



UNIVERSITAS INDONESIA

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL
RNA-DEPENDENT RNA-POLYMERASE
VIRUS DENGUE DENGAN INHIBITOR POTENSIAL
PEPTIDA SIKLIS DISULFIDA**

SKRIPSI

**RAIMA SYAHIDAH NOORS
0606029050**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI S1 REGULER KIMIA
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**SIMULASI DINAMIKA MOLEKUL
RNA-DEPENDENT RNA-POLYMERASE
VIRUS DENGUE DENGAN INHIBITOR POTENSIAL
PEPTIDA SIKLIS DISULFIDA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

**RAIMA SYAHIDAH NOORS
0606029050**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI S1 REGULER KIMIA
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Raima Syahidah Noors

NPM : 0606029050

Tanda Tangan : ...

Tanggal : ...

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Raima Syahidah Noors
NPM : 0606029050
Program Studi : S1 Reguler Kimia
Judul Skripsi : Simulasi Dinamika Molekul *RNA-Dependent RNA-Polymerase* Virus Dengue dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Usman Sumo F.T (.....)
Penguji : Dr. Endang Saepudin (.....)
Penguji : Dr. Asep Saefumillah (.....)
Penguji : Dr. Welizar (.....)

Ditetapkan di :
Tanggal :

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Usman Sumo F.T, selaku dosen pembimbing yang telah menyediakan waktu, tenaga, dan pikiran untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi ini;
2. Kedua orang tua (Iman Nursyah, S.Sos dan Aminah), kakak penulis Mariam Awallyn Noors dan adik penulis, Adima Insan Akbar Noors yang selalu memberikan dukungan material dan moril;
3. Dr. Ridla Bakri selaku ketua departemen Kimia FMIPA UI;
4. Dr. Widayanti Wibowo selaku pembimbing akademis penulis yang selalu memberikan arahan dalam menyusun perkuliahan;
5. Ir. Widyastuti Samadi selaku Kordik dan Dra. Tresye Utari selaku Korlit yang melancarkan semua urusan teknis UP hingga sidang;
6. Prof. Sumi Hudiyono sebagai ketua KBI Biokimia yang memberikan kesempatan penulis untuk dapat dibimbing Prof. Usman Sumo F.T;
7. Semua dosen departemen Kimia yang telah membagikan ilmu pada penulis;
8. Semua staf departemen, Pak Trisno, dan laboran-laboran yang membantu penulis dalam berbagai hal;
9. Tim Bioinformatika S1, S2, dan S3 terutama rekan penulis Nissia Apriyanti atas diskusi-diskusi selama penelitian berlangsung;

10. Rindu Wahono atas gambar makara, *software-software*, ilmu komputer, dvd-dvd film dan kursus organiknya serta celaan-candaan yang mewarnai keseharian penulis;
11. Theresia Ansi Virda Arizona yang selama dua tahun rela hidup berdampingan dengan penulis, atas waktu dan obrolan tidak penting yang selalu kita habiskan bersama;
12. Kartika Puspa Nigrum yang senantiasa berbagi gosip, canda, dan tawa, terimakasih telah percaya kepada penulis untuk berbagi cerita;
13. Martinus Adi Anggoro yang telah lulus mendahului penulis atas dorongan semangat melalui smsnya;
14. Sahabat asrama: Kharisma Amalia Lukman dan Ayudiani, yang menemani penulis sejak awal perkuliahan; para punggawa NTC (Faiza, Putu, Feri, dan semua anggota lainnya), Tantri dan Winda yang senantiasa tidur bersama saat menginap di lab; Tim Bioinformatrip (Didit, Noval: “Kapan kita berangkat?”)
15. Semua rekan penelitian lantai 3 (Tanti, Vania V, Wisnu, Indra dll), dan rekan penelitian lantai 4 (Britsanti, Nanik, Vania R, Atyka, Steffany, Hogan dll);
16. Sahabat Kimia '06, dan semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Penulis

2010

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

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

Nama : Raima Syahidah Noors
NPM : 0606029050
Program Studi : S1Reguler
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Simulasi Dinamika Molekul *RNA-dependent RNA-polymerase* Virus Dengue dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal :
Yang menyatakan

(Raima Syahidah Noors)

ABSTRAK

Nama : Raima Syahidah Noors
Program Studi : S1 Reguler Kimia
Judul : Simulasi Dinamika Molekul *RNA-dependent RNA-polymerase*
Virus Dengue dengan Inhibitor Potensial Peptida Siklis
Disulfida

Pada penelitian terdahulu telah diusulkan dua buah ligan polipeptida siklik disulfida-CDEEC dan CDGSC-sebagai inhibitor potensial untuk enzim RNA-dependent RNA-polymerase virus dengue melalui molecular docking. Simulasi molecular docking dilakukan dengan keadaan tanpa pelarut dimana enzim dibuat rigid dan ligan dibiarkan bebas berotasi untuk mencari konformasi terbaik. Pada kenyataan dalam sistem seluler terdapat pelarut yang membuat enzim memiliki pergerakan dinamis. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan simulasi dinamika molekul untuk memperkirakan sistem kompleks enzim-ligan yang lebih nyata. Simulasi dinamika molekul dijalankan pada selama 5ns pada suhu 300 dan 312 K. Pada akhir simulasi 300 K CDEEC membentuk ikatan dengan dua residu penting pada RdRp yaitu Arg-729 dan Arg-737 sedangkan CDGSC tidak berikatan dengan residu penting manapun. CDEEC juga memberikan hasil yang lebih baik dibanding CDGSC pada simulasi 312 K. CDEEC membentuk ikatan dengan dua residu penting yaitu Arg-737 dan Ser-710 sementara CDGSC tidak berikatan dengan satupun residu penting. Berdasarkan hasil tersebut CDEEC merupakan inhibitor yang lebih baik dan layak untuk dikembangkan sebagai obat anti dengue.

Kata Kunci : anti-dengue, docking, dinamika molekul, RdRp, polipeptida
xiv+89 halaman; 22 gambar; 9 tabel;
Daftar Pustaka : 37 (2002-2010)

ABSTRACT

Name : Raima Syahidah Noors
Program Study : Chemistry
Title : Molecular Dynamics Simulation of RNA-dependent RNA-polymerase Dengue Virus with Potential Inhibitor of Disulfide Cyclic Peptide

Previous researches have proposed two ligands of disulfide cyclic polypeptide which are CDEEC and CDGSC as potential inhibitor of RNA-dependent RNA-polymerase dengue virus by molecular docking. Molecular docking simulation is done without a solvent in which enzyme is made rigid and ligand was left free to rotate to find the best conformation. In fact in a cellular system there is a solvent that makes the enzyme has a dynamic movement. Therefore in this paper molecular dynamics simulation is done to estimate more reliable condition of enzyme-ligand complex. In this work molecular dynamics simulation is done during 5 ns with two different temperature, 300 and 312 K. At the end of MD simulation at 300 K, CDEEC binds to two RdRp important residues, Arg-729 and Arg-737 while CDGSC doesn't bind to any important residues. Simulation at 312 K also revealed nearly the same result, CDEEC binds to two RdRp important residues, Arg-737 and Ser-710, whereas CDGSC doesn't bind to any important residues. Based on the result of these two simulation, CDEEC is proposed as a better inhibitor of RdRp dengue virus and feasible to be developed as anti-dengue drug.

Key Words : anti-dengue, docking, molecular dynamics, polypeptide, RdRp
xiv+89 pages ; 22 pictures, 9 tables,
Bibliography : 37 (2002-2010)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI ILMIAH	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH	xiv
BAB 1. Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Hipotesis.....	4
1.4 Tujuan Penelitian	4
BAB 2. Tinjauan Pustaka	5
2.1 Virus Dengue	5
2.1.1 Daur Hidup Virus Dengue	6
2.1.2 Pemetaan Genom Virus Dengue	7
2.1.3 NS5.....	8
2.1.4 NS5 <i>RNA-dependent RNA Polymerase</i>	9
2.2 Enzim.....	9
2.3 Inhibitor Enzim	10
2.4 <i>Drug Development</i> dan <i>Drug Design</i>	11
2.4.1 <i>Rational Drug Design</i>	12
2.4.2 Peptida Sebagai Obat	14
2.5 <i>Molecular Docking</i>	15
2.6 Simulasi Dinamika Molekul	16
2.6.1 Ensambel.....	17
2.6.2 Parameter Simulasi.....	18
2.6.3 Minimisasi.....	19
2.6.4 Tahapan Simulasi Dinamika Molekul.....	20
2.7 <i>Molecular Operating Environment</i>	21
BAB 3. Metode Penelitian.....	23
3.1 Pencarian Data Struktur Tiga Dimensi Enzim NS5 <i>RNA-Dependent RNA Polymerase</i> Virus Dengue	23
3.2 Visualisasi dan Persiapan Enzim RdRp Virus Dengue	23
3.3 Penggambaran Ligan Peptida.....	23
3.4 <i>Docking</i> ligan peptida dengan enzim RdRp.....	25
3.4.1 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Protein	25
3.4.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Ligan	25
3.4.3 <i>Docking</i>	25

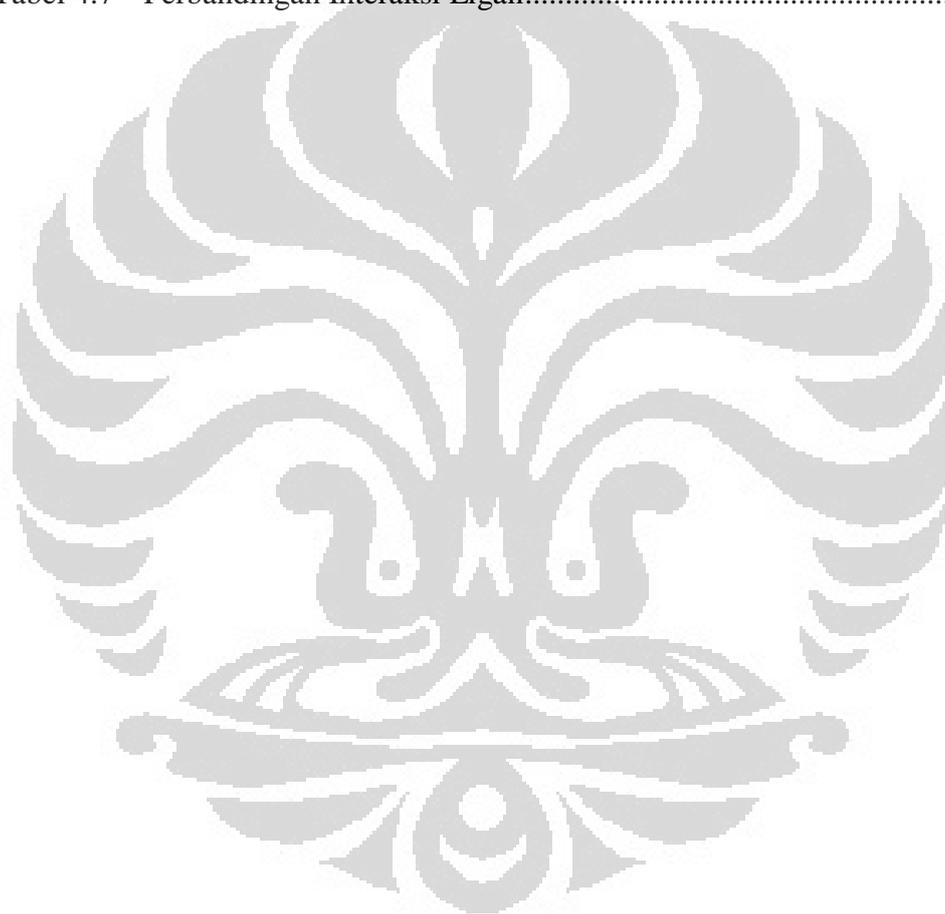
3.5	Analisa hasil <i>docking</i>	26
3.5.1	Nilai Energi Bebas Ikatan	26
3.5.2	Interaksi Ligan	26
3.6	Simulasi Dinamika Molekul	26
3.6.1	Inisialisasi.....	26
3.6.2	Simulasi.....	26
3.7	Analisa Hasil Simulasi Dinamika Molekul.....	27
3.7.1	Konformasi selama Simulasi.....	27
3.7.2	Interaksi Ligan selama Simulasi	27
BAB 4.	Hasil dan Pembahasan.....	28
4.1	Pencarian Data Struktur Tiga Dimensi Enzim NS5 <i>RNA-Dependent RNA Polymerase</i> virus dengue	28
4.2	Visualisasi dan Persiapan Enzim RNA-Dependent RNA-Polymerase Virus Dengue	28
4.3	Penggambaran Ligan Polipeptida Siklik Disulfida	31
4.4	<i>Docking</i> Ligan Polipeptida dengan Enzim RdRp Virus Dengue.....	32
4.4.1	Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Enzim RdRp Virus Dengue	32
4.4.2	Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Ligan.....	33
4.4.3	<i>Docking</i> Enzim dengan Ligan	34
4.5	Analisa Hasil <i>Docking</i>	35
4.5.1	Energi Bebas Ikatan.....	36
4.5.2	Interaksi Ligan	37
4.6	Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan Ligan Polipeptida Siklik Disulfida	39
4.7	Analisa Hasil Simulasi Dinamika Molekul	41
4.7.1	Analisa Konformasi selama Simulasi Dinamika Molekul	42
4.7.2	Analisa Interaksi Ligan selama Simulasi Dinamika Molekul	43
4.7.2.1	Simulasi Dinamika Molekul pada 300 K	44
4.7.2.2	Simulasi Dinamika Molekul pada 312 K	50
4.7.2.3	Perbandingan Interaksi Ligan Simulasi Dinamika Molekul 300 K dan 312 K	57
BAB 5.	PENUTUP.....	59
5.1	Kesimpulan.....	59
5.2	Saran.....	59
	Daftar Pustaka.....	61
	Lampiran-lampiran.....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Penggambaran Struktur Virus Dengue	5
Gambar 2.2	Daur Hidup Virus Dengue	7
Gambar 2.3	Pemetaan genom virus dengue	8
Gambar 2.4	Tahapan <i>Drug Development</i>	12
Gambar 2.5	Skema <i>Rational Drug Design</i>	14
Gambar 2.6	<i>Docking</i> antara enzim dengan ligan	16
Gambar 2.7	Tahapan Simulasi Molekul	21
Gambar 3.1	Ligan CDEEC	24
Gambar 4.1(a)	Gambar enzim RdRp secara utuh	30
Gambar 4.1(b)	Penggambaran muatan ketiga residu penting	30
Gambar 4.1(c)	Penggambaran ketiga residu penting dengan untai 3tP dari 3'dGTP	30
Gambar 4.2	Gambar Enzim RdRp Virus Dengue yang telah terprotonasi...32	
Gambar 4.3(a)	Interaksi antara enzim RdRp setelah <i>docking</i> dengan CDEEC	38
Gambar 4.3(b)	Interaksi antara enzim RdRp setelah <i>docking</i> dengan CDGSC	38
Gambar 4.4(a)	Interaksi ligan CDEEC sebelum SDM 300 K	48
Gambar 4.4(b)	Interaksi ligan CDEEC sesudah SDM 300 K	48
Gambar 4.4(c)	Interaksi ligan CDGSC sebelum SDM 312 K	49
Gambar 4.4(d)	Interaksi ligan CDGSC sesudah SDM 312 K	49
Gambar 4.5(a)	Interaksi ligan CDEEC sebelum SDM 300 K	55
Gambar 4.5(b)	Interaksi ligan CDEEC sesudah SDM 300 K	55
Gambar 4.5(c)	Interaksi ligan CDGSC sebelum SDM 312 K	56
Gambar 4.5(d)	Interaksi ligan CDGSC sesudah SDM 312 K	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Keuntungan dan Kerugian Penggunaan Peptida sebagai Obat	15
Tabel 2.2	Daftar Aplikasi dalam MOE	22
Tabel 4.1	Tabel Data Nilai S hasil <i>Docking</i>	37
Tabel 4.2	Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi Tahap <i>Run</i>	44
Tabel 4.3	Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi tahap <i>Cool</i>	47
Tabel 4.4	Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap <i>Heat</i>	50
Tabel 4.5	Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap <i>Run</i>	51
Tabel 4.6	Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap <i>Cool</i>	54
Tabel 4.7	Perbandingan Interaksi Ligan	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Bagan Kerja	64
Lampiran 2	Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida	65
Lampiran 3	Daftar Asam Amino	66
Lampiran 4	Visualisasi Enzim RdRp virus dengue dengan keenam motifnya.....	67
Lampiran 5	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue pada 300 K.....	68
Lampiran 6	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDEEC pada 300 K.....	70
Lampiran 7	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDGSC pada 300 K.....	72
Lampiran 8	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue pada 312 K.....	74
Lampiran 9	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDEEC pada 312 K.....	77
Lampiran 10	Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDGSC pada 312 K.....	80
Lampiran 11	Tabel Data Hasil <i>Docking</i>	83
Lampiran 12	Plot Energi Potensial Total Sistem terhadap Waktu Tahap Inisialisasi	84
Lampiran 13	Plot Energi Potensial Total Sistem terhadap Waktu Tahap Simulasi	87

DAFTAR ISTILAH

- ADMET : Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi dan Toksisitas; memerlukan aspek farmakokinetik dari senyawa obat.
- Antiviral : metode pengobatan yang digunakan secara khusus untuk merawat infeksi virus. Seperti antibiotik untuk bakteri, antiviral digunakan spesifik untuk virus tertentu. Berbeda dengan vaksin yang bekerja dengan cara menginduksi sel imun tubuh, antiviral bekerja dengan cara menghambat perkembangan virus sehingga virus tidak mampu menginfeksi tubuh.
- de novo : mengacu pada sintesis senyawa kompleks dari senyawa yang lebih sederhana.
- Finger* : bagian pada struktur tiga dimensi enzim yang diibaratkan seperti jari-jari pada saat tangan terkepal
- Forcefield* : kumpulan persamaan dan parameter yang mendefinisikan potensial permukaan dari sebuah molekul
- Genom : keseluruhan bahan genetik yang membawa semua informasi pendukung kehidupan pada suatu makhluk hidup, baik yang merupakan gen atau bukan.
- RMS : Root Mean Square; uji statistik untuk menghitung nilai-nilai yang bervariasi
- RMSD : Root Mean Square Distance; pengukuran terhadap jarak rata-rata antara tulang punggung dengan protein yang disuperposisikan.
- Serotipe : sekelompok mikroorganisme, virus, atau sel yang diklasifikasikan berdasarkan antigen pada permukaan selnya.
- Thumb* : bagian pada struktur tiga dimensi enzim yang diibaratkan seperti ibu jari pada saat tangan terkepal

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan ilmu pengetahuan yang pesat telah membawa berbagai perubahan dalam hidup manusia. Sebagai salah satu contoh, kemajuan dalam ilmu biologi dan bioinformatika telah membawa pemahaman yang lebih baik mengenai bagaimana fungsi suatu organisme dalam skala seluler dan molekuler. Sebagai dampak dari kemajuan ini, kebanyakan penelitian dalam bidang industri farmasi saat ini mulai mengidentifikasi target yang cocok dalam organisme dan merancang obat untuk berinteraksi dengan target. (Franca, *et al.* 2006). Perancangan obat dengan cara ini dikenal dengan pendekatan *target-oriented* atau dikenal juga dengan *rational drug design*.

Dalam *rational drug design*, proses perancangan obat dimulai dengan mengetahui struktur target protein dan kemudian membentuk basis data yang memuat kumpulan senyawa yang diperkirakan berinteraksi dengan target protein tersebut. Untuk menentukan senyawa yang memiliki interaksi paling baik dan menjadi kandidat untuk disintesa menjadi obat dilakukan serangkaian teknik analisa dengan menggunakan bantuan komputer. Dua teknik komputasi yang paling dikenal dalam proses perancangan obat adalah *docking* dan simulasi dinamika molekul.

Teknik *docking* dirancang untuk menemukan konformasi yang paling sesuai dari ligan dan reseptornya (Alonso, *et al.* 2006). Sedangkan simulasi dinamika molekul merupakan salah satu bagian dari pendekatan komputasi dimana atom dan molekul dibiarkan saling berinteraksi selama periode waktu tertentu sehingga tingkah laku sistem dapat teramati (Nurbaiti, 2009). Teknik *docking* yang cepat dan murah dapat dikombinasikan dengan simulasi dinamika molekul yang lebih memakan biaya untuk memperkirakan kompleks protein-ligan yang lebih nyata (Alonso, *et al.* 2006).

Penyakit dengue yang disebabkan oleh infeksi virus dengue masih menjadi masalah kesehatan masyarakat dunia. Virus dengue (DENV) telah menginfeksi 50 hingga 100 juta orang tiap tahun, dengan 500.000 pasien menderita penyakit yang lebih parah yaitu demam berdarah dengue atau *dengue hemorrhagic fever* (DHF) dan mengakibatkan kurang lebih 20.000 kematian terutama pada anak-anak. Virus dengue ditransmisikan kedalam tubuh manusia melalui gigitan oleh nyamuk betina dari genus *Aedes* (Qi. *et al*,2008).

DENV merupakan virus yang termasuk pada famili Flaviviridae, dengan genusnya adalah *flavivirus*. Virus ini mempunyai empat serotipe yang dikenal dengan DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 (<http://www.infeksi.com/articles.php?lng=in&pg=53>, diakses 27 Januari 2010 10:59 WIB). Infeksi oleh salah satu serotipe tidak melindungi pasien dari infeksi ketiga serotipe lainnya. Infeksi dari salah satu serotipe justru akan memperparah akibat apabila terinfeksi ketiga serotipe lainnya (Tomlinson. *et al*, 2009). Dikarenakan adanya empat serotipe yang berbeda inilah, pengembangan vaksin untuk dengue menjadi sulit. Selain itu pengembangan vaksin juga dipersulit dengan kurangnya model hewan yang cocok untuk dengue. Dengan keadaan seperti ini, antiviral menjadi salah satu cara pengobatan untuk dengue yang menjanjikan.

DENV merupakan virus RNA yang genom RNA-nya memiliki panjang sekitar 10,7 kb. RNA genom ditranslasi menjadi poliprotein tunggal, yang kemudian dipecah menjadi tiga protein struktural (C-prM-E) dan tujuh protein nonstruktural (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) oleh protease virus maupun protease sel (Yap, *et al*, 2007). Protein-protein yang telah diketahui ini dapat menjadi target inhibitor antiviral untuk penanggulangan DENV.

NS5 dari semua jenis flavivirus memiliki setidaknya 3 enzim yang penting untuk propagasi viral. Terletak pada bagian N-terminal dari NS5, terdapat kurang lebih 320 residu yang merupakan *S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase* (MTase) yang memiliki fungsi sebagai MTase dan guaniltransferase (Qi, *et al*.2008). Bagian C-terminal NS5 pada posisi residu 420-900 merupakan *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) yang bertanggung jawab untuk sintesis dari template RNA intermediet untuk replikasi selanjutnya

dari genom RNA untai positif (Qi. *et al*, 2008). Dikarenakan sel manusia kekurangan *RNA-dependent DNA* atau *RNA polymerase* seperti pada *HIV-1 reverse transcriptase* atau RdRp flavivirus, maka jenis enzim ini menjadi salah satu target obat yang paling menjanjikan sebagai antiviral (Sampath & Padmanabhan, 2009).

Yin *et al* pada tahun 2009 telah menemukan dan mensintesa sebuah inhibitor alosterik untuk RdRp DENV yaitu senyawa turunan dari asam n-sulfonilntranilat. Senyawa ini diidentifikasi dapat menghambat secara selektif polimerase viral dengue dan berdasarkan studi komputasional simulasi dinamika molekul terhadap kompleks RdRp dengan senyawa ini diketahui bahwa senyawa tersebut berikatan pada sisi alosterik antara daerah *finger* dan *thumb* RdRp. Pemetaan daerah *finger* dan *thumb* RdRp dapat dilihat pada **Lampiran 4**.

Bian (2009) telah memodelkan berbagai jenis polipeptida siklis disulfida untuk menjadi inhibitor RdRp DENV melalui *molecular docking*. Dari penelitiannya tersebut, Bian mengusulkan sebuah senyawa yaitu CDEEC sebagai kandidat obat untuk mengatasi infeksi DENV. Selain itu, Karimah (2009) juga merancang polipeptida siklik disulfida sebagai inhibitor bagi RdRp dengan menggunakan asam amino yang berbeda dan mengusulkan sebuah senyawa baru sebagai kandidat obat, yaitu CDGSC. Bian (2009) dan Karimah (2009) melakukan perancangan obat dengan menggunakan teknik *molecular docking* dimana enzim dibuat rigid dan ligan dibuat dinamis. Pada kenyataannya, kompleks enzim-ligan berada dalam sel dimana didalamnya terdapat pelarut sehingga enzim memiliki sifat dinamis. Oleh karena itu, untuk mendapatkan kondisi kompleks enzim-ligan yang lebih menyerupai keadaan sebenarnya, dalam tulisan ini akan dilakukan simulasi dinamika molekul.

1.2 Perumusan Masalah

Melalui simulasi yang akan dilaksanakan terhadap kedua inhibitor potensial, CDEEC dan CDGSC, ingin diketahui:

- Apakah kedua inhibitor potensial dapat berinteraksi dengan residu-residu penting pada saat simulasi *docking* dan dinamika molekul dilakukan?

- Apakah interaksi yang terjadi antara inhibitor dengan enzim RdRp stabil sepanjang masa simulasi dinamika molekul?
- Bagaimana perubahan konformasi yang terjadi saat simulasi dinamika molekul dijalankan?

1.3 Hipotesis

Baik CDGSC maupun CDEEC diharapkan akan memperlihatkan interaksi dengan RdRp yang sama pada saat *docking* dan simulasi dinamika molekul. CDGSC diharapkan menjadi ligan yang lebih baik dibanding CDEEC

1.4 Tujuan

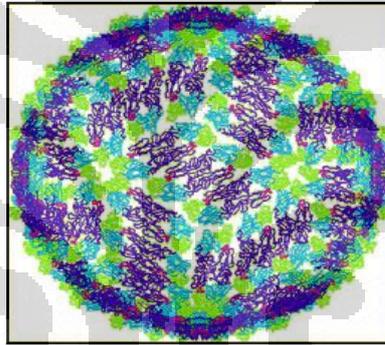
Simulasi dinamika molekul kompleks enzim RdRp DENV dengan dua ligan yang diusulkan oleh Bian (2009) dan Karimah (2009) bertujuan untuk menganalisa interaksi kedua ligan tersebut dengan enzim dalam keadaan berpelarut. Simulasi ini juga bertujuan untuk mengamati perubahan konformasi enzim dan pengaruh pengkompleksan ligan terhadap perubahan konformasi enzim. Pada akhirnya, dengan simulasi dinamika molekul diharapkan dapat ditentukan ligan yang lebih baik diantara CDEEC dan CDGSC untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat obat anti dengue.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Virus Dengue

Virus dengue (DENV) merupakan bagian dari flavivirus, sebuah kelompok yang terdiri dari 70 virus, dan sebagian besar (termasuk *west nile virus* (WNV), *yellow fever virus*, *japanese encephalitis virus* (JEV), *tick-borne encephalitis* (TBEV) dan *australian encephalitis viruses*) berkaitan dengan penyakit pada manusia (Umareddy, 2007). Struktur DENV dapat dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Penggambaran Struktur Virus Dengue

[sumber: <http://www.microbiologybytes.com/virology/Flaviviruses.html>]

Terdapat empat serotipe antigen yang berbeda dari virus dengue, yaitu DENV-1, DENV-2, DENV-3 dan DENV-4. Pengklasifikasian keempat serotipe DENV ini berdasarkan jenis antibodi yang dihasilkan dalam tubuh manusia setelah terinfeksi. Semua serotipe memiliki morfologi dan genome sama tetapi antigennya berbeda (Hendra, 2006).

Infeksi oleh salah satu serotipe tidak melindungi pasien dari infeksi ketiga serotipe lainnya. Infeksi dari salah satu serotipe justru akan memperparah akibat apabila terinfeksi ketiga serotipe lainnya (Tomlinson. *et al*, 2009). Hal ini disebabkan karena adanya antibodi heterolog yang telah ada sebelumnya akan membentuk kompleks antigen-antibodi, selanjutnya akan mengaktifasi sistem komplemen yang menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding pembuluh

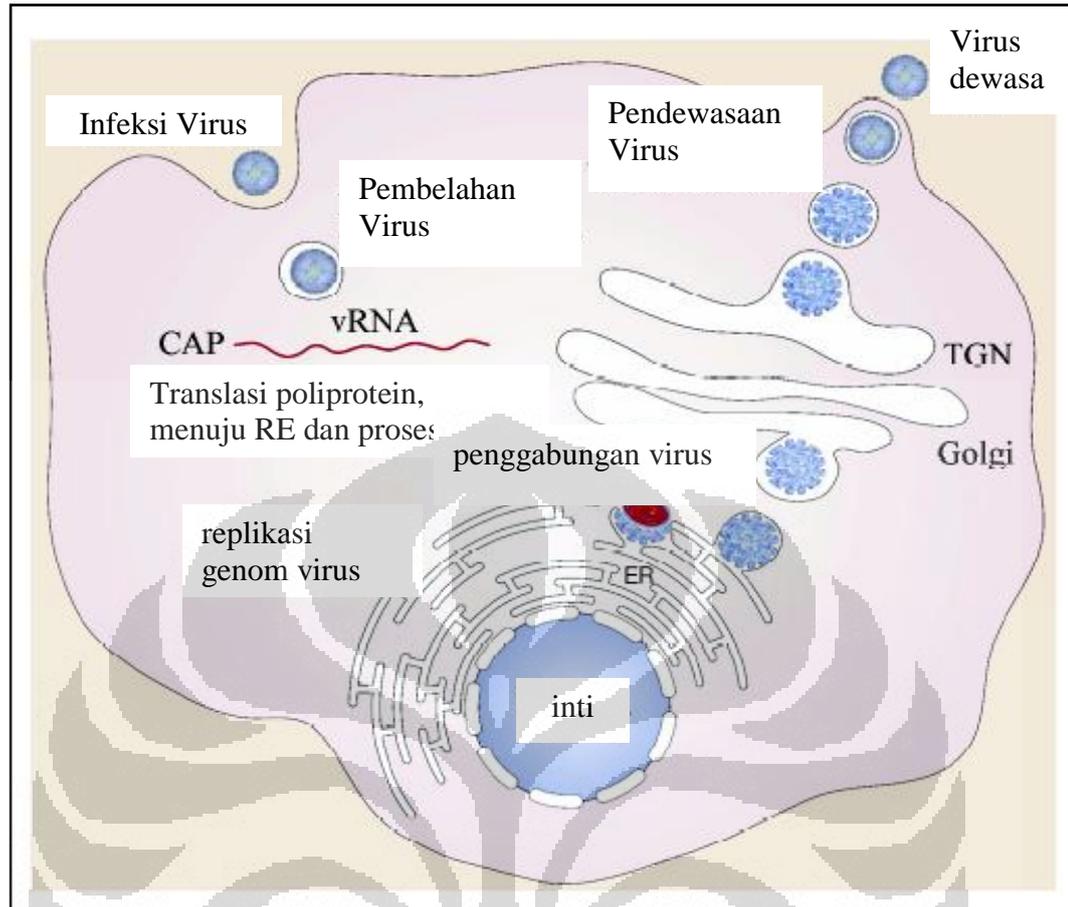
darah dan menyebabkan merembesnya plasma dari intravaskuler ke ekstravaskuler (Nurfadly,2009). Teori ini dikenal dengan sebutan Teori *Antibody-Dependent Enhancement* (ADE) (Hendra, 2006).

2.1.1 Daur Hidup Virus Dengue

Virion mengikat pada permukaan sel inang dan masuk secara perlahan melalui endositosis yang dimediasi reseptor. Asidifikasi dari vesikel endosomal memicu trimerisasi ireversibel protein E pada virion yang menghasilkan gabungan dari viral dan membran sel. Setelah penggabungan terjadi, nukleokapsid (NC) dilepaskan ke dalam sitoplasma, RNA positif ditranslasikan menjadi poliprotein tunggal yang kemudian mengalami kotranslasi dan pos-translasi oleh protease viral dan inang.

Replikasi genom terjadi pada membran intraseluler. Pemasangan dan formasi partikel virus yang belum dewasa terjadi pada permukaan retikulum endoplasma (ER) ketika protein struktural dan RNA-yang baru disintesis terikat pada lumen ER. Walaupun partikel ini mengandung E dan prM, membran lipid dan NC, partikel-partikel ini tidak dapat menginduksi penggabungan sel inang, sehingga sel inang tetap tidak terinfeksi, karena protein prM diperlukan untuk proses selanjutnya. Partikel subviral juga diproduksi di ER, tetapi hanya mengandung glikoprotein dan membran, dan kurang protein C dan RNA genomik, yang membuatnya tidak mampu menginfeksi juga.

Hasil dari viral yang belum dewasa yang tidak mampu menginfeksi dan partikel subviral ditransportasikan ke TGN. Partikel virion yang belum dewasa kemudian membelah karena furin protease inang sehingga menjadi dewasa. Virion dewasa dan partikel subviral kemudian dilepaskan oleh sel inang melalui eksositosis (Qi. *et al*,2008). Daur hidup DENV ini dapat diamati melalui **Gambar 2.2**.

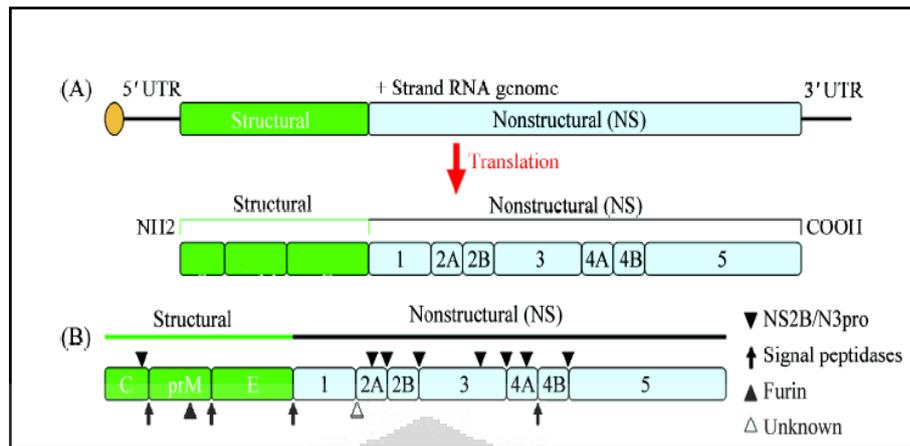


Gambar 2.2 Daur Hidup Virus Dengue

[sumber: Qi, *et al.*, 2008]

2.1.2 Pemetaan Genom Virus Dengue

Genom RNA dengue memiliki panjang sekitar 10,7 kb dan mengandung struktur *cap* tipe I metil guanosa pada ujung 5-nya tetapi tanpa ekor poliadenil. Genom RNA ditranslasi menjadi poliprotein tunggal, yang kemudian dipecah menjadi tiga protein struktural (C-prM-E) dan tujuh protein nonstruktural (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) oleh protease virus maupun protease sel (Yap *et al.*, 2007). Pemetaan sederhana dari poliprotein tunggal DENV terlihat pada **Gambar 4.3**.



Gambar 2.3 Pemetaan genom virus dengue

[Sumber: Qi *et al.*, 2008]

Seperti yang dijelaskan oleh Sampath dan Padmadabhan (2009), fungsi masing-masing protein adalah sebagai berikut:

- Protein C : berinteraksi dengan genom RNA viral untuk menghasilkan nukleokapsid;
- prM dan protein E : berasosiasi untuk membentuk partikel virus yang belum dewasa dan tidak memiliki kemampuan menginfeksi;
- Protease NS3-NS2B : situs pembuatan poliprotein;
- Helikase NS3 : meluluhkan stuktur sekunder untuk menginisiasi sintesis RNA atau untuk memisahkan dupleks RNA, baik untuk memisahkan intermediet dsRNA yang terbentuk selama sintesis RNA viral maupun sebagai sebuah translokase yang dapat menghilangkan protein yang terikat pada RNA viral.

2.1.3 NS5

NS5 terletak pada ujung C genom RNA virus dan terdiri dari kurang lebih 900 residu asam amino. NS5 dari semua jenis flavivirus memiliki setidaknya dua enzim yang penting untuk propagasi viral. Terletak pada bagian N-terminal dari NS5, terdapat kurang lebih 320 residu yang merupakan *S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase* (MTase) yang memiliki fungsi sebagai MTase dan guaniltransferase. Bagian C-terminal NS5 pada posisi residu 420-900 merupakan *RNA-dependent RNA*

polymerase (RdRp) yang bertanggung jawab untuk sintesis dari *template* RNA intermediet untuk replikasi selanjutnya dari genom RNA untai positif (Qi. *et al*, 2008).

2.1.4 NS5 RNA-dependent RNA Polymerase

RNA-dependent RNA Polymerase (RdRp) *flavivirus* menunjukkan aktivitas primer-indepen, enzim ini menginisiasi sintesis RNA secara *de novo*. Setelah inisiasi, perubahan konformasi harus terjadi untuk memungkinkan terjadinya proses perpanjangan untai RNA (Malet. *et al*, 2008).

RdRp viral memiliki ciri utama yang membedakannya dari konformasi dasar *right handed “u-shaped”* yang diadopsi dari polimerase DNA. Seperti yang pertama kali terlihat pada RdRp HCV, sisi aktif terlihat dikelilingi oleh elemen struktural yang panjang (dinamakan “*fangertips*”) yang menghubungkan daerah *thumb* dan *finger*. Struktur tambahan memberikan penampilan yang lebih kompak terhadap molekul, seperti menjadi lebih terbuka-dan kurang mendesak- dibanding stuktur DNA polimerase. Lebih jauh lagi, tambahan motif sekuens (motif F) yang diduga memiliki peranan penting dalam stabilisasi lahirnya pasangan basa hanya ada di RdRp (Yap.*et al*, 2009). Motif ini dapat dilihat di **Lampiran 4**.

2.2 Enzim

Enzim adalah katalis. Meskipun kebanyakan enzim adalah protein, telah ditemukan dalam jumlah yang sedikit jenis enzim yang berupa protein ribonukleat dan beberapa di antara jenis ini memiliki aktivitas pada bagian RNA dibanding bagian proteinnya. Enzim membentuk ikatan sementara dengan satu atau lebih reaktan pada reaksi yang dikatalisis. Dengan membentuk ikatan tersebut enzim memperkecil energi aktivasi yang dibutuhkan sehingga reaksi dapat dipercepat. (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Enzymes.html> jum'at 14 mei 2010 11:16 WIB)

Enzim seperti molekul protein lainnya memiliki berat molekul yang bervariasi sekitar 12.000 hingga lebih dari satu juta g/mol. Beberapa enzim tidak memerlukan gugus kimia untuk aktivitasnya selain dari residu asam amino yang

dimilikinya. Jenis enzim lain membutuhkan tambahan komponen kimia yang disebut dengan kofaktor- ion anorganik seperti Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} atau Zn^{2+} - atau kompleks organik maupun molekul organologam yang disebut koenzim. (Lehninger, 2004)

Hal yang berbeda dari reaksi yang dikatalisis enzim adalah reaksi berlangsung dalam bagian tertentu pada enzim yang disebut dengan sisi aktif. Molekul yang terikat dalam sisi aktif disebut sebagai substrat. Pada permukaan sisi aktif terdapat residu asam amino dengan gugus substituen yang mengikat substrat dan mengkatalisis transformasi kimianya. Konsep enzim kompleks enzim-substrat pertama kali diperkenalkan oleh Charles-Adolpe Wurtz pada 1880 dan dirangkum dalam persamaan berikut:



dimana E adalah enzim, S adalah substrat dan P adalah produk. ES dan EP adalah kompleks enzim dengan substrat dan enzim dengan produk. (Lehninger, 2004)

Struktur dan fungsi enzim dipengaruhi oleh interaksi nonkovalen yang terdiri atas ikatan hidrogen, ikatan ionik, interaksi van der Waals, dan interaksi hidrofobik. Akumulasi dari keempat jenis interaksi ini memberikan kontribusi terhadap kestabilan struktur tiga dimensi dan aktivitas katalitik enzim. (Wuriyani, 2009)

2.3 Inhibitor Enzim

Inhibitor enzim merupakan molekul yang berinteraksi melalui cara tertentu dengan enzim untuk mencegah enzim bekerja dengan normal. Terdapat beberapa jenis inhibitor, yaitu: nonspesifik, ireversibel, reversibel –kompetitif dan nonkompetitif. Racun dan obat juga merupakan contoh dari inhibitor enzim.

Inhibitor nonspesifik mempengaruhi semua enzim dengan cara yang sama. Metode inhibisi dari jenis inhibitor ini meliputi perubahan kimia atau fisika hingga terjadi denaturasi protein dari enzim dan oleh karena itu bersifat ireversibel.

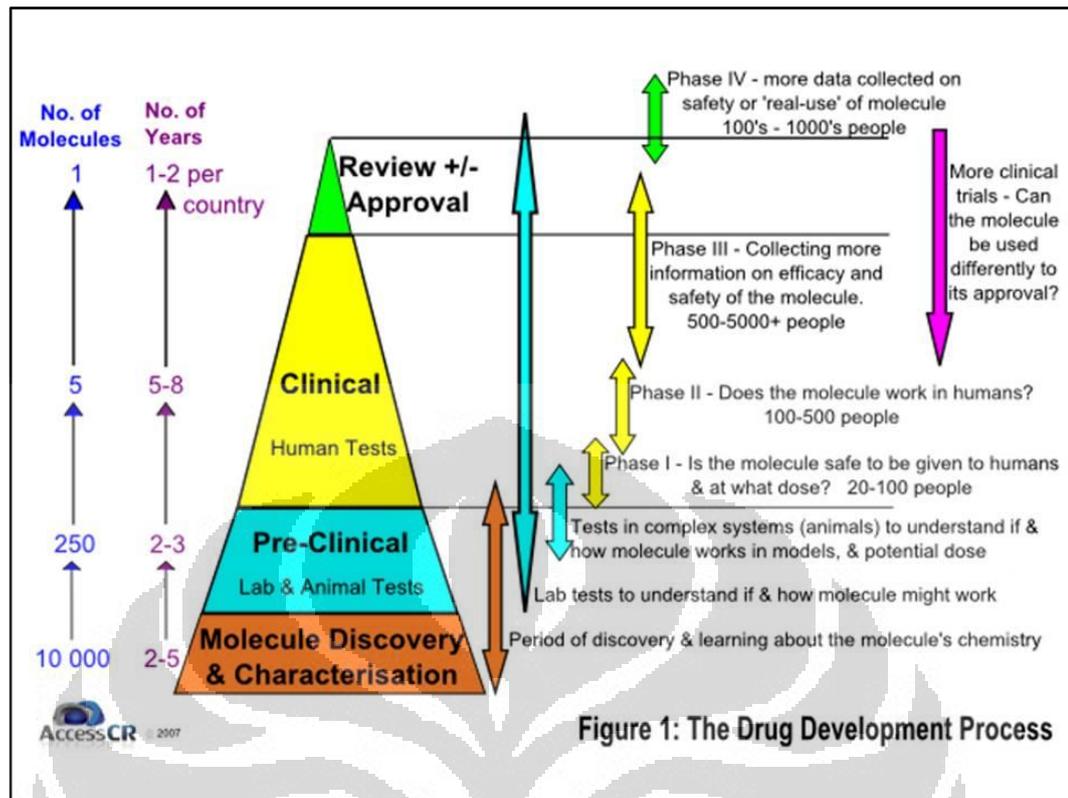
Inhibitor spesifik menghambat kerja enzim secara selektif. Inhibitor jenis ini dibagi lagi menjadi dua jenis yaitu inhibitor kompetitif dan nonkompetitif. Inhibitor kompetitif adalah semua jenis senyawa yang memiliki kemiripan

struktur kimia dan geometri dari substrat. Inhibitor ini berkompetisi untuk mendapatkan sisi aktif yang sama dengan molekul substrat. Inhibitor berinteraksi dengan enzim tanpa adanya reaksi kimia. Proses inhibisi dipengaruhi oleh konsentrasi inhibitor, konsentrasi substrat, dan afinitas relatif enzim dan substrat pada sisi aktif. Sedangkan inhibitor nonkompetitif bereaksi baik pada posisi yang jauh atau dekat dengan sisi aktif. Efek dari inhibitor nonkompetitif adalah perubahan bentuk enzim dan sisi aktifnya, sehingga substrat tidak dapat bereaksi lagi dengan enzim.

Inhibitor ireversibel membentuk ikatan kovalen yang kuat dengan enzim. Inhibitor jenis ini bereaksi pada posisi yang dekat ataupun jauh dari sisi aktif. Inhibitor ini tidak bisa digantikan dengan kelebihan substrat. Inhibitor reversibel bekerja dengan cara merusak struktur dasar enzim sehingga enzim kehilangan aktivitas biologisnya.

2.4 *Drug development dan Drug Design*

Drug development atau pengembangan obat adalah serangkaian proses panjang dalam penentuan, perancangan, pembuatan dan penjualan suatu obat. Proses yang termasuk di dalamnya adalah penelitian pra-klinis yakni pengujian terhadap mikroorganisme atau hewan dan percobaan klinis terhadap manusia (Wuriyani, 2009). Proses penemuan dan pengembangan obat ini merupakan kegiatan yang mahal akibat tingginya biaya yang dibutuhkan untuk melaksanakan tiap tahapannya. Total rata-rata biaya pengembangan obat berkisar antara US\$ 897 juta hingga US\$ 1,9 milyar dan membutuhkan waktu antara 10-15 tahun (Karimah, 2009) seperti yang terlihat pada **Gambar 2.4**.



Gambar 2.4 Tahapan *Drug Development*

[<http://www.accesscr.com.au/upload/Image/Drug%20Development%20Process%20jpg.jpg>]

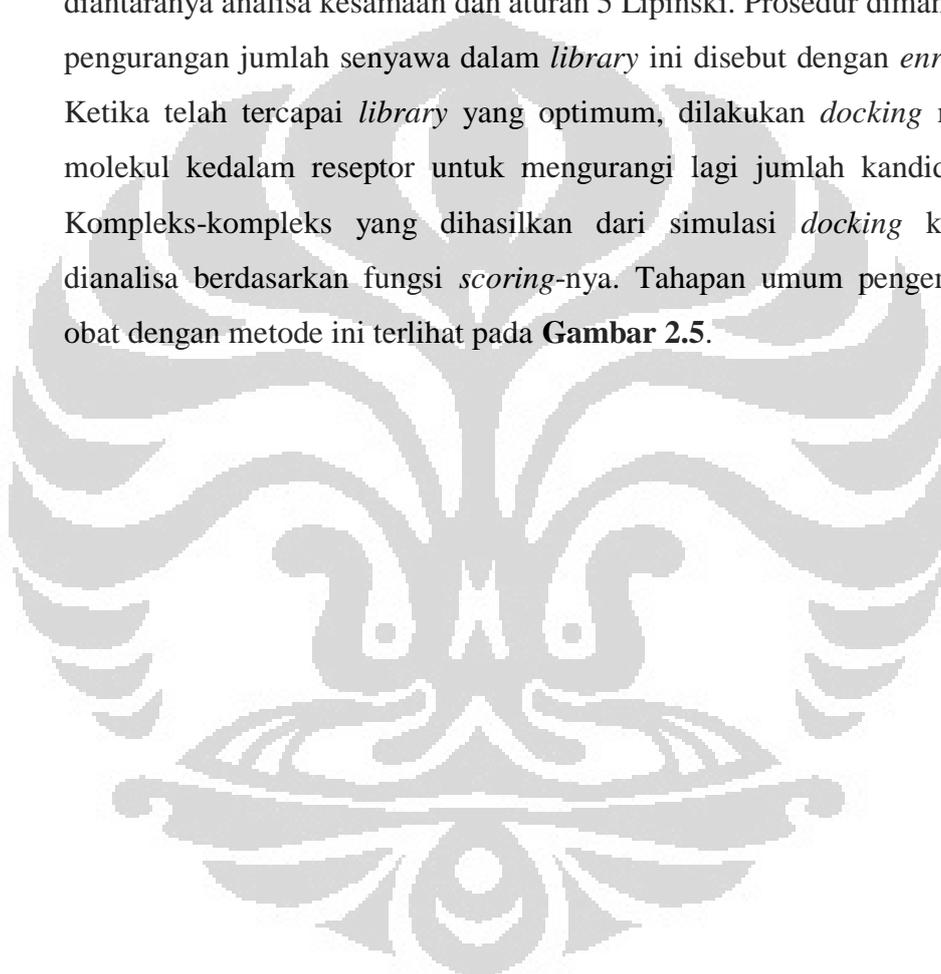
Drug design adalah suatu metode perancangan obat (*drug*) yang didasarkan pada analisis biologis dan fisik dari targetnya. Target dalam proses ini merupakan molekul-molekul atau bagian dari makromolekul yang berperan vital dalam proses metabolik dari kondisi patologis seseorang akibat penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen. Umumnya *drug* ini dirancang untuk menghambat atau menghentikan jalur metabolisme dari molekul-molekul utama penyebab penyakit dengan cara membentuk ikatan terhadap sisi aktif dari molekul-molekul tersebut sehingga molekul *drug* dapat berperan sebagai inhibitor. (<http://www.techfak.uni-bielefeld.de/bcd/ForAll/Introd/drugdesign.html> diakses 7 juni 2010, 16:57 WIB)

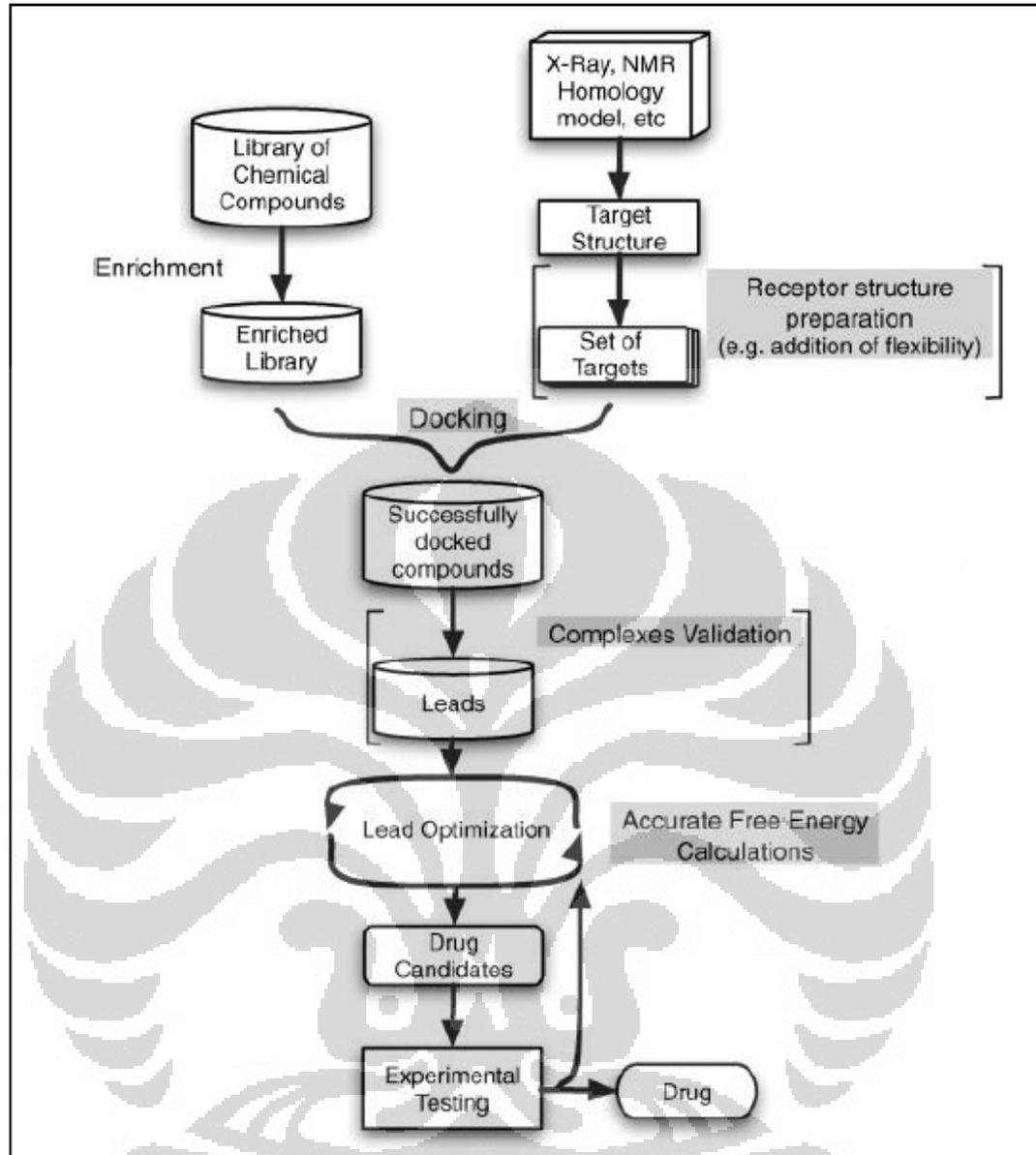
2.4.1 Rational Drug Design

Rational drug design merupakan pengembangan dari *drug design*. Perancangan obat dengan metode ini dimulai ketika struktur dari protein target telah diketahui. Tahapan selanjutnya adalah mengumpulkan *database*

yang berisi kumpulan-kumpulan senyawa yang dapat berinteraksi dengan protein target. Kumpulan senyawa ini disebut dengan *library*. Sebelum simulasi *docking* dijalankan, dilakukan metode *virtual screening* untuk mengurangi jumlah senyawa dalam *library*. *Virtual screening* adalah pemilihan senyawa yang memenuhi kriteria tertentu melalui alat komputasional.

Kriteria yang biasa digunakan untuk pemilihan senyawa tersebut diantaranya analisa kesamaan dan aturan 5 Lipinski. Prosedur dimana terjadi pengurangan jumlah senyawa dalam *library* ini disebut dengan *enrichment*. Ketika telah tercapai *library* yang optimum, dilakukan *docking* molekul-molekul kedalam reseptor untuk mengurangi lagi jumlah kandidat obat. Kompleks-kompleks yang dihasilkan dari simulasi *docking* kemudian dianalisa berdasarkan fungsi *scoring*-nya. Tahapan umum pengembangan obat dengan metode ini terlihat pada **Gambar 2.5**.





Gambar 2.5 Skema *Rational Drug Design*

[sumber: Alonso et al.,2006]

2.4.2 Peptida sebagai Obat

Peptida adalah molekul yang terdiri dari dua atau lebih asam amino yang terhubung dengan ikatan peptida. Ikatan peptida terbentuk dari reaksi kondensasi antara gugus karboksilat asam amino dengan gugus amina dari asam amino lain (Pratt, Charlotte W. dan Kathleen Cornley, 2004). Peptida memiliki jumlah residu asam amino yang lebih kecil dibanding protein, dan batasan suatu rangkaian asam amino masih disebut peptida adalah 50 asam amino (Lehninger, 2004).

Dengan perkembangan ilmu, saat ini peptida juga telah berkembang menjadi salah satu senyawa yang digunakan untuk *drug design*. Hal ini dikarenakan walaupun memiliki kestabilan yang rendah, peptida memiliki aktivitas dan spesifitas yang tinggi, toksisitas yang rendah serta relatif tidak terakumulasi dalam tubuh (Sehgal, 2006). Keuntungan dan kerugian dari penggunaan peptida sebagai obat terangkum dalam **Tabel 2.1**.

Tabel 2.1 Keuntungan dan Kerugian Penggunaan Peptida sebagai Obat

Keuntungan	Kerugian
<ul style="list-style-type: none"> • Ukuran kecil • Aktifitas tinggi • Spesifitas tinggi • Minimasi kontak dengan obat lain • Immunogenitas • Toksisitas rendah • Diversitas • Mudah untuk memilih 	<ul style="list-style-type: none"> • Stabilitas yang rendah dalam tubuh • Bioavailabilitas yang rendah secara oral • Membutuhkan suntikan • Penghantaran ke sel yang rendah

[diolah dari sumber: Huther, A dan Dietrich, U, 2007.]

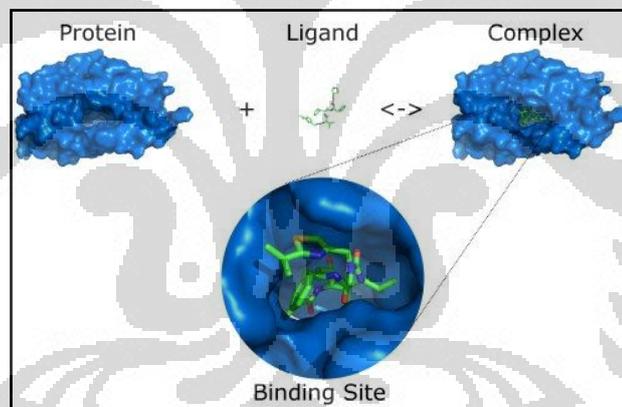
2.5 *Molecular Docking*

Molecular docking merupakan suatu proses komputasi dalam mencari sebuah ligan yang dapat terikat dengan baik secara geometris dan energisitas terhadap sisi ikatan dari sebuah protein (Wuriyani, 2009). Prinsip dasar teknik ini adalah menghasilkan satu set konformasi dari kompleks reseptor dan mengurutkannya berdasarkan kestabilan (Alonso, Hernain et al 2006). Tujuan akhir dari proses *molecular docking* adalah pencapaian konformasi yang optimal untuk protein dan ligan, dan orientasi relatif antara protein dan ligan yang memiliki energi bebas keseluruhan paling kecil. Proses *docking* secara umum diperlihatkan pada **Gambar 2.6**.

Untuk melakukan proses *docking*, yang pertama kali dibutuhkan adalah struktur protein yang diinginkan. Struktur protein ini dan *database* dari sejumlah ligan kemudian berperan sebagai masukan untuk program *docking*. Keberhasilan program *docking* bergantung pada dua komponen, yaitu *search algorithm* (algoritma pencarian) dan *scoring*.

Bagian pencarian meliputi semua kemungkinan orientasi dan konformasi dari protein yang dipasangkan dengan ligan. Selain itu, semua kemungkinan rotasi dan translasi relatif ligan terhadap protein menjadi dasar pencarian. Kebanyakan program *docking* menggunakan fleksibilitas ligan sebagai dasar pencarian dan beberapa menggunakan fleksibilitas reseptor protein. Semua bentuk konformasi yang diperoleh selama pencarian disebut dengan pose.

Seperti yang dijelaskan oleh Eldemiro Moman, *scoring* merupakan nilai dari posisi yang terukur pada saat ligan tepat berikatan dengan sisi aktif aktif enzim. Proses *scoring* selama fase posisi biasanya melibatkan perhitungan energi meliputi energi elektrostatik, van der Waals, dan ketegangan rantai ligan. Untuk proses *re-scoring* selanjutnya dapat digunakan untuk mengestimasi secara lebih akurat energi bebas ikatan ($\Delta G_{\text{binding}}$) dan mungkin termasuk entropi dan pelarutan.



Gambar 2.6 Docking antara enzim dengan ligan

[Sumber: <http://www-ucc.ch.cam.ac.uk/research/images/docking-small.jpg>]

2.6 Simulasi Dinamika Molekul

Dinamika molekul mengamati molekul-molekul dalam suatu sistem tertutup, di mana jumlah materi (molekul) dalam sistem tidak berubah. Energi dapat keluar atau masuk sistem, tergantung dari jenis simulasi yang dilakukan. Suatu sistem adalah suatu kuantitas materi atau volume yang dipilih untuk diamati, sedangkan materi dan volume di luar sistem disebut lingkungan. Pemisah antara sistem dan lingkungan disebut batas, yang secara teoritis tidak memiliki massa ataupun volume tersendiri. Sistem terbagi atas sistem tertutup, jika materi

tidak dapat menembus batas, dan sistem terbuka, jika materi dapat menembus batas (Witoelar, 2002).

Materi pada skala makroskopis terdiri dari atom-atom berjumlah sangat besar (bilangan Avogadro berorde 10^{23}). Dikarenakan keterbatasan komputasi, maka simulasi dinamika molekul hanya dapat melakukan perhitungan untuk ratusan atau ribuan atom. Semakin banyak atom dalam simulasi, semakin realistis hasil yang diperoleh, tetapi biaya komputasi semakin mahal (Sofyan, 2007) dan waktu yang dibutuhkan untuk simulasi pun semakin lama. Pada penelitian ini dilakukan simulasi terhadap RdRp virus dengue yang terdiri dari kurang lebih 500 residu asam amino memerlukan waktu 7-10 hari untuk menjalankan satu simulasi.

2.6.1 Ensambel

Suatu ensambel adalah koleksi dari keadaan sistem yang mungkin yang memiliki keadaan mikroskopis berbeda tetapi memiliki keadaan makroskopis sama. Beberapa ensambel yang sering digunakan dalam dinamika molekul adalah ensambel mikrokanonikal, ensambel kanonikal, dan ensambel isobarik-isotermal. Ensambel digunakan untuk mengatur kondisi suhu, tekanan, dan volume selama simulasi dijalankan.

1. Ensambel Mikrokanonikal (NVE)

Ensambel mikrokanonikal adalah ensambel yang memiliki karakteristik jumlah molekul N dan volume V konstan serta energi total E konstan. Ensambel ini diperoleh dari sistem yang terisolasi sehingga tidak ada interaksi sistem dengan lingkungan. Dengan demikian energi tidak dapat keluar dan masuk ke sistem sehingga energi total E konstan.

2. Ensambel Kanonikal (NVT)

Ensambel kanonikal adalah ensambel dengan keadaan suhu tetap dan jumlah molekul N dan volume V tidak berubah.

3. Ensambel Isobarik-Isotermal (NPT)

Dalam ensambel isobarik-isotermal, volume sistem dapat berubah atau menjadi suatu variabel. Pada ensambel ini tekanan dan suhu sistem dijaga agar tetap konstan dan jumlah molekul N pun tidak berubah.

2.6.2 Parameter Simulasi

Dalam menjalankan simulasi dinamika molekul, terdapat beberapa jenis parameter yang harus ditentukan. Parameter-parameter tersebut diantaranya adalah tahapan waktu, jari-jari *cutoff*, sistem protein-pelarut, parameter suhu dan tekanan, dan suhu simulasi.

Pemilihan tahapan waktu (*timestep*) pada proses simulasi didasarkan pada pertimbangan akurasi dan ekonomis dimana nilai tahapan waktu dapat mempengaruhi kesalahan yang terkait dengan algoritma. Nilai tahapan waktu besar akan mempercepat proses simulasi dengan tingkat kesalahan besar dan sebaliknya, nilai tahapan waktu yang kecil akan memberikan kesalahan yang kecil akan tetapi membutuhkan waktu simulasi yang lebih lama. (Nurbaiti, 2009)

Jari-jari *cutoff* merupakan suatu nilai batas bagi partikel agar masuk dalam perhitungan gaya total atom. Semakin besar jari-jari *cutoff* yang digunakan maka akan semakin banyak atom yang dimasukkan kedalam perhitungan dan menambah waktu simulasi yang dibutuhkan. Oleh karena itu, efisiensi waktu simulasi juga dapat dilakukan dengan penentuan jari-jari *cutoff* yang sesuai.

Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan menggunakan proses solvasi/pelarutan biomolekul untuk mendapatkan keadaan yang mendekati sistem nyata. Menurut Becker dkk pada 2001 terdapat dua jenis sistem pelarut yang dipergunakan, yaitu implisit dan eksplisit (Nurbaiti, 2009). Menurut Onufriev dkk pada 2004, pada sistem implisit molekul pelarut hanya berperan sebagai medium dan tidak terlalu terlibat dalam suatu proses simulasi (Nurbaiti, 2009). Pada sistem ini, pengaruh pelarut dimodelkan oleh pelarut kontinyu dimana pelarut diganti dengan suatu tetapan dielektrik kontinyu yang dirumuskan sebagai Persamaan Generalized Born. Sedangkan pada sistem solvasi eksplisit, molekul protein secara nyata dikelilingi oleh molekul air (Nurbaiti, 2009).

Parameter suhu dan tekanan diatur dengan memilih ensambel yang sesuai dengan tujuan simulasi yang akan dilakukan. Pemilihan suhu dimana simulasi akan berjalan juga disesuaikan dengan tujuan simulasi.

2.6.3 Minimisasi

Proses minimisasi energi atau dikenal lebih singkat dengan sebutan minimisasi merupakan tahapan krusial dalam simulasi dinamika molekul. Melalui tahapan inilah akan didapatkan struktur molekul dengan energi paling rendah yang menyerupai keadaannya di alam. Dalam disertasinya pada tahun 2009 Nurbaiti menyebutkan bahwa:

Koordinat awal suatu biomolekul yang akan dipelajari umumnya diperoleh dari hasil kristalografi sinar-X ataupun pemodelan struktur 3D, yang jarak antar satu atom dengan yang lainnya sangat dekat ataupun sangat jauh dari posisi kesetimbangan. Ketidaksesuaian geometri ini menyebabkan terjadinya interaksi yang tidak disukai (*bad van de Waals contact*) maupun efek-efek sterik berenergi tinggi yang nantinya mengakibatkan sistem yang disimulasikan menjadi tidak stabil. Karenanya setelah parameter simulasi sistem disesuaikan sehingga mendekati keadaan nyata, dilakukan proses minimisasi sehingga posisi geometri atom yang tidak sesuai dapat dikembalikan sedemikian rupa menghasilkan energi potensial terendah bagi sistem.

Berdasarkan tinjauan entropi, energi potensial permukaan protein memiliki banyak sekali daerah minimum lokal (*local minima*), sehingga proses minimisasi energi untuk mencari minimum global (*global minima*) merupakan suatu proses yang tidak sederhana. Beberapa algoritma minimisasi telah dikembangkan untuk mencari posisi geometri atom yang paling sesuai dengan tingkat energi terendah. Namun karena proses melokalisasi minimum global merupakan proses yang rumit sehingga pengembangan algoritma minimum hingga saat ini hanya diarahkan pada pencarian minimum lokal terdekat. Secara umum, terdapat 2 jenis algoritma minimisasi yaitu (i) yang tidak melibatkan proses derivatif disebut sebagai algoritma orde ke 0 dan (ii) yang melibatkan proses derivatif, terdiri atas algoritma orde pertama seperti metode *steepest descent* (SD) dan *conjugate gradient* (CG) dan algoritma orde kedua misalnya metode Newton Raphson. Adapun algoritma

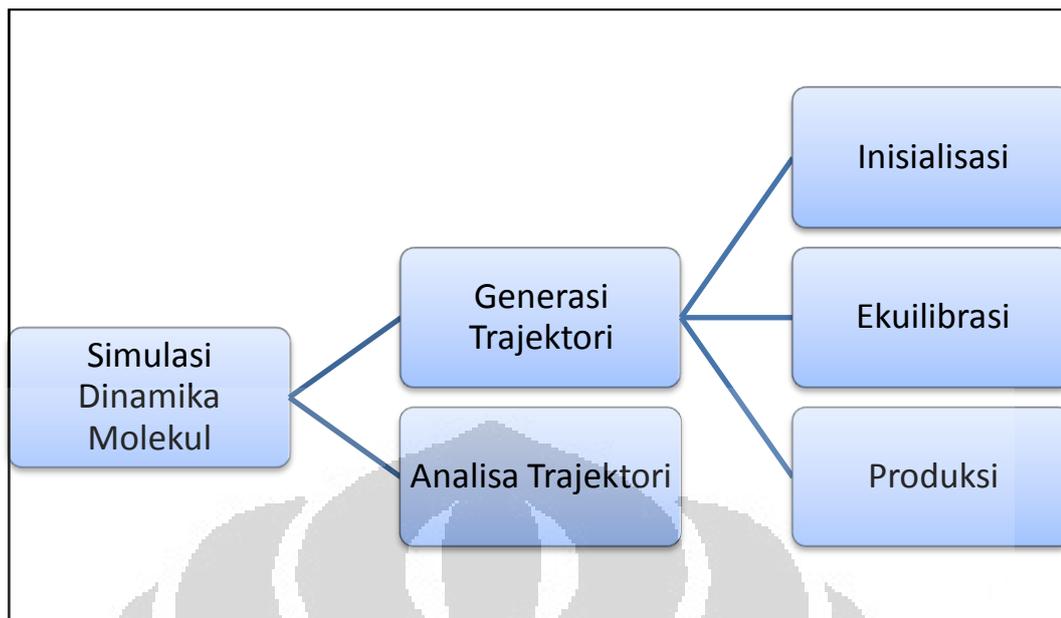
minimisasi yang paling banyak digunakan dalam simulasi biomolekul adalah metode SD dan CG.

Metode SD merupakan algoritma minimisasi yang paling sederhana ((Deift dan Zhou, 1993) yaitu dengan menggunakan turunan pertama untuk mencari minimum lokal. Algoritma ini seringkali disebut sebagai perkiraan titik-pelana (*saddle-point approximation*) dan memanfaatkan informasi tentang kemiringan tetapi tidak bentuk kurva/kontur energi permukaan protein.

Metode *Conjugate Gradient* juga menggunakan turunan pertama untuk mencari minima lokal. Perbedaan metode ini dengan metode *steepest descent* adalah algoritma CG memperhitungkan langkah sebelumnya untuk melangkah pada tahapan berikutnya sehingga dapat mengatasi kekurangan metode SD dalam mengenali informasi bentuk kurva energi potensial permukaan.

2.6.4 Tahapan Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan produksi trajektori molekul-molekul dalam simulasi, lalu analisa dapat dilakukan bersamaan atau setelah simulasi. Trajektori tergenerasi menjadi tiga tahapan yaitu, inisialisasi, ekuilibrasi, dan produksi. Dalam proses simulasi dinamika molekul yang dilakukan pada penelitian ini, tahapan ekuilibrasi dan inisialisasi tergabung dalam satu tahap simulasi. Tahapan simulasi dinamika molekul ini dapat terlihat pada **Gambar 2.7**.



Gambar 2.7 Tahapan Simulasi Molekul

[diolah dari sumber: Witoelar, 2002]

Tahap inisialisasi terdiri dari penentuan sistem unit algoritma dan parameter simulasi dan inisialisasi molekul-molekul. Inisialisasi molekul melibatkan penentuan posisi awal dan kecepatan awal molekul-molekul (Witoelar, 2002). Ekuilibrasi merupakan proses pemerataan kerapatan posisi atom di semua bagian sistem sekaligus memberikan kondisi rileks pada molekul akibat pengekangan ketika sistem dipanaskan (Nurbaiti, 2009). Tahapan terakhir dalam simulasi, yaitu tahapan produksi merupakan tahap utama dalam simulasi dinamika molekul. Pada tahapan inilah diperoleh informasi mengenai interaksi atom dalam simulasi.

2.7 *Molecular Operating Environment*

Molecular operating environment (MOE) merupakan suatu sistem perangkat lunak komersial yang dirancang oleh *Chemical Computing Group* untuk membantu *cheminformatics*, *molecular modeling*, *bioinformatics*, *virtual screening*, *structured based design* dan dapat digunakan untuk membuat aplikasi baru yang berbasis SVL (*Scientific Vector Language*). (Karimah, 2009)

Perangkat lunak MOE merupakan perangkat yang bersifat interaktif, dirancang untuk komputer dengan sistem operasi *windows* dan alat *molecular*

modeling dengan aplikasi yang luas. Aplikasi yang dapat dijalankan dengan MOE terlihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2.2 Daftar Aplikasi dalam MOE

Bidang	Aplikasi
Bioinformatics	Structure and Family Databases, Fold/Homologue Identification, Alignment, Consensus Database
Cheminformatics	Descriptors, Similarity and Diversity, Conformation Databases, 3D Search, Pharmacophore Queries/Elucidation/Linkers, 2D Depiction, Structure-Activity Analysis, RECAP Analysis, SD Pipeline Commands
High Throughput Discovery	HTS Analysis, Binary QSAR, Combinatorial Library Design
Structure Based Design	Ligand Explorer, Active Site Detection, Contact Potentials, Docking, Fragment Analysis, Protein-Ligand Interactions and Fingerprints, BREED: 3D Ligand Generator, 3D Protonation State Assignment, Protomers and Tautomers, Surfaces and Maps
Protein Modeling	Homology Modeling, Residue Mutation, Mechanics, Dynamics, Analysis, Antibody Modeling, Protein pKa
Molecular Modeling and Simulations	Forcefields, Electrostatics, Mechanics, Dynamics, Diffraction, 3D Molecule Builders, Molecular Surfaces
Methodology Development and Deployment	Prototyping, Integrating, Distributed Computing
MOE/web	SD Filter, Structure Activity Report, Homology Search, Small Molecule Properties, Database Browser

[diolah dari sumber: MOE-tutorial, 2008]

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pencarian Data Struktur Tiga Dimensi Enzim NS5 *RNA-Dependent RNA Polymerase* Virus Dengue

Data Protein NS5 *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) virus dengue diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan PDB ID 2J7U yang dikeluarkan oleh *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB dengan alamat situs: <http://www.rcsb.org/pdb/>) menggunakan perangkat komputer yang terhubung dengan internet. Perangkat komputer yang digunakan memiliki spesifikasi Intel® Core™2 Duo CPU E7500 dengan RAM 2.00 GB, sistem operasi yang digunakan adalah Microsoft Windows XP Professional Version 2002 Service Pack 2 dengan browser internet Mozilla Firefox.

3.2 Visualisasi dan Persiapan Enzim RdRp Virus Dengue

Sebelum digunakan untuk proses *docking*, enzim RdRp virus dengue yang telah diunduh divisualisasi kedalam perangkat lunak MOE 2008.10 dan dilakukan beberapa persiapan awal. Dilakukan visualisasi untuk melihat posisi residu-residu penting dari enzim ini dan kemudian dilakukan persiapan sesuai parameter yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Bian, yaitu penghilangan molekul air, ion klorin, dan polietilen glikol . Hal ini dilakukan untuk memisahkan enzim dari ion-ion lain yang tidak berkaitan dengan proses katalisisnya. Setelah itu melalui pilihan *potensial setup* dilakukan pengaturan *forcefield* dan jenis solvasi yang akan digunakan.

3.3 Penggambaran Ligan Peptida

Ligan-ligan yang akan digunakan dalam penelitian ini berasal dari dua penelitian sebelumnya yaitu, CDGSC dan CDEEC. Kedua ligan pentapeptida ini digambar secara dua dimensi dengan menggunakan program *ACDlabs* dan dimodelkan secara siklik dengan ujung sistein. Gambar kemudian dioptimasi tiga

3.4 Docking ligan peptida dengan enzim RdRp

3.4.1 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Protein

Untuk mengoptimasi geometri protein pertama dilakukan protonasi untuk merubah keadaan makromolekul ke tingkat ionisasinya dengan *protonate3D*, optimasi *partial charge* dan selanjutnya dilakukan minimisasi energi hingga mencapai RMS (*root mean square*) gradient 0,05 karena RdRp merupakan molekul berukuran besar sehingga angka 0,05 dianggap telah memperlihatkan akurasi yang cukup tinggi. Parameter lainnya menggunakan *default*. Optimasi dilakukan dengan perangkat lunak MOE 2008.10.

3.4.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Ligan

Optimasi ligan dilakukan dengan MOE database viewer (dv). Seluruh ligan di *wash* untuk mendapatkan konformasi struktur yang paling disukai, kemudian optimasi dengan *force field* MMFF94x untuk mengatur potensial permukaan molekul, dan jenis solvasi yang dipilih *gas phase*. Minimisasi energi ligan selanjutnya dilakukan hingga mencapai RMS gradient 0,001 karena ligan merupakan molekul kecil sehingga diperlukan nilai RMS gradient yang lebih kecil untuk mendapatkan akurasi yang tinggi. Parameter yang lainnya menggunakan parameter awal MOE.

3.4.3 Docking

Simulasi *docking* dilakukan dengan program *MOE-dock*. Kedua ligan peptapeptida diatur untuk berinteraksi dengan residu enzim yang dipilih, yaitu Arg-737, Arg-729, dan Ser-710 yang merupakan residu-residu penting pada RdRp virus dengue. Enzim dibuat rigid, sedangkan ligan dibiarkan berotasi. *Placement method* yang digunakan adalah *triangle matcher* dengan *no.of return pose* 2500000, parameter lainnya sesuai pengaturan awal dari MOE.

3.5 Analisa hasil *docking*

3.5.1 Nilai Energi Bebas Ikatan

Nilai energi bebas ikatan yang dihasilkan pada proses *docking* dilihat pada arsip hasil proses *docking* yang disimpan dengan format .mdb dengan simbol S pada tabel data hasil *docking*. Nilai s dari kedua kompleks enzim-ligan dibandingkan untuk menentukan ligan dengan energi bebas terendah.

3.5.2 Interaksi Ligan

Analisa terhadap interaksi ligan dengan residu-residu asam amino enzim RdRp virus dengue diidentifikasi dan divisualisasi secara dua dimensi melalui menu *ligand interaction* pada MOE. Interaksi ligan yang dievaluasi berupa ikatan hidrogen dan kontak residu antara ligan dengan enzim.

3.6 Simulasi Dinamika Molekul

Sebelum simulasi dinamika molekul dijalankan, sistem dipreparasi dengan menu *partial charge* dan minimisasi energi dilakukan hingga mencapai RMS gradient 0,05. Selanjutnya dilakukan pemilihan solvasi yang sesuai melalui menu *potential setup*.

Simulasi dinamika molekul dilakukan dengan *MOE-dynamic* 2008.10. Simulasi dijalankan terhadap kompleks enzim-ligan CDEEC dan enzim-CSGDC. *Force field* MMFF99x digunakan untuk simulasi dinamika molekul dan ensambel yang dipilih adalah ensambel NVT dengan *time step* 1 fs dengan *sampling* setiap 0,5 ps.

3.6.1 Inisialisasi

Inisialisasi dilakukan selama 30 ps pada temperatur tetap 300K. Inisialisasi dilakukan untuk semua kompleks enzim-ligan dan enzim sendiri. Tahapan ini dilakukan tepat sebelum simulasi berlangsung.

3.6.2 Simulasi

Dilakukan simulasi dengan skala waktu 5 ns dengan proses pendinginan selama 20 ps. Simulasi dilakukan pada suhu 300 K dan 312 K.

Untuk simulasi pada suhu 312K terlebih dahulu dilakukan proses pemanasan selama 20 ps. Suhu 300 K merupakan suhu optimum enzim dan 312 K adalah suhu tubuh manusia saat terkena demam.

3.7 Analisa Hasil Simulasi Dinamika Molekul

Analisa dilakukan setelah proses simulasi selesai terhadap trajektore-trajektori simulasi dinamika molekul. Untuk masa inialisasi dilakukan pengamatan tiap 10 ps. Untuk proses ekuilibrasi 5 ns data molekul diambil setiap 500 ns dan untuk proses pemanasan serta pendinginan yang berjalan masing-masing selama 20 ps, pengamatan dilakukan setiap 5 ps.

3.7.1 Konformasi selama Simulasi

Data visualisasi konformasi kompleks tiap jeda waktu pengamatan disimpan dan kemudian diobservasi untuk melihat pergerakan enzim dan kompleks enzim-ligan selama simulasi.

3.7.2 Interaksi Ligan selama Simulasi

Analisa terhadap interaksi ligan dengan antara diidentifikasi dan divisualisasi secara dua dimensi melalui menu *ligand intercation* pada MOE. Interaksi ligan yang dievaluasi berupa ikatan hidrogen dan kontak residu antara ligan dengan enzim. Interaksi ini diidentifikasi pada setiap trajektori yang disimpan. Bagan kerja penelitian secara umum dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pencarian Data Struktur Tiga Dimensi Enzim NS5 *RNA-Dependent RNA Polymerase* Virus Dengue

Data struktur enzim RdRp yang digunakan diunduh dari *Protein Data Bank* <http://www.rcsb.org/pdb/>, yang dikelola oleh *Research Collaboratory for Structural Biology*. Enzim RdRp yang diunduh memiliki PDB ID 2j7u seperti yang juga digunakan pada dua penelitian terdahulu.

Enzim RdRp virus dengue dengan PDB ID 2j7u merupakan kristal enzim dengan resolusi 1,85 angstrom dan merupakan RdRp dari DENV3. Pada kristal enzim ini terdapat tiga buah atom logam yaitu logam Mg dan dua buah logam Zn. Selain ketiga logam tersebut, pada sutruktur enzim ini juga terdapat ion klorin dan molekul polietilen glikol.

Struktur ini diperoleh melalui difraksi sinar-X oleh Yap et al dan dipublikasi secara *online* sejak Mei 2007. RdRp virus dengue yang diunduh memiliki enam motif penyusun yang tetap (*conserved*) yaitu motif A, B, C, D, E, dan F. Visualisasi enzim RdRp virus dengue dengan PDB ID 2j7u ini dengan keenam motifnya dapat dilihat di **Lampiran 4**.

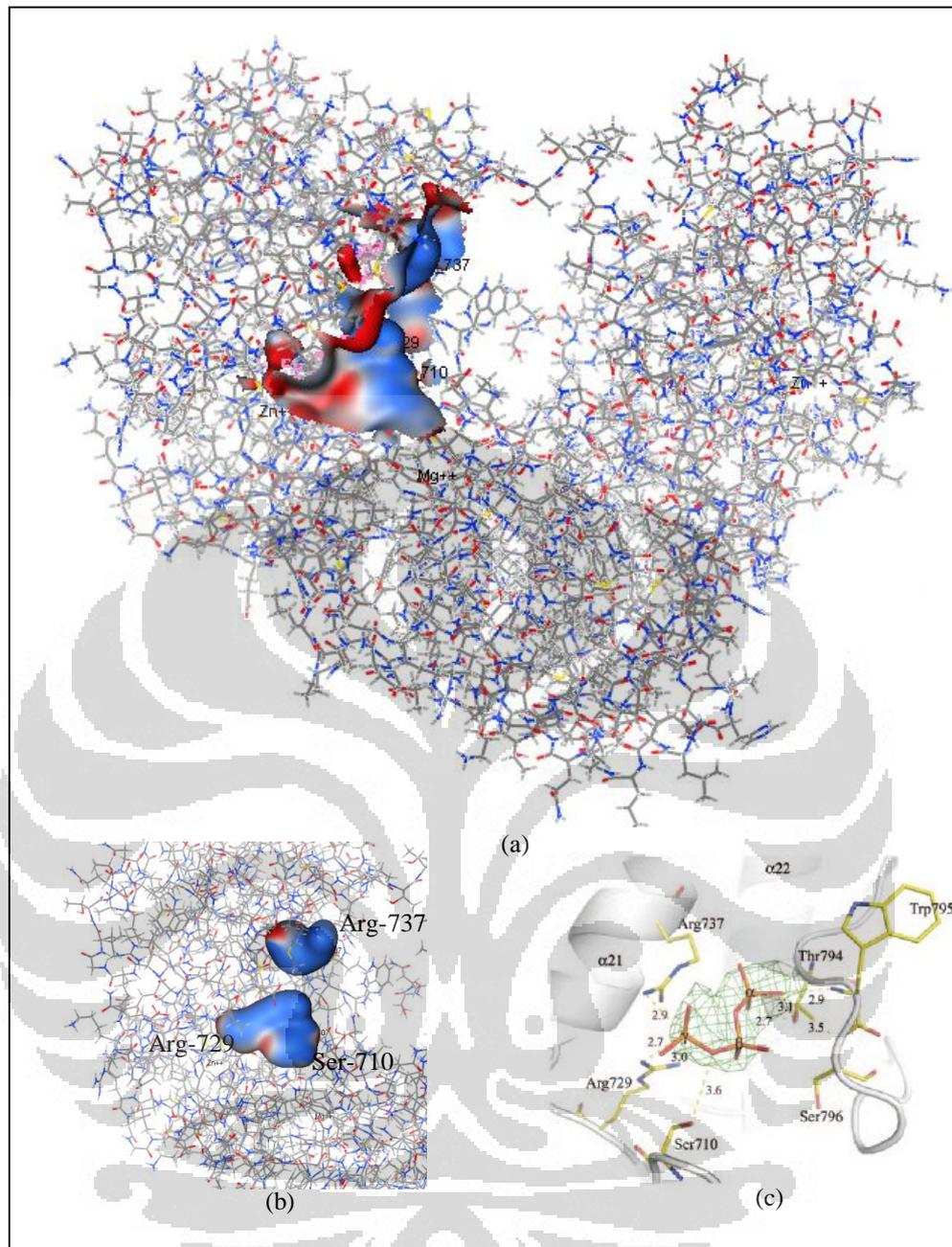
4.2 Visualisasi dan Persiapan Enzim *RNA-Dependent RNA-Polymerase* Virus Dengue

Melalui *MOE Sequence Editor* pada perangkat lunak MOE 2008.10 dilakukan penghilangan molekul air, klorin dan polietilen glikol dari struktur kristal. Molekul air dihilangkan karena pada proses *docking* yang akan dilakukan, enzim akan dibuat rigid. Molekul klorin dan polietilen glikol adalah molekul yang diperoleh saat pengkristalan kristal dan perlu dihilangkan karena tidak memiliki fungsi dalam kerja enzim. Enzim yang akan digunakan untuk *docking* terdiri enzim RdRp itu sendiri dan ketiga logam kofaktornya (satu Mg dan dua Zn).

Pada enzim yang telah diberikan perlakuan awal, dilakukan visualisasi untuk melihat posisi residu-residu yang memiliki fungsi penting dan akan digunakan untuk proses *docking*. Berdasarkan publikasi dari Yap et al pada tahun 2007 untuk melakukan kerjanya, enzim RdRp virus dengue memerlukan untai 3'dGTP dan dalam RdRp DENV3 untai tP (trifosfat) dari 3'dGTP ini letaknya ditandai oleh residu-residu Ser-710, Arg-729, dan Arg-737. Penggambaran interaksi untai tP (trifosfat) dari 3'dG terhadap ketiga residu tersebut dapat dilihat pada **Gambar 4.1(c)**.

Ser-710, Arg-729, dan Arg-737 merupakan residu-residu penting dalam RdRp virus dengue yang memiliki posisi tetap (*strictly conserved residues*) sepanjang rantai RNA positif dan diketahui menginisiasi replikasi dengan mekanisme secara de novo termasuk pada DENV 1-4 (Yap et al.,2007). Oleh karena itu, ketiga residu ini dijadikan target ikatan inhibitor saat proses *docking* dan simulasi dinamika molekul dan analisa sifat inhibisi ligan akan diamati dari interaksi ligan dengan ketiga residu ini.

Pada **Gambar 4.1(a)** terlihat bahwa ketiga residu penting dari RdRp virus dengue terletak di daerah *fingers* RdRp. Dari visualisasi ini juga terlihat bahwa letak ketiga residu penting agak menjorok ke bagian dalam enzim. Untuk mengetahui muatan ketiga residu penting, digunakan pilihan *surface and map* pada MOE 2008.10. **Gambar 4.1(b)** memberikan visualisasi yang lebih jelas mengenai posisi dan muatan ketiga residu penting. Dari **Gambar 4.1(b)** terlihat bahwa residu-residu penting pada RdRp virus dengue terlihat berwarna biru yang menandakan bahwa ketiga residu tersebut memiliki muatan positif.



Gambar 4.1 (a) Gambar enzim RdRp secara utuh, daerah berwarna biru dan merah menunjukkan daerah sekitar residu penting, warna merah menggambarkan muatan negatif dan biru muatan positif; (b) penggambaran muatan ketiga residu penting (c) penggambaran ketiga residu penting dengan untai 3tP dari 3'dGTP berdasarkan Yap et al, 2007

Melalui pilihan potential setup dilakukan pengaturan *forcefield* dan jenis solvasi yang akan digunakan. Berdasarkan penelitian sebelumnya *forcefield* yang

sesuai untuk proses *docking* enzim RdRp ini adalah MMFF94x dan keadaan solvasi dipilih pada *gas phase* (fasa gas) dimana perhitungan energi solvasi dihilangkan. Jenis *forcefield* MMFF94 dilaporkan sebagai *forcefield* yang sesuai dan efisien untuk meminimisasi kompleks enzim-ligan dan variannya, MMFF94x, menjamin geometri planar dari ikatan peptida (Mazur, Pawel et al. 2009). Selain itu, *forcefield* MMFF94x juga dapat menempatkan atom hidrogen pada posisi yang paling tepat sehingga sangat berguna untuk validasi posisi atom hidrogen dalam keadaan solvasi oleh molekul air (Wuriyani, 2009). Solvasi dipilih pada keadaan fasa gas karena pada tahapan *docking*, enzim akan dibuat rigid.

4.3 Penggambaran Ligan Polipeptida Siklik Disulfida

Ligan polipeptida yang digunakan dalam penelitian ini adalah ligan yang diusulkan oleh Bian yaitu Cys-Asp-Glu-Glu-Cys atau CDEEC, dan oleh Karimah, Cys-Asp-Gly-Ser-Cys atau CDGSC. Gambar kedua ligan dapat dilihat pada **Lampiran 2** dan tata cara penyingkatan asam amino dapat dilihat pada **Lampiran 3** Kedua ligan ini merupakan ligan-ligan yang dipilih setelah dilakukan simulasi *docking* pada serangkaian kandidat ligan. Untuk inhibisi RdRp virus dengue dipilih ligan yang terdiri dari residu asam amino bermuatan negatif karena residu target memiliki muatan positif. Ligan dimodelkan siklik dengan ikatan disulfida karena ikatan disulfida ini dipercaya dapat menstabilkan protein hingga temperatur diatas 100° C (Nurbaiti, 2009)..

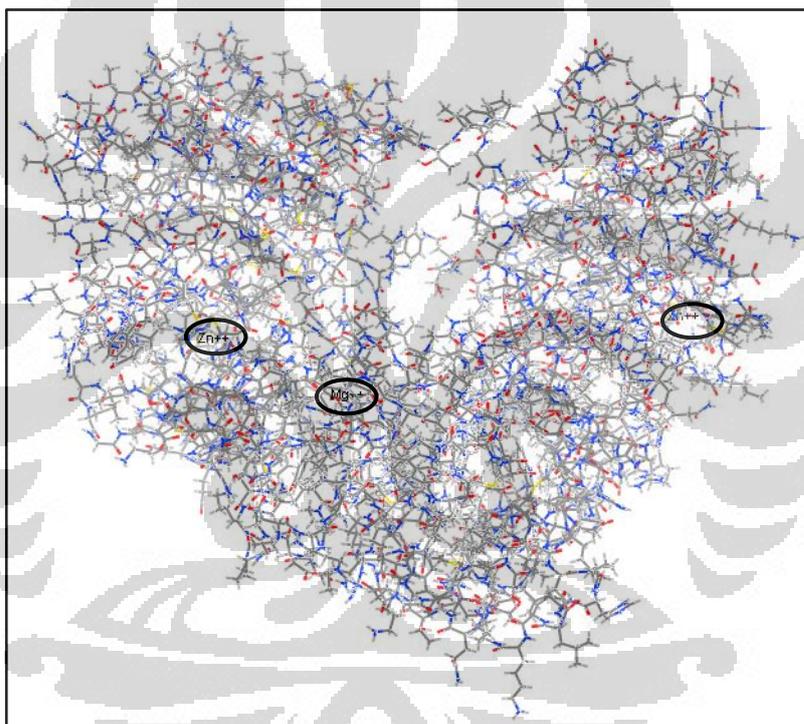
Ligan polipeptida siklik ini digambar secara dua dimensi dengan menggunakan perangkat lunak ACDlabs. Pada gambar yang dibuat kemudian dilakukan optimasi bentuk 3 dimensi dengan menggunakan menu *3D optimization*. Ligan yang telah dioptimasi disimpan dalam jenis file MDLMolfile.

Agar dapat digunakan dalam proses *docking* menggunakan perangkat lunak MOE 2008.10, ligan harus memiliki jenis *file* yang sesuai. MOE 2008.10 hanya dapat mendeteksi ligan dengan format MDLMol sehingga pada *file* ligan polipeptida yang telah dibuat perlu diubah. Format MDLMolfile ini dikonversi menjadi MDLMol dengan perangkat lunak VegaZZ.

4.4 Docking Ligan Polipeptida dengan Enzim RdRp Virus Dengue

4.4.1 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Enzim RdRp Virus Dengue

Optimasi geometri enzim RdRp virus dengue dilakukan dengan memilih menu *protonate3D* pada kolom *compute* dalam MOE 2008.10. Tahapan ini bertujuan untuk mengubah enzim kedalam bentuk ionisasinya dan menentukan koordinat tiga dimensi untuk atom-atom hidrogen dalam makromolekul. Atom-atom hidrogen diperukan untuk mekanika molekular, dinamika molekular atau kalkulasi elektrostatik. Visualisasi enzim yang telah diprotonasi dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Gambar Enzim RdRp Virus Dengue yang telah terprotonasi
(lingkaran hitam menunjukkan ketiga ion kofaktor)

Selanjutnya pada enzim yang telah terprotonasi ditambahkan muatan parsial dengan memilih menu *partial charge* pada pilihan *compute* dalam MOE 2008.10 dan parameter yang dipilih adalah *current forcefield*. Dengan pemilihan metode ini, penambahan muatan parsial dilakukan pada *forcefield* yang sebelumnya telah dipilih yaitu MMFF94x. Muatan parsial ini perlu dihitung untuk mengevaluasi energi potensial.

Tahapan berikutnya yang dilakukan adalah minimisasi energi enzim. Aplikasi *energy minimize* dalam MOE menghitung koordinat atomik yang merupakan *local minima* dari fungsi energi molekular. Minimisasi energi berguna untuk pembuatan molekul, penentuan konformasi dengan energi rendah, pencarian konformasi dan persiapan untuk simulasi dinamika molekul dan analisa vibrasional. Minimisasi energi dilakukan dengan mengaplikasikan teknik optimisasi non-linear dengan skala besar untuk menghitung konformasi (mendekati geometri awal) dimana energi dari atom-atom adalah nol. Minimisasi energi dilakukan dengan *forcefield* yang sama yaitu MMFF94x dan dilakukan hingga mencapai *RMS gradient* 0,05 kcal/Å.

4.4.2 Optimasi Geometri dan Minimisasi Energi Ligan

Ligan yang sebelumnya telah dikonversi hingga berformat MDLMol dapat secara langsung dibuka dengan MOE 2008.10 untuk kemudian dilakukan optimasi lebih lanjut. Optimasi ligan dalam MOE 2008.10 dilakukan dengan menggunakan *MOE database viewer*. Optimasi awal yang dilakukan adalah operasi *wash* untuk memperbaiki struktur ligan dan posisi atom hidrogen. Setelah itu dilakukan optimasi kalkulasi energi menggunakan *force field* MMFF94 hingga mencapai *RMS gradient* 0,001 kcal/Å. Parameter lain yang digunakan menggunakan pengaturan dasar dari MOE.

Operasi *wash* biasa dilakukan terlebih dahulu sebelum melakukan operasi utama pada *database* molekul yang bertujuan untuk meyakinkan bahwa molekul yang dimasukkan dalam *database* berada dalam bentuk yang sesuai untuk tahapan selanjutnya. Proses optimasi geometri dan minimisasi energi pada ligan diharapkan dapat menghilangkan *bad contact* dari struktur ligan. *Bad contact* yang dimaksud adalah interaksi yang bersifat tidak rasional yang muncul pada sistem molekuler dengan mengacu pada keadaan riil suatu sistem tertentu. Penghilangan *bad contact* akan menghasilkan bentuk geometri struktur yang sesuai atau mendekati keadaan sebenarnya di alam.

4.4.3 Docking Enzim dengan Ligan

Pada penelitian ini simulasi *docking* kembali dilakukan karena adanya perbedaan perangkat lunak yang digunakan dengan penelitian terdahulu. Selain itu, pada penelitian terdahulu proses simulasi *docking* dilakukan terhadap sekelompok kandidat ligan dengan jumlah yang banyak sehingga menyulitkan dalam proses pengambilan data. Dengan dilakukannya *docking* ulang maka proses pengambilan data akan menjadi lebih mudah karena dihasilkan data tunggal.

Proses *docking* enzim dengan ligan CDEEC dan CDGSC dikerjakan dengan menggunakan pilihan *MOE-Dock*. Proses *docking* dilakukan ligan CDEEC dan CDGSC terhadap enzim *RNA-dependent RNA polymerase* virus dengue. *Database* ligan diatur untuk berinteraksi dengan Ser-710, Arg-729, dan Arg-737. Pengaturan ini dilakukan dengan menggunakan *MOE sequence editor*. Pada tahapan ini, enzim dibuat rigid dan ligan dibiarkan bergerak (berotasi) secara bebas.

Untuk mendapatkan konformasi yang tepat, dilakukan pengaturan terhadap beberapa parameter dalam menu *docking*. *Placement method* yang dipilih adalah *triangle matcher* yang merupakan pengaturan awal dari program MOE dan jumlah putaran diatur sebanyak 2.500.000. *Triangle matcher* digunakan untuk mengorientasikan ligan dalam sisi aktif berdasarkan *charge group* dan *spatial fit*. *Triangle matcher* menunjukkan gerakan acak ligan dalam sisi aktif enzim untuk menghasilkan orientasi ikatan yang optimal (Cook, 2009).

Selama proses *docking* berlangsung, satu seri posisi (beberapa konformasi dan orientasi tertentu dari kompleks enzim-ligan) dihasilkan untuk setiap molekul. Algoritma untuk optimisasi orientasi enzim-ligan bekerja dengan penjajaran dari atom ligan triplet pada sisi yang merupakan pusat bidang alfa (*alpha-sphere*) yang tercipta pada sisi ikatan yang ditentukan. Selama simulasi konformasi dihasilkan secara bertahap dari konformer tunggal (protomer, tautomer) dengan mengaplikasikan satu set koleksi sudut torsi yang dipilih terhadap ikatan yang dapat berotasi. (Mazur, Pawel. et al, 2009).

Fungsi *scoring* yang dipilih pada tahap ini adalah London dG dengan *retain* sebesar 100 tanpa duplikasi. Fungsi *scoring* London dG mengkalkulasi energi bebas ikatan dari ligan dan satu set posisi dengan nilai paling tinggi dipilih untuk setiap molekul yang di-*docking* (Mazur, Pawel et al. 2009). Bentuk fungsionalnya merupakan penjumlahan dari persamaan-persamaan:

$$\Delta G = c + E_{flex} + \sum_{h-bonds} c_{HB} f_{HB} + \sum_{m-lig} c_M f_M + \sum_{atoms\ i} \Delta D_i$$

dimana c merupakan rata-rata penambahan/pengurangan entropi rotasional dan translasional; E_{flex} merupakan energi akibat kehilangan fleksibilitas ligan (dihitung hanya dari topologi ligan); f_{HB} mengukur ketidaksempurnaan geometri dari ikatan hidrogen; c_{HB} merupakan energi ideal untuk ikatan hidrogen; f_M menghitung ketidaksempurnaan geometri dari ligasi logam; c_M merupakan energi ideal untuk ligasi logam; dan D_i adalah energi desolvasi atom ke- i . (MOE-tutorial, 2008)

Hasil pose ligan yang didapatkan dari tahap penempatan diperbaiki lebih lanjut pada tahap *refinement* (perbaikan). *Refinement* yang dipilih adalah *forcefield* dengan konfigurasi pengulangan sebanyak 100 dan parameter lain sesuai dengan pengaturan awal dari MOE. Pada pengaturan awal dari MOE pilihan *refinement forcefield* menggunakan *pocket cut off* 6Å. Pengaturan jarak ini menentukan jarak reseptor yang diikutsertakan pada proses *docking*. *Retain* terakhir diatur hanya menampilkan satu konformasi terbaik. Arsip hasil *docking* disimpan secara otomatis oleh MOE dengan format .mdb.

4.5 Analisa Hasil *Docking*

Docking yang dilakukan dalam penelitian ini memiliki tujuan yang berbeda dengan penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya, *docking* bertujuan untuk menentukan ligan terbaik dari satu deret ligan tertentu. Dalam penelitian ini *docking* dilakukan hanya untuk mendapatkan konformasi terbaik dari kompleks enzim-ligan untuk kemudian dilakukan simulasi dinamika molekul.

4.5.1 Energi Bebas Ikatan

Kestabilan kompleks yang terbentuk dari enzim dan inhibitor dapat dinyatakan dengan suatu konstanta biologis yang disebut dengan, K_A sesuai persamaan:

$$K_A = K_i^{-1} = \frac{[EI]}{[E][I]}$$

dimana E adalah enzim, I adalah inhibitor dan EI adalah kompleks enzim dengan inhibitor. Dengan asumsi kondisi termodinamika yang seimbang untuk formasi kompleks protein-ligan, nilai tetapan konstanta K_A dapat digunakan untuk mengkuantifikasi nilai energi bebas ikatan ($\Delta G_{\text{binding}}$) (Wuriyani, 2009). Hubungan antara nilai energi ikatan dengan K_A tersebut dijelaskan melalui persamaan:

$$\Delta G = -RT \ln K_A$$

Hasil pose terbaik pada program *MOE-Dock* akan disimpan dalam sebuah *database*. *Database* ini mengandung keterangan yang berisi nilai S (nilai akhir *docking*), E_{conf} (energi konformer), E_{place} (energi dari tahapan penempatan), E_{score1} dan E_{score2} (energi dari tahap *rescoring*), dan E_{refine} (energy dari tahapan *refinement*). Pada tabel *database* hasil *docking* di **Lampiran 11** terlihat bahwa nilai S yang menggambarkan energi bebas ikatan $\Delta G_{\text{binding}}$ dalam Kkal/mol sama dengan nilai E_{refine} .

E_{refine} merupakan total perhitungan sejumlah energi yang digambarkan dengan persamaan:

$$E_{(x)} = E_{\text{str}} + E_{\text{ang}} + E_{\text{stb}} + E_{\text{oop}} + E_{\text{tor}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{ele}} + E_{\text{sol}} + E_{\text{res}}$$

dengan E_{str} = energi pemuluran ikatan, E_{ang} = energi sudut, E_{stb} = energi pemuluran-tekukan, E_{oop} = energi *out-of-plane*, E_{tor} =energi torsi, E_{vdw} =energi van der Waals, E_{ele} = energi elektrostatik, E_{sol} = energi solvasi, dan E_{res} =energi *restraint*. *Docking* yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan solvasi fasa gas sehingga perhitungan energi solvasi dihilangkan.

Tabel 4.1 Tabel Data Nilai S hasil *Docking*

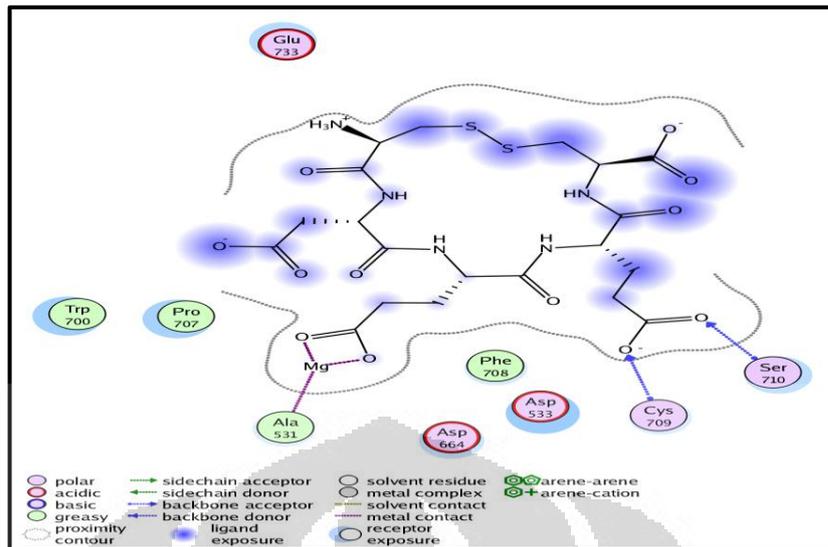
Ligan	S ($\Delta G_{binding}$) Kkal/mol
CDEEC	-24.2558
CDGSC	-35.7418

Dari **Tabel 4.1** terlihat bahwa baik ligan CDEEC maupun CDGSC memiliki nilai yang negatif. Data $\Delta G_{binding}$ yang negatif dan relatif kecil menandakan bahwa konformasi ligan yang terbentuk pada kompleks enzim-ligan berada pada konformasi yang paling stabil (*favourable*). Pada tabel terlihat bahwa ligan CDGSC memiliki nilai S yang lebih kecil dibanding CDEEC. Hal ini memperlihatkan bahwa ikatan yang terbentuk antara enzim RdRp dengan ligan CDGSC secara termodinamika lebih disukai dibanding ikatan antara enzim RdRp dengan ligan CDEEC.

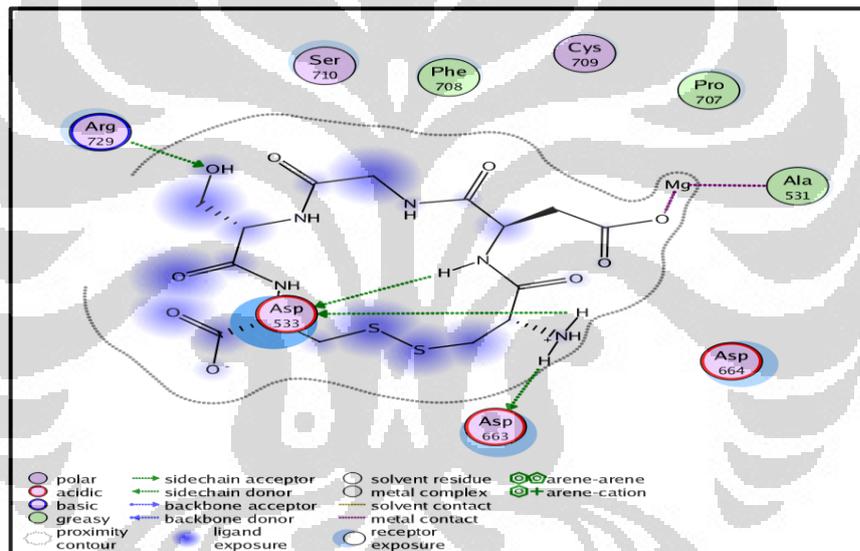
Berdasarkan fungsi termodinamika yang telah dijelaskan sebelumnya, terlihat bahwa dikarenakan adanya faktor $(-RT)$, ΔG memiliki hubungan terbalik dengan nilai K_A dan EI. Oleh karena itu, nilai ΔG yang semakin kecil menunjukkan bahwa kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk semakin baik. Dengan demikian berdasarkan hasil *docking* kompleks enzim RdRp dengan CDGSC memiliki kestabilan yang lebih baik dibanding dengan kompleks enzim RdRp dengan CDEEC.

4.5.2 Interaksi Ligan

Meskipun nilai energi bebas ikatan dapat menggambarkan kecenderungan terbentuknya kompleks enzim-inhibitor, banyak peneliti berpendapat bahwa fungsi *scoring* tidak dapat dikorelasikan secara kuantitatif terhadap aktivitas biologis (Mazur, Pawel et al, 2009). Untuk menganalisa secara kuantitatif kompleks yang terbentuk, maka pada tulisan ini ditampilkan diagram interaksi reseptor-ligan dalam dua dimensi. Diagram ini memperlihatkan interaksi yang kuat atau ikatan hidrogen dan juga interaksi elektrostatik atau transfer muatan antara ligan dengan reseptor.



(a)



(b)

Gambar 4.3 Gambar menunjukkan interaksi antara enzim RdRp dengan inhibitor potensial setelah *docking* (a)dengan CDEEC; (b)dengan CDGSC

Berdasarkan **Gambar 4.3**, terlihat bahwa baik ligan CDEEC maupun CDGSC memiliki interaksi yang mengarah pada sisi aktif yaitu berdekatan dengan asam amino Asp-663 atau Asp-664 yang termasuk pada motif C. Kedua residu asam amino ini termasuk tiga buah residu yang dikenal dengan sebutan sisi katalitik GDD (Gly-Asp-Asp) dan terletak pada domain *palm* dari enzim RdRp virus dengue.

Ligan CDEEC membentuk ikatan hidrogen dengan salah satu residu penting RdRp yaitu Ser-710. CDGSC juga membentuk ikatan dengan residu penting Arg-729. Selain itu, SDGSC juga memiliki kontak dengan Ser-710 walaupun tidak membentuk ikatan.

Pada diagram interaksi reseptor-ligan, terlihat bahwa baik CDEEC dan CDGSC membentuk ikatan ionik dengan logam Mg. Fungsi ion Mg^{2+} dalam enzim RdRp belum diketahui dengan jelas. Akan tetapi van Dijk et al (2004) dalam tulisannya mengatakan bahwa:

The crucial role of Mg^{2+} ions in the catalysis of phosphodiester bond formation has long been known (Steitz&Steits,1993; Pelletier et al, 1994; Steitz,1998). Mg^{2+} has also been implicated in stabilizing the daughter strand in replication complexes of bacteriophage T7 DNA polymerase (Double et al, 1998), bacillus DNA polymerase (Kiefer et al, 1998), and $\phi 6$ RdRP (Salgado et al, 2004). The $\phi 6$ RdRP Mg^{2+} ions also transiently stabilized the by-product PP_i , before its release via the substrate pore (Salgado et al,2004).

Dengan demikian diharapkan dengan terikatnya logam Mg^{2+} ini, kerja RdRp virus dengue akan semakin terganggu. Jumlah ikatan kimia yang dibentuk oleh ligan CDGSC lebih banyak dibanding dengan ligan CDEEC. Hal ini menunjukkan bahwa ligan CDGSC membentuk ikatan yang lebih baik dengan enzim RdRp dan hasil ini sejalan dengan hasil *scoring docking* dimana CDGSC memiliki nilai S yang lebih kecil dibanding CDEEC.

4.6 Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan Ligan Polipeptida Siklik Disulfida

Dalam penelitian ini, simulasi dinamika molekul (SDM) yang dilakukan memiliki dua tujuan utama. Tujuan pertama adalah untuk mendapatkan kondisi kompleks enzim-ligan yang mendekati keadaan nyata dan tujuan kedua adalah sebagai perbaikan (*refinement*) hasil *docking* yang telah dilakukan pada penelitian

sebelumnya. Simulasi dinamika molekul tidak hanya dilakukan untuk kompleks enzim-inhibitor tetapi juga untuk enzim RdRp virus dengue itu sendiri.

Sebelum dilakukan simulasi, sistem dioptimasi dengan *partial charge* dan minimisasi dengan *forcefield* MMFF94x hingga RMS gradient mencapai 0,05. Berbeda dengan *docking* yang menggunakan solvasi fasa gas, simulasi dijalankan dengan menggunakan solvasi born. Dengan pemilihan solvasi born, dinamika molekul akan disimulasikan dalam keadaan sistem pelarut implisit agar air hanya berperan sebagai medium.

Ensambel yang dipilih pada simulasi ini adalah ensambel NVT dimana jumlah molekul, volume dan tekanan sistem tetap. Dalam laboratorium, suhu sistem lebih mudah dikendalikan daripada energi total sistem sehingga percobaan sering dilakukan pada suhu konstan dan ensambel kanonikal (NVT) mendekati percobaan pada suhu konstan (Sofyan, 2007).

Algoritma yang digunakan dalam simulasi ini adalah algoritma NPA (*Nosé-Poincaré-Anderson*). Algoritma ini dipilih karena akurat dan sensitif serta dapat mengatur ensambel dengan tepat. Metode NPA ini didasarkan pada persamaan Hamiltonian yang diperluas dimana derajat kebebasan ditambahkan kedalam sistem untuk meyakinkan bahwa trajektori sampel dari distribusi statistik sesuai dengan keadaan termodinamika yang diinginkan.

Hasil *position*, *velocity* dan *acceleration* simulasi disimpan setiap 0,5 pikodetik. Pengamatan hasil simulasi dilakukan terhadap konformasi enzim dan kompleks enzim-ligan dan interaksi ligan terhadap residu enzim selama simulasi dengan menyimpan trajektori pada skala waktu yang telah ditentukan.

Menurut beberapa peneliti, simulasi dinamika molekul yang dimaksudkan untuk disain obat ideal dilakukan pada suhu 300-314 K. Rentang suhu tersebut adalah rentang temperatur yang mungkin untuk tubuh manusia. Pada penelitian ini, simulasi dilakukan pada dua suhu yang berbeda yaitu 300 dan 312 K. Suhu 300 K dipilih karena pada suhu ini enzim berada pada konformasi terbaiknya dan suhu 312 K adalah suhu tubuh manusia saat demam. Gejala awal demam berdarah adalah demam tinggi sehingga ligan disimulasikan sebagai obat yang diberikan saat penderita infeksi dengue mengalami demam.

Simulasi dinamika molekul dengan perangkat lunak *MOE-dynamics* dibagi menjadi dua tahap utama yaitu inisialisasi dan simulasi. Inisialisasi dilakukan selama 30 ps pada suhu 300 K dan parameter ini dilakukan untuk semua simulasi. Inisialisasi dilakukan selama 30 ps karena berdasarkan penelitian sebelumnya sistem enzim RdRp mencapai keadaan yang stabil setelah 30 ps. Hal ini ditunjukkan dengan bentuk grafik energi potensial total (U) sistem yang mendekati linear setelah 30 ps. Plot U terhadap waktu selama inisialisasi dapat dilihat pada **Lampiran 12**.

Tahap kedua yaitu simulasi merupakan tahapan paling penting karena pada tahap ini akan dihasilkan trajektori-trajektori yang akan dianalisa kemudian. Pada *MOE-dynamics* terdapat tahap ini dibagi lagi menjadi tiga bagian yaitu *heat*, *run*, dan *cool*. Tahap *heat* adalah tahap pemanasan dimana molekul dipanaskan hingga suhu yang diinginkan. Tahap *run* adalah tahap dimana simulasi berlangsung dan *cool* adalah tahap dimana sistem molekul didinginkan hingga mencapai suhu 1 K. Pada tahap *cool* sistem didinginkan dengan tujuan untuk mendapatkan konformasi dengan energi terendah.

Untuk simulasi pada 300 K tidak memerlukan tahap *heat* karena suhu simulasi sama dengan temperatur inisialisasi. Tahap *heat* baru dijalankan untuk simulasi pada 312 K karena sistem perlu dipanaskan dari suhu inisialisasi 300 K menjadi 312 K. Tahap *heat* dijalankan selama 20 ps karena berdasarkan percobaan, waktu 20 ps cukup untuk menaikkan temperatur sistem menjadi 312 K. Tahap *run* ditentukan berjalan selama 5 ns. Berdasarkan beberapa publikasi, waktu 5 ns cukup untuk mengamati interaksi yang terjadi antara enzim dengan ligan untuk tujuan *drug design*. Waktu untuk tahap terakhir *cool*, ditentukan sama dengan *heat* yaitu selama 20 ps.

4.7 Analisa Hasil Simulasi Dinamika Molekul

Hasil kalkulasi dinamika molekul dapat dilihat pada keluaran *database viewer* MOE dalam format .mdb. Visualisasi pergeseran konformasi enzim-ligan dan interaksi ligan hasil simulasi dinamika molekul dilakukan dengan memilih konformasi ligan pada jangka waktu tertentu. Jangka waktu yang dipilih adalah

tiap 10 ps untuk tahap inialisasi, tiap 5 ps untuk tahap *heat*, tiap 500 ps untuk tahap *run* dan tiap 5 ps juga untuk tahap *cool*.

4.7.1 Analisa Konformasi selama Simulasi Dinamika Molekul

Dalam konteks protein, konformasi merujuk pada sebuah penyusunan tiga dimensi dari sekelompok atom yang dapat diubah tanpa merusak satupun ikatan kovalen (Bhagavan, 2002). Enzim terdiri dari ratusan bahkan lebih ikatan yang berotasi, sehingga secara teoritis enzim dapat memiliki kemungkinan konformasi dengan jumlah tak hingga. Perubahan konformasi enzim akan diamati pada trajektori-trajektori yang dihasilkan setelah simulasi dijalankan. Pengamatan perubahan konformasi dilakukan baik pada enzim RdRp sendiri dan kompleks RdRp-ligan.

Perubahan konformasi enzim dan kompleks enzim-ligan diamati tiap jangka waktu yang ditentukan. Visualisasi dua dimensi pergeseran konformasi enzim pada simulasi dinamika molekul 300 K terlihat pada **Lampiran 5**. Pada gambar terlihat dalam kondisi berpelarut enzim memiliki pergerakan yang dinamis. Pada tahap inialisasi, nyaris tidak terlihat dan pada saat simulasi terlihat secara perlahan perubahan konformasi enzim. Konformasi enzim pada akhir simulasi terlihat berbeda dengan saat awal simulasi. Walaupun demikian enzim berhasil mempertahankan bentuk tiga dimensi dan susunan asam aminonya.

Pada **Lampiran 6** terdapat visualisasi pergerakan konformasi enzim saat dikomplekskan dengan ligan CDEEC pada simulasi dinamika molekul 300 K. Terlihat bahwa sama seperti pada saat enzim disimulasikan, pada kompleks pun terjadi perubahan konformasi tanpa mengubah struktur tiga dimensi enzim. Hasil yang secara kasat mata tidak berbeda pun terlihat pada **Lampiran 7** yang merupakan visualisasi dua dimensi dari perubahan konformasi kompleks enzim-ligan CDGSC pada simulasi dinamika molekul 300 K.

Pergerakan enzim pada simulasi dinamika molekul 312 K tergambar pada **Lampiran 8**. Pada tahap inialisasi, nyaris tidak terlihat perubahan konformasi dan konformasi enzim mulai berubah perlahan saat simulasi.

Perubahan konformasi yang dihasilkan pada temperatur 312 K mirip dengan perubahan konformasi pada 300 K. Hal ini menunjukkan bahwa pada suhu 312 K enzim belum kehilangan struktur tiga dimensinya.

Perubahan konformasi yang nyaris sama diperlihatkan pada simulasi kompleks enzim-ligan CDEEC pada 312 K yang digambarkan **Lampiran 9**. Hasil ini hampir serupa dengan perubahan konformasi kompleks enzim-ligan CDGSC pada **Lampiran 10**.

Selain melalui pengamatan terhadap visualisasi enzim dan kompleks enzim-ligan secara dua dimensi, untuk menganalisa kestabilan enzim juga dilakukan pengamatan secara kualitatif terhadap energi potensial total sistem. Seperti yang terlihat pada **Lampiran 12**, pada tahap inialisasi baik enzim sendiri maupun setelah dikomplekskan dengan ligan memberikan bentuk plot energi potensial total sistem terhadap waktu yang relatif sama. Untuk simulasi pada 300 K maupun pada 312 K sistem enzim dan kompleks enzim-ligan mencapai kesetimbangan setelah 30 ps dengan energi bebas berkisar pada angka -14000 kkal/mol.

Pada **Lampiran 13** terlihat perbandingan kurva energi potensial sistem total terhadap waktu selama simulasi untuk semua sistem baik pada 300 K maupun 312 K. Plot energi yang diberikan oleh sistem enzim-ligan tidak jauh berbeda dengan plot energi pada simulasi enzim sendiri. Saat simulasi 300 K berlangsung, nilai energi bebas berkisar antara -14000 selama tahap *run* berlangsung dan saat tahap *cool* energi turun drastis hingga mencapai -21000.

4.7.2 Analisa Interaksi Ligan selama Simulasi Dinamika Molekul

Seperti pada analisa konformasi, analisa terhadap interaksi ligan juga dilakukan pada jangka waktu yang ditentukan. Interaksi diidentifikasi melalui menu *Ligand interaction* dan hasilnya dirangkum dalam tabel pengamatan. Observasi terhadap interaksi ligan diutamakan pada ikatan kimia yang terbentuk antara ligan dengan residu enzim RdRp dan kontak antara ligan dengan residu enzim RdRp.

4.7.2.1 Simulasi Dinamika Molekul pada 300 K

Tabel 4.2 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi Tahap *Run*

waktu (ps)	Interaksi Ligan CDEEC		Interaksi Ligan CDGSC	
	Ikatan Kimia	Kontak Residu	Ikatan Kimia	Kontak Residu
0	Lys-689, Mg (Asp-664, Asp-533)	Asp-663, Pro- 707, Ser 710	Cys-709, Lys- 698, 2 ikatan dengan Asp- 533, Mg	Ala-531, Lys- 689, Asp-664, Pro-707, Phe- 708
500	Lys-389, Arg- 737, Mg (Asp- 533, Asp-664)	Asp-663, Asp- 690, Trp-795	Lys-698, Thr- 534, 2 ikatan dengan Asp- 533, Lys-689, Cys-709, Mg (Asp-664, Pro- 707)	Gln-695, Phe- 708, Gln-693, Ala-535, Ser- 697
1000	Trp-795, Arg- 729, His-711, Lys-698, Mg (Asp-663, Asp-664)	Asp-533, Ars- 737, Glu-733, Cys-709, Tyr- 606.	Thr-534, 2 ikatan dengan Asp-533, Lys- 698, Cys-709, Mg(Asp-664, Pro-707)	Lys-689, Asp- 663, Gln-695, Phe-708
1500	Arg-737 , His- 711, Lys-698, Mg (Asp-663, Asp-533, Asp- 664)	Cys-709, Tyr- 766, Trp-795, Arg-729, Glu- 733, Val-603, Tyr-606	Mg (Pro-707), Lys-689, Thr- 534, 2 ikatan dengan Asp- 533, Lys-698, Cys-709	Ala-535, Asp- 663, Met-340, Phe-708, Met- 342
2000	Lys-698, Mg (Asp533)	Trp-795, Glu- 733, Cys-709, Asp-663, Asp- 664	Lys-689, Mg (Pro-707, Asp- 664), 2 ikatan dengan Asp533, Lys- 698, Cys-709	Ile-691, Thr- 534, Gln-695, Ala-528, Asp- 663, Met-340, Phe-708, Met- 342

Lanjutan Tabel 4.1 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi Tahap *Run*

2500	Arg-729 , Lys-698, Mg (Asp-533, Asp-663, Asp-664)	His-711, Asp-690, Trp-795	Lys-689, Mg (Pro-707, Asp-664), 2 ikatan dengan Asp533, Lys-698, Cys-709, Thr-534	Gly-536, Ser-697, Asp-663, Met-340, Phe-708, Thr-345, Pro-347
3000	Glu-733, Arg-737 , Arg-729 , Lys-698, Mg (Asp-533, Asp-664)	Trp-795, Ile-740, Asp-663	Lys-689, Mg (Asp-664), 2 ikatan dengan Asp-533, Lys-698, Cys-709	Asp-663, Gln-695, Phe-708, Gln-339, Pro-707
3500	Arg-737 , Glu-733, Lys-798, Mg (Asp-533, Asp-663, Asp-664)	His-711, Asp-690, Trp-795, Met-761, Asp-729	Lys-689, Mg (Gln-339), 2 ikatan dengan Asp-533, Thr-534, Met-340, Lys-698	Phe-348, Ala-535, Asp-664, Asp-663, Leu-734, Ile-735
4000	Glu-733, Arg-729 , Lys-698, Mg	Arg-737 , Arg-739, Asp-690, Asp-664, Asp-553, His-711, Asp-663	2 ikatan dengan Asp-533, Thr-534, Lys-798, Mg	Asp-664, Thr-539, Asp-663, Gln-339
4500	Arg-737 , Ser-741, Arg-729 , Lys-698, Mg (Asp533, Asp-663)	Trp-795, Cys-709, Asp-664, Ile-691, Tyr-606, Asp-690	Thr-534, 2 ikatan dengan Asp-533, Mg (Gln-339), Lys-698	Asp-663, Gly-349, Gly-536, Asp-664, Met-340, Asp-344, Met-336, Leu-734, Glu-733

Lanjutan Tabel 4.1 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi Tahap *Run*

5000	Arg-737 , Ser-741, Lys-698, Mg (Asp-533)	Ile-740, Arg-729, Trp-795, Cys-709, Asp-663, Asp-664, Ala-738, Arg-739	Mg (Gln-339), Lys-698	Met-340, Asp-663, Asp-533, Thr-534, Ala-535, His-798, Thr-539, Phe-354, Leu-734, Ile-735, Val-337, Asp-664, Ser-697
------	---	--	-----------------------	---

Ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg^{2+} menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg^{2+}

Berdasarkan **Tabel 4.2** pada awal simulasi tahap *run* ($t=0$ ps) terlihat bahwa baik CDEEC maupun CDGSC hanya berinteraksi dengan sedikit residu enzim RdRp. Hal ini mungkin karena pada awal simulasi, kedua ligan masih dalam kondisi penyesuaian untuk mencari konformasi yang sesuai.

Pada saat $t=0$ CDEEC memiliki kontak dengan residu penting yaitu Ser-710. Akan tetapi setelah simulasi berjalan untuk beberapa waktu terlihat bahwa CDEEC tidak lagi memiliki kontak dengan Ser-710. CDEEC bergerak menjauhi Ser-710 dan pada saat $t=1500$ membentuk ikatan hidrogen dengan Arg-737. Pada pengamatan selanjutnya ikatan ini terlepas dan kemudian CDEEC kembali berikatan dengan Arg-737 pada $t=2500$ ps dan ikatan ini stabil hingga $t=5000$ ps. Posisi ligan CDEEC cenderung stabil yaitu berada pada sisi katalitik GDD dimana terlihat bahwa CDEEC selalu memiliki interaksi dengan Asp-663 dan atau dengan Asp-664 baik membentuk ikatan maupun tidak.

Berbeda dengan CDEEC, ligan CDGSC tidak membentuk ikatan dengan residu penting dari enzim RdRp. Walaupun demikian ligan ini masih berada pada posisi sisi katalitik GDD dimana CDGSC juga masih berinteraksi dengan Asp-663 ataupun Asp-664 baik membentuk ikatan hidrogen maupun tidak. Pada tabel juga terlihat bahwa CDEEC dan CDGSC membentuk ikatan ionik yang kuat dengan Mg^{2+} dan ikatan ini stabil hingga akhir tahap *run*.

Tabel 4.3 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan Simulasi tahap *Cool*

Waktu (ps)	Interaksi Ligan CDEEC		Interaksi Ligan CDGSC	
	Ikatan Kimia	Kontak Residu	Ikatan Kimia	Kontak Residu
5005	Arg-729, Arg-737 , Ser-741, Mg (Asp-663), Lys-698	Trp-795, Cys-709, Arg-739, Ile-740, Ala-798. Asp-664, Asp-533, Trp-795	Mg (Gln-339), Lys-698, Ser-697, 2 ikatan dengan Asp-533, Thr-534	Phe-354. Thr-539, Asp-664, Ala-535, Asp-663, Gln-695, Met-340, Val-337, Leu-734
5010	Ser-741, Arg-737, Arg-729 , His-711, Lys-698, Mg (Asp-663, Asp-664, Asp-533)	Ile-740, Ala-738, Glu-733, Arg-739, cys-709, Trp-795	Lys-698, Mg, 2 ikatan dengan Asp-533, Thr-534	Met-340, Gln-339, Asp-663, Leu-734, Phe-348, Asp-664, Ala-535, Gln-695
5015	Lys-698, His-711, Arg-729 , 2 ikatan dengan Arg-737 , Ser-741, Tyr-606, Mg (Asp-533, Asp-664)	Asp-663, Ala-738, Ile-740, Cys-709, Trp-795	Mg, Thr-534, 2 ikatan dengan Asp-533, Lys-698	Ala-535, Met-340, Asp-663, Gln-695, Gln-339, Leu-734
5020	Arg 729 , 2 ikatan dengan Arg-737 , Ser-741, Tyr-606, Lys-698, His-711, Mg (Asp-533, Asp-663, Asp-664)	Trp-795, Cys-709, Arg-739, Ile-740, Ala-738	Thr-534, 2 ikatan dengan Asp-533, Mg, Lys-698	Ile-735, Phe-354, Asp-664, Ala-535, Gln-339, Gln-695, Met-340, Leu-734

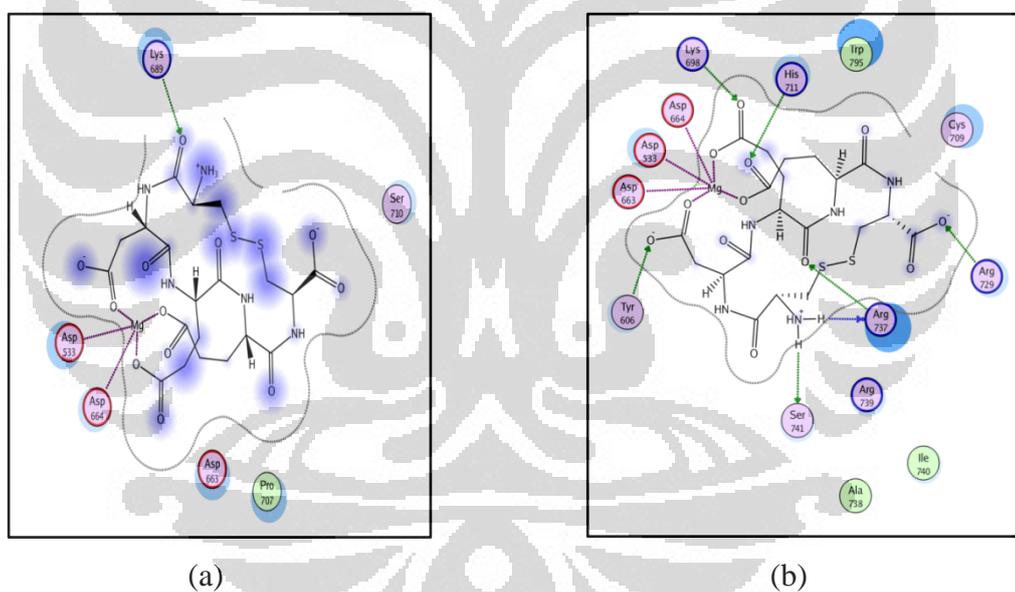
Ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg^{2+} menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg^{2+}

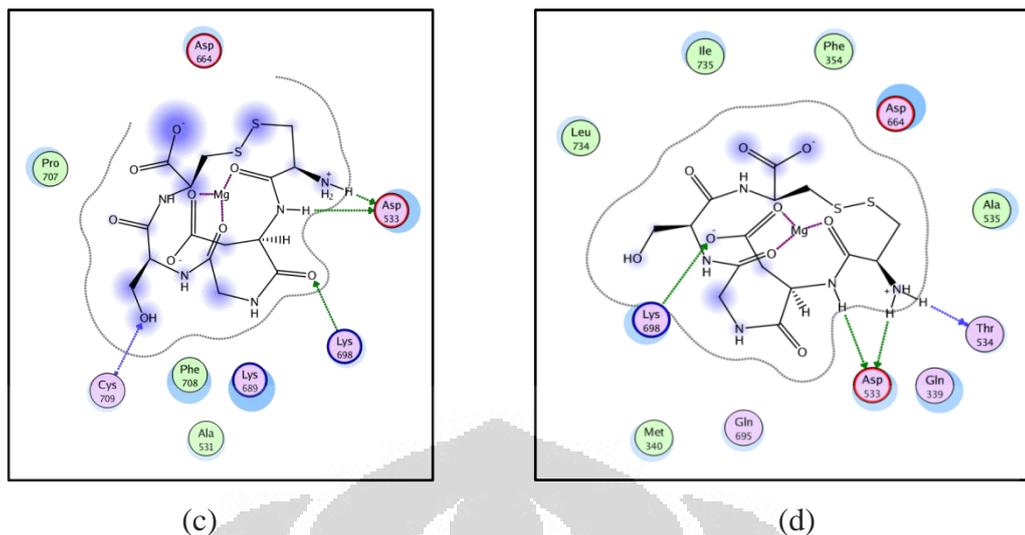
Tahap *cool* merupakan tahap dimana sistem molekul mencari konformasi dengan energi paling rendah melalui pendinginan suhu sistem sehingga energi sistem turun secara cepat. Berdasarkan data **Tabel 4.3** terlihat bahwa baik CDEEC dan CDGSC berhasil mempertahankan posisinya di sekitar sisi katalitik GDD dengan berinteraksi dengan Asp-663 dan/atau Asp-664 baik membentuk ikatan hidrogen maupun tidak. Pada akhir

simulasi CDEEC terlihat membentuk ikatan dengan Asp-663 dan Asp-664 yang dijematani oleh ion Mg^{2+} . Sementara itu, ligan CDGSC pada akhir simulasi tercatat hanya memiliki kontak dengan residu Asp-664 tanpa membentuk ikatan.

Ligan CDEEC berhasil mempertahankan ikatan hidrogen yang terbentuk dengan residu penting Arg-729 dan Arg-737. Bahkan setelah waktu 5015 ps CDEEC membentuk dua ikatan hidrogen sekaligus dengan Arg-737. Hal ini menggambarkan betapa kuat dan stabilnya ikatan yang terbentuk antara CDEEC dengan Arg-737. Sedangkan sama seperti simulasi tahap *run*, CDGSC tidak berikatan dengan satu pun residu penting pada tahap *cool* ini.

Untuk mengamati adanya perubahan interaksi ligan sebelum (setelah inisialisasi) dan sesudah simulasi dapat dilihat pada **Gambar 4.4** berikut:





Gambar 4.4 Interaksi Ligan pada SDM 300 K (a) interaksi ligan CDEEC sebelum simulasi; (b) interaksi ligan CDEEC sesudah simulasi; (c) interaksi ligan CDGSC sebelum simulasi; (d) interaksi ligan CDGSC sesudah simulasi

Berdasarkan diagram interaksi ligan dengan residu enzim RdRp terlihat bahwa interaksi CDEEC dengan enzim bertambah setelah simulasi dilakukan. Sebelum simulasi, CDEEC hanya membentuk 1 ikatan hidrogen dan 3 ikatan ionik dengan Mg^{2+} . Setelah simulasi berlangsung CDEEC membentuk 7 ikatan hidrogen dimana terbentuk dua ikatan dengan Arg-737 dan satu ikatan dengan Arg-729 dan 3 ikatan ionik dengan Mg^{2+} .

Hasil yang berbeda ditunjukkan pada ligan CDGSC. Jumlah ikatan yang dibentuk CDGSC sebelum dan sesudah simulasi adalah sama, yaitu 4 ikatan hidrogen dan 3 ikatan ionik. Yang berbeda adalah sebelum simulasi terbentuk ikatan dengan Cys-709 dan sesudah simulasi ikatan ini tidak terlihat lagi. Setelah proses simulasi selesai, CDGSC membentuk ikatan baru dengan Thr-534. Walaupun jumlah ikatan kimia yang terbentuk adalah sama, tetapi jumlah kontak CDEEC dengan residu asam amino enzim RdRp meningkat. Jika sebelum simulasi, CDGSC hanya memiliki kontak dengan 5 residu maka setelah simulasi CDGSC memiliki kontak dengan 8 residu asam amino.

4.7.2.2 Simulasi Dinamika Molekul pada 312 K

Tabel 4.4 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap *Heat*

Waktu (ps)	Interaksi Ligan CDEEC		Interaksi Ligan CDGSC	
	Ikatan Kimia	Kontak Residu	Ikatan Kimia	Kontak Residu
0	Glu-733, Ser-710 , 2 ikatan dengan Lys-689, Mg (Asp-664, Asp-533)	Asp-538, Gln-339, Pro-707	Phe-708, Mg	Met-539, Ala-531, Ile-691, Ala-535, Asp-664, Pro-707, Asp-663
5	Lys-689, Mg (Asp-533), Glu-733, Ser-710	Gln-339, Asp-664, Ala-535	Phe-708, Mg (Asp-663),	Pro-696, Lys-698, Pro-707, Asp-664
10	Lys-689, Mg (Asp-664), Glu-733, Ser-710	Gln-339, Thr-338, Met-340, Asp-690, Asp-533, Phe-708, Pro-730, Asp-732	Pro-707, Phe-708, Asp-663, Mg	Val-706, Lys-698
15	Lys-689, Glu-733, 2 ikatan dengan Ser-710 , Mg	Met-340, Thr-338, Asp-538, Gln-339, Cys-709, Phe-708, Thr-534, Asp-664, Asp-533	Pro-707, Mg	Asp-663, asp-664, Met-529, Val-706, Lys-698
20	2 ikatan dengan Ser-710 , 2 ikatan dgn Lys-689, Glu-733, Mg	Pro-707, Gln-339, Asp-538, Asp-533, Asp-664, Thr-534	Lys-689, Mg (Asp-663)	Asp-664, Tyr-530, Gln-693, Asn-613, Thr-610

Ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg²⁺ menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg²⁺

Berdasarkan **Tabel 4.4** pada tahap awal simulasi 312 K ini terlihat bahwa kedua ligan masih berada pada sisi katalitik GDD. Hal ini diperlihatkan dengan interaksi yang terbentuk antara ligan dengan Asp-663 dan/atau Asp-664 baik membentuk ikatan hidrogen maupun tidak.

Sama seperti saat awal simulasi pada 300 K, ligan CDEEC berikatan dengan Ser-710. Jika pada simulasi 300 K ikatan ini kemudian hilang seiring dengan waktu simulasi, maka pada 312 K CDEEC terlihat memiliki ikatan hidrogen yang cukup stabil dengan Ser-710 hingga akhir fasa *heat*. Untuk simulasi 312 K, CDGSC memperlihatkan interaksi yang tidak jauh berbeda dengan pada saat 300 K. CDGSC tidak berikatan dengan residu penting enzim RdRp. Pada tahanan *heat* ini, baik CDEEC maupun CDGSC memiliki ikatan ionik yang stabil dengan Mg^{2+} .

Tabel 4.5 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap *Run*

Waktu (ps)	Interaksi Ligan CDEEC		Interaksi Ligan CDGSC	
	Ikatan Kimia	Kontak Residu	Ikatan Kimia	Kontak Residu
520	Glu-733, Ser-710 , Mg (Asp-533, Asp-664)	Gln-602, Gly-604, Pro-707, Asp-690, Asp-663, Ala-535	Lys-689, Lys-698, Mg (Asn-613), 2 ikatan dgn Asp-538	Gln-339, Met-336, Met-340, Trp-537, asp-664, Asp-663, Thr-534, Val-666
1020	Arg-737 , Mg (Asp533, Asp-690, Asp-664), Lys-355, Ser-710	Val-603, Pro-707, Phe-354, Cys-709, ser-849, Asp-732, Gly-604, Phe-708	Lys-689, Asp-538, Tyr-606, Mg (Asn-613)	Asp-664, Asp-663, Ala-535, Thr-534, Ile-691, Ala-531, Lys-698
1520	Arg-737 , Cys-709, Lys-355, Mg (Asp-533, Asp-664, Asp-690)	Met-340, Phe-708, Val-706, Pro-707, Ser-710	Lys-689, 2 ikatan dgn Asp-538, Trp-537, Mg (Asn-613, Asp-663)	Thr-338, Met-342, Tyr-606, Thr-605, Asp-664, Gly-536, Trp-700, Ile-691

Lanjutan Tabel 4.5 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap *Run*

2020	Lys-355, Arg-737 , Cys-709, Ser-710 , Mg (Asp-690)	Phe-354, Asp-533, Asp-664, Asp-663, Phe-708, Val-706, Pro-707, Ser-849	2 ikatan dgn Lys-689, Tyr-606, 2 ikatang dgn Asp-538, Trp-537, Mg	Thr-534, Asp-664, Asp-663, Asn-613, Gln-536
2520	Arg-739, Cys-709, Lys-355, Ser-710 , Mg (Asp-664, Asp-690)	Asp-533, Phe-354, Phe-708, Val-353, Val-706, Pro-707	Thr-338, Tyr-707, 2 ikatan dgn Asp-538, Lys-689, Gly-699, Mg (Asp-663, Asp-613)	Gly-536, Trp-537, Asp-664, Lys-698, Asp-702
3020	Lys-355, Mg (Asp-690, Asp-533), Arg-737	Asp-664, Ile-735, Glu-733, Gly-736, Cys-709, Pro-707, Phe-354	Lys-698, Lys-689, 2 ikatan dgn Asp-538, Mg (Asn-613)	Gly-699, Asp-702, Trp-700, Ala-535, Asp-663, Thr-534, Asp-664, Thr-605
3520	Arg-737 , Cys-709, 2 ikatan dgn Lys-355, Mg (Asp-533, Asp-690), Ser-710	Gly-736, Asp-664, Phe-708, Glu-733	Lys-698, Thr-605, Gly-699, 2 ikatan dgn Asp-538, Mg (Asp-664, Asn-613)	Arg-739, Leu-608, Gly-607, Tyr-606, Trp-537, Asp-663, Trp-700, Thr-534, Asp-702, Lys-329
4020	Arg-737 , Cys-709, Mg	Lys-355, Glu-733, Tyr-606, Asp-664, Ile-691, Val-706, Asp-690, Asp-533, Phe-708, Ser-710, Pro-707	Lys-329, Arg-737, Asp-520, Lys-698, 2 ikatan dgn Asp-538, Thr-605, Mg	Trp-703, Asp-663, Asn-613, Asp-664, Tyr-606, Arg-739, Gly-607, Phe-708
4520	Arg-737 , Lys-355, Cys-709, Gln-350, Mg (Asp-533, Asp-664, Asp-690)	Arg-352, Gly-736, Thr-605, Asp-663, Phe-708, Pro-707, Ser-710, Val-706	2 ikatang dgn Asp-538, Mg (Gln-617, Asn-613), Lys-698, Lys-329	Arg-737 , Trp-537, Asp-664, Asp-663, Thr-605, Arg-739, Ile-740

Lanjutan Tabel 4.5 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap *Run*

5020	Glu-733, Arg-737 , Mg (Asp-553, Asp-664, Asp-690)	Gln-350, Gly-736, Tyr-606, Val-353, Lys-355, Cys-709, Ile-691, Pro-707	Thr-605, 2 ikatan dgn Asp-538, Lys-698, Mg (Gln-617, Asp-663)	Asp-520, Tyr-606, Asp-664, Trp-537, Asn-613, Asp-532, Arg-739, Phe-713, Trp-703, Ile-740, His-711
------	--	--	---	---

Ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg^{2+} menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg^{2+}

Data pada **Tabel 4.5** memperlihatkan bahwa saat simulasi memasuki tahap *run* posisi kedua ligan masih tetap berada di sekitar sisi katalitik GDD dan posisi ini bertahan hingga tahap *run* simulasi 312 K ini selesai. Ligan CDEEC dan CDGSC pun tetap terlihat membentuk ikatan ionik yang kuat dengan Mg^{2+} pada tahap ini.

Ligan CDEEC terlihat tetap berikatan dengan Ser-710 pada awal tahap *run*. Saat $t = 1020$ ps terlihat bahwa CDEEC membentuk ikatan dengan residu yang lain yaitu Arg-737. Ikatan dengan Arg-737 terlihat stabil dan terus teramati hingga $t = 2020$ ps. Pengamatan pada $t = 2520$ ps menunjukkan bahwa CDEEC tidak lagi berikatan dengan Arg-737, akan tetapi pada $t = 3020$ ps ikatan antara CDEEC dengan Arg-737 kembali teramati dan ikatan ini stabil hingga akhir tahap *run*. Ikatan hidrogen antara CDEEC dengan Ser-710 teramati hingga $t = 1020$ ps. Pada $t = 1520$ ps ikatan ini tidak nampak lagi dan ikatan dengan Ser-710 baru terlihat pada $t = 2020$ dan $t = 2520$ ps. Setelah itu, ikatan dengan Ser-710 kembali tidak teramati dan hanya terlihat lagi saat $t = 3520$ ps.

Pada awal tahap *run*, ligan CDGSC menunjukkan kemiripan dengan tahap *run* saat simulasi 300 K. Ligan CDGSC tidak berikatan dengan satu pun residu penting dari enzim RdRp. Satu-satunya ikatan yang terbentuk antara CDGSC dengan Arg-737 yang merupakan residu penting teramati pada $t = 4520$ ps.

Tabel 4.6 Tabel Pengamatan Interaksi Ligan tahap Cool

Waktu (ps)	Interaksi Ligan CDEEC		Interaksi Ligan CDGSC	
	Ikatan Kimia	Kontak Residu	Ikatan Kimia	Kontak Residu
5025	Glu-733, Arg-737 , 2 ikatan dgn Lys-355, Mg (Asp-533, Asp-664, Asp-690)	Tyr-606, Ile-691, Pro-707, Cys-709, Phe-354, Gln-350, Val 353	Lys-698, 2 ikatan dgn Asp-538, Mg (Asp-663, Asn-613, Gln-617)	Arg-739, Tyr-606, Thr-605, Asp-664, Trp-537, Asp-520, Leu-608, His-711, Asp-352, Trp-703
5030	Arg-737 , 2 ikatan dgn Glu-753, 2 ikatan dgn Lys-355, Mg (Asp-690)	Tyr-606, Cys-709, Pro-707, Val-706, Pro-692, Ile-691, Phe-708, Asp-533, Asp-664	Asp-538, Lys-698, Mg (Asp-663, Asp-664, Asn-613, Gln-617)	Thr-605, Leu-608, Gly-607, Trp-537, Tyr-606, Arg-739, Trp-703, Ile-740, Asp-332, His-711, Asp-520
5035	Mg (Asp,533, Asp-664, Asp-690), Tyr-606, Arg-737 , Cys-709, 2 ikatan dgn Lys-355, 2 ikatan dgn Glu-733, Ser-710	Ile-691, Phe-708, Gly-736, Pro-707, Val-353	Lys-698, Asp-520, Thr-605, 2 ikatan dgn Asp-538, Mg (Gln617, Asp-663)	Gly-607, Tyr-606, Arg-739, Trp-700, Ile-740, Trp-703, Phe-713, His-711, Asn-613, Asp-664, Trp-537, Leu-608
5040	2 ikatan dgn Glu-733, Ser-710 , 2 ikatang dgn Lys-355, Cys-709, Arg-737 , Tyr-606, Mg (Asp-664, Asp-690)	Gln-350, Pro-707, Phe-708, Asp-533, Ile-691	Thr-605, 2 ikatan dgn Asp-538, Lys-698, Asp-520, Mg (Gln-617, Asp-663, Asp-613)	Arg-739, Ile-740, Trp-703, Asp-332, Phe-713, His-711, Asp-664, Gly-607, Tyr-606, Leu-608

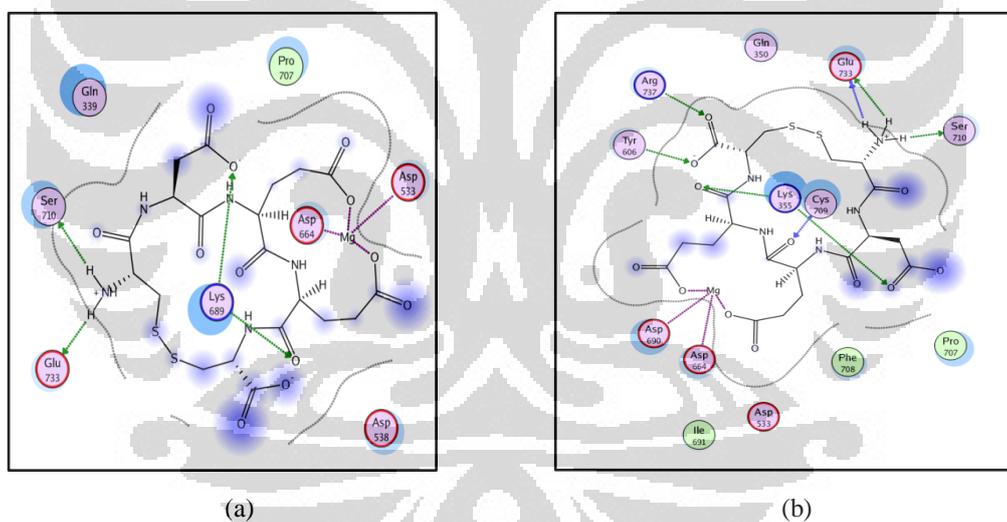
Ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg²⁺ menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg²⁺

Tabel 4.6 yang berisi pengamatan interaksi ligan pada tahap *cool* simulasi 312 K memberikan hasil hampir serupa. Kedua ligan masih membentuk ikatan ionik yang kuat dan stabil dengan Mg²⁺. Ligan CDEEC

dan CDGSC juga masih berinteraksi dengan Asp-663 dan/atau Asp-664 yang menunjukkan bahwa kedua ligan masih berada pada posisi sisi katalitik GDD.

CDEEC berhasil membentuk ikatan hidrogen yang stabil dengan Arg-737 dan ikatan terus teramati hingga proses simulasi berakhir. Pada akhir simulasi CDEEC juga teramati membentuk ikatan hidrogen dengan residu penting lainnya yaitu Ser-710. Jika pada akhir simulasi 312 K ini CDEEC membentuk ikatan dengan dua residu penting enzim RdRp, maka ligan CDGSC tidak terlihat berikatan dengan residu-residu penting satu pun. Hasil ini sama dengan hasil simulasi pada 300 K dimana CDGSC tidak berikatan dengan satu pun residu penting.

Penggambaran lebih jelas mengenai perbandingan interaksi ligan sebelum dan setelah inialisasi dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.



simulasi belum berjalan terlihat 3 ikatan ionik tetapi saat simulasi selesai hanya teramati dua ikatan ionik.

4.7.2.3 Perbandingan Interaksi Ligan Simulasi Dinamika Molekul 300 K dan 312 K

Untuk menentukan kestabilan interaksi ligan CDEEC dan CDGSC pada kedua suhu simulasi perlu dibandingkan interaksi ligan setelah kedua simulasi tersebut dilakukan. Perbandingan ini dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

Tabel 4.7 Perbandingan Interaksi Ligan

Ligan	<i>Docking</i>	SDM 300 K	SDM 312K
CDEEC	Ser-710 , Cys-709, Ala-531, Mg, Pro-707, Trp-700, Glu-733	Arg 729 , 2 ikatan dengan Arg-737 , Ser-741, Tyr-606, Lys-698, His-711, Mg (Asp-533, Asp-663, Asp-664) Trp-795, Cys-709, Arg-739, Ile-740, Ala-738	2 ikatan dgn Glu-733, Ser-710 , 2 ikatang dgn Lys-355, Cys-709, Arg-737 , Tyr-606, Mg (Asp-664, Asp-690) Gln-350, Pro-707, Phe-708, Asp-533, Ile-691
CDGSC	Arg-729 , Asp-533, Ala-531, Mg, Asp-663, Asp-664, Ser-710 , Phe-708, Cys-709, Pro-707	Thr-534, 2 ikatan dengan Asp-533, Mg, Lys-698 Ile-735, Phe-354, Asp-664, Ala-535, Gln-339, Gln-695, Met-340, Leu-734	Thr-605, 2 ikatan dgn Asp-538, Lys-698, Asp-520, Mg (Gln-617, Asp-663, Asp-613) Arg-739, Ile-740, Trp-703, Asp-332, Phe-713, His-711, Asp-664, Gly-607, Tyr-606, Leu-608

ket: dicetak tebal merupakan residu penting; tanda kurung setelah ion Mg²⁺ menunjukkan residu yang berikatan dengan ion Mg²⁺

Dari **Tabel 4.7** terlihat bahwa pada saat *docking*, ligan CDEEC membentuk ikatan dengan residu penting Ser-710. Ikatan dengan Ser-710 ini tidak

terlihat pada akhir simulasi dinamika molekul 300 K dan kembali terlihat pada akhir simulasi 312 K. Walaupun CDEEC kehilangan ikatannya dengan Ser-710 pada simulasi 300 K, CDEEC berhasil membentuk ikatan dengan dua residu penting lain yaitu Arg-729 dan Arg 737. Pada simulasi dinamika molekul 312 K ikatan CDEEC dengan Arg-729 tidak teramati lagi. Pada saat *docking*, CDEEC tidak terlihat memiliki interaksi dengan sisi katalitik GDD. Interaksi dengan sisi katalitik GDD teramati pada simulasi dinamika molekul 300 K dimana CDEEC membentuk ikatan dengan Asp-663 dan Asp-664 yang dijembatani oleh ion Mg^{2+} . Akan tetapi, CDEEC tidak dapat mempertahankan interaksi ini pada simulasi 312 K. Saat simulasi 312 K berakhir terlihat bahwa CDEEC hanya berinteraksi dengan Asp-664.

Hasil yang relatif berbeda diperlihatkan oleh interaksi ligan CDGSC. Pada saat *docking*, ligan ini berikatan dengan Arg-729 dan memiliki kontak dengan residu Ser-710. Akan tetapi interaksi dengan kedua residu penting ini tidak teramati baik pada simulasi dinamika molekul 300 K dan 312 K. Hasil simulasi *docking* ligan CDEEC memperlihatkan bahwa ligan ini berinteraksi dengan sisi katalitik GDD yaitu Asp-663 dan Asp-664. Interaksi ini juga teramati pada akhir simulasi 312 K sedangkan pada simulasi dinamika molekul 300 K hanya terlihat CDGSC berinteraksi dengan Asp-664.

BAB 5

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

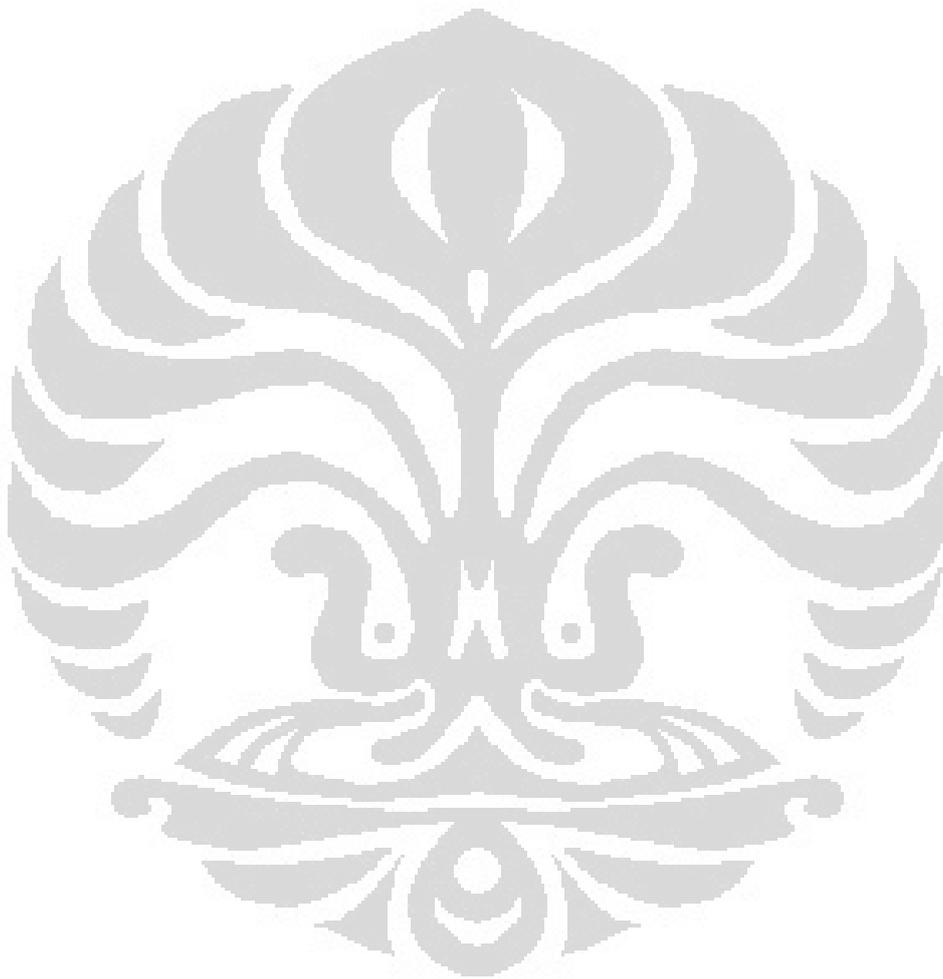
Berdasarkan visualisasi dua dimensi yang diperoleh, terlihat bahwa perubahan konformasi enzim RdRp pada simulasi dinamika molekul 300 K dan 312 K menunjukkan kemiripan pola perubahan konformasi. Hal ini ditunjang dengan plot energi potensial total sistem yang nilai dan bentuk nyaris sama pada semua simulasi. Data-data ini menandakan bahwa enzim masih memiliki bentuk tiga dimensinya dan stabil sepanjang simulasi. Penambahan ligan pada enzim juga terlihat tidak mempengaruhi kestabilan enzim.

Hasil *docking* menunjukkan bahwa CDGSC merupakan inhibitor yang lebih baik dibanding CDEEC. Hal ini karena CDGSC memiliki nilai S yang lebih kecil dibanding CDEEC dan CDGSC pun membentuk memperlihatkan kontak dengan Arg-737 dan Ser-710 sedangkan CDEEC hanya memiliki kontak dengan Ser-710. Simulasi yang dilakukan pada 300 dan 312 K memberikan hasil yang berbeda dengan proses *docking*. Pada simulasi 300 K, ligan CDEEC teramati membentuk ikatan dengan Arg-737 dan Arg-729 sedangkan CDGSC tidak berikatan dengan residu penting satu pun. Pada simulasi 312 K, CDEEC membentuk ikatan hidrogen yang stabil dengan Ser-710 dan Arg-737. Berdasarkan hasil simulasi ini disimpulkan bahwa CDEEC merupakan inhibitor yang lebih baik dibanding CDGSC dan CDEEC layak dikembangkan menuju tahap selanjutnya sebagai obat anti-dengue.

5.2 Saran

Perlu dilakukan studi untuk mengetahui efek ADMET dari ligan sehingga diperoleh gambaran yang lebih nyata jika ligan dikembangkan sebagai obat anti-dengue. Simulasi dinamika molekul lebih lanjut juga diperlukan untuk mengetahui mekanisme inhibisi ligan. Perlu dilakukan SDM dengan perangkat lain untuk menguji kestabilan kompleks enzim-ligan dengan mencari nilai RMSD

(uji statistik yang membandingkan posisi antara kompleks enzim-ligan selama simulasi dengan posisi enzim berdasarkan hasil kristalografi) agar diketahui efek penambahan ligan pada kestabilan enzim secara kuantitatif.

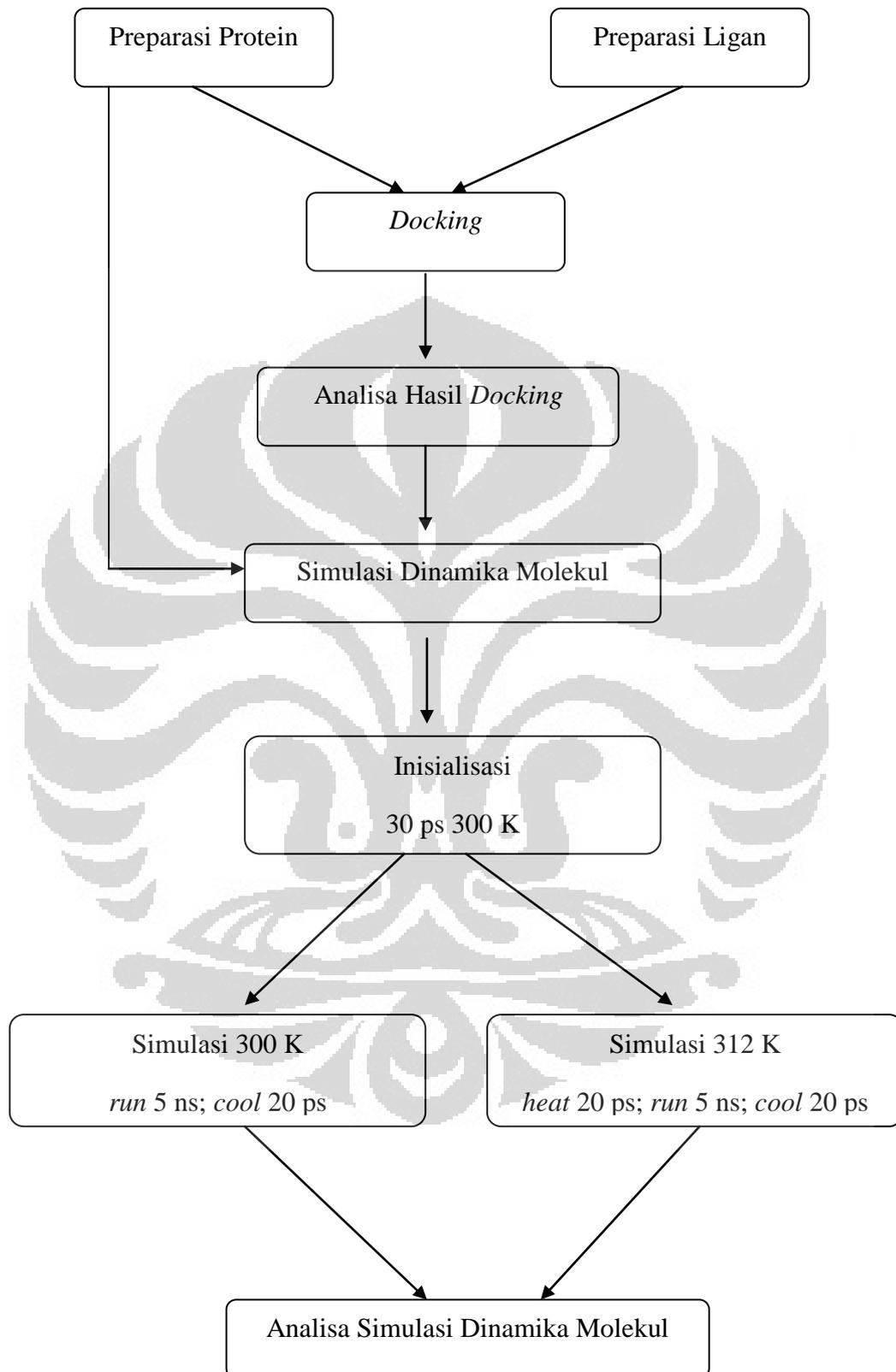


DAFTAR PUSTAKA

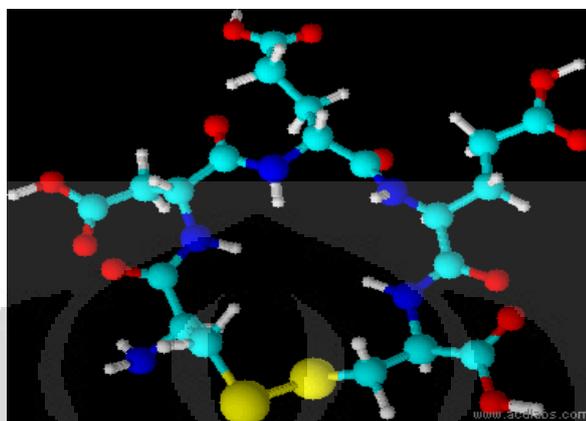
- Alonso, H, Bliznyuk, A.A, dan Gready, J.E. (2006). Combining Docking and Molecular dynamic Simulation in Drug Design. *Medicinal Research, Reviews, Vol.26, No.5, 531-568.*
- Bian, W.R.W. (2009). Karya Sarjana Utama Kimia: *Studi Pendahuluan Perancangan Inhibitor Peptida Potensial bagi Enzim RNA-dependent RNA-polymerase pada Virus Dengue secara In Silico.* Depok: Dept. Kimia FMIPA UI.
- Bhagavan, N.V. (2002). *Medical Biochemistry* (4th edition). Harcourt Academic Press.
- Choi K.H. dan Rossmann M.G. (2009). RNA-dependent RNA polymerases from Flaviviridae. *Current Opinion in Structural Biology 19:746-751.*
- Cook, I.T et al. (2009). Structural rearrangement of SULT2A1: effects on dehydroepiandrosterone and raloxifene sulfation. *Horm Mol Biol Clin Invest 2010;1;(2):81-87*
- Chemical Computational Group. (2008). Molecular Operating Environment Tutorial.
- Franca, et al. (2006). Molecular dynamics of Onteraction of Plasmodium falciparum and human Serine Hydromethyltransferase with 5-Formyl-6-hydrofolic Acid Analogues: Design of New Potential Antimalaria. *J. Braz. Chem. Soc., Vol 17, No.7, 1383-1392.*
- Hendra. (2006). Karya Sarjana Utama Kimia: *Analisis Rancangan Vaksin Tetravalen Dengue Virus secara In Silico menggunakan Protein E DENV-3 sebagai Backbone melalui Homology Modelling.* Kimia FMIPA-UI.
- Huther, A dan Dietrich, U. (2007). The Emerge of Pepide as Therapeutic Drug for The Inhibiton of HIV-1. *AIDS: Rev. 2007;9:208-17*
- Karimah, E. (2009). Karya Sarjana Utama Kimia: *Perancangan Pentapeptida Siklik sebagai Inhibitor Kompetitif RNA-dependent RNA polymerase dengue secara Molecular Docking.* Kimia FMIPA-UI.

- Lehninger. (2004). *Biochemistry* (4th edition). New York: W.H Freeman and Company.
- Mazur, P. et al. (2009). Does Molecular Docking Reveal Alternative Chemopreventive Mechanism of Activation of Oxireductase by Sulforaphane Isothiocyanate? *J. Mol. Model.* DOI 10.1007/s00894-009-0628-5
- Malet, H., et al. (2008). The flavivirus polymerase as a target for drug discovery. *Review, Antiviral Research*, 80: 23–35.
- Moman, Eldemiro. *Pharmaceutical and Medicinal Chemistry*. Saarland University.
- Nurbaiti, S.(2009). Disertasi: *Stabilitas termal dan Pergerakan Dinamis Klenow-Like DNA Polimerase 1 ITB-1 Berdasarkan Simulasi Dinamika Molekul*. Bandung: FMIPA ITB.
- Nurfadly. (2009). *Deteksi dan Penentuan Serotipe Virus Dengue Tipe 1 dari Nyamuk Aedes Aegypti dengan menggunakan Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) di Kota Medan*. Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara
- Pratt, C.W. dan Cornley K. (2004). *Essential Biochemistry*. USA: John Wiley & Son.
- Qi et al.(2008). Biological characteristics of dengue virus and potential targets for drug design. *Acta Biochim Biophys Sin*: 91-101.
- Sampath dan Padmanabhan. (2009). Molecular targets for flavivirus drug discovery. *Antiviral Research* 81: 6–15
- Sehgal, A. (2006). *New Application in Discovery, Manufacturing, and Therapeutic*. Tracy Beaudoin.
- Sofyan, A. (2007). *Simulasi Bulk Polyethylene-oxide Menggunakan Simulasi Dinamika Molekul*. Laporan Tugas Akhir Sarjana Teknik Fisika Institut Teknologi Bandung.
- Tomlinson et al. (2009). New Approaches to Structure-Based Discovery of Dengue Protease Inhibitors. *Infectious Disorders-Drug Targets*, 9, 327-343 327.
- Van Dijk, A.A et al. (2004). Initiation of Viral RNA-Dependent RNA polymerization. *Journal of General Virology*, 85, 1077-1093.

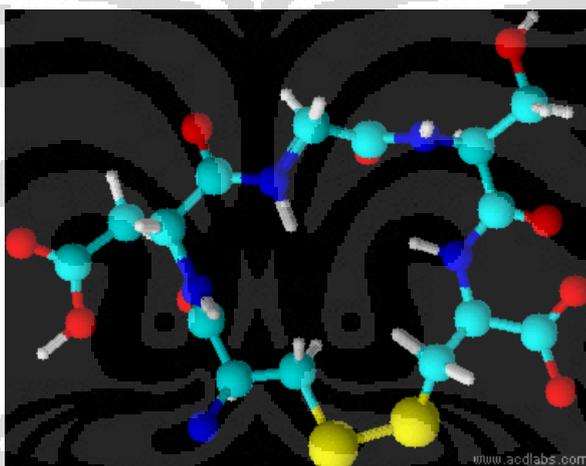
- Witoelar, A. (2002). *Perancangan dan Analisa Simulasi Dinamika Molekul Ensemble Mikrokkanonikal dan kanonikal dengan Potensial Lennard Jones*. Laporan Tugas Akhir Sarjana Teknik Fisika Institut Teknologi Bandung.
- Wuriyani, K.T. (2009). Karya Sarjana Utama Kimia: *Perancangan Peptida Siklis Disulfida sebagai Inhibitor Potensial Enzim NS3-NS2B Protease Virus Dengue melalui Molecular Docking*. Kimia FMIPA UI.
- Yap, *et al.* (2007). Crystal structure of the dengue virus RNA-dependent RNA polymerase catalytic domain at 1.85-angstrom resolution. *J. Virol.* 81, 4753–4765.
- Yin *et al.* (2009). N-sulfonylanthranilic Acid Derivatives as allosteric Inhibitors of Dengue Viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Med. Chem.* 53, 7934–7937.
- AccessCR “*Drug Development*” 7 Juni 2010 17:03 WIB
<http://www.accesscr.com.au/upload/Image/Drug%20Development%20Processes%20jpg.jpg>
- Biology Pages “*Enzymes*” 14 Mei 2010 11:16 WIB
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/E/Enzymes.html>
- Elmhurst “*Inhibition*” 14 Mei 2010 11:25 WIB
<http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/573inhibit.html>
<http://www-ucc.ch.cam.ac.uk/research/images/docking-small.jpg>
- Infeksi “*Demam Berdarah Dengue*” 27 Januari 2010 10:59 WIB
<http://www.infeksi.com/articles.php?lng=in&pg=53>
- Litbang Depkes “*Demam Berdarah*” 27 Januari 2010 11:10 WIB
<http://www.litbang.depkes.go.id/maskes/052004/demamberdarah1.htm>
- Microbiologybytes “*Flaviviruses*” 9 Februari 2010 9:38 WIB
<http://www.microbiologybytes.com/virology/Flaviviruses.html>
- Protein Data Bank “*RdRp Virus Dengue*” 1 Februari 2010 08:15 WIB
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2J7U>
- Teckfak “*Drug Design*” 7 Juni 2010 16:57 WIB <http://www.techfak.uni-bielefeld.de/bcd/ForAll/Introd/drugdesign.html>
- UQ.edu “*Amino Acid Structure*” 30 Mei 2010 11:05 WIB
<http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/aastructures.jpg>

Lampiran 1. Bagan Kerja Penelitian

Lampiran 2. Inhibitor Potensial Peptida Siklis Disulfida

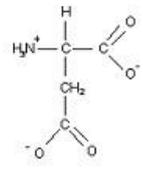
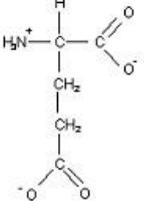
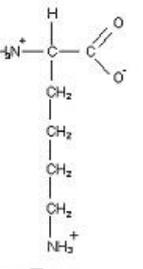
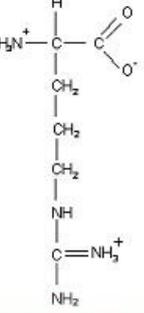
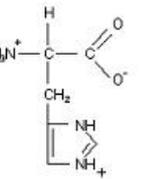
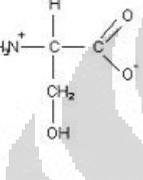
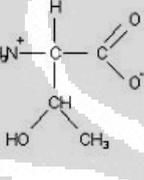
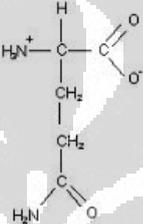
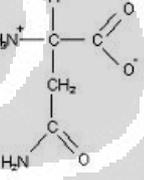
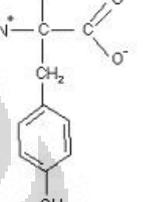
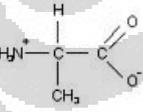
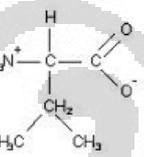
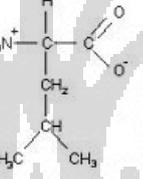
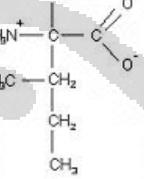
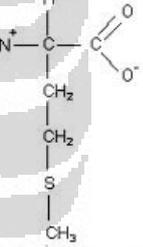
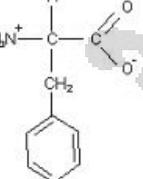
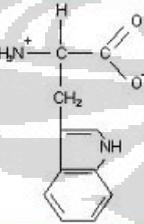
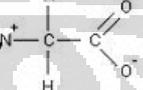
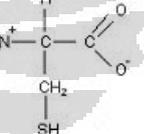
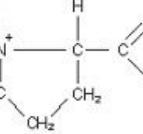


CDEEC



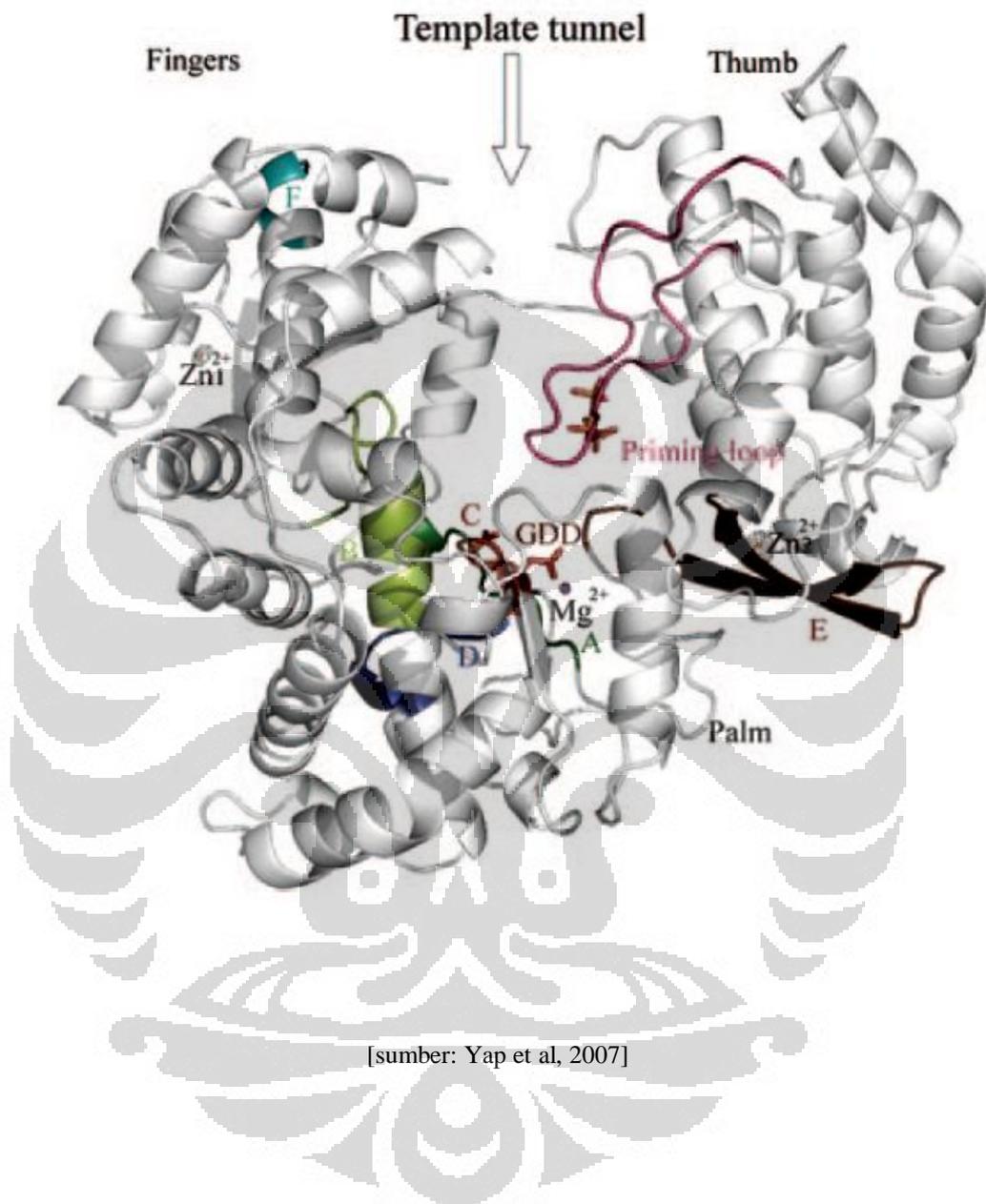
CDGSC

Lampiran 3. Daftar Asam Amino

Polar	Non-polar		"Special"	
				
Aspartic Acid (asp or D)	Glutamic Acid (glu or E)	Lysine (lys or K)	Arginine (arg or R)	Histidine (his or H)
				
Serine (ser or S)	Threonine (thr or T)	Glutamine (gln or Q)	Asparagine (asn or N)	Tyrosine (tyr or Y)
				
Alanine (ala or A)	Valine (val or V)	Leucine (leu or L)	Isoleucine (ile or I)	Methionine (met or M)
				
Phenylalanine (phe or F)	Tryptophan (trp or W)	Glycine (gly or G)	Cysteine (cys or C)	Proline (pro or P)

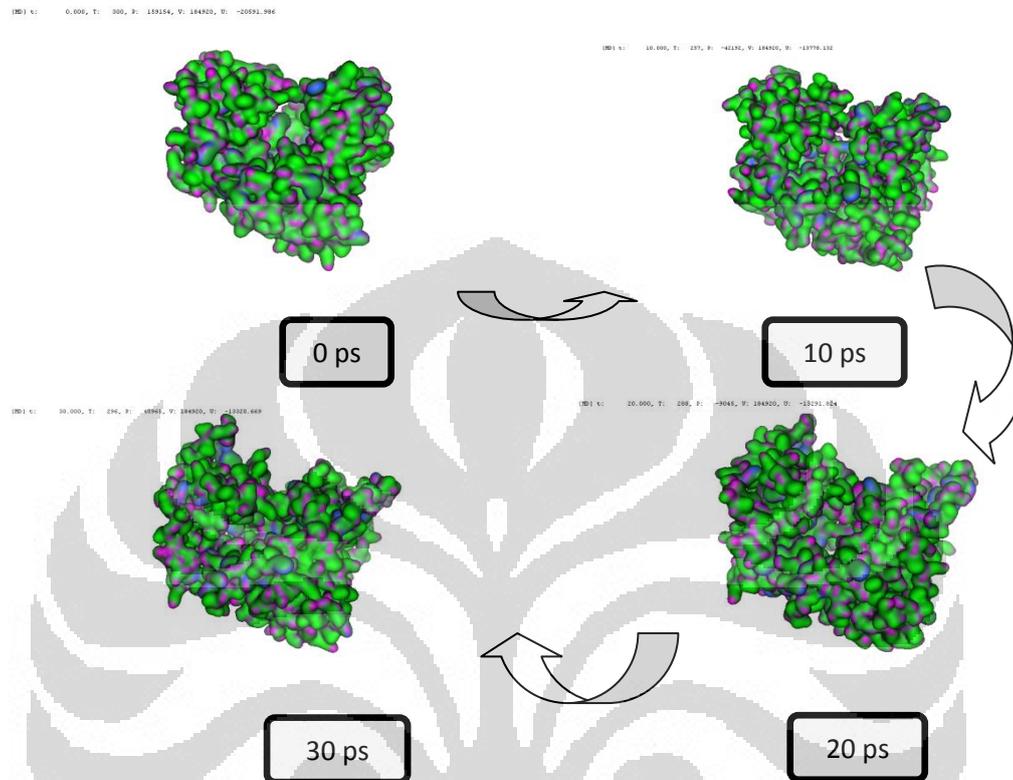
[sumber: <http://www.di.uq.edu.au/sparq/images/aastructures.jpg>]

Lampiran 4. Visualisasi Enzim RdRp virus dengue dengan keenam motifnya

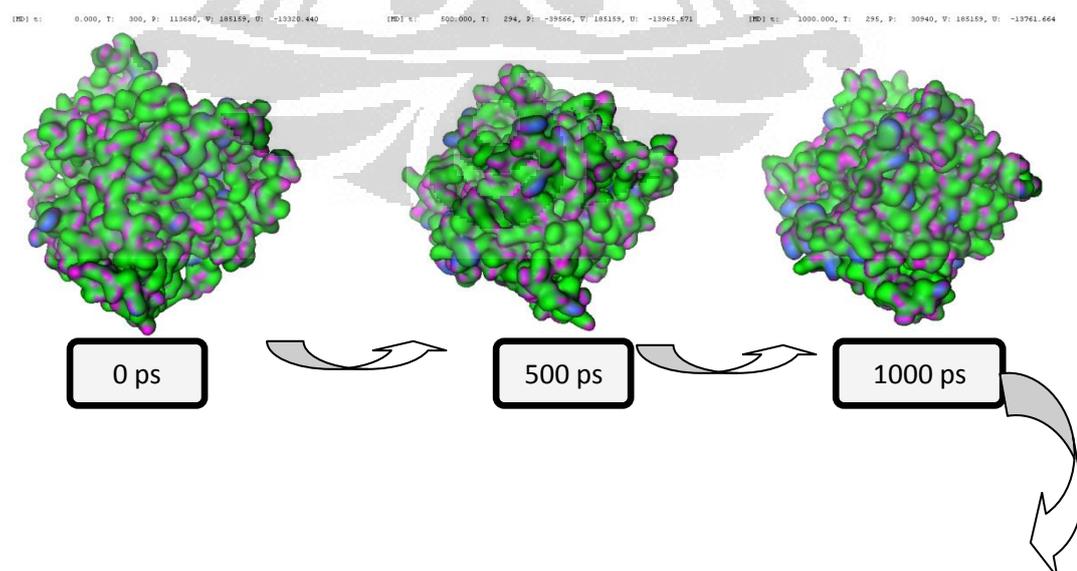


Lampiran 5. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue pada 300 K

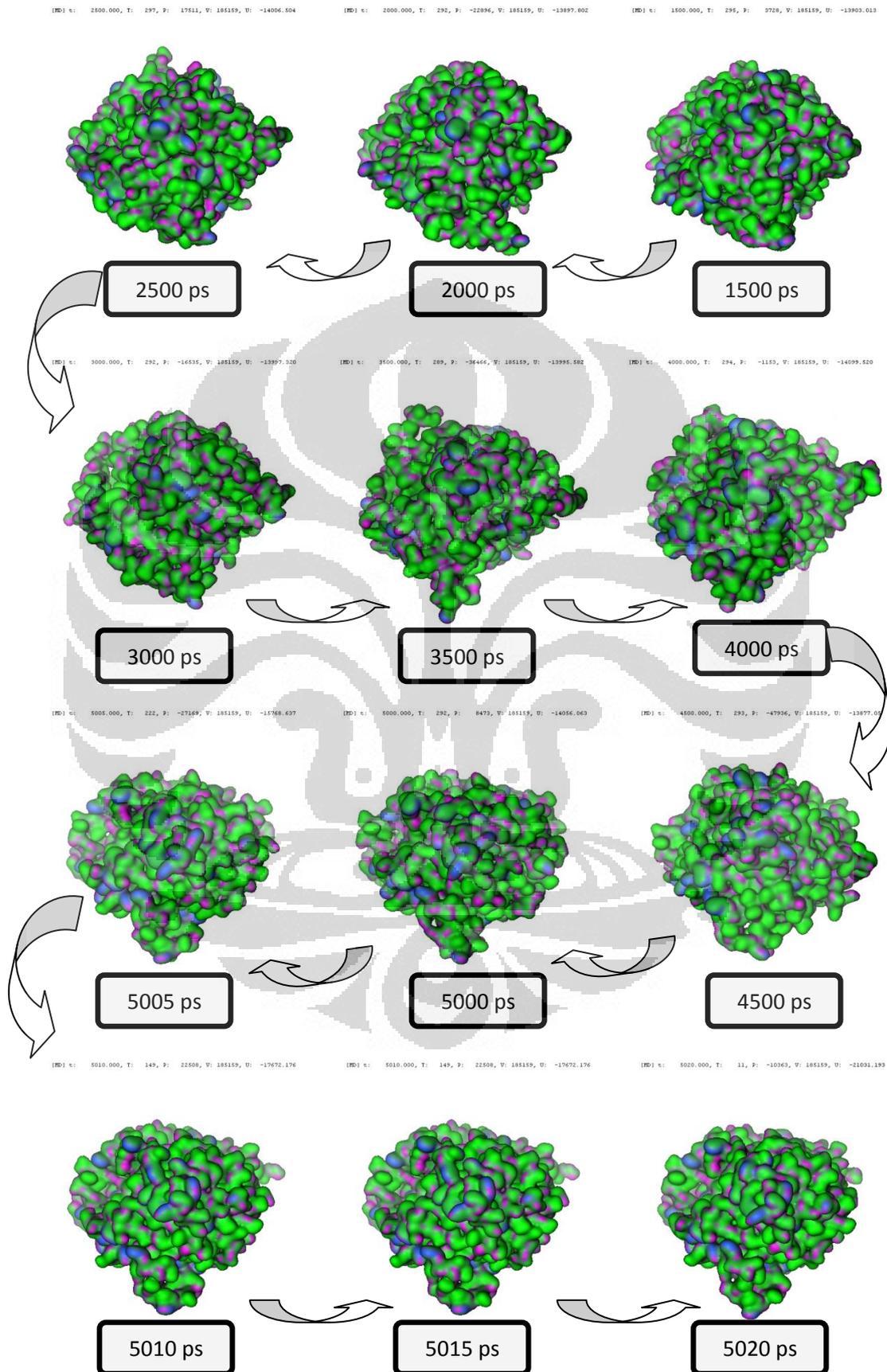
Tahap Inisialisasi



Tahap Simulasi

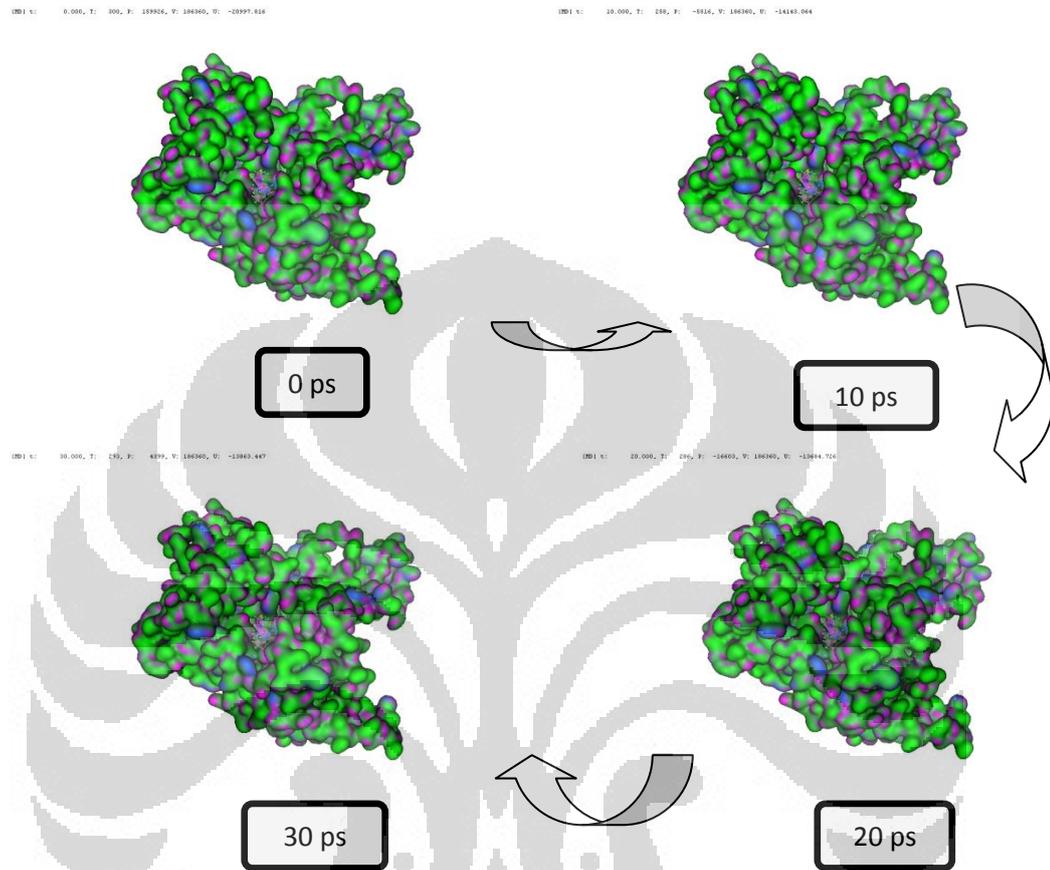


(Lanjutan)

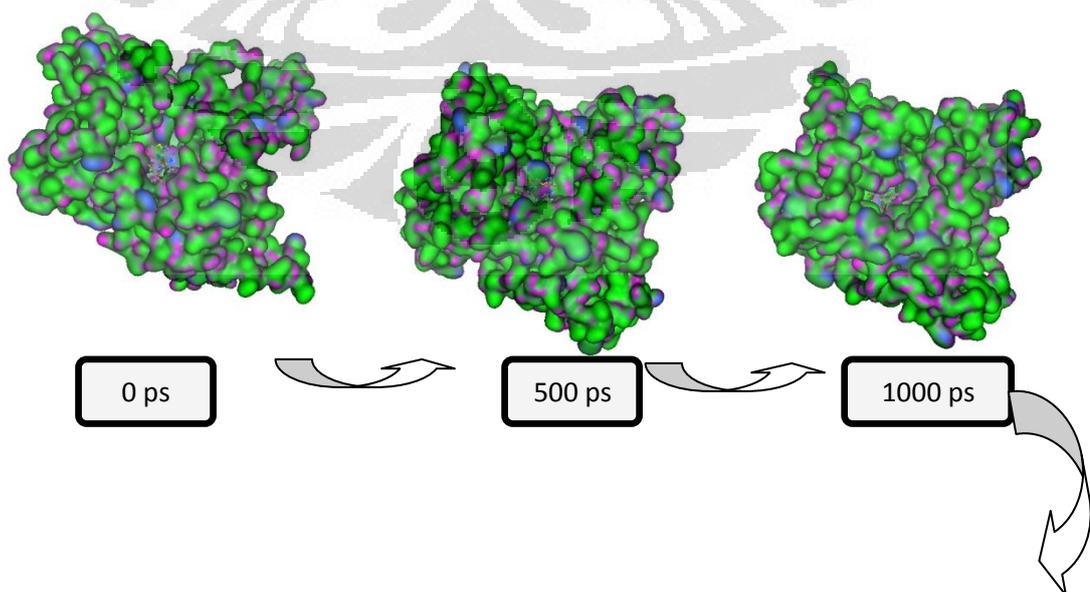


Lampiran 6. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDEEC pada 300 K

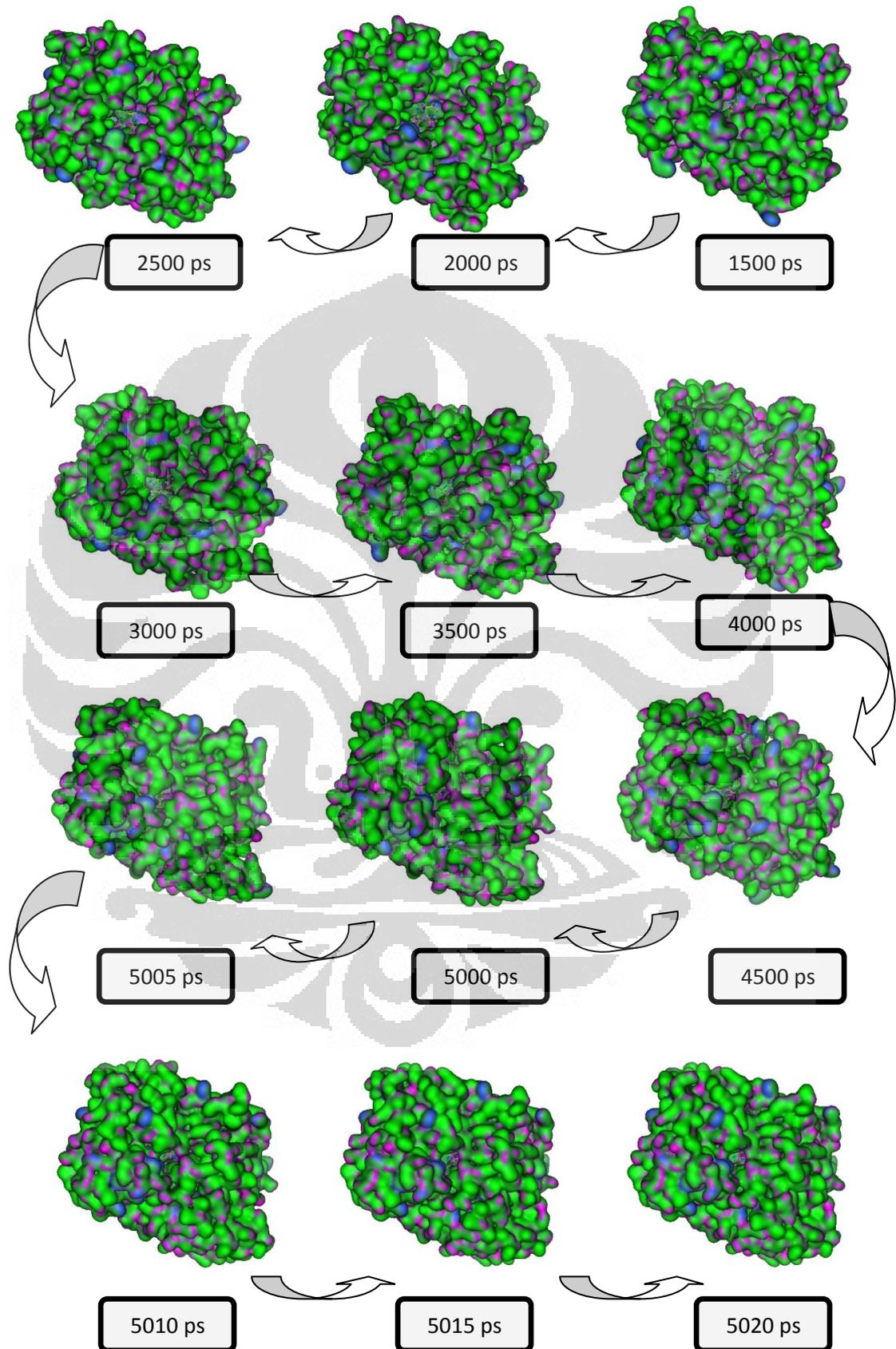
Tahap Inisialisasi



Tahap Simulasi

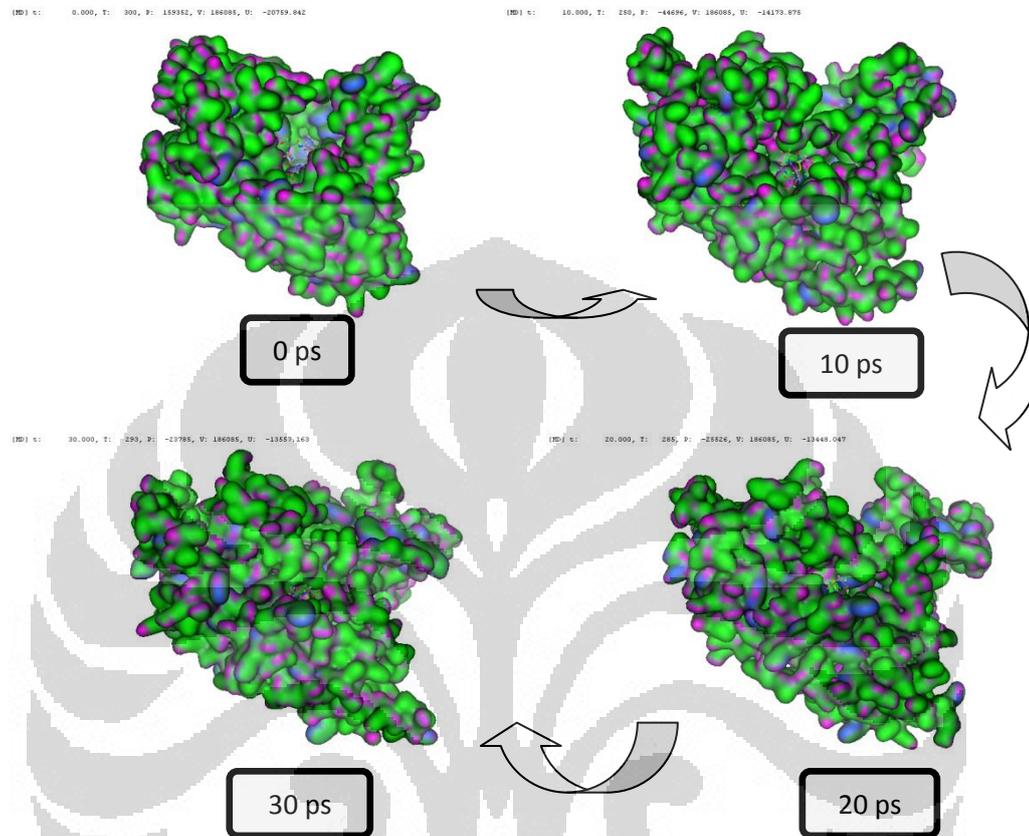


(Lanjutan)

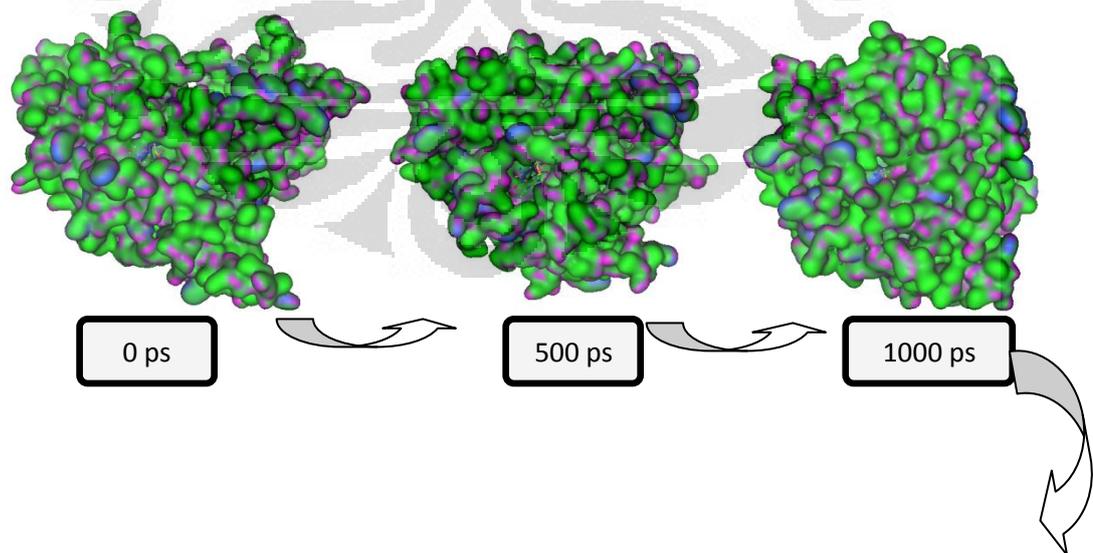


Lampiran 7. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDGSC pada 300 K

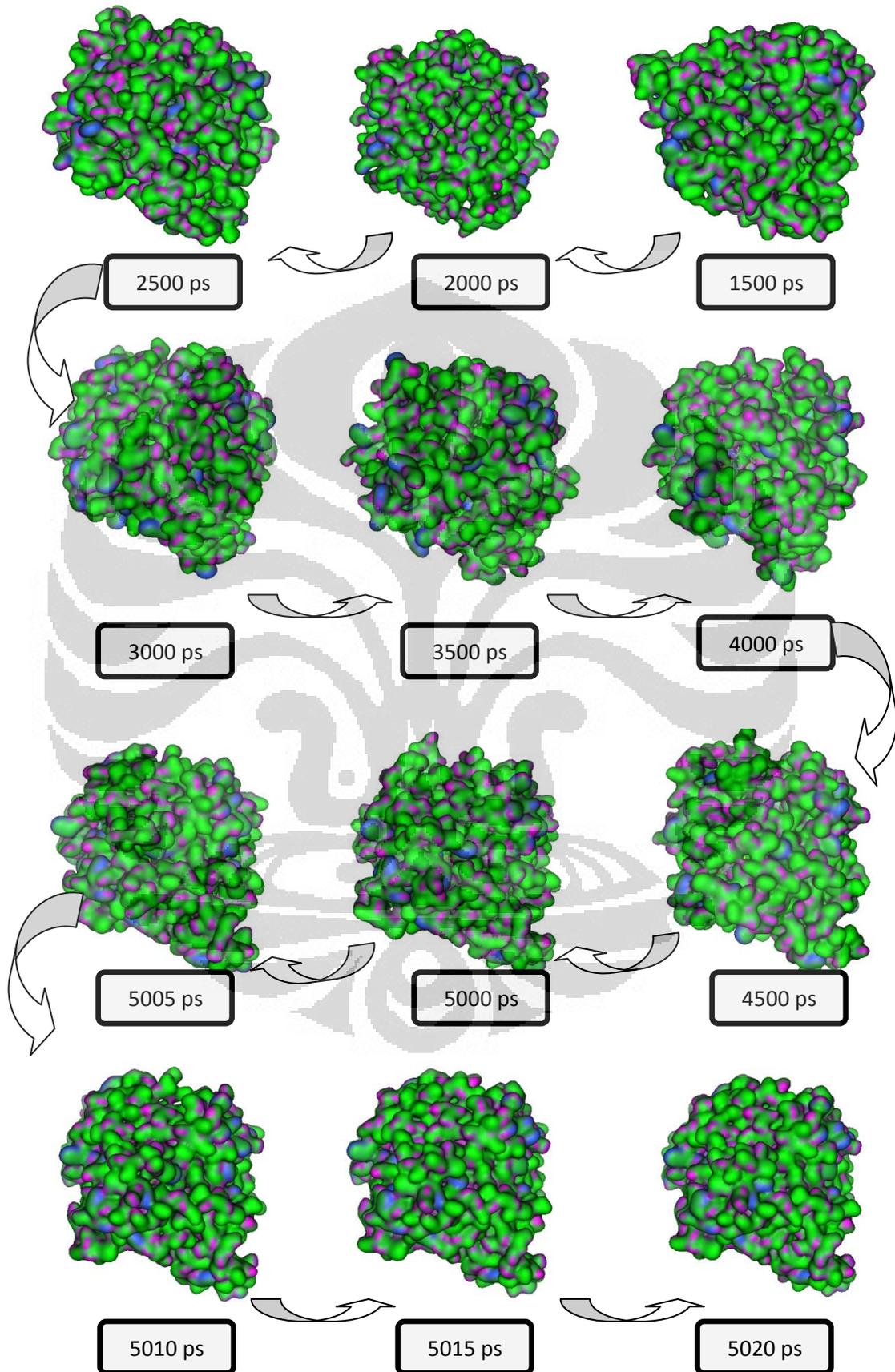
Tahap Inisialisasi



Tahap Simulasi

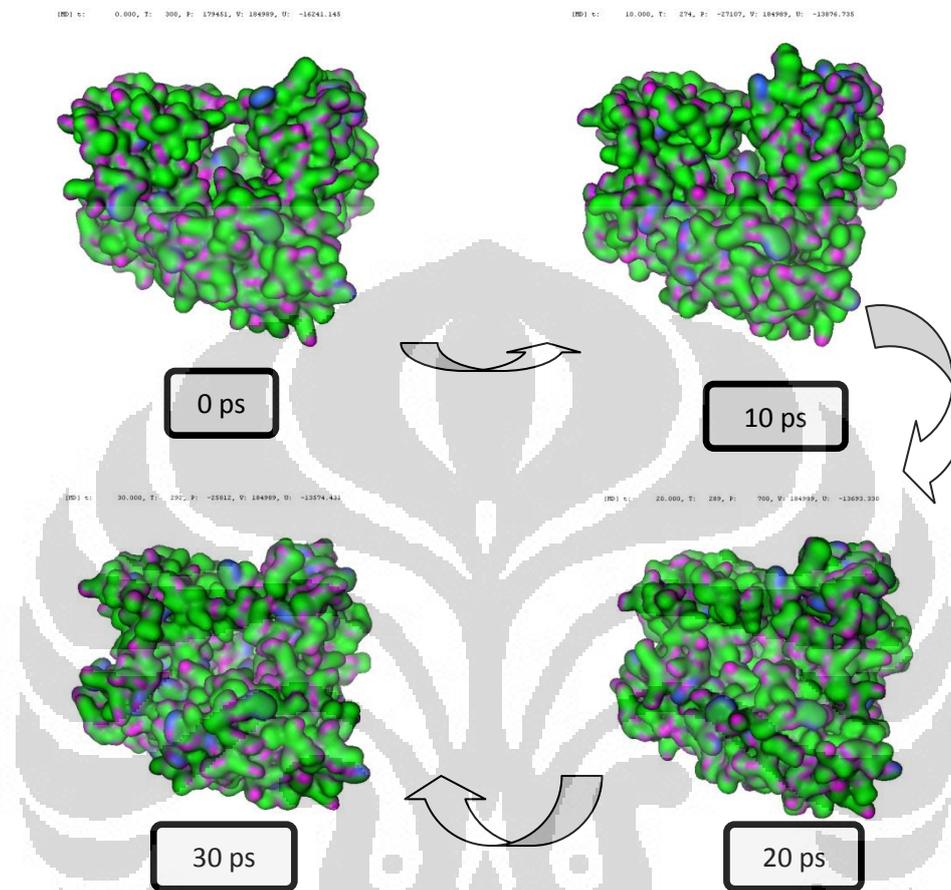


(Lanjutan)

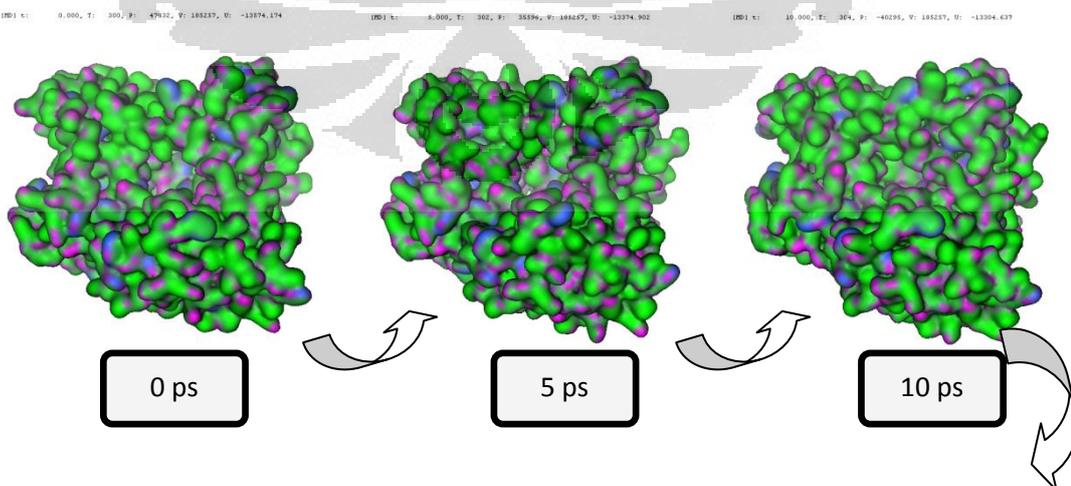


Lampiran 8. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue pada 312 K

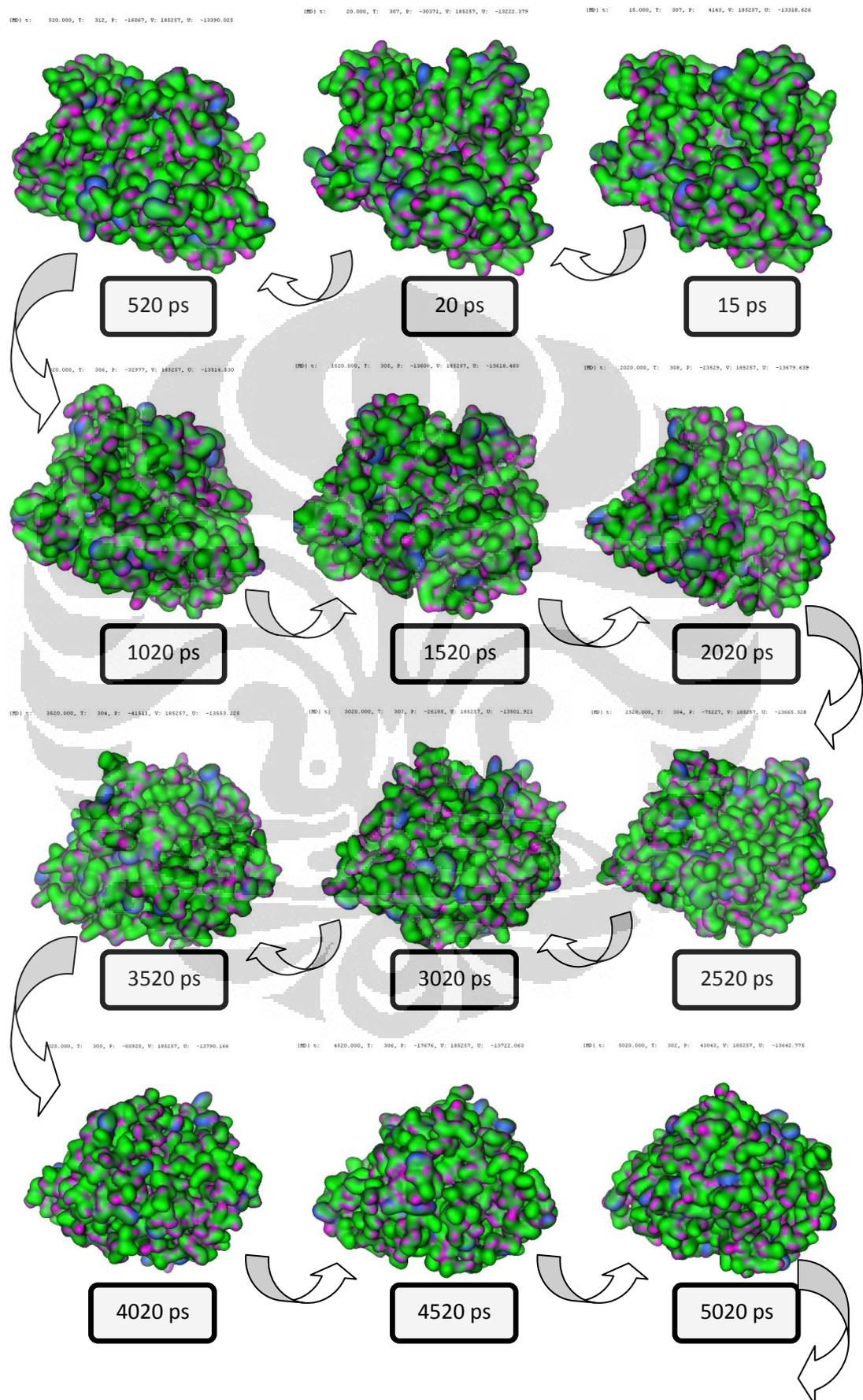
Tahap Inisialisasi



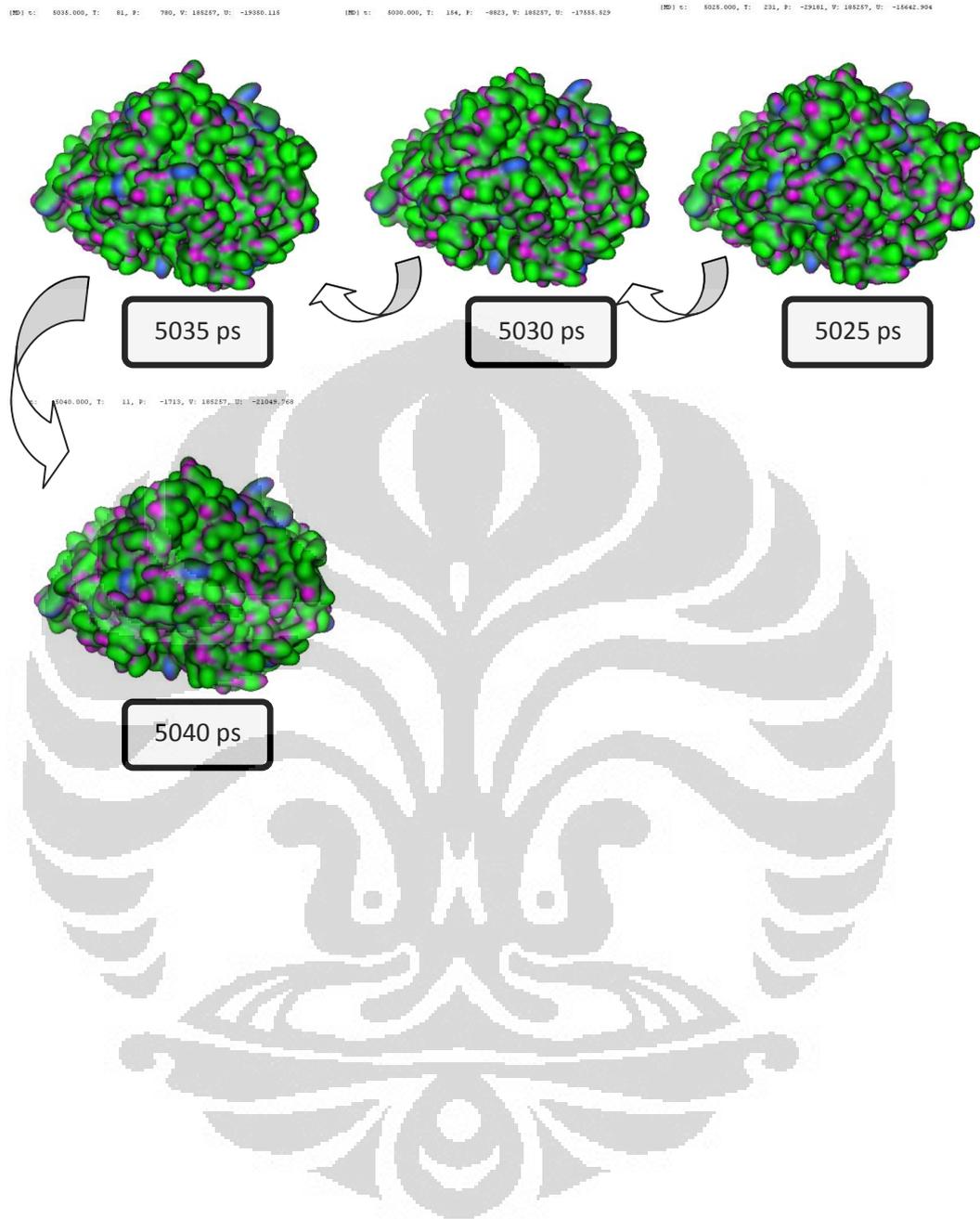
Tahap Simulasi



(Lanjutan)

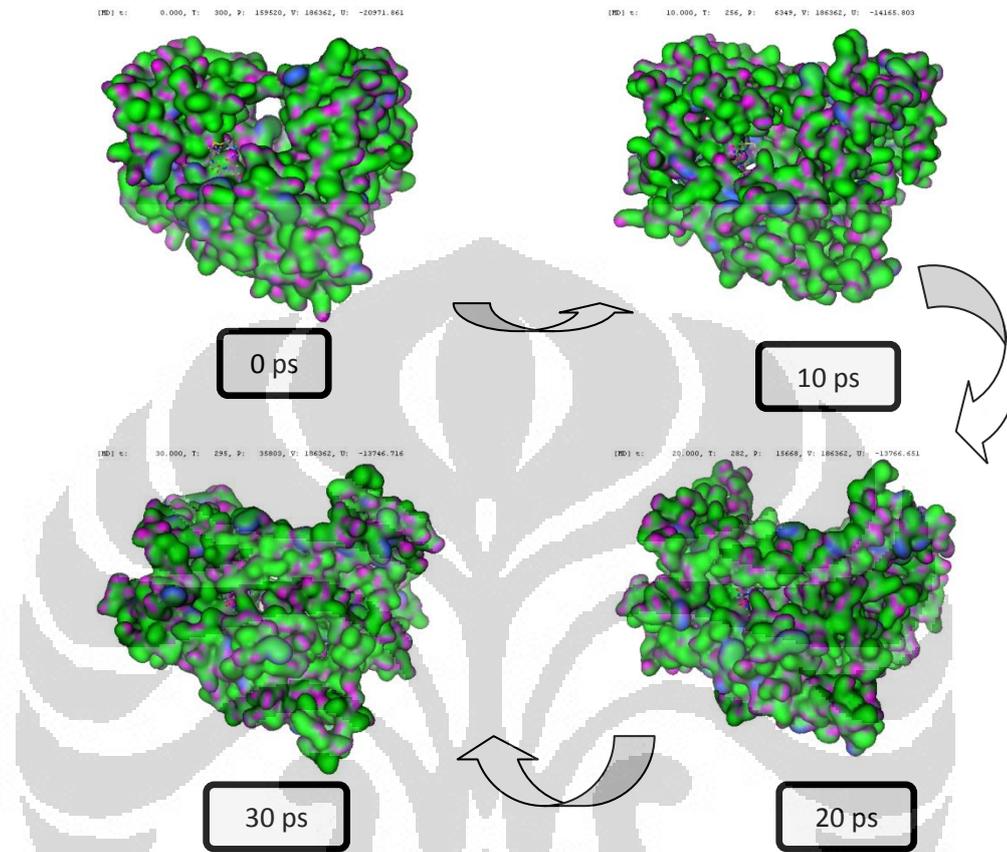


(Lanjutan)

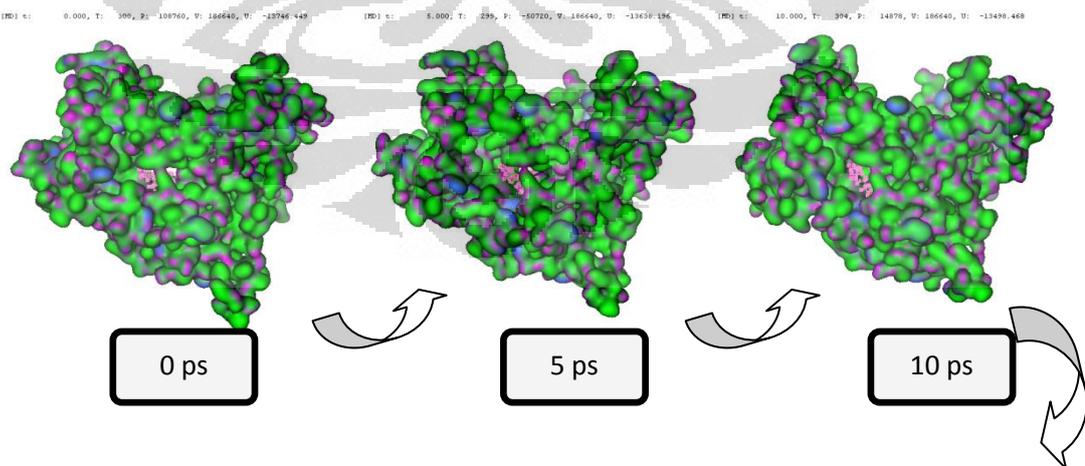


Lampiran 9. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDEEC pada 312 K

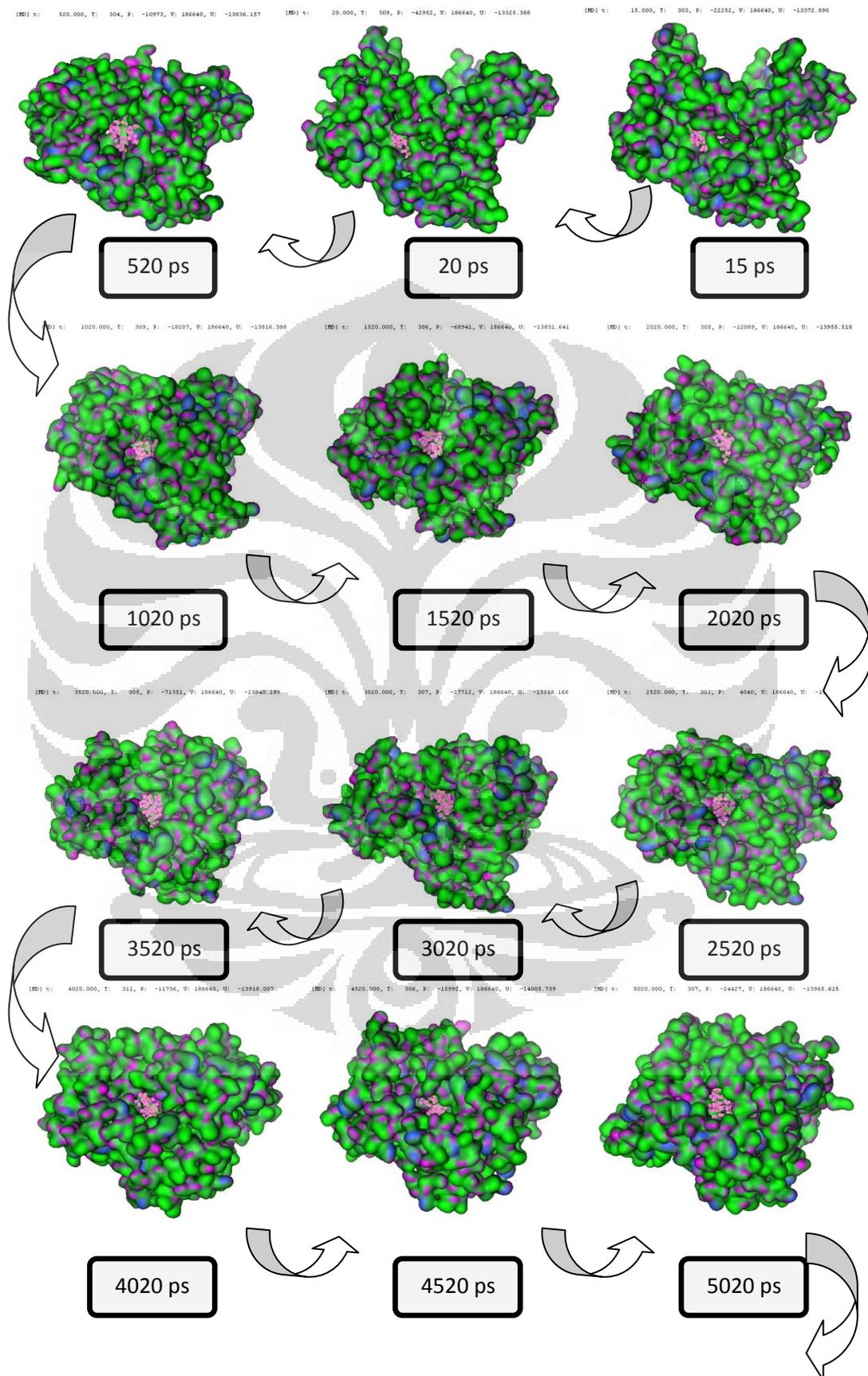
Tahap Inisialisasi

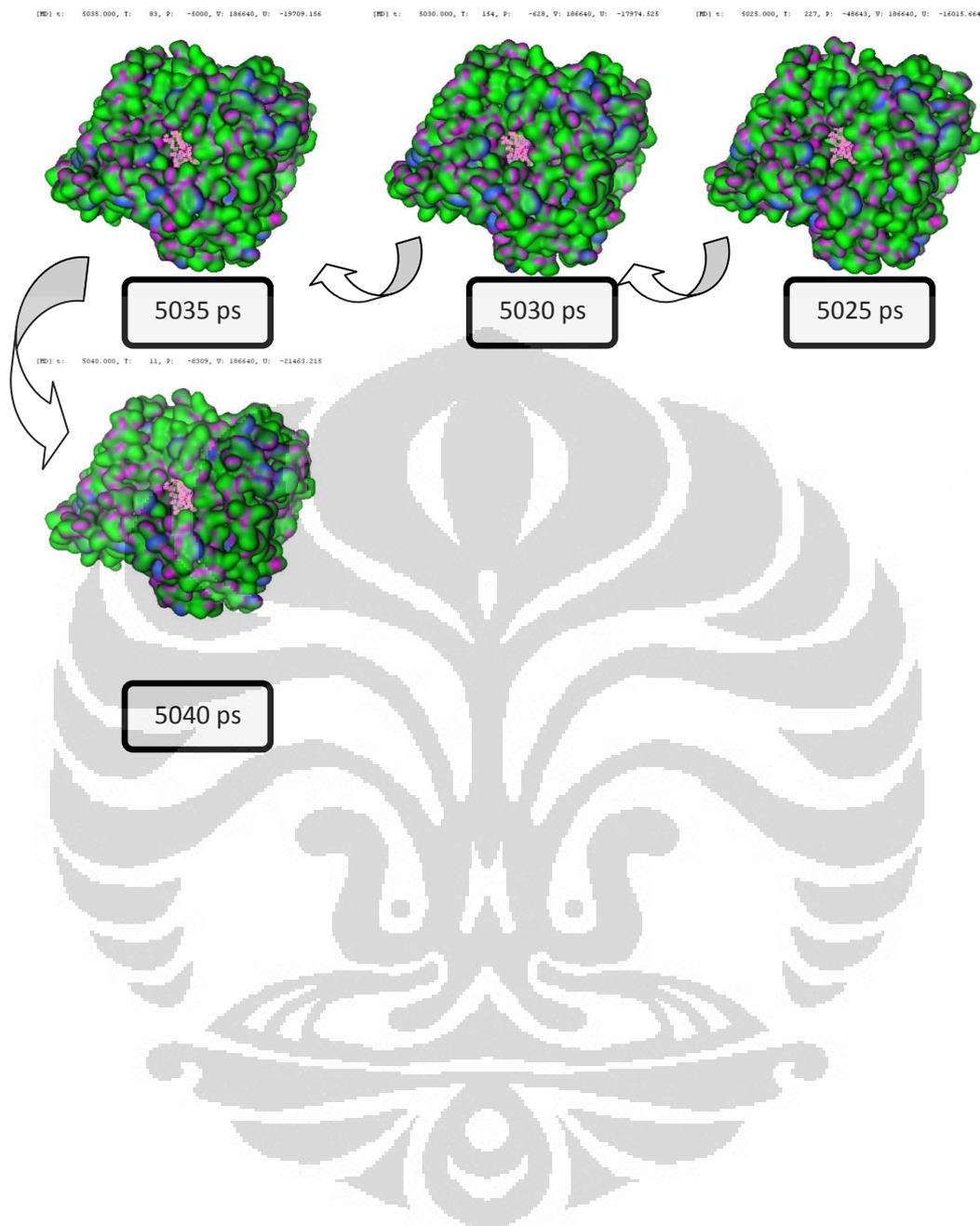


Tahap Simulasi



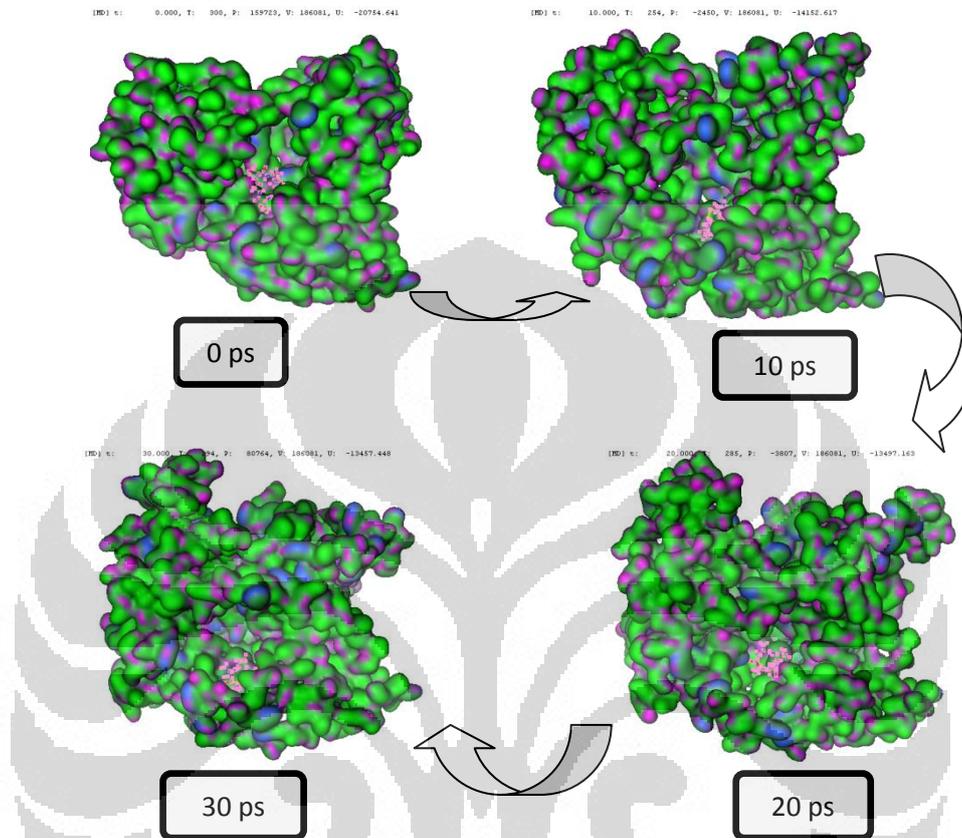
(Lanjutan)



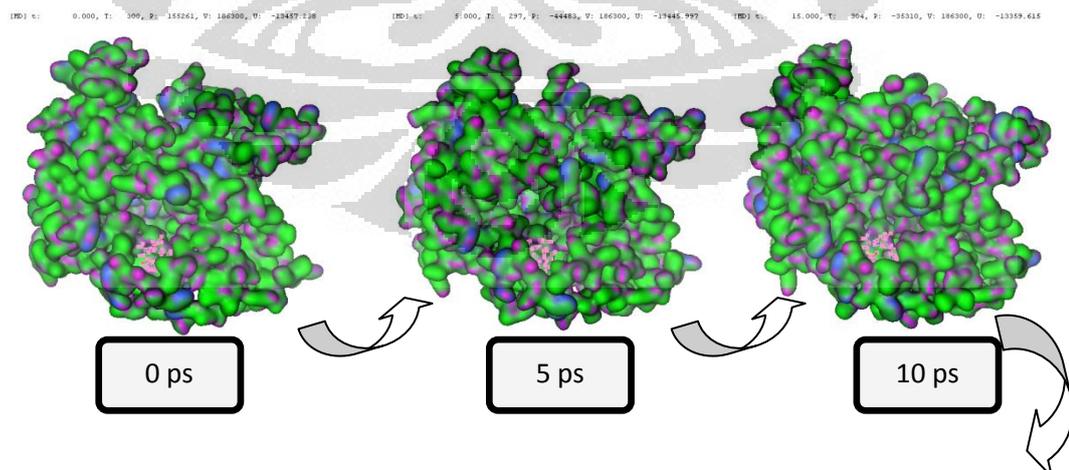
(Lanjutan)

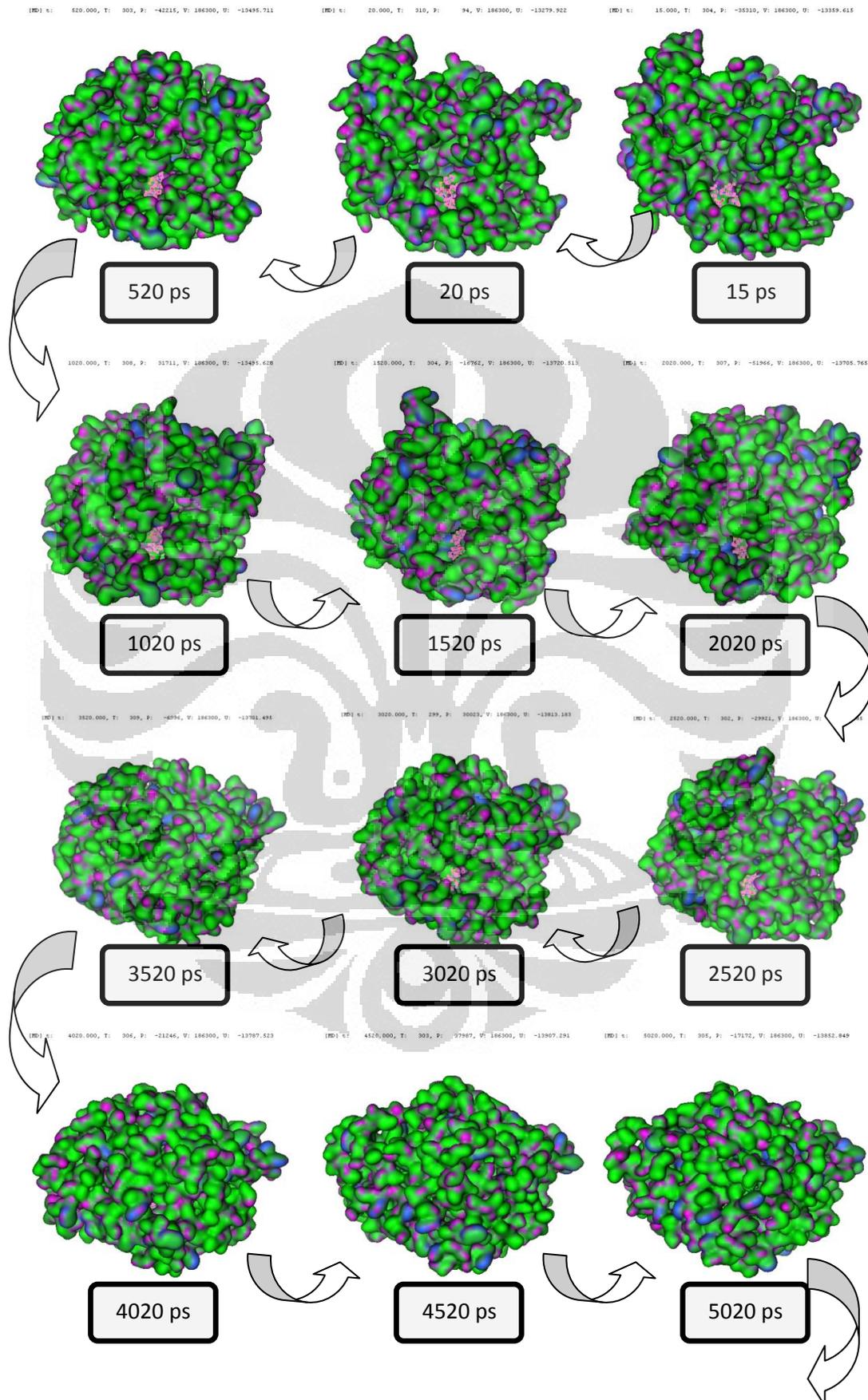
Lampiran 10. Visualisasi Simulasi Dinamika Molekul Enzim RdRp Virus Dengue dengan CDGSC pada 312 K

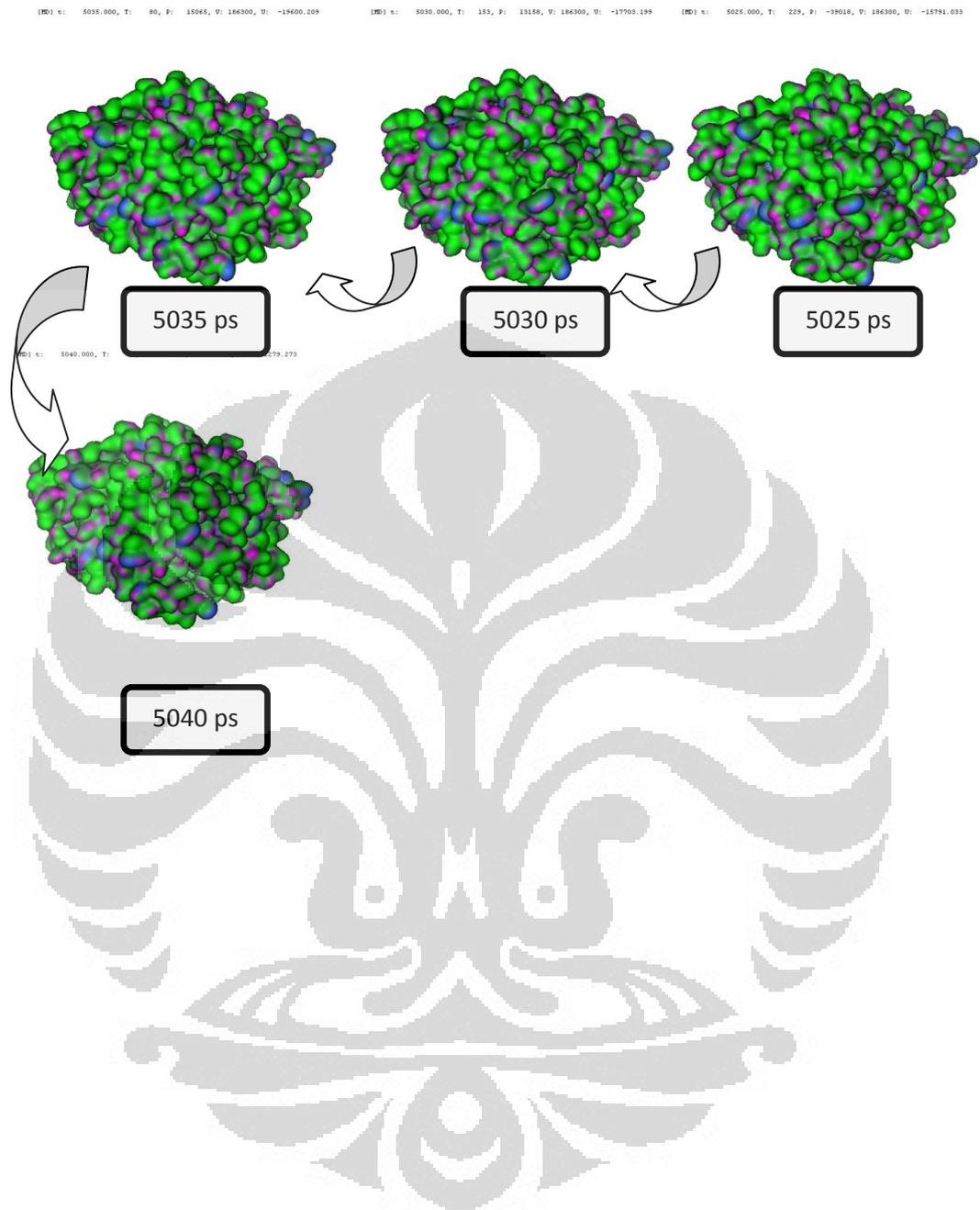
Tahap Inisialisasi



Tahap Simulasi

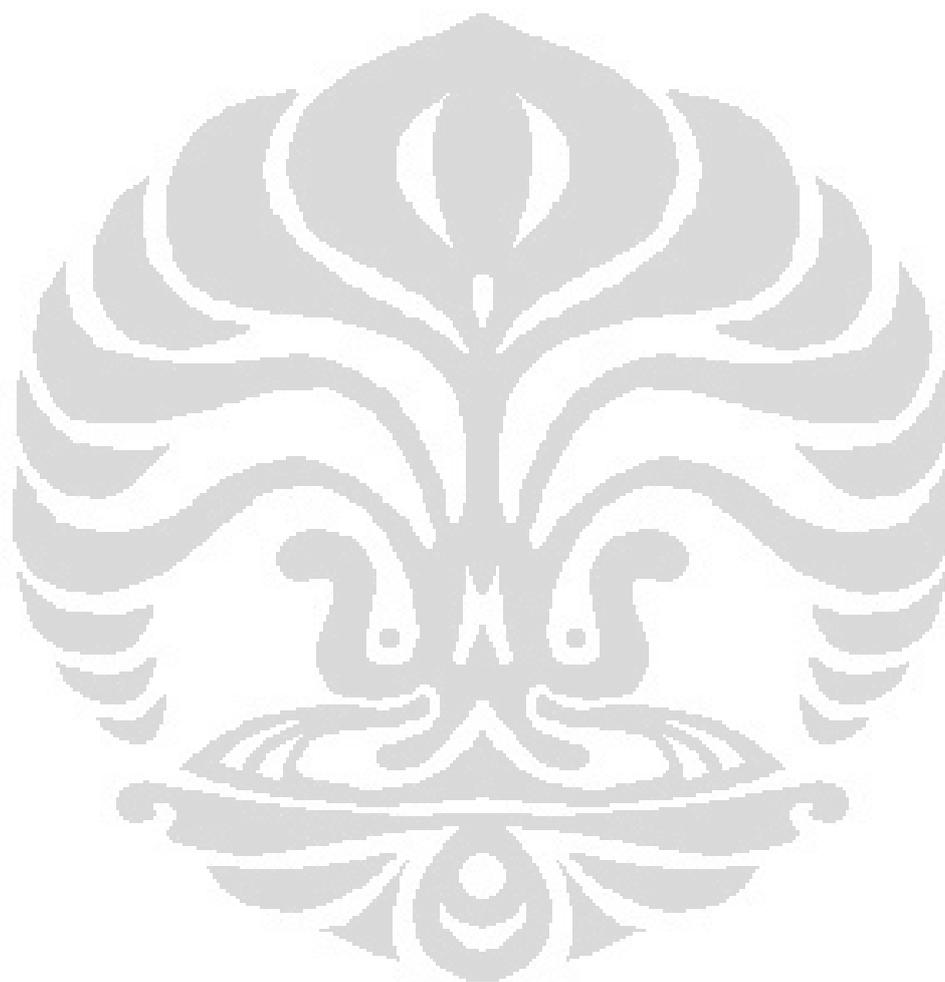


(Lanjutan)

(Lanjutan)

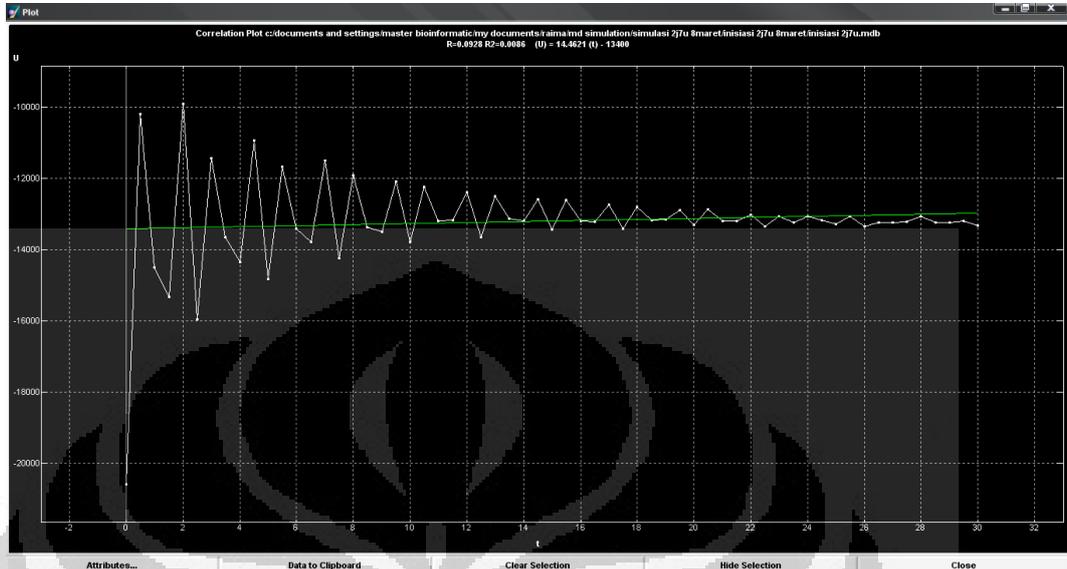
Lampiran 11. Tabel Data Hasil *Docking*

	mol	mseq	S	E_conf	E_place	E_score1	E_refine
1	DEE.mol	1	-24.2558	2.1767	-81.7428	-11.7345	-24.2558
2	DGS.mol	2	-35.7418	4.0000	-34.8497	-11.2130	-35.7418

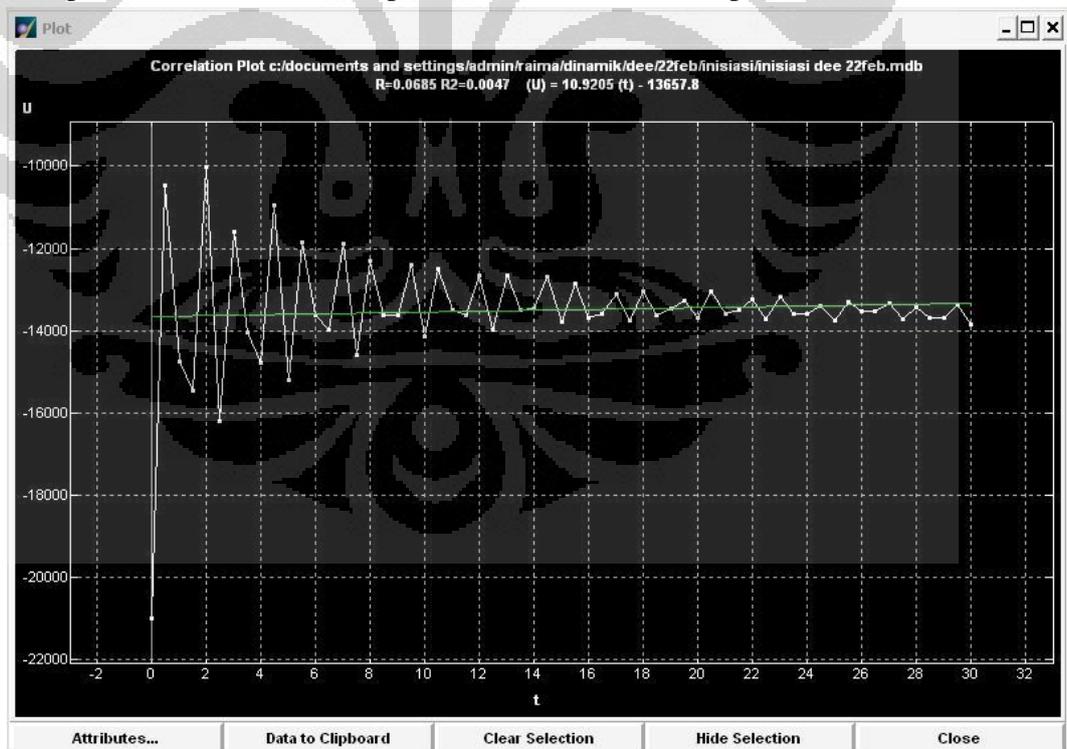


Lampiran 12. Plot Energi Potensial Total Sistem terhadap Waktu Tahap Inisialisasi

1. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp untuk Simulasi pada 300 K

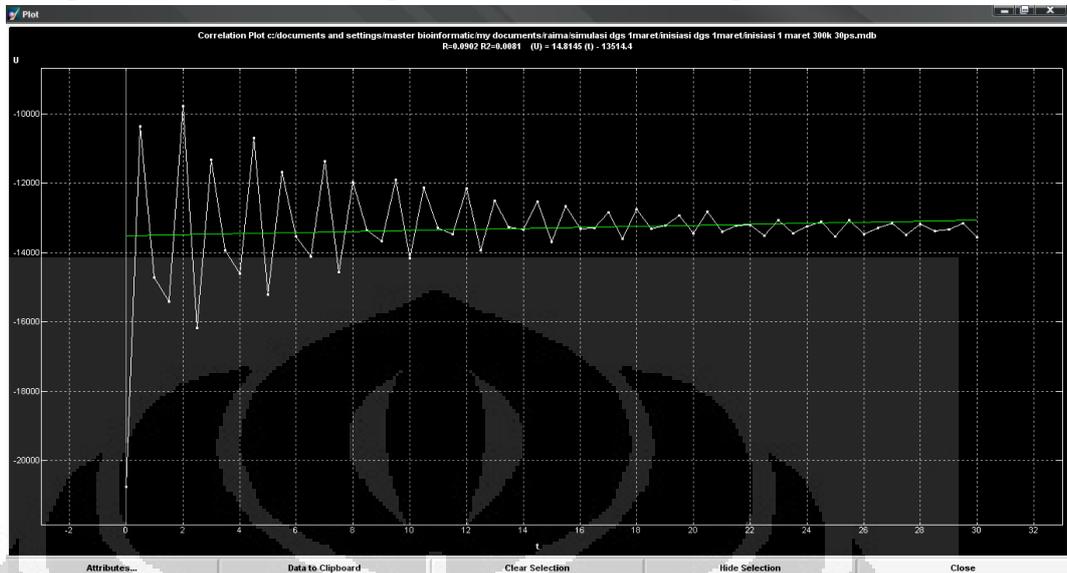


2. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp-CDEEC untuk Simulasi pada 300K

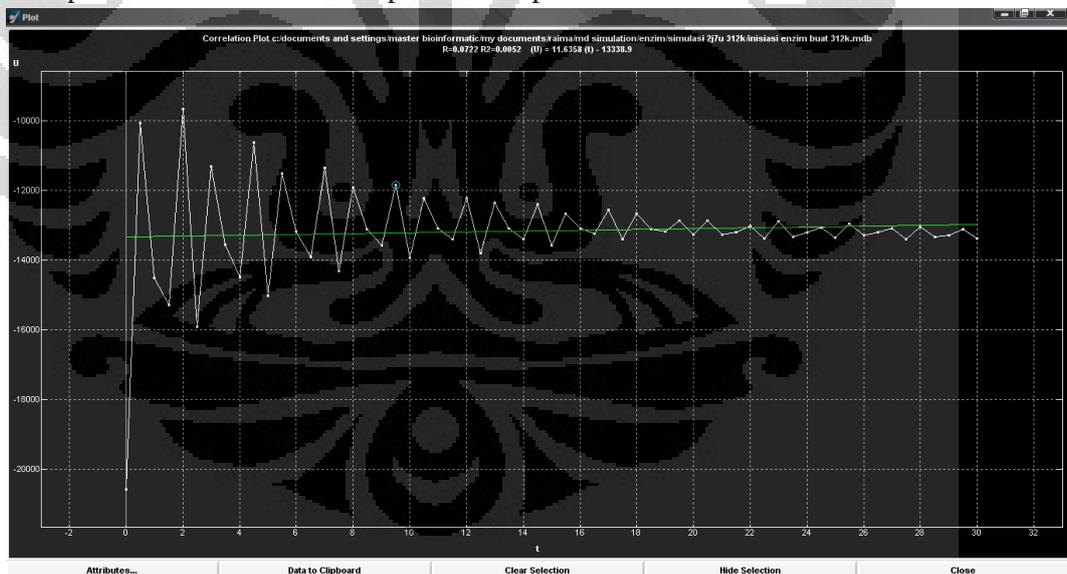


(Lanjutan)

3. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp-CDGSC untuk Simulasi pada 300K

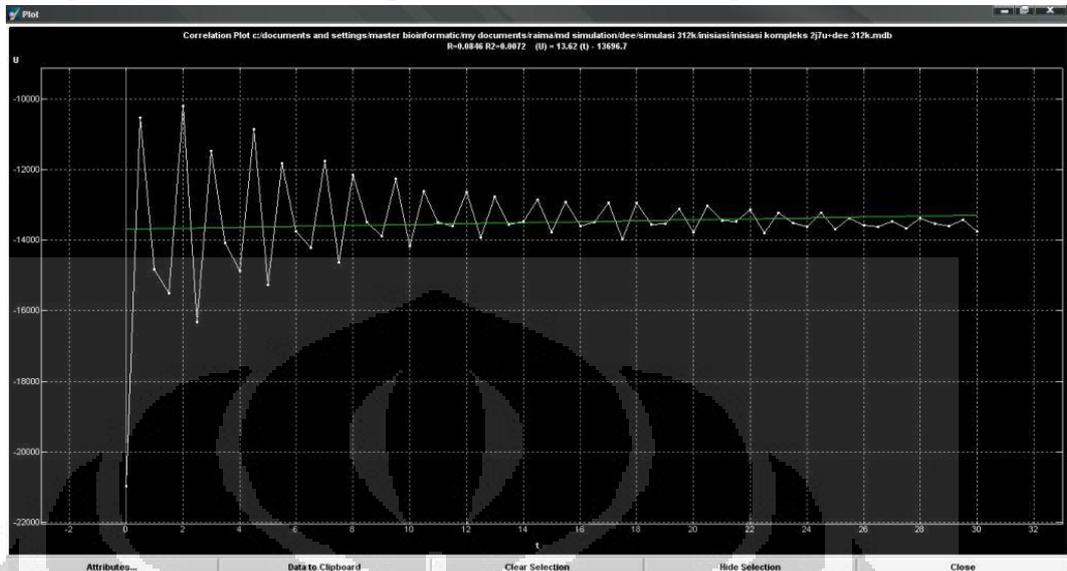


4. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp Simulasi pada 312 K

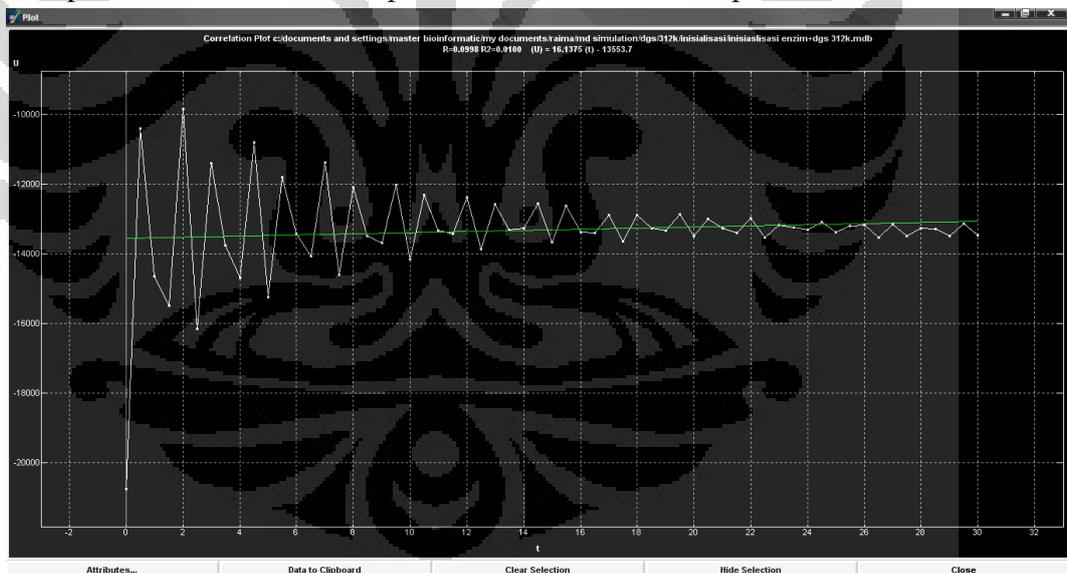


(Lanjutan)

5. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp-CDEEC untuk Simulasi pada 312 K

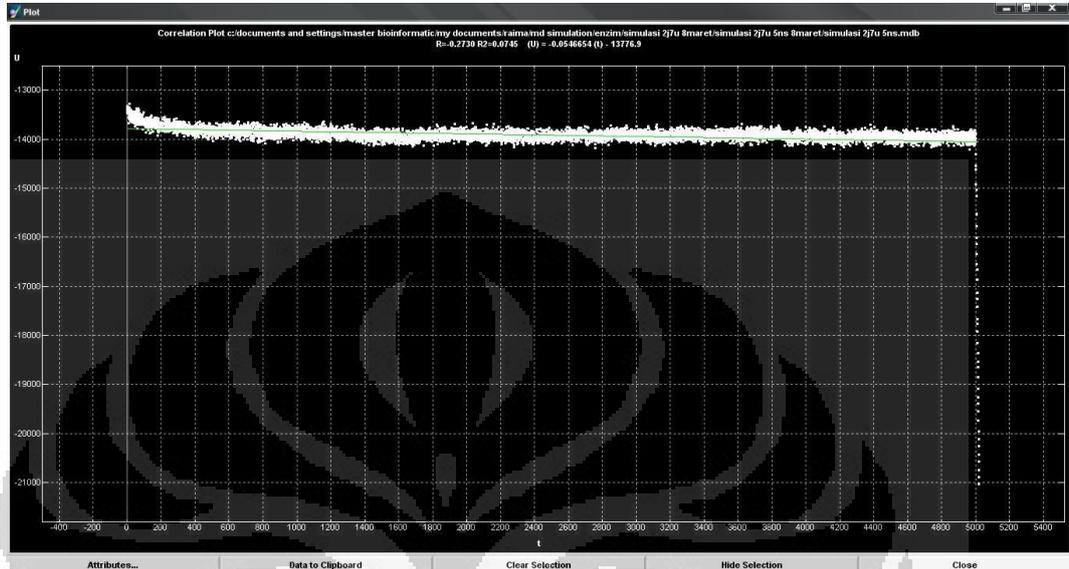


6. Tahap Inisialisasi Enzim RdRp-CDGSC untuk Simulasi pada 312K

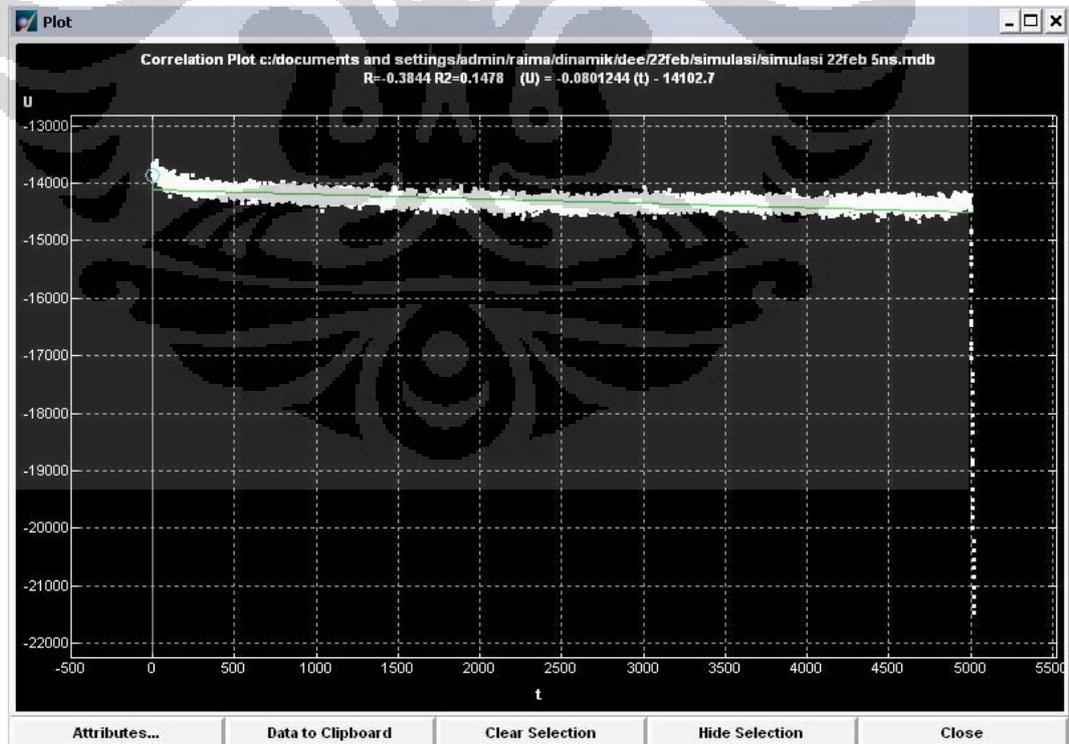


Lampiran 13. Plot Energi Potensial Total Sistem terhadap Waktu Tahap Simulasi

1. Tahap Simulasi Enzim RdRp untuk Simulasi pada 300 K

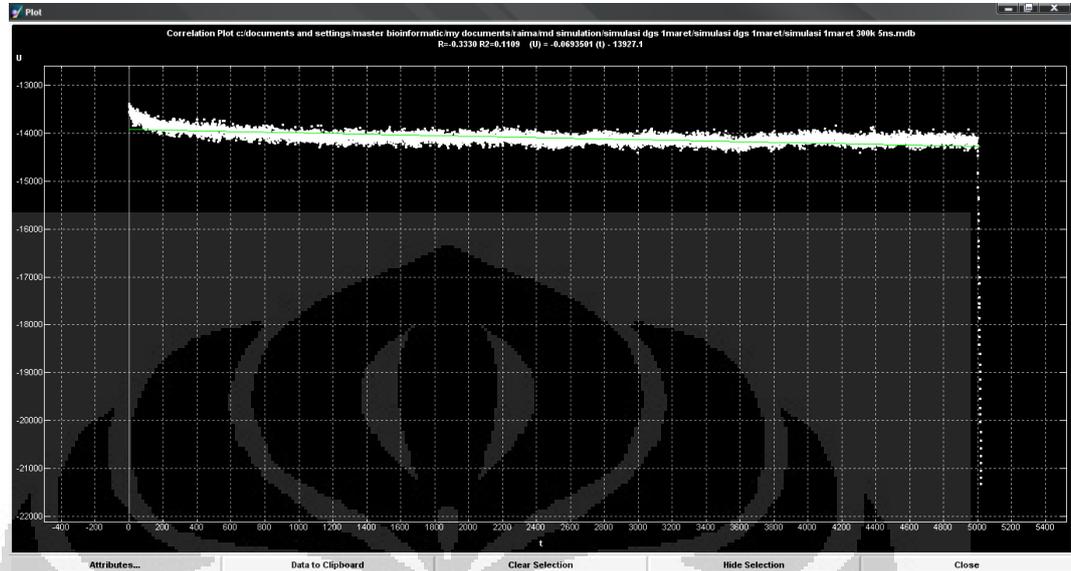


2. Tahap Simulasi Enzim RdRp+CDEEC untuk Simulasi pada 300 K

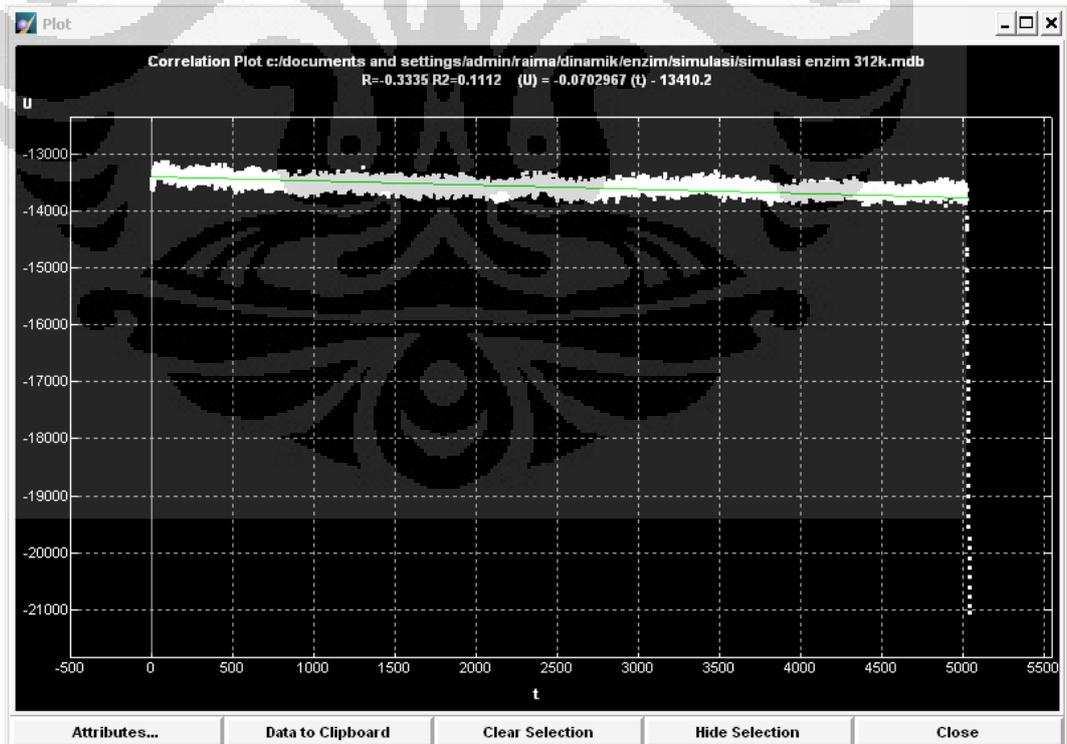


(Lanjutan)

3. Tahap Simulasi Enzim RdRp+CDGSC untuk Simulasi pada 300 K

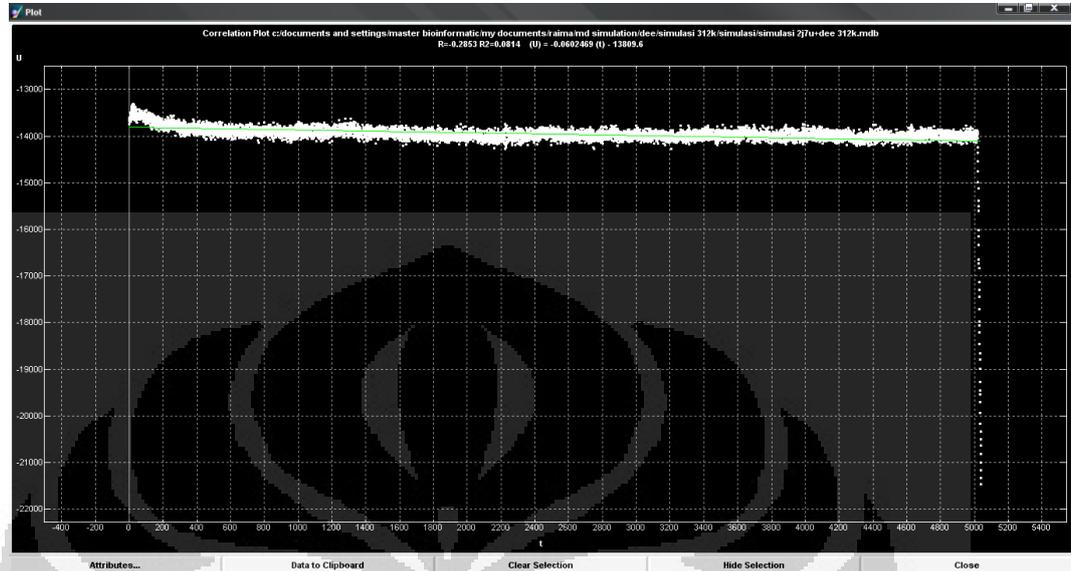


4. Tahap Simulasi Enzim RdRp untuk Simulasi pada 312 K



(Lanjutan)

5. Tahap Simulasi Enzim RdRp+CDEEC untuk Simulasi pada 312 K



6. Tahap Simulasi Enzim RdRp+CDGSC untuk Simulasi pada 312 K

