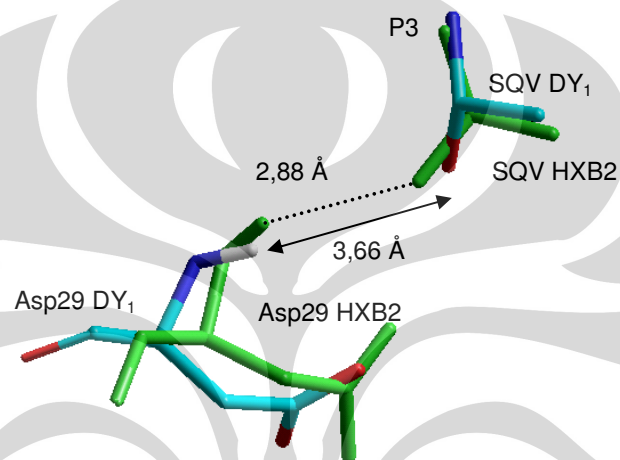
Daerah *hot spot* interaksi antara SQV dan PR HIV-1 dilingkupi kurang lebih 34 residu antara lain Asp25/25'-Asp30/30', Ile47/47'-Phe53/53', dan Pro80/80'-Gly84/84'. Ile47/47'-Phe53/53' terletak pada *ring flaps* enzim yang berperan secara langsung terhadap pengikatan SQV. Pada daerah ini juga terjadi perubahan struktur dan posisi yang cukup signifikan seperti terlihat pada **Gambar 4.37**.

Gugus samping residu Phe53' mengalami rotasi pada sumbu $C_{\beta}-C_{\gamma}$ sebesar $66,08^{\circ}$ dan juga bergeser sejauh $1,54 \text{ \AA}$ bersama-sama residu yang lain sehingga menyebabkan posisi *backbone* rantai B bergeser menjauh relatif terhadap *backbone* A. Yang cukup menarik adalah pergeseran yang terjadi pada residu Phe53. Jika diperhatikan dengan seksama pergeseran pada residu ini diikuti pula oleh pergeseran sub site P3 secara koheren, ketika Phe53 bergeser menjauh dari posisi semula sub site P3 juga mengalami pergeseran pada arah yang sama. Phe53 mengalami pergeseran sejauh $0,19 \text{ \AA}$ yang diikuti oleh SQV sehingga jarak atom terdekat antara Phe53 dan SQV yang semula $4,31 \text{ \AA}$ menjadi lebih dekat $0,74 \text{ \AA}$. SQV mengalami konformasi di beberapa bagian terutama sub site P1 dan P3, sedikit perubahan orientasi juga terjadi pada sub site P2 namun tidak memberikan pengaruh yang dominan terhadap struktur SQV secara global, seperti terlihat pada gambar berikut:



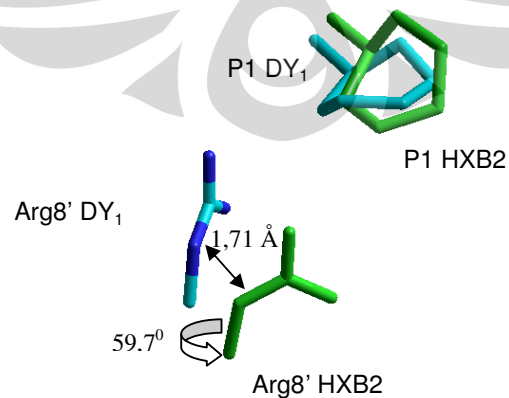
Gambar 4.38 Konformasi struktur SQV kompleks dengan HXB2 dan DY₁.

Perubahan yang cukup mencolok terjadi pada sub site P1 dan P3. Sub site P3 berdekatan dengan atom nitrogen yang mengikat hidrogen dan membentuk ikatan hidrogen dengan residu Asp29. Pergeseran yang terjadi pada Asp29 menyebabkan panjang ikatan hidrogen melebar menjadi 3,66 Å. Pelebaran ini mengakibatkan ikatan hidrogen terputus. Namun demikian sub site P3 dan gugus samping residu Asp29 tidak mengalami perubahan yang besar seperti terlihat pada **Gambar 4.39**.



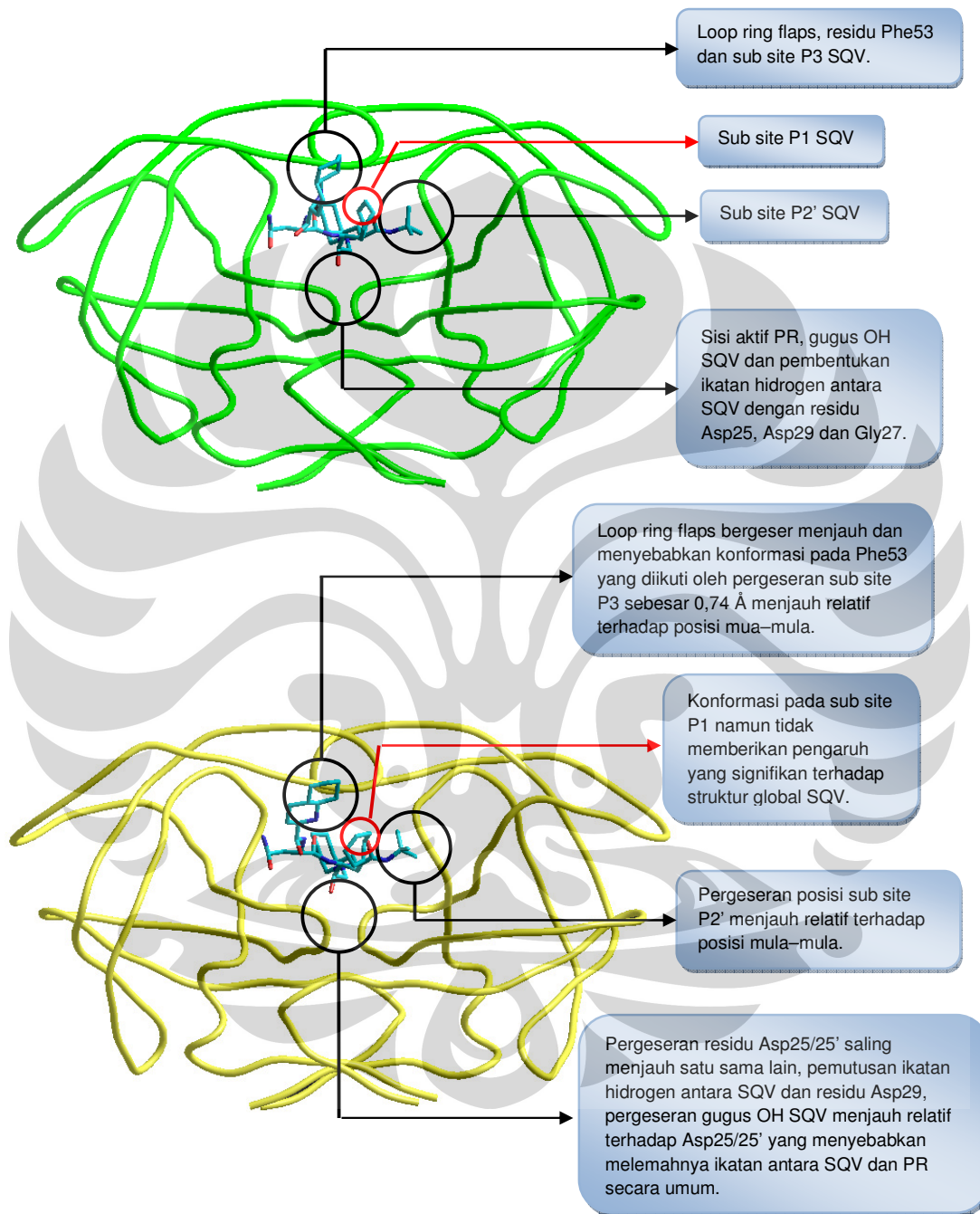
Gambar 4.39 Perubahan pola interaksi SQV terhadap Asp29 DY₁ relatif terhadap HXB2.

Pada sub site P1, konformasi pada residu Arg8' menyebabkan P1 berotasi sebesar 45,26° sedangkan residu Arg8' sendiri mengalami rotasi pada sumbu C–N sebesar 59,7° dan bertranslasi sejauh 1,71 Å.



Gambar 4.40 Perubahan pola interaksi sub site P1 SQV terhadap asam amino Arg8'.

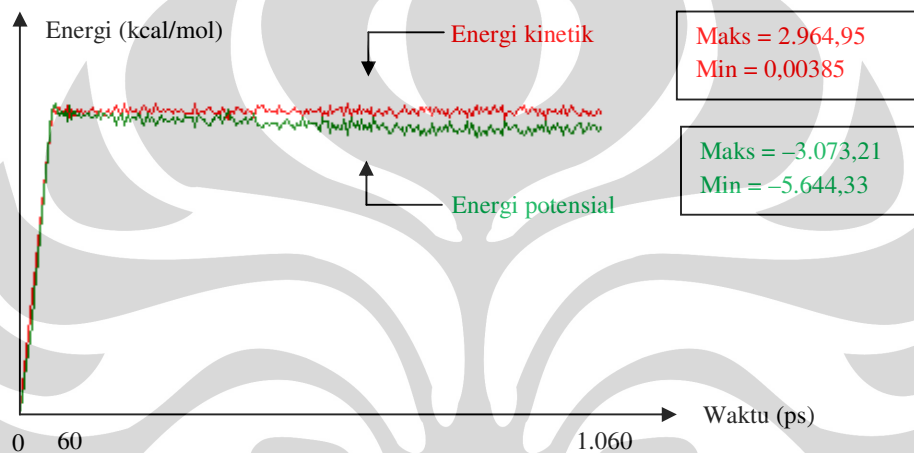
Mutasi yang muncul pada DY_1 secara keseluruhan menyebabkan konformasi struktur tertier seperti tampak pada **Gambar 4.41**.



Gambar 4.41 Perbandingan konformasi PR HIV – 1 kompleks dengan SQV pada a) HXB2 dan b) DY_1 .

4.5.2 Analisis Hasil Simulasi MDS HXB2 dan DY₁

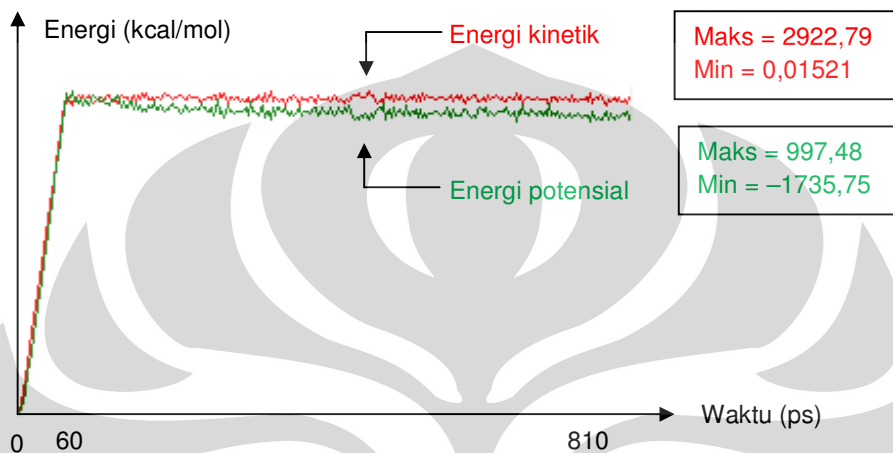
Simulasi HXB2 dan DY₁ dilakukan secara terpisah dengan parameter dan definisi variabel fisis yang sama. Hasil simulasi yang telah dilakukan menunjukkan kestabilan nilai energi selama 1.060 ps.



Gambar 4.42 Grafik energi potensial dan energi kinetik terhadap waktu selama 810 ps simulasi kompleks DY₁ dan SQV.

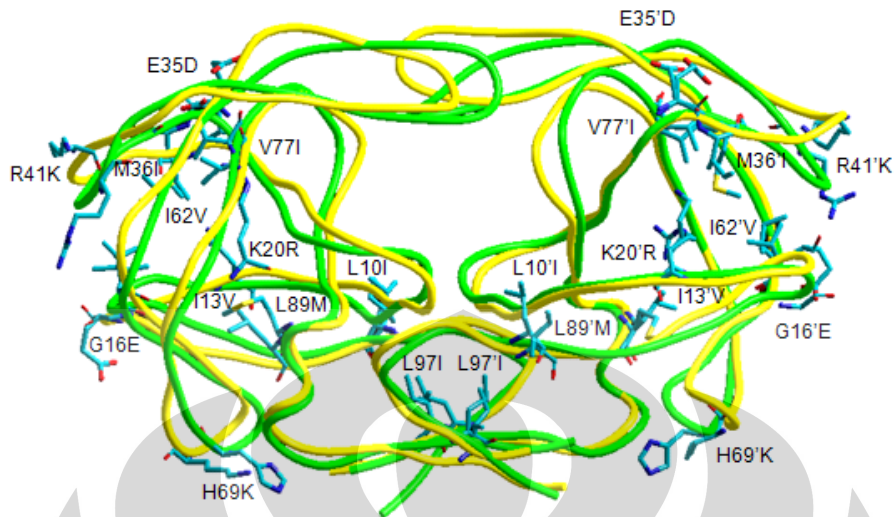
Pemanasan dilakukan pada tahap temperatur yang kecil yaitu 0, 2 K untuk menghilangkan *bad movement* dari atom-atom dalam sistem. Proses dilanjutkan pada fase ekuilibrium. Seperti terlihat pada grafik di atas, pada rentang waktu antara 60 – 810 ps (750 ps), energi potensial dan energi kinetik tidak mengalami fluktuasi yang besar dan cenderung stabil selama proses simulasi berlangsung. Hal ini menunjukkan bahwa sistem yang terdiri dari PR HIV-1 (DY₁) dan SQV berada dalam kondisi stabil. Demikian juga pada sistem HXB2, grafik energi

potensial dan energi kinetik terhadap waktu menunjukkan fluktuasi energi yang kecil dan selama fase ekuilibrium berlangsung energi potensial dan energi kinetik cenderung konstan seperti terlihat pada **Gambar 4.43**.



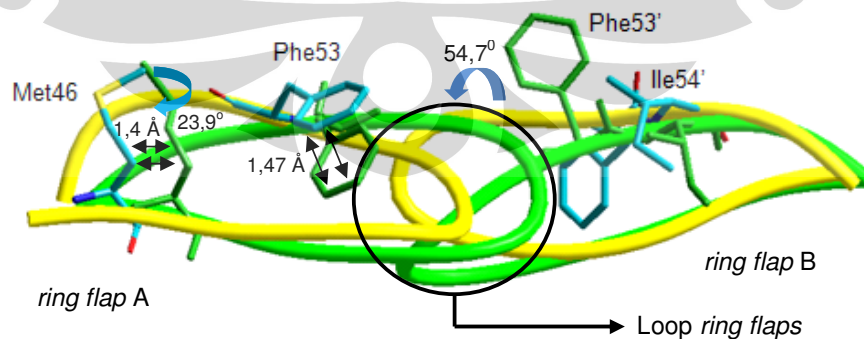
Gambar 4.43 Grafik energi potensial dan energi kinetik terhadap waktu selama 810 ps simulasi kompleks HXB2 dan SQV.

Konformasi struktur PR muncul pada daerah khususnya pada bagian yang terjadi mutasi. Untuk memudahkan identifikasi dan pengamatan maka pada **Gambar 4.44** ditampilkan *fitting* struktur HXB2 dan DY₁. Rendering warna kuning menunjukkan struktur PR DY₁ sedangkan warna hijau menunjukkan struktur PR HXB2. Residu yang ditampilkan hanya residu yang mengalami mutasi antara lain residu pada posisi 10, 13, 16, 20, 35, 36, 41, 62, 69, 77, 89, dan 97 pada tiap-tiap monomer.



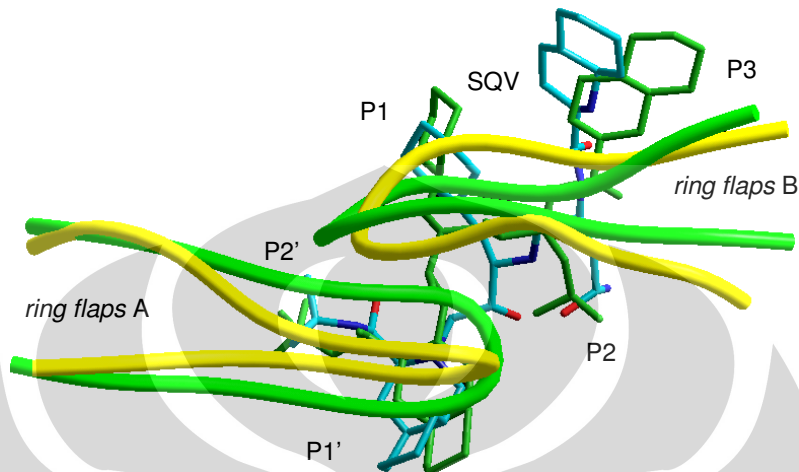
Gambar 4.44 Konformasi struktur DY_1 relatif terhadap HXB2 .

Terlihat bahwa hampir seluruh asam amino yang mengalami mutasi mengalami pergeseran posisi yang cukup signifikan yang berkisar antara 0,64 Å hingga 2,57 Å. Perubahan-perubahan struktur asam amino di tempat-tempat yang relatif jauh dari pusat aktif protease secara tidak langsung memberikan efek yang cukup mencolok khususnya pada daerah *hot spot* ikatan antara protease dan SQV. Perubahan tersebut misalnya muncul pada *ring flaps* yang bergeser semakin melebar dari posisi mula-mula seperti terlihat pada **Gambar 4.45**.



Gambar 4.45 Konformasi *ring flaps* PR DY_1 relatif terhadap HXB2.

Baik *backbone* rantai A maupun B pada daerah *ring flaps* menunjukkan perubahan struktur yang cukup signifikan, seperti terlihat pada **Gambar 4.46**.

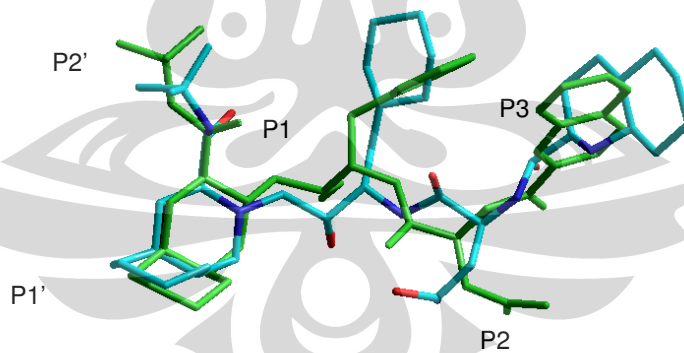


Gambar 4.46 Konformasi interaksi SQV pada DY_1 dan HXB2 (dilihat dari atas relatif terhadap **Gambar 4.44**).

Pada rantai A teramati pergeseran residu Phe53 sejauh $1,47 \text{ \AA}$ yang berada dalam rentang pergeseran interaksi hidrogenik. Demikian juga pada residu Met46, translasi *backbone* HXB2 menyebabkan residu yang dekat dengan residu yang mengalami mutasi pada posisi 35 ini, E35D, bergeser sejauh $1,4 \text{ \AA}$. Selain itu residu Met46 juga mengalami rotasi sejauh $23,9^\circ$ terhadap sumbu C–S. Rotasi dan translasi juga muncul pada *backbone* HXB2 rantai B sejauh $54,7^\circ$ menyebabkan pergeseran kedudukan rantai samping residu Phe53' dan residu Ile54' menjauh dari posisi semula. Posisi akhir loop *ring flaps* backbone DY_1 relatif terhadap HXB2 bergeser rata-rata sejauh $6,78 \text{ \AA}$ atau melebar sejauh $1,18 \text{ \AA}$ dari posisi semula. Sudut relatif antar bidang loop mempunyai besar yang nyaris sama, 56° . Konformasi yang cenderung berbeda antara *ring flap* A dan B baik pada HXB2 maupun DY_1 ini lebih dipengaruhi karena struktur SQV yang bersifat asimetris

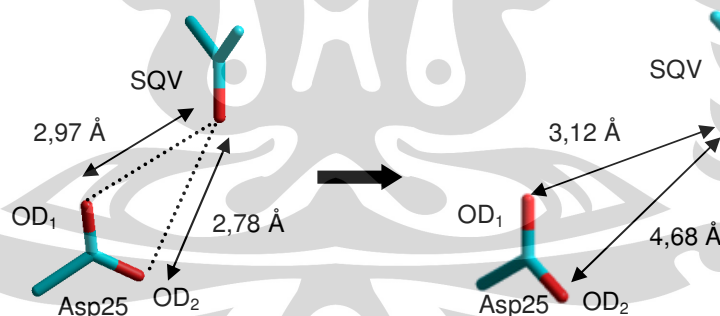
sehingga secara energetik memberikan pengaruh yang berbeda pula pada tiap *ring flap* yang berdekatan. Secara keseluruhan, konformasi yang muncul pada *ring flap* A dan B pada DY_1 menyebabkan perubahan pola interaksi yang muncul antara DY_1 dan SQV

Selain sub site P2, secara keseluruhan struktur SQV mengalami perubahan seolah-olah menjadi lebih cekung dibanding struktur mula-mula. Interaksi jarak jauh yang muncul pada sub site P1' terhadap *ring flap* A menyebabkan kedudukan sub site P1' bergeser secara koheren terhadap kedudukan *ring flaps* A. Demikian juga pada sub site P1 dan P2 yang secara energetik mempunyai andil besar terhadap pembentukan ikatan hidrogen antara gugus OH pada SQV dengan atom oksigen pada gugus karboksil pada residu Asp25 membentuk struktur yang lebih kompak. Hasil *fitting* struktur SQV HXB2 terhadap SQV DY_1 memberikan penjelasan yang lebih detail terhadap konformasi yang muncul pada SQV seperti tertera pada gambar berikut ini:



Gambar 4.47 Konformasi struktur SQV, warna hijau menunjukkan SQV kompleks dengan HXB2. Gambar disajikan dalam sudut pandang berbeda untuk kemudahan analisis.

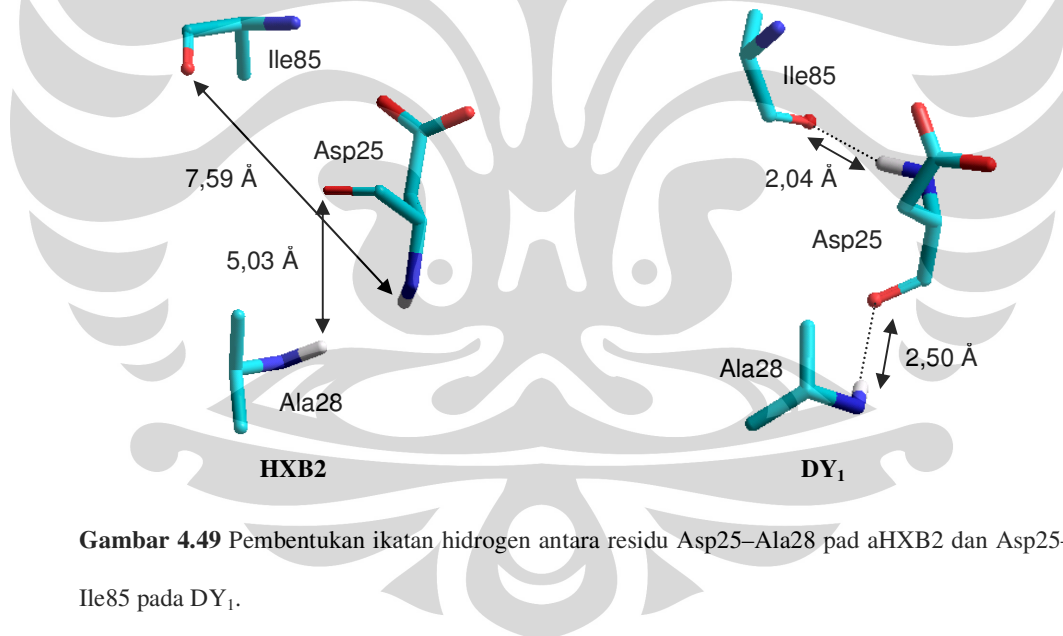
Dengan mengacu pada konformasi yang terjadi pada struktur SQV, diprediksikan bahwa kompleks DY_1 -SQV akan mempunyai struktur yang lebih stabil dibanding kompleks HXB2-SQV berdasarkan hasil pengamatan terhadap gugus OH pada SQV kompleks dengan DY_1 yang bergeser mendekati ke sisi aktif enzim sejauh $1,96 \text{ \AA}$ relatif terhadap posisi gugus OH SQV kompleks dengan HXB2. Namun pengamatan lebih lanjut terhadap daerah *hot spot* justru memberikan hasil yang mencengangkan, bukannya menjadi semakin stabil, ikatan hidrogen yang sebelumnya terbentuk antara gugus OH SQV dengan atom oksigen OD_1 pada gugus karboksil residu Asp25 malah lenyap. Posisi OH bergeser sejauh $3,12 \text{ \AA}$ relatif terhadap OD_1 pada gugus karboksil residu Asp25 atau $0,15 \text{ \AA}$ lebih jauh dari posisi semula. Demikian juga jarak OH terhadap OD_2 , mengalami pergeseran menjadi $4,68 \text{ \AA}$ atau $1,90 \text{ \AA}$ lebih jauh dari jarak semula, seperti terlihat pada gambar berikut ini:



Gambar 4.48 Pergeseran kedudukan gugus OH relatif terhadap OD_1 residu Asp25. Untuk simplifikasi, atom hidrogen tidak ditunjukkan dalam gambar.

Posisi *backbone* residu Asp25/25'-Thr26/26'-Gly27/27' bergeser saling menjauh satu sama lain. Selain itu, pergeseran juga muncul pada residu Asp25/25' dalam orde yang cukup mengejutkan. Gugus karboksil Asp25 berputar sejauh

71,21⁰ terhadap sumbu C_β-C_γ atau 14,12⁰ lebih kecil dibanding nilai mutlak sudut rotasi residu Asp25' pada sumbu C_β-C_γ. Residu Asp25 sendiri secara keseluruhan mengalami perubahan posisi seperti terlihat pada **Gambar 4.48**. Mutasi yang terjadi di tempat-tempat yang relatif jauh dari daerah aktif secara tidak langsung memberikan pengaruh pada konformasi yang terjadi pada daerah aktif khususnya residu Asp25. Rotasi gugus karboksil pada residu Asp25 dipengaruhi oleh munculnya interaksi jarak jauh antara Asp25 dengan residu di sekitarnya antara lain Ala28 dan Ile85 yang jauh lebih dominan dibanding interaksi antara Asp25 dengan SQV. Ikatan hidrogen terbentuk antara residu Asp25 dengan residu Ala28 dan Ile85 seperti tampak pada gambar berikut:

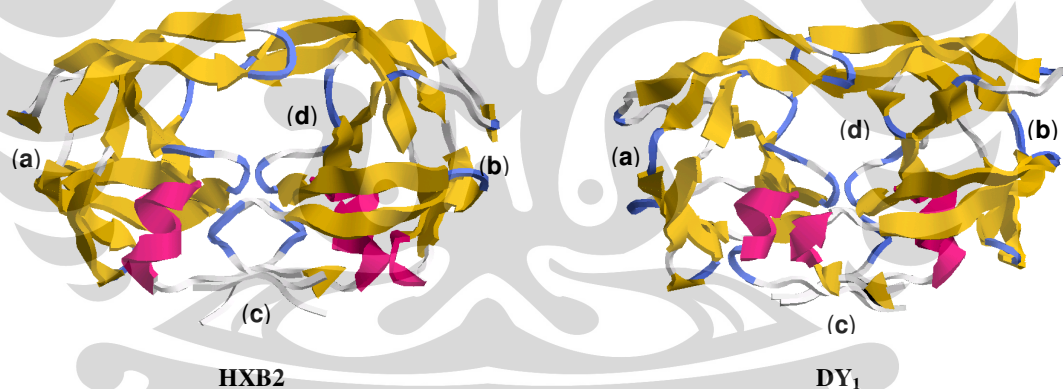


Gambar 4.49 Pembentukan ikatan hidrogen antara residu Asp25-Ala28 pada aHXB2 dan Asp25-Ile85 pada DY₁.

Perubahan posisi residu Asp25 pada DY₁ inilah yang menjadi penyebab utama lenyapnya ikatan hidrogen OH SQV terhadap OD₁ dan OD₂ residu Asp25. Hasil ini secara tidak langsung memberikan konfirmasi terhadap status kemanjuran SQV pada *treatment* terhadap DY₁. Mengacu pada mekanisme

penghambatan enzim protease HIV-1 pada keadaan transisi dapat diketahui bahwa kompleks DY₁-SQV menghasilkan keadaan enzim PR HIV-1 yang tidak aktif. Keadaan non-aktif PR HIV-1 ini diketahui dari tidak terbentuknya kompleks DY₁-SQV yang stabil, ditandai dengan terputusnya ikatan hidrogen antara Asp25 dengan SQV.

Struktur global HXB2 dan DY₁ menunjukkan terjadinya perubahan pada struktur tertier. Seperti terlihat pada gambar berikut ini, perubahan dari keadaan β -sheet menjadi α -helix muncul pada *backbone* residu Pro39/39'-Gly40/40', indeks (a) dan (b). Perubahan ini menghasilkan struktur yang cenderung fleksibel dibanding sebelumnya sehingga konformasi yang terjadi dapat dipahami secara rasional.

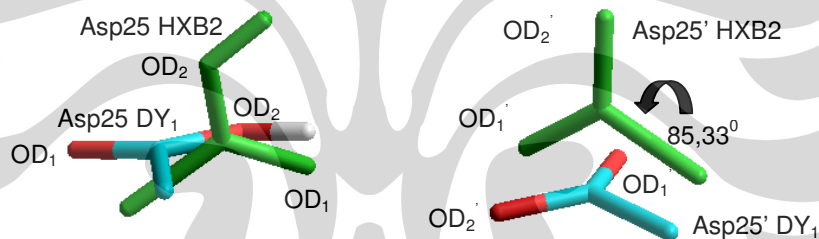


Gambar 4.50 Konformasi struktur HXB2 dan DY₁ secara global.

Konformasi struktur tertier juga terjadi pada daerah (c), residu Thr4'-Pro9' mengalami perubahan yang semula membentuk heliks menjadi sheet yang berakibat pada perubahan aktivitas biologi secara lokal menjadi kurang fleksibel. Daerah (d) yang merupakan salah satu bagian dari *hot spot* interaksi PR HIV-1

terhadap SQV pada umumnya memiliki kecenderungan struktur yang fleksibel. Pada simulasi ini diperoleh hasil yang cukup unik pada daerah (d) ini yaitu munculnya konformasi dari helix menjadi sheet. Dengan mengacu pada **Gambar 4.47**, sub site P2 SQV mengalami rotasi yang cukup signifikan sejauh 170° terhadap sumbu C–C. Pergeseran ini diperkirakan karena interaksi jarak jauh yang cukup dominan antara sub site P2 dengan Thr80'–Pro82'.

Seperti terlihat pada gambar berikut ini, residu Asp25 DY₁ mengalami pergeseran posisi yang cukup signifikan relatif terhadap Asp25 HXB2. Demikian juga pada Asp25', dibandingkan dengan struktur Asp25' HXB2, bidang OD₁'–C γ '–OD₂' residu Asp25' DY₁ berbeda sekitar $85,3^{\circ}$.



Gambar 4.51 Konformasi residu Asp25 DY₁ relatif terhadap Asp25 HXB2.

Konformasi ini berpengaruh langsung terhadap kestabilan kompleks DY₁–SQV. Seperti terlihat pada **Gambar 4.48** dan **4.49**, konformasi pada Asp25/25' dan beberapa residu di sekitarnya menyebabkan lenyapnya ikatan hidrogen yang terbentuk antara SQV dan residu khususnya Asp25. Berdasarkan analisis energetik menggunakan metode DFT dengan persamaan *exchange–correlation* B3LYP dan basis set 6–31G, perbedaan energi kompleks Asp25 (DY₁)–SQV adalah sebesar $-914.674,61$ kcal/mol dengan besar energi korelasi $-1.877,23$

kcal/mol sedangkan energi kompleks Asp25 (HXB2)–SQV sebesar $-924.745,95$ kcal/mol dengan besar energi korelasi $-1.877,35$ kcal/mol. Kompleks HXB2–SQV lebih stabil dibanding DY₁–SQV. Penurunan nilai energi ikat sebesar $10.071,46$ kcal/mol, dengan menyertakan faktor energi korelasi, memberikan indikasi bahwa konformasi pada sisi aktif yang menyebabkan terputusnya beberapa ikatan hidrogen antara Asp25 dan SQV menghasilkan struktur kompleks yang labil. Akibatnya PR DY₁ tidak berada dalam keadaan aktif ketika berinteraksi dengan SQV. PR HIV-1 yang tidak aktif ketika direaksikan dengan inhibitor pada keadaan transisinya menandakan bahwa enzim tersebut tidak bisa mengenali inhibitor.

Simulasi dilakukan pada keadaan transisi di mana protease berikatan dengan SQV. Protease yang berada dalam keadaan aktif berada dalam kondisi tepat akan memotong substrat, yang ditandai dengan terbentuknya ikatan hidrogen antara substrat dan atom oksigen pada gugus karboksilat residu Asp25 atau Asp25'. Dalam konteks penghambatan kerja enzim, protease diberi substrat berupa SQV yang tidak bisa “potong” melalui mekanisme proteolisis. Protease yang berada dalam keadaan aktif pada fase transisi ketika direaksikan dengan SQV menandakan protease masih bisa mengenali SQV sebagai substratnya dan hal itu berarti SQV dapat memblokir kerja enzim protease. Sebaliknya, jika pada fase transisi kestabilan kompleks baik secara struktur maupun energetik tidak terbentuk maka dapat disimpulkan bahwa enzim protease berada dalam keadaan non-aktif atau tidak mengenali SQV sebagai substratnya. Dalam hal ini enzim protease tetap dapat menjalankan fungsinya sebagai pemecah poliprotein selama proses maturasi untuk membentuk struktur fungsional virus.

4.5.3 Diskusi

☪ Efek pelarut air terhadap interaksi antara PR HIV-1 dan SQV

Kebanyakan biomolekul pada keadaan *in vivo* berada dalam konsentrasi yang kecil, mM atau μM . Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar komponen yang menyusun suatu sistem biomolekul (biomolekul dan lingkungannya), dalam konteks umum, adalah pelarut yaitu air. Sifat air yang polar dan dapat berperan sebagai donor dan aseptor ikatan hidrogen mempunyai pengaruh terhadap perubahan geometri dan aktivitas kimia suatu molekul. Struktur tertier dari molekul dipengaruhi oleh interaksi intrinsik yang bersifat kovalen dan interaksi ekstrinsik yang bersifat non-kovalen (interaksi jarak jauh) dari sub struktur penyusun dan lingkungannya yang bergantung pada sifat polaritas, tingkat keasaman, dan geometri atom-atom yang menyusun sistem tersebut.

Secara energetik, perubahan yang terjadi pada geometri molekul menyebabkan perubahan distribusi medan gaya total baik internal maupun eksternal. Terkait dengan aktivitas biologis suatu molekul, perubahan medan gaya berpengaruh pada *mutual recognition* antara molekul satu dengan molekul yang lain. Dalam konteks dinamika enzim, air memberikan pengaruh terutama konfigurasi medan gaya pada sisi aktif dan beberapa bagian yang mengandung asam amino yang bersifat polar.

HXB2 dan DY_1 disimulasikan dalam keadaan vakum. Pada awal mulanya simulasi hendak dilakukan pada kondisi dimana HXB2 dan DY_1 dilarutkan dalam air dengan ukuran “kotak” kubus $65 \times 65 \times 65 \text{ \AA}^3$ dan model air SPC atau TIP3P

yang diikuti dengan penghitungan prediksi nilai pH optimal pada keadaan transisi. Namun karena keterbatasan sumber daya komputasi yang tersedia saat ini maka simulasi *tidak* dapat dijalankan dalam periode waktu yang rasional sehingga simulasi dilakukan dalam kondisi vakum. PR HIV-1 secara struktural tergolong dalam molekul yang bersifat rigid sehingga perubahan medan gaya akibat interaksi non-kovalen molekul terhadap air yang bersifat polar tidak menyebabkan perubahan yang besar terhadap struktur kovalen PR HIV-1 secara global. Perubahan struktur yang terjadi cenderung bersifat lokal.

Secara global *backbone* protease DY₁ tidak memiliki perbedaan yang signifikan dibanding *backbone* protease HXB2 (hasil difraksi sinar-X). Perubahan yang muncul justru perubahan pada daerah-daerah dimana terjadi mutasi dan sebagaimana telah disampaikan pada pembahasan 4.5.1, perubahan struktur yang muncul bersifat lokal. Demikian juga pada pola interaksi antara DY₁-SQV maupun HXB2-SQV. Prediksi keadaan terprotonasi (pembahasan 4.4) protease HIV-1 telah berhasil dikonfirmasi dengan simulasi sistem kompleks PR-SQV yang ditunjukkan dengan terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus OH SQV dan gugus karboksil Asp25 baik pada DY₁ maupun HXB2 yang membentuk keadaan stabil pada fase transisi.

Hasil simulasi tahap I yaitu minimisasi struktur menunjukkan bahwa telah terjadi konformasi khususnya di tempat-tempat yang mengalami mutasi dan daerah aktif enzim. Seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 4.35**, perubahan geometri SQV dan daerah aktif enzim mengakibatkan melebarnya jarak antara SQV dan residu Asp25. Pelebaran jarak menyebabkan interaksi jarak jauh menurun sehingga memperbesar potensial barrier transfer proton antara SQV dan

Asp25. Hasil ini dikonfirmasi dengan menurunnya energi total interaksi jarak jauh (van der Waals) dari -1.360 kcal/mol menjadi $-1.323,35$ kcal/mol atau turun sebesar $36,65$ kcal/mol. Demikian juga interaksi elektrostatik, energi total DY_1 lebih kecil dibanding energi total HXB2 dengan selisih $2,44$ kcal/mol. Hasil yang diperoleh pada tahap simulasi I ini juga memberikan konfirmasi bahwa mekanisme *direct nucleophilic attack* dapat terjadi baik pada HXB2 maupun DY_1 walaupun memiliki tingkat kestabilan yang berbeda.

Pada tahap simulasi II, konformasi struktur dalam orde yang cukup besar muncul baik pada HXB2 maupun DY_1 . Walaupun struktur global antara HXB2 dan DY_1 tidak jauh berbeda namun kedua-duanya mengalami deviasi yang cukup besar terhadap struktur difraksi sinar-X yang digunakan sebagai referensi. Secara biologis HXB2 masih memiliki fungsi utamanya (mengikat SQV) walaupun telah terjadi perubahan kestabilan energi kompleks. Perubahan tersebut dipicu oleh bergesernya kedudukan residu-residu pada daerah aktif HXB2 seperti ditunjukkan **Gambar 4.35** dan **4.48**. Perubahan posisi menyebabkan potensial barrier meningkat cukup besar yaitu $220,68$ kcal/mol dengan penurunan energi exchange-correlation sebesar $9,39$ kcal/mol.

Mengacu pada hasil penelitian yang telah dilakukan di beberapa jurnal internasional, efek pelarut air terhadap struktur geometri 3D molekul PR HIV-1 tidak terlalu besar. Hasil RMSD pada backbone berkisar antara $1,04 \text{ \AA}$ – $1,92 \text{ \AA}$ untuk simulasi terhadap mutasi tunggal pada protease HIV-1. Pada penelitian kali ini RMSD backbone diperoleh nilai sebesar $0,84 \text{ \AA}$ pada rantai A dan $0,91 \text{ \AA}$ pada rantai B. Secara keleuruhan, RMSD pada rantai A dan B adalah $0,875 \text{ \AA}$. Dibandingkan dengan struktur yang diperoleh Wittayanarakul, dkk., perbedaan

konformasi yang terjadi pada PR yang terlarut dalam air dan dalam vakum adalah sebesar 15,4 %. Demikian juga pada backbone sisi aktif PR HXB2 dan DY₁, hasil *fitting* menunjukkan tidak terjadi pergeseran posisi backbone yang signifikan. Hal ini dikonfirmasi dengan nilai RMSD yang hanya 0,21 Å pada rantai A dan 0,32 Å pada rantai B. Hanya saja, dengan tidak adanya pelarut menyebabkan rantai samping residu Asp25 dan Asp25' mengalami konformasi yang cukup besar akibat interaksi internal. Khususnya pada hasil simulasi MDS, seperti terlihat pada **Gambar 4.48** dan **4.49** konformasi yang terjadi pada sisi aktif DY₁ menyebabkan struktur kompleks DY₁-SQV tidak stabil. Dalam beberapa penelitian sejenis [10, 11, 15, 23], walaupun konformasi yang terjadi menyebabkan penurunan energi ikat kompleks PR HIV-1 dengan inhibitor namun struktur kompleks pada sisi aktif enzim tetap berada dalam keadaan yang stabil artinya masih terbentuk ikatan hidrogen antara sisi aktif dengan SQV. Hal ini karena sistem disimulasikan dalam keadaan terlarut dalam air sehingga untuk beberapa asam amino yang bersifat polar, Asp25 dan Asp25' memiliki rantai samping yang polar, maka pergerakan atom-atom secara statistik berpeluang menjadi kurang bebas akibat konstrain-konstrain energi yang bersifat non kovalen dari lingkungan dan residu-residu tetangganya.

Di samping tidak adanya air, vibrasi atom dan molekul akibat pemanasan dari suhu 0 K hingga 300 K menyebabkan peregangan di bagian-bagian tertentu yang berpeluang besar meningkatkan mobilitas rantai samping tiap-tiap residu. Mobilitas ini menyebabkan fluktuasi medan gaya berubah-ubah. Interaksi antara medan gaya lokal sangat berpeluang menyebabkan konformasi struktur yang *tidak* diharapkan. Walaupun fluktuasi medan gaya total ini cenderung konstan, lihat

grafik pada **Gambar 4.42** dan **4.43**, namun fluktuasi medan gaya lokal berubah-ubah. Faktor inilah yang diasumsikan menjadi penyebab utama konformasi Asp25 pada DY_1 pasca simulasi MDS yang mengakibatkan putusya ikatan hidrogen antara SQV dengan Asp25. Asumsi ini berdasarkan pada perubahan struktur ruang pada tiap-tiap mutasi yang terjadi dan perubahan energi ikat lokal seperti yang telah dijelaskan pada pembahasan **4.5.1**.

Dengan segala keterbatasan pendefinisian parameter sistem dan metode yang digunakan, dalam konteks penelitian ini berdasarkan data hasil simulasi dan perhitungan energi maka dapat diambil kesimpulan bahwa mutasi-mutasi yang muncul pada DY_1 menyebabkan konformasi struktur 3D dari PR HIV-1 relatif terhadap HXB2 khususnya pada tempat-tempat munculnya mutasi. Lebih jauh, mutasi-mutasi tersebut menyebabkan perubahan medan gaya sistem yang menginduksi konformasi pada sisi aktif DY_1 sehingga energi kompleks DY_1 -SQV mengalami penurunan yang cukup besar. Hasil prediksi dari simulasi ini masih sangat bersifat hipotetik karena, di samping metode simulasi yang sangat minim dan bersifat kompromistik, data rujukan yang digunakan untuk mengetahui akurasi prediksi dari simulasi ini tidak tersedia. Untuk itu perlu adanya data uji laboratorium yang dapat digunakan untuk mengkonfirmasi hasil prediksi yang telah dilakukan.

BAB V

KESIMPULAN

Data genotyping DNA virus HIV-1 sub tipe AE (kode DY₁) hasil pemindaian terhadap pasien pengidap HIV/AIDS dengan menggunakan metode PCR menunjukkan bahwa telah terjadi mutasi pada enzim protease virus tersebut yang diprediksikan berpotensi dapat menyebabkan penurunan sensitivitas virus terhadap obat ARV. Dengan menggunakan metode simulasi berbasis fisika kuantum dan analisis mutasi DY₁ relatif terhadap sub tipe B, diperoleh hasil bahwa ketika protease DY₁ direaksikan dengan SQV terjadi konformasi struktur yang cukup signifikan dan penurunan energi ikat kompleks sebesar 10.071,46 kcal/mol.

Studi dimulai dengan menentukan keadaan terprotonasi PR HXB2 kompleks dengan SQV pada keadaan bebas dan berikatan dengan substrat. Pada mulanya diperkirakan protonasi terjadi pada residu Asp25 pada atom OD₂ namun hasil simulasi menunjukkan bahwa protonasi pada OD₁ lebih stabil dan cenderung mendekati struktur hasil eksperimen. Demikian juga pada perhitungan ketika enzim berikatan dengan substrat. Pada level perhitungan semi-empirik diperoleh nilai energi kestabilan paling besar muncul pada model protease *diprotonasi* yaitu sebesar -158.749,87 kcal/mol atau 0,011 % lebih stabil dibanding model protease *monoprotonasi* pada Asp25. Namun demikian, dengan menggunakan level teori perhitungan yang lebih tinggi, DFT, diperoleh nilai energi kestabilan pada model *monoprotonasi* Asp25 yaitu sebesar -702.383,92 kcal/mol. Dengan mengacu pada analisis struktur dan energetik serta penelitian yang telah dilakukan di beberapa

jurnal internasional maka disimpulkan bahwa keadaan terprotonasi PR HIV-1 sub tipe B (1HXB kompleks dengan SQV) terjadi pada residu Asp25.

Untuk mengetahui efek mutasi yang muncul pada DY_1 maka simulasi dan perhitungan dilanjutkan terhadap kompleks protease dan SQV secara keseluruhan. Hasil simulasi menunjukkan bahwa telah terjadi konformasi struktur sekunder yang cukup signifikan yang berpengaruh langsung terhadap kestabilan kompleks protease dan SQV. Simulasi dilakukan dalam dua tahap yaitu minimisasi energi dan simulasi MDS. Pada tahap minimisasi energi, konformasi struktur muncul terutama pada daerah aktif dan ring flaps yang ditandai dengan melebarnya jarak antara Asp25 dan Asp25 serta putusanya ikatan hidrogen antara SQV dengan residu Asp29. Pada ring flaps, telah terjadi peregangan pada loop A yaitu pada residu Phe53 yang diikuti oleh pergeseran sub site P3 SQV.

Perhitungan dan simulasi yang lebih komprehensif dilakukan untuk mengetahui efek mutasi terhadap struktur global sistem dan kestabilan energi kompleks protease dan SQV. Hasilnya adalah konformasi pada daerah aktif dan hot spot interaksi SQV terhadap protease menyebabkan ikatan hidrogen antara protease dan SQV lenyap sama sekali. Hal ini mengakibatkan menurunnya tingkat kestabilan sebesar 10.071,46 kcal/mol pada daerah aktif DY_1 . Pergeseran pada ring flaps juga menyebabkan perubahan posisi pada beberapa sub site SQV yang cenderung menjauh dari daerah aktif enzim. Namun demikian, mekanisme resistensi DY_1 terhadap SQV belum dapat dipahami secara mendetail. Perlu adanya kajian yang lebih mendalam terutama terhadap pola interaksi protein pada sistem protease-SQV dengan level teori yang lebih tinggi dan pendekatan sistem

yang lebih realistik. Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mutasi-mutasi yang muncul memberikan efek lokal yang cukup signifikan dan berpengaruh terhadap struktur global kompleks PR–SQV.
2. Keadaan terprotonasi PR HIV–1 terjadi pada gugus karboksil residu Asp25 atom OD₁.
3. Konformasi pada daerah hot spot menyebabkan penurunan energi ikat antara DY₁ dan SQV.
4. Berdasarkan metode dan parameter yang digunakan dalam penelitian ini, disimpulkan bahwa mutasi yang muncul pada DY1 berpotensi menyebabkan virus menjadi resisten terhadap SQV.

Secara umum, dalam konteks definisi parameter dan keterbatasan metode simulasi yang digunakan, dengan mengacu pada data mutasi pada HXB2, mutasi–mutasi yang muncul pada DY₁ diprediksikan menyebabkan virus menjadi resisten terhadap SQV namun mutasi “yang mana” yang paling dominan menjadi penyebab virus menjadi resisten belum diketahui. Pengkajian lebih lanjut terhadap hasil penelitian ini masih sangat perlu dilakukan karena metode yang digunakan dalam penelitian ini masih terbatas dan sedikit. Demikian juga terhadap objek penelitian itu sendiri, masih terbatas pada **satu** kluster mutasi yang diasumsikan muncul secara simetris pada enzim protease. Obat ARV yang digunakan sebagai model *treatment*-pun masih terbatas pada *Saquinavir* padahal masih banyak jenis obat ARV lain yang tingkat efektifitasnya perlu diuji terlebih dahulu sebelum diberikan kepada pasien.

Untuk mengetahui karakteristik HIV-1 sub tipe AE pada level molekuler secara lebih mendetail maka perlu adanya penelitian terhadap mutasi-mutasi lain dalam skala yang lebih masiv. Ketersediaan data struktur sinar-X atau NMR virus HIV-1 di Indonesia menjadi kendala tersendiri ketika melakukan proses perhitungan dan simulasi. Dengan sangat terpaksa, *template* yang digunakan mengambil dari strktur sinar-X HXB2 yang memiliki perilaku biologis yang berbeda dalam merespon obat ARV tertentu. Walaupun secara fisika perbaikan struktur dapat dilakukan dengan mudah namun aktivitas biologis virus dalam merespon inhibitor tertentu tidak dapat diprediksi begitu saja karena proses-proses biologis dalam makhluk hidup lebih cenderung bersifat non linier, bertolak belakang dengan logika metode simulasi yang saat ini dikembangkan. Oleh karena itu, ke depan diharapkan terbentuk kerjasama yang terintegrasi antara disiplin ilmu terkait untuk bersama-sama mencari solusi dari berbagai kendala yang bersifat fundamental dalam rangka untuk menanggulangi mewabahnya HIV/AIDS di Indonesia. Sebagai tindak lanjut dari penelitian yang masih sangat awal ini, ke depan ada beberapa poin penting yang sangat dianjurkan untuk dilakukan antara lain:

1. Analisis simulasi secara komprehensif terhadap data-data mutasi hasil pengolahan dengan metode *genotyping* dalam skala yang lebih luas lagi yaitu dengan cara membuat analisis terhadap masing-masing mutasi pada seluruh data *genotyping* yang tersedia.
2. Penggunaan metode analisis yang lebih mendalam seperti analisis termodinamika menggunakan metode *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area* (MM/PBSA), analisis energetik pada daerah aktif

PR HIV-1 dengan menyertakan efek lingkungan (residu-residu yang masih berada dalam jangkauan interaksi fisika) menggunakan metode ONIOM.

3. Setting parameter lingkungan yang lebih realistik seperti pelarutan dalam air, setting nilai pH, variasi tekanan dan temperatur serta waktu simulasi yang lebih lama.
4. Penentuan struktur sinar-X virus HIV-1 yang bersirkulasi di Indonesia. Untuk melakukan ini diperlukan kerjasama dengan disiplin ilmu terkait seperti *mikrobiologi*. Hal ini penting karena *starting model* dari simulasi yang dilakukan berdasarkan struktur sinar-X virus.

Dalam rentang waktu yang lebih jauh lagi, diharapkan penelitian ini berujung pada apa yang disebut sebagai “*Computer Based Drug Design*” khususnya untuk strain virus HIV Indonesia sebagai salah satu upaya untuk turut serta memerangi penyakit HIV/AIDS di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lindgren, M.T. 2004. *Exploring inhibitors of HIV-1 protease: Interaction studies with applications for drug discovery*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 1038, ACTA Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- [2] UNAIDS, WHO. *AIDS epidemic update: December 2006*, Joint United Nations Program on HIV/AIDS, World Health Organization: Geneva, 2006.
- [3] Schaal, Wesley. 2002. *Computational studies of HIV-1 protease inhibitors*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 263, ACTA Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- [4] UNAIDS www.unaids.org/millenniumgoals/. 2008.
- [5] ANTARA. *Latest Development of HIV/AIDS Cases in Indonesia cause for Increasing Concern*. 2008. www.antara.co.id. Akses web site: Minggu, 04 Mei 2008.
- [6] The Jakarta Post. *HIV/AIDS in Indonesia Rise*. 2008. www.thejakartapost.com. Akses web site: Minggu, 04 Mei 2008.
- [7] Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patient with AIDS and risk for AIDS. *Science* (1984) 224 (4648): 500-3.
- [8] Barre-Sinoussi, F., Chermann J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J. et. al. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* (1983) 220 (4599): 868-871.

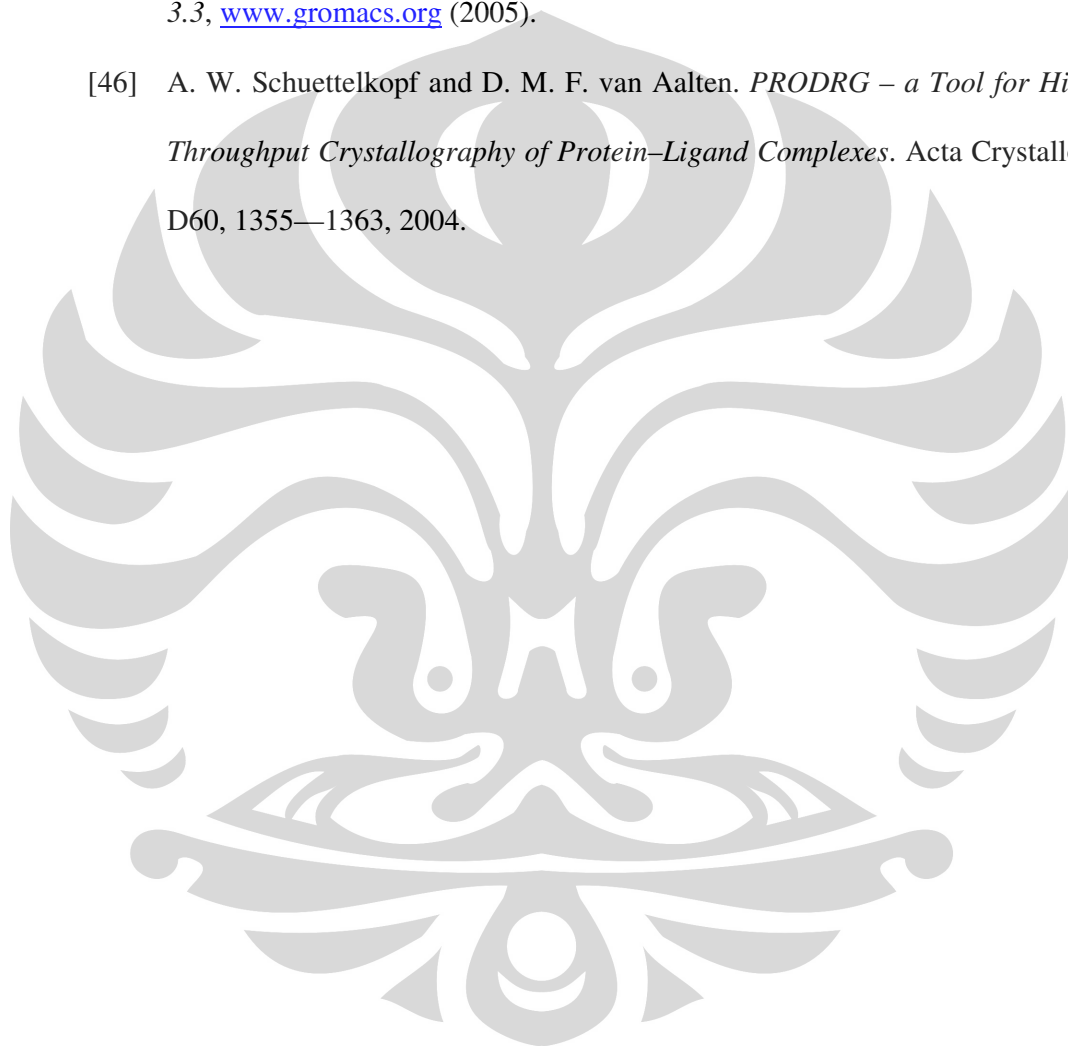
- [9] Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* (1986) 233: 343-346.
- [10] Wittayanarakul, K., O. Aruksakunwong, S. Saen-oon, W. Chantratita, V. Parasuk, P. Sompornpisut, and S. Hannongbua. Insight into saquinavir resistance in the G48V HIV-1 protease: Quantum calculations and molecular dynamic simulations. *Biophysical Journal* (2005) 88:867-879.
- [11] Meiselbach, H., Horn, A.H.C., Harrer, T., and Sticht, H. Insight into amprenavir resistance in E35D HIV-1 protease mutation from molecular dynamics and binding free-energy calculations. *J Mol Model* (2007), 13: 297-304.
- [12] Bereenwinkel, Niko. *Computational Analyze of HIV-1 drug resistance data.* zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. Nat) der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät I der Universität des Saarlandes, Saarbrücken 2003.
- [13] Listyaningsih, E., McArdle, J., Graham, R., Sudarijo, M., Porter, Kevin., Suharyono, W., Corwin, A., Gunawan, S., dan Beckett, C. *Genetic and Demographic Characterization of Indonesian HIV Cases from 1993 to 1996.* 6th Asia Pacific Congress of Medical Virology. Kuala Lumpur, Malaysia 7–10 December 2003.
- [14] Jensen, Frank. 1999. *Introduction to Computational Chemistry.* John Wiley and Sons, New York.

- [15] Agostinetti, S. Piana. *AB initio Molecular Dynamics Studies on HIV-1 Protease*. Dissertation for the degree of *Doctor Philosophiae*, International School for Advanced Studies, October 2000.
- [16] Hoffmann, C., Rockstroh, J.K., and Kamps, B.S. 2006. *HIV Medicine 2006*. Flying Publisher, Paris. Web site <http://www.HIVMedicine.com>.
- [17] Yasmon, A., Bela, B., Ibrahim, F., Yuniastuti, E., dan Djauzi, S. *Pemindaian Gen Protease HIV dari Orang dengan HIV/AIDS*. Komunikasi Pribadi, Jakarta 2008.
- [18] Arthur, L. O.; Bess, J. W., Jr.; Sowder, R. C., 2nd; Benveniste, R. E.; Mann, D. L.; Chermann, J. C.; Henderson, L. E. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* (1992) 258: 1935-1938.
- [19] Turner, B. G.; Summers, M. F. *Structural biology of HIV*. *J. Mol. Biol.* (1999) 285: 1-32.
- [20] Janvier, K., Petit, C., Le Rouzic, E., Schwartz, O., Benichou, S. *HIV auxiliary proteins: an interface between the virus and the host*. *AIDS* 2000, 14 Suppl. 3, S21-30.
- [21] Hansen, J., Schulze, T., Moelling, K. *RNase H activity associated with bacterially expressed reverse transcriptase of human T-cell lymphotropic virus III/lymphadenopathy-associated virus*. *J Mol Chem* (1987) 262 (26): 12393-12396.
- [22] Fujiwara, T and Craigie, R. *Integration of mini-retroviral DNA: a cell-free reaction for biochemical analysis of retroviral integration*. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86 (9): 3065-3069.

- [23] Trlyska, J., Grochowski, P., McCammon, J.A. *The role of hydrogen bonding in the enzymatic reaction catalyzed by HIV-1 protease*. Protein Science, 13:513-528, 2004.
- [24] Bela, Budiman. *HIV Life Cycle: Unpublished result*. Institute for Human Virology and Cancer Biology, University of Indonesia (IHVCB-UI) 2007.
- [25] Shuman, C.F. 2003. *Interaction characteristics of viral protease targets and inhibitors: Perspectives for drug discovery and development of model systems*. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 822, ACTA Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- [26] Dolin, R., Masur, H., and Saag, M.S. 1999. *Aids Therapy*. Churchill Livingstone, USA.
- [27] Leach, A.R. 2001. *Molecular Modeling: Principles and Applications*, 2nd Edition. Prentice Hall, England.
- [28] Becke, A. D. *Density Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange*. *J. Chem. Phys* (1993) 98: 5648-5652.
- [29] Beck, T.L. *Density functional methods for ab initio modeling of molecules and materials: Molecular modeling 981*. 1999. Department of Chemistry, University of Cincinnati. Web access: <http://www.bessie.che.uc.edu/tlb/teach>.
- [30] Hohenberg, P. and Kohn, W. *Inhomogeneous Electron Gas*. Physical Review, (1964) B136: 864-871.
- [31] Kohn, W. and Sham, L.J. *Self Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects*. Physical Review (1965) A140: 1133-1138.

- [32] Vosko, S.H., Wilk, L., and Nusair, M. *Accurate Spin Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin Density Calculations: A Critical Analysis*. Canadian Journal of Physics (1980) 58: 1200-1211.
- [33] Lee, C., Yang, W., and Parr, G.R. Development of the Colle-Salvetti Correlation Energy Formula into a Functional on the Electron Density. *Physical Review* (1988) B37: 785-789.
- [34] Drug Resistance Interpretation HIVdb program, Stanford University. Akses web site www.hivdbprogram.stanford.edu. 2007.
- [35] Rhee, Soo-Yon, et.al. *Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database*. Nucleic Acid Research, 2003, Vol. 31, No.1 DOI: 10.1093/nar/gkg100. Oxford University Press, 2003.
- [36] Johnson, VA, et.al. *Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2006*. Special Contribution-Resistance Mutations, Vol. 14, Issue 3, August/September 2006. International AIDS Society – USA, 2006.
- [37] Krohn, A, Redshaw, S, Ritchie, J.C, Graves, B.J, and Hatada, M.H. *Novel Binding Mode of Highly Potent HIV-1 Proteinase Inhibitors Incorporating the (R)-Hydroxyethylamine 3 Isostere*. Journal Medicinal Chemistry, Vol. 34-3340, 1991.
- [38] Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D, Broadhurst, A.V., Craigi, J.C., Duncan, I.B., et.al. *Rational Design of Peptide – Based HIV Proteinase Inhibitors*. Science, V.248 – 358, 1990.
- [39] <http://www.rcsb.org/pdb/>
- [40] <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/drugBank/>
- [41] ArgusLab 4.0. Mark A. Thompson. Planaria Software LLC, Seattle, WA. <http://www.arguslab.com>. 2006.

- [42] Trlyska, J., Antosiewicz, J., Geller, M. et.al. *Protein Science* 8, 180, 1999.
- [43] Hyland, L. J.; Tomaszek, T. A.; Meek, T. D. *Biochemistry* **1991**, 30, 8454.
- [44] Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. *VMD–Visual Molecular Dynamics*. *J. Molec. Graphics* 1996, 14.1, 33–38.
- [45] Van der Spool, D., Lindahl, E., Hess, B. et.al. *Gromacs User Manual version 3.3*, www.gromacs.org (2005).
- [46] A. W. Schuettelkopf and D. M. F. van Aalten. *PRODRG – a Tool for High-Throughput Crystallography of Protein–Ligand Complexes*. *Acta Crystallogr. D*60, 1355—1363, 2004.



Lampiran A

A. Prinsip variasi

Prinsip variasi menyatakan bahwa fungsi–fungsi gelombang yang bersifat pendekatan menghasilkan nilai perhitungan energi lebih besar atau sama dengan nilai energi eksak, $E \geq E_0$. Agar $E = E_0$ maka fungsi gelombang haruslah bersifat eksak. Fungsi gelombang eksak dapat ditentukan dengan cara sebagai berikut:

Misal solusi eksak persamaan gelombang Schrodinger diketahui maka:

$$\mathbf{H}\Psi_i = E_i \Psi_i, \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, \infty \quad (\text{A1})$$

Dari persamaan (A1) terlihat bahwa terdapat solusi untuk persamaan gelombang adalah tak terhingga dengan energi minimum dicapai pada $i = 0$, $E_0 = 0$. Karena operator \mathbf{H} bersifat Hermitik maka solusi-solusi persamaan gelombang tersebut membentuk fungsi basis. Dengan mengasumsikan solusi persamaan gelombang bersifat ortogonal dan ternormalisasi maka dalam notasi Dirac persamaan gelombang ternormalisasi dituliskan sebagai:

$$\langle \Psi_i | \Psi_j \rangle = \delta_{ij}$$

Persamaan gelombang dapat diekspansi dalam bentuk kombinasi linier dari fungsi gelombang individu elektron (solusi eksak) sebagai:

$$\Phi = \sum_{i=0}^{\infty} a_i \Psi_i \quad (\text{A2})$$

Energi dari persamaan (A2) dapat ditentukan yaitu:

$$W = \frac{\langle \Phi | \mathbf{H} | \Phi \rangle}{\langle \Phi | \Phi \rangle}$$
$$W = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} a_i \sum_{j=0}^{\infty} a_j \langle \Psi_i | \mathbf{H} | \Psi_j \rangle}{\sum_{i=0}^{\infty} a_i \sum_{j=0}^{\infty} a_j \langle \Psi_i | \Psi_j \rangle}$$

Dengan menggunakan persamaan (A1) dan sifat ortonormal dari Ψ_i , diperoleh:

$$W = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2 E_i}{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2}$$

Prinsip variasi menyatakan bahwa $W \geq E_0$ sehingga:

$$W - E_0 = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2 E_i}{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2} - E_0 = \frac{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2 (E_i - E_0)}{\sum_{i=0}^{\infty} a_i^2} \geq 0$$

a_i^2 hanya mempunyai nilai positif atau nol, demikian juga dengan $E_i - E_0$. Untuk memperoleh $E_i = E_0$ maka untuk nilai dari $a_{i \neq 0} = 0$ karena $E_i - E_0$ selalu tidak nol (dengan mengabaikan keadaan dasar yang terdegenerasi). Hal ini berarti $a_0 = 1$, dan fungsi gelombang Φ adalah solusi eksak.

B. Teori Hohenberg–Kohn

Teori Hohenberg–Kohn, yang merupakan cikal bakal dari DFT, menyatakan bahwa *energi sistem pada keadaan dasar ditentukan oleh densitas elektron sistem*. Dalam mekanika gelombang, densitas elektron merupakan kuadrat dari fungsi gelombang yang diintegrasikan terhadap $N-1$ koordinat elektron. Secara umum untuk sistem yang terdiri dari M atom dan N elektron, Hamiltonian dapat dituliskan sebagai:

$$\mathbf{H} = - \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{r}_i|} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>1}^N \frac{1}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>1}^M \frac{Z_A Z_B}{|\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|}$$

Mengacu pada pendekatan *Born – Oppenheimer*, suku terakhir dari persamaan di atas adalah konstan. Terlihat bahwa Hamiltonian bergantung pada jumlah elektron dan potensial hasil interaksi antara inti dan elektron yang memberikan indikasi bahwa energi dan juga densitas elektron sistem ditentukan oleh variabel-variabel tersebut. Dengan mengasumsikan terdapat dua potensial eksternal yang bekerja

pada sistem, V_{eks} dan V'_{eks} , maka Hamiltonian sistem dapat dituliskan sebagai \mathbf{H} dan \mathbf{H}' yang bekerja pada fungsi gelombang Ψ dan Ψ' .

Dengan menggunakan \mathbf{H} sebagai operator fungsi gelombang (pendekatan) Ψ' maka dengan prinsip variasi diperoleh:

$$\begin{aligned} \langle \Psi' | \mathbf{H} | \Psi' \rangle &> E_0 \\ \langle \Psi' | \mathbf{H} | \Psi' \rangle + \langle \Psi' | \mathbf{H} - \mathbf{H}' | \Psi' \rangle &> E_0 \\ E_0 + \langle \Psi' | \mathbf{V}_{\text{ekt}} - \mathbf{V}'_{\text{ekt}} | \Psi' \rangle &> E_0 \\ E'_0 + \int \rho(\mathbf{r})(\mathbf{V}_{\text{ekt}} - \mathbf{V}'_{\text{ekt}}) d\mathbf{r} &> E'_0 \end{aligned} \quad (\text{B1})$$

Demikian juga untuk fungsi gelombang (pendekatan) Ψ , Hamiltonian \mathbf{H}' bekerja pada fungsi tersebut dan dengan menggunakan prinsip variasi diperoleh:

$$E_0 + \int \rho(\mathbf{r})(\mathbf{V}_{\text{ekt}} - \mathbf{V}'_{\text{ekt}}) d\mathbf{r} > E'_0 \quad (\text{B2})$$

Dengan menambahkan kuantitas pada persamaan (B1) dan (B2) diperoleh:

$$E'_0 + E_0 > E'_0 + E_0 \quad (\text{B3})$$

Persamaan (B3) menunjukkan bahwa asumsi dua potensial eksternal berbeda yang bekerja pada sistem yang sama adalah keliru. Hal tersebut memberikan implikasi bahwa terdapat korelasi antara densitas elektron dan energi sistem pada keadaan dasar. Dalam konteks DFT, hal tersebut dapat dinyatakan ulang bahwa energi sistem merupakan fungsi unik dari densitas elektron.

$$\left. \begin{aligned} \int \rho'(\mathbf{r}) d\mathbf{r} &= N \\ E_0[\rho'] &\geq E_0[\rho] \end{aligned} \right\} \quad (\text{B4})$$

Dengan menggunakan densitas elektron sebagai parameter fisis sistem maka logika prinsip variasi dapat diterapkan untuk menentukan relasi langsung antara energi pada keadaan dasar sistem sebagai fungsi dari densitas elektron seperti tertera pada persamaan (B4).

C. Adiabatic Connection Formula (ACF)

Teori Hellman–Feynman menyatakan bahwa:

$$\frac{\partial}{\partial \lambda} \langle \Psi_\lambda | \mathbf{H}_\lambda | \Psi_\lambda \rangle = \left\langle \Psi_\lambda \left| \frac{\partial \mathbf{H}_\lambda}{\partial \lambda} \right| \Psi_\lambda \right\rangle \quad (\text{C1})$$

Dengan menggunakan Hamiltonian $\mathbf{H}_\lambda = \mathbf{T} + \mathbf{V}_{\text{ext}}(\lambda) + \lambda \mathbf{V}_{\text{ee}}$ diperoleh:

$$\frac{\partial}{\partial \lambda} \langle \Psi_\lambda | \mathbf{H}_\lambda | \Psi_\lambda \rangle = \left\langle \Psi_\lambda \left| \frac{\partial \mathbf{V}_{\text{ext}}(\lambda)}{\partial \lambda} + \lambda \mathbf{V}_{\text{ee}} \right| \Psi_\lambda \right\rangle \quad (\text{C2})$$

λ disebut *parameter kopling* yang mempunyai nilai $0 \leq \lambda \leq 1$. Pada saat $\lambda = 0$, artinya tidak ada interaksi inter–elektronik yang mengakibatkan tidak adanya E_C , yang muncul hanya E_X . Dengan bertambahnya nilai λ , interaksi inter–elektronik mulai muncul dan ketika $\lambda = 1$ sistem berada dalam pengaruh interaksi *exchange* dan *correlation*.

Dengan mengintegrasikan persamaan (C2) dan mengasumsikan bahwa densitas elektron ρ sistem konstan diperoleh:

$$\int_0^1 \frac{\partial}{\partial \lambda} \langle \Psi_\lambda | \mathbf{H}_\lambda | \Psi_\lambda \rangle d\lambda = \int_0^1 \left\langle \Psi_\lambda \left| \frac{\partial \mathbf{V}_{\text{ext}}(\lambda)}{\partial \lambda} + \lambda \mathbf{V}_{\text{ee}} \right| \Psi_\lambda \right\rangle d\lambda$$

$$\langle \Psi_1 | \mathbf{H}_1 | \Psi_1 \rangle - \langle \Psi_0 | \mathbf{H}_0 | \Psi_0 \rangle = \langle \Psi_1 | \mathbf{V}_{\text{ext}}(1) | \Psi_1 \rangle - \langle \Psi_0 | \mathbf{V}_{\text{ext}}(0) | \Psi_0 \rangle + \int_0^1 \langle \Psi_\lambda | \mathbf{V}_{\text{ee}} | \Psi_\lambda \rangle d\lambda$$

$$E_1 - E_0 = \int \rho(\mathbf{r}) \mathbf{V}_{ext}(1) d\mathbf{r} - \int \rho(\mathbf{r}) \mathbf{V}_{ext}(0) d\mathbf{r} + \int_0^1 \langle \lambda | \mathbf{V}_{ee} | \lambda \rangle d\lambda$$

Energi untuk sistem dimana elektron diasumsikan tidak berinteraksi diberikan oleh persamaan berikut ini:

$$E_0 = \langle \Psi_0 | \mathbf{T} | \Psi_0 \rangle + \int \rho(\mathbf{r}) \mathbf{V}_{ext}(0) d\mathbf{r}$$

Untuk sistem elektron yang berinteraksi diberikan oleh persamaan:

$$E_1 = \langle \Psi_0 | \mathbf{T} | \Psi_0 \rangle + \int \rho(\mathbf{r}) \mathbf{V}_{ext}(1) d\mathbf{r} + \int_0^1 \langle \lambda | \mathbf{V}_{ee} | \lambda \rangle d\lambda$$

Untuk $\lambda = 1$ maka $\mathbf{V}_{eks} = \mathbf{V}_{ne}$. Dengan menggunakan definisi energi DFT:

$$E_{DFT}[\rho] = T_s[\rho] + E_{ne}[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho]$$

Diperoleh relasi ACF sebagai berikut:

$$E_{xc} = \int_0^1 \langle \Psi_\lambda | \mathbf{V}_{xc}(\lambda) | \Psi_\lambda \rangle d\lambda$$

Lampiran B

Tabel B.1 Unit Atomik (Atomic Units, a.u.)

Simbol	Kuantitas	SI	a.u.
m_e	massa elektron	$9,110 \times 10^{-31}$ kg	1
e	muatan elektron	$1,602 \times 10^{-19}$ C	1
h	konstanta Planck	$6,626 \times 10^{-34}$ Js	2π
\hbar	$h/2\pi$	$1,055 \times 10^{-34}$ Js	1
a_0	radius Bohr	$5,292 \times 10^{-11}$ m	1
E_H	energi Hartree	$4,360 \times 10^{-18}$ J	1
c	kecepatan cahaya	$2,998 \times 10^8$ m/s	137,036
μ_B	magneton Bohr ($= e\hbar/2me$)	$9,274 \times 10^{-24}$ J/T	$1/2$
μ_N	magneton inti	$5,051 \times 10^{-27}$ J/T	$2,723 \times 10^{-4}$
$4\pi\epsilon_0$	permitivitas ruang hampa	$1,113 \times 10^{-10}$ C ² /Jm	1
μ_0	permeabilitas ruang hampa ($4\pi/c^2$)	$1,257 \times 10^{-6}$ Ns ² /C ²	$6,692 \times 10^{-4}$

Konversi energi:

1 a.u. = 627,51 kcal/mol.

1 kcal/mol = 4,184 kJ/mol.