



UNIVERSITAS INDONESIA

**Analisis Aktivitas Mutasi HIV-1 Protease dari Model Pasien RY1 dan DY1
Terhadap Inhibitor Amprenavir dengan Metode *Molecular Dynamic
Simulation***

SKRIPSI

M. KHARI SECARIO

0606068392

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FISIKA

DEPOK

MEI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**Analisis Aktivitas Mutasi HIV-1 Protease dari Model Pasien RY1 dan DY1
Terhadap Inhibitor Amprenavir dengan Metode *Molecular Dynamic
Simulation***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains

M. KHARI SECARIO

0606068392

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI FISIKA

DEPOK

MEI 2012

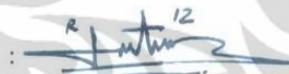
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Muh. Khari Secario

NPM : 0606068392

Tanda Tangan :



Tanggal : 1 Juni 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Muh. Khari Secario

NPM : 0606068392

Program Studi : S1 Reguler Fisika

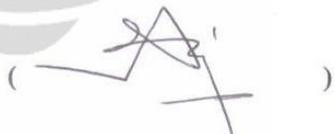
Judul Skripsi : Analisis Aktivitas Mutasi HIV-1 Protease dari Model Pasien RY1 dan DY1 Terhadap Inhibitor Amprenavir dengan Metode *Molecular Dynamic Simulation*

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Reguler Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. rer. nat. Rosari Saleh ()

Penguji : Dr. rer. nat. Musaddiq Musbach ()

Penguji : M. Aziz Majidi Ph.D. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 24 Mei 2012

UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan penulis ilmu dan pengetahuan untuk mempelajari studi yang penulis lakukan dalam skripsi ini. Serta atas kekuatan yang diberikan-NYA untuk menyelesaikan seluruh tulisan yang ada pada skripsi ini. *Shalawat* serta salam bagi Rasulullah Muhammad SAW yang memberikan penulis inspirasi untuk tetap bersabar dan berusaha dalam menghadapi setiap masalah dalam penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa kita hidup tidak bisa terlepas dari bantuan orang lain, begitu pula dengan skripsi ini. Meskipun skripsi ini dibuat oleh penulis untuk memenuhi syarat dalam mendapatkan gelar sarjana sains, namun penyusunannya tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Karena itu penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. rer. nat. Rosari Saleh sebagai pembimbing dan ibu bagi penulis. Begitu banyak hal yang penulis dapatkan dari beliau, pengetahuan, nasihat, dorongan, fasilitas, bahkan hingga omelannya yang semua itu beliau berikan untuk kebaikan penulis. Meskipun hingga saat akhir penulis belum bisa menjadi sosok yang beliau inginkan, namun semoga semangat untuk menjadi lebih baik dari beliau tidak akan pernah pupus.
2. Prof. Dr. Harkristuti Harkrisnowo yang banyak memberikan nasihat dan semangat untuk menuntaskan skripsi ini.
3. M. Aziz Majidi, Ph.D. dan Dr. Mussadiq Musbach sebagai penguji yang telah memberikan penulis kesempatan untuk berdiskusi sehingga penulis bisa mendapatkan masukan dan informasi yang berharga dalam studi ini.
4. Lusitra Munisa, M.Si yang telah bersedia membantu penulis dalam banyak hal hingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini. Juga atas nasihat beliau yang menyadarkan penulis atas banyak hal. Walaupun masih ada nasihat beliau yang harus penulis coba pahami lebih dalam.
5. Sigit Jaya Herlambang, S.Si sebagai kakak yang sangat berarti untuk penulis. Meskipun terkesan cuek, tapi beliau masih bersedia untuk

berdiskusi, memberikan bantuan, dan mengedit skripsi penulis dengan kesabarannya.

6. Cenmi Mulyanto, S.Si sebagai kakak dan rekan diskusi. Namun saat ini tidak penulis ketahui keberadaannya, semoga kita bisa bertemu lagi.
7. Sutarto, M.Si yang juga sebagai sosok kakak yang penting. Bantuan beliau dalam diskusi mengenai presentasi sidang penulis sangat menolong.
8. Zessinda Luthfa yang banyak mengajarkan penulis untuk banyak bersabar dalam menghadapi masalah-masalah dalam penulisan skripsi ini.
9. Rekan-rekan di Lab Fisika Lanjutan: Rizki Mahmudah, Iyan Subiyanto, S.Si, Paulus, Syahril Siregar, Saefudin Jaelani, S.Si, Septian Rahmat Adnan, Ahmad Fauzi, S.Si, dan Saipudin “mamen” yang banyak menghibur penulis disaat penulis membutuhkan semangat. Rasanya kebersamaan dengan kalian tidak ada habisnya.
10. Rekan-rekan di R103A: Dionisius Montja, Suhendro Purbo, Nadia Febiana, S.Si, Daniel Suhendro, S.Si, Jefferson Adrian, Haryo Sokoidanto, Santi Septiani, Nedy Farisia, Mergoramadayenty, S.Si, Dita Oktri, Dwi Cahaya, atas bantuan dan waktu kebersamaannya.
11. Keluarga penulis yang senantiasa mendorong penulis untuk mengambil pendidikan yang lebih tinggi.
12. Semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Mohon maaf tidak dapat disebutkan satu per satu.

Ucapan terimakasih saja rasanya tidak cukup untuk membalas semua kebaikan mereka, namun biarlah Allah SWT yang membalasnya dengan kebaikan. Skripsi ini pun tentunya masih memiliki banyak kekurangan. Penulis mengharapkan segala masukan untuk menjadikan studi ini lebih baik. Semoga skripsi ini dapat dilanjutkan dan berguna bagi banyak orang.

Penulis

Mei 2012

*“Life isn’t about fate, but about doing something that isn’t
your fate to begin with...”*

Khari Secario



HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Muh. Khari Secario

NPM : 0606068392

Tanda Tangan :



Tanggal : 1 Juni 2012

ABSTRAK

Nama : Muh. Khari Secario
Program Studi : Fisika
Judul : Analisis Aktivitas Mutasi HIV-1 Protease dari Model Pasien RY1 dan DY1 Terhadap Inhibitor Amprenavir dengan Metode Molecular Dynamic Simulation

Protease (PR) pada HIV berperan dalam proses maturasi virus agar dapat menginfeksi sel inang. Proses tersebut berlangsung dalam sisi aktif PR dengan memotong poliprotein virus. Banyaknya ragam mutasi residu PR membuat interaksi PR dengan obat yang diberikan dapat berbeda. Pasien dari Indonesia sendiri memiliki karakteristik galur tipe AE yang berbeda dengan galur B yang banyak ditemukan di negara-negara barat. Dua PR pasien dari Indonesia dengan kode RY1 (10 mutasi) dan DY1 (12 mutasi) disimulasikan dengan metode simulasi dinamika molekuler untuk meninjau interaksi antara kedua PR dengan obat amprenavir (APV). Berdasarkan hasil energinya, interaksi RY1-APV lebih kuat bila dibandingkan dengan DY1-APV. Hasil tersebut diperkuat dengan tinjauan struktural dan ikatan hidrogen terhadap residu mutasi yang dimiliki kedua pasien. Model pasien RY1 memiliki mutasi di residu ke-45 yang diketahui membantu mempertahankan interaksi PR-APV, sedangkan model pasien DY1 memiliki mutasi pada residu ke-10 yang diketahui mengurangi interaksinya dengan obat.

Kata Kunci : HIV, Protease, amprenavir, MDS, dinamika molekuler, mutasi, ikatan hidrogen

xiv + 100 halaman : 53 gambar, 5 tabel, 1 bagan

Daftar Pustaka : 90 (1983-2011)

ABSTRACT

Name : Muh. Khari Secario
Program Study : Physics
Title : Activity analysis of HIV-1 Protease Mutations of Patient Model RY1 and DY1 Against Amprenavir Inhibitor with Molecular Dynamic Simulation Method

Protease (PR) on the HIV virus plays a role in the maturation process in order to infect host cells. The process takes place in the active site PR by cutting viral polyprotein. Many kinds of mutated residues at PR makes interaction with the drug can vary. Patients from Indonesia itself has AE type strain that has different characteristic with B type strain which are found in western countries. Two PR patients from Indonesia with RY1 code (10 mutations) and DY1 code (12 mutations) is simulated by molecular dynamics simulation methods to evaluate the interaction between two PR with amprenavir (APV). Based on the energy, RY1-APV interaction is stronger when compared to DY1-APV. These results are supported by structural insights and hydrogen bonding to residue mutations that occur in both patients. RY1 patient model have mutations in 45th residue, that is known to help maintain the interaction of PR-APV. While the DY1 patient model have mutations in the 10th residue, that is known to reduce the interaction with the drug.

Key Words : HIV, Protease, amprenavir, MDS, molecular dynamics, mutation, hydrogen bond

xiv + 100 pages : 53 pictures, 5 tables, 1 chart

Bibliography : 90 (1983-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR BAGAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)	4
2.1. Struktur dan Siklus Hidup Virus	6
2.2. Terapi Antiretroviral.....	9
BAB 3 TINJAUAN PUSTAKA.....	11
3.1. HIV-1 Protease	11
3.2. Keadaan Terprotonasi.....	13
3.3. Pengaruh Mutasi pada Resistensi Inhibitor	14
3.4. Perbandingan Sekuen	16
3.5. Studi Interaksi.....	17
BAB 4 METODE.....	21
4.1. <i>Sequence Alignment</i>	22
4.2. Pemodelan Protein Berbasis <i>Template</i>	23
4.3. Medan Gaya CHARMm.....	24
4.4. <i>Implicit Solvent</i>	28
4.5. Minimisasi	29
4.5.1. <i>Steepest Descent</i>	30
4.5.2. <i>Conjugate Gradient</i>	31

4.6. Simulasi Dinamika Molekuler.....	33
4.7. Energi Interaksi PR-Inhibitor	34
BAB 5 HASIL DAN DISKUSI.....	35
5.1. Preparasi Struktur	35
5.1.1. <i>Sequence Alignment</i>	35
5.1.2. Mutasi Struktur	37
5.1.3. Analisis Mode Protonasi.....	40
5.2. Simulasi Dinamika Molekuler.....	41
5.2.1. <i>Heating</i>	43
5.2.2. <i>Equilibration</i>	46
5.2.3. <i>Production</i>	49
5.2.4. Pengaruh Struktural Model.....	54
5.3. Analisa Struktural dari Mutasi Residu	64
5.3.1. L10I.....	64
5.3.2. I13V	66
5.3.3. G16E.....	69
5.3.4. K20R.....	70
5.3.5. E35D & M36I.....	72
5.3.6. R41K.....	75
5.3.7. K45R.....	77
5.3.8. R57K.....	78
5.3.9. I62V	79
5.3.10. H69K.....	80
5.3.11. V77I.....	82
5.3.12. L89M	83
5.3.13. L97I.....	85
BAB 6 KESIMPULAN	91
DAFTAR PUSTAKA	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Peta persebaran penderita baru virus HIV pada 2011 (telah diolah kembali).....	1
Gambar 2.1	Data penderita HIV/AIDS berdasarkan kategori usia yang dikumpulkan oleh depkes	5
Gambar 2.2	Struktur Virus HIV (telah diolah kembali).....	7
Gambar 2.3	Daur hidup HIV (telah diolah kembali).....	8
Gambar 2.4	Struktur obat yang disetujui FDA pada 2006.....	10
Gambar 3.1	Poliprotein pada HIV.....	11
Gambar 3.2	Struktur HIV-1 PR (telah diolah kembali)	12
Gambar 3.3	Proses pemotongan poliprotein pada sisi aktif HIV-1 PR.....	13
Gambar 3.4	Daftar mutasi pada PR.....	15
Gambar 4.1	Bagan penelitian	21
Gambar 4.2	Metode untuk mendapatkan nilai matriks <i>sequence alignment</i>	22
Gambar 4.3	Peregangan ikatan antara dua atom	24
Gambar 4.4	Perubahan sudut yang dibentuk oleh tiga atom.....	25
Gambar 4.5	Sudut torsi yang dibentuk oleh empat atom	26
Gambar 4.6	Sudut simpangan keluar bidang.....	27
Gambar 4.7	Model <i>implicit solvent</i> pada molekul sistem	28
Gambar 4.8	Lintasan algoritma <i>steepest descent</i>	31
Gambar 4.9	Pencarian nilai minimum x pada <i>conjugate gradient</i>	32
Gambar 5.1	Hasil <i>sequence alignment</i> RY1 & DY1 terhadap WT.....	33
Gambar 5.2	Superposisi <i>backbone</i> dari PR WT dengan kedua pasien	39
Gambar 5.3	Sembilan mode protonasi pada sisi aktif PR	40
Gambar 5.4	Ikatan hidrogen yang terbentuk antara WT dengan APV	42
Gambar 5.5	Kurva temperatur pada proses <i>heating</i>	44
Gambar 5.6	Kurva energi kinetik pada proses <i>heating</i>	44
Gambar 5.7	Kurva energi potensial pada proses <i>heating</i>	45

Gambar 5.8	Kurva energi total pada proses <i>heating</i>	46
Gambar 5.9	Kurva temperatur pada proses <i>equilibration</i>	47
Gambar 5.10	Kurva energi kinetik pada proses <i>equilibration</i>	47
Gambar 5.11	Kurva energi potensial pada proses <i>equilibration</i>	48
Gambar 5.12	Kurva energi total pada proses <i>equilibration</i>	49
Gambar 5.13	Kurva temperatur pada proses <i>production</i>	50
Gambar 5.14	Kurva energi kinetik pada proses <i>production</i>	50
Gambar 5.15	Kurva energi potensial pada proses <i>production</i>	51
Gambar 5.16	Kurva energi total pada proses <i>production</i>	52
Gambar 5.17	Presentase okupansi ikatan hidrogen pada PR pasien	55
Gambar 5.18	Sisi aktif protease	56
Gambar 5.19	Nilai komponen energi ikatan hidrogen	57
Gambar 5.20	Struktur residu yang berikatan dengan APV	58
Gambar 5.21	Struktur APV yang berada pada sisi aktif	60
Gambar 5.22	Struktur residu ke-9 hingga 11 (DY1).....	66
Gambar 5.23	Struktur residu ke-12 hingga 14 (RY1 & DY1).....	67
Gambar 5.24	Struktur residu ke-15 hingga 17 (DY1).....	69
Gambar 5.25	Struktur residu ke-19 hingga 21 (RY1 & DY1).....	71
Gambar 5.26	Struktur residu ke-34 hingga 37 (RY1 & DY1).....	74
Gambar 5.27	Struktur residu ke-40 hingga 42 (RY1 & DY1).....	76
Gambar 5.28	Struktur residu ke-44 hingga 46 (RY1).....	77
Gambar 5.29	Struktur residu ke-56 hingga 58 (RY1).....	78
Gambar 5.30	Struktur residu ke-61 hingga 63 (DY1).....	79
Gambar 5.31	Struktur residu ke-68 hingga 70 (RY1 & DY1).....	81
Gambar 5.32	Struktur residu ke-76 hingga 78 (DY1).....	83
Gambar 5.33	Struktur residu ke-88 hingga 90 (RY1 & DY1).....	84
Gambar 5.34	Struktur residu ke-96 hingga 98 (RY1 & DY1).....	86
Gambar 5.35	Nilai pergeseran struktur residu mutasi dan tetangganya.....	88

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Daftar mutasi residu dari kedua PR pasien.....	36
Tabel 5.2	Jarak ikatan hidrogen yang terbentuk pada sisi aktif.....	41
Tabel 5.3	Data energi setiap mode protonasi WT dengan APV.....	42
Tabel 5.4	Data energi ketiga model pada akhir simulasi.....	53
Tabel 5.5	Data sifat residu mutasi pada model PR kedua pasien.....	65

DAFTAR BAGAN

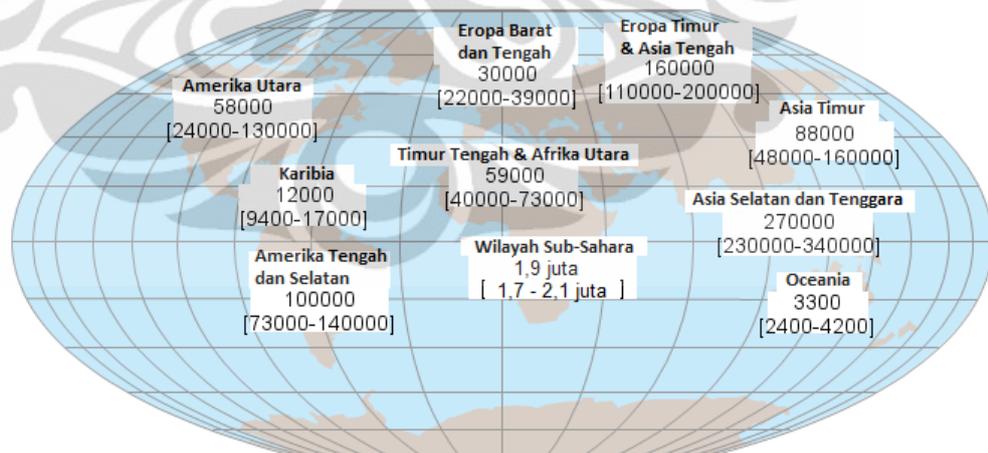
Bagan 5.1	Tahapan proses pemodelan PR pasien	38
-----------	------------------------------------------	----

BAB 1

PENDAHULUAN

Acquired Immune Deficiency Syndrom (AIDS) merupakan sebuah sindrom penurunan sistem kekebalan tubuh yang menyebabkan berbagai komplikasi penyakit. Hingga saat ini, belum diketahui cara terbaik mengobati sindrom yang disebabkan oleh *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) tersebut dan penularan HIV/AIDS cukup tinggi pada negara-negara kecil dan berkembang. Di Asia Tenggara sendiri terdapat sekitar 270.000 penderita baru virus HIV (gambar 1.1). Meskipun Perserikatan Bangsa-Bangsa (PBB) telah mencanangkan *zero infection* pada salah satu poin *Millenium Development*, rendahnya kesadaran masyarakat dan belum ditemukannya metode pengobatan yang efisien membuat HIV/AIDS masih sulit ditangani.

Perkiraan Jumlah Penderita Baru HIV (Dewasa dan Anak-Anak) | 2011



Total: 2,7 Juta (2,4-2,9 Juta)



Gambar 1.1 Peta persebaran penderita baru virus HIV pada 2011^[1] (telah diolah kembali)

Salah satu kesulitan menemukan metode pengobatan efisien untuk AIDS, disebabkan oleh sifat mutasi HIV yang bisa sangat berbeda antara satu pasien dengan pasien lainnya. Variasi mutasi muncul akibat rendahnya akurasi HIV ketika mereplikasikan diri^[2]. Mutasi pada HIV dapat membuat efektivitas obat berkurang. Kasus mutasi pada protease (PR) terbilang unik bila dibandingkan dengan bagian HIV lain seperti *reverse transcriptase* (RT) atau *integrase* (IT). Protease (PR) memiliki dua kategori mutasi: mayor dan minor, sedangkan RT dan IT hanya satu jenis mutasi saja^[3].

Salah satu metode yang umum dilakukan untuk mengobati pasien penderita HIV/AIDS, adalah terapi obat *antiretroviral* ataupun HAART. Terapi ARV menggunakan empat jenis obat berbeda. Masing-masing jenis obat menghalau secara spesifik bagian HIV tertentu. Satu jenis obat yang sering digunakan adalah inhibitor PR yang menghalau fungsi enzim PR dari HIV dalam proses maturasi virus HIV.

Protease berperan dalam proses maturasi virus dengan cara memotong poliprotein yang masuk ke dalam sisi aktif. Inhibitor PR yang diberikan akan menghambat proses maturasi dengan berikatan pada sisi aktif PR. Dengan cara ini poliprotein tidak dapat memasuki PR dan proses maturasi tidak terjadi. Pada beberapa studi, simulasi dilakukan untuk melihat interaksi antara PR dengan inhibitor yang diberikan.

Studi energetik melalui simulasi dilakukan untuk melihat kestabilan dari struktur PR ketika berikatan dengan inhibitor^[4]. Energi ikat pun diperhitungkan untuk melihat efektivitas obat terhadap HIV PR. Interaksi PR dengan inhibitor pada sisi aktif banyak dipengaruhi oleh ikatan hidrogen yang terbentuk pada asam amino PR^[5]. Simulasi struktural untuk melihat aktivitas dari PR juga telah dilakukan dalam beberapa studi. Hasil simulasi mampu memperlihatkan pergerakan residu PR sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam pembuatan inhibitor PR^[6].

Pada studi ini, dilakukan simulasi terhadap model PR dari dua pasien Indonesia dengan kode RY1 dan DY1. Kedua model PR memiliki mutasi yang

berbeda dan akan diinteraksikan dengan inhibitor PR amprenavir (APV). Struktur PR kedua pasien dibuat berdasarkan struktur model yang terdapat di *Protein Data Bank* (PDB). Simulasi pada studi ini dilakukan pada kedua struktur dengan menggunakan parameter-parameter yang sudah ditetapkan.

Simulasi dilakukan menggunakan metode dinamika molekuler/mechanika molekuler (MM). Metode ini dijalankan berdasarkan pendekatan aktivitas molekuler yang sebenarnya terjadi pada sel. Metode MM yang digunakan menggunakan basis *forcefield* (medan gaya) CHARMM. Medan gaya ini memodelkan struktur 3D dengan memasukkan parameter interaksi antar atom dan molekul sebagai fungsi posisi^[7, 8] (lihat bab 4).

Pada studi ini, dilakukan tinjauan terhadap energetik dan struktural dari PR RY1 dan DY1. Kestabilan struktur dibandingkan dari nilai energi strukturalnya. Energi ikat bebas kompleks PR-inhibitor dicocokkan dengan data ikatan hidrogen yang terbentuk pada sisi aktif PR. Kestabilan struktur kemudian juga dievaluasi dengan pergerakan residu-residu yang termutasi beserta dua residu tetangganya. Hasil dari simulasi yang dilakukan dapat dilihat lebih lengkap pada bab 5.

Dari studi ini akan didapat data mengenai interaksi kedua enzim PR dengan inhibitor APV. Kemudian dilakukan peninjauan terhadap hasil tersebut dan kaitannya terhadap pengaruh APV pada kedua pasien. Diharapkan studi ini dapat dilanjutkan dengan menggunakan beberapa inhibitor lain yang berbeda. Sehingga dapat diaplikasikan untuk pemilihan inhibitor untuk pasien HIV/AIDS. Serta dengan menggunakan data struktural dari mutasi PR dapat menjadi acuan dalam pengembangan obat ARV yang lebih efisien. Hasil studi ini akan dituliskan dalam enam bab. Bab 1 akan menjelaskan latar belakang dilakukannya studi ini. Pengenalan mengenai HIV dan AIDS akan dirangkum dalam bab 2. Beberapa studi yang telah dilakukan oleh peneliti lain diberikan secara singkat pada bab 3. Bab 4 akan menjelaskan metode-metode yang digunakan pada studi ini. Bab 5 dan bab 6 menjabarkan hasil serta analisa dan juga kesimpulan yang diperoleh dari studi ini.

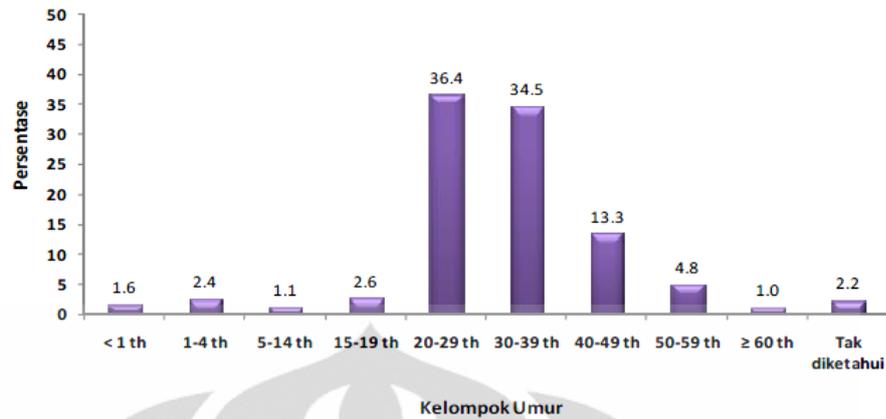
BAB 2

HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)

Umumnya orang salah mengira HIV dan AIDS sebagai dua hal yang sama, mengingat penulisannya yang sering digabung menjadi HIV/AIDS. Jika HIV adalah sejenis virus, maka AIDS adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi HIV. Singkatan HIV berasal dari *Human Immunodeficiency Virus*. Virus ini menyerang manusia dan mengakibatkan menurunnya sistem kekebalan tubuh (imunitas). Penurunan sistem kekebalan tubuh ini dikenal dengan nama *Acquired Immune Deficiency Syndrom* (AIDS). Seseorang dapat menderita AIDS melalui kontak dengan pengidap HIV dan terinfeksi. Penderita AIDS akan mengalami beragam infeksi dan terjangkit berbagai macam penyakit yang berbeda.

Keberadaan HIV/AIDS sebagai salah satu penyakit yang sudah mencapai tahap pandemik, sangat mengkhawatirkan masyarakat dunia. HIV/AIDS dapat menyerang pria, wanita, orang dewasa, usia muda, dari berbagai suku bangsa dan agama tanpa pandang bulu. Hingga saat ini terdapat lebih dari 7.500 orang meninggal setiap hari, lebih dari 300 orang meninggal setiap jam, dan terdapat 5 orang yang meninggal akibat AIDS setiap detik. Dari data yang dikumpulkan UNAIDS^[1, 9-10], HIV/AIDS merupakan salah satu penyebab kematian terbesar di negara berkembang. Meski begitu banyak kasus HIV/AIDS yang tercatat, penyakit ini ternyata masih relatif baru di dunia kesehatan.

Untuk menentukan seorang pasien terjangkit HIV/AIDS, metode yang umum dilakukan adalah dengan tes sampel darah, sel tubuh, ataupun cairan tubuh lain (umumnya air liur). Seseorang yang memiliki HIV di dalam tubuhnya, akan dikatakan positif HIV. Karena HIV membutuhkan proses yang sangat lama untuk mengubah sistem kekebalan tubuh hingga penderita mulai merasakan berbagai penyakit, status *HIV disease* digunakan. Status tersebut menjadi penanda waktu antara pasien tersebut ketika mulai diketahui terjangkit HIV hingga nantinya didiagnosis mengidap AIDS. Pada saat seseorang positif mengidap AIDS, maka ia sudah berada pada tahap akhir dari infeksi HIV.



Gambar 2.1 Data penderita HIV/AIDS berdasarkan kategori usia yang dikumpulkan oleh depkes^[11]

Seseorang akan divonis mengidap AIDS jika memiliki HIV positif dan salah satu dari beberapa penyakit yang termasuk ke dalam infeksi oportunistik. Tercatat ada sekitar 26 penyakit yang termasuk ke dalam akibat dari infeksi oportunistik, di antaranya adalah *pneumonia*, *kaposi sarcoma*, kanker rahim, dan tuberkulosis pada paru-paru. Selain itu, seorang penderita HIV juga dapat divonis mengidap AIDS jika memiliki HIV positif dan kekurangan salah satu jenis sel darah putih yang dikenal dengan *T-cells* (sel T). Sel T merupakan komponen penting dalam sistem kekebalan tubuh yang mampu meningkatkan antibodi, bakteri, virus, maupun kanker.

Berdasarkan data yang dikeluarkan oleh departemen kesehatan pada triwulan kedua tahun 2011^[11], terdapat 2001 kasus AIDS yang dilaporkan dari seluruh Indonesia. Dari data tersebut, sebanyak 1298 atau 64,9 % penderitanya adalah laki-laki, dan 35,1 % perempuan. Cara penularan utama berasal dari hubungan seksual (76,3 %) dan penggunaan jarum suntik (16,3 %). Mayoritas penderita merupakan usia muda produktif 20-29 tahun (36,4 %) dan 30-39 tahun (34,5 %).

Hingga saat ini, banyak sekali metode pengobatan yang dikembangkan untuk menangani pasien HIV/AIDS. Beberapa di antaranya adalah dengan mengembangkan obat *antiviral*, *chemotherapy*, hingga HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*). Obat yang dikembangkan untuk penderita HIV/AIDS hanya menghambat satu bagian siklus proses replikasi ataupun pematangan dari

HIV saja yang dikenal dengan inhibitor. Kerja obat yang cenderung spesifik membuat terapi pengobatan membutuhkan lebih dari satu macam obat, dan biasanya dapat menimbulkan efek samping seperti mual, gagal ginjal, perubahan bentuk tubuh, hingga halusinasi.

2.1. Struktur dan Siklus Hidup Virus

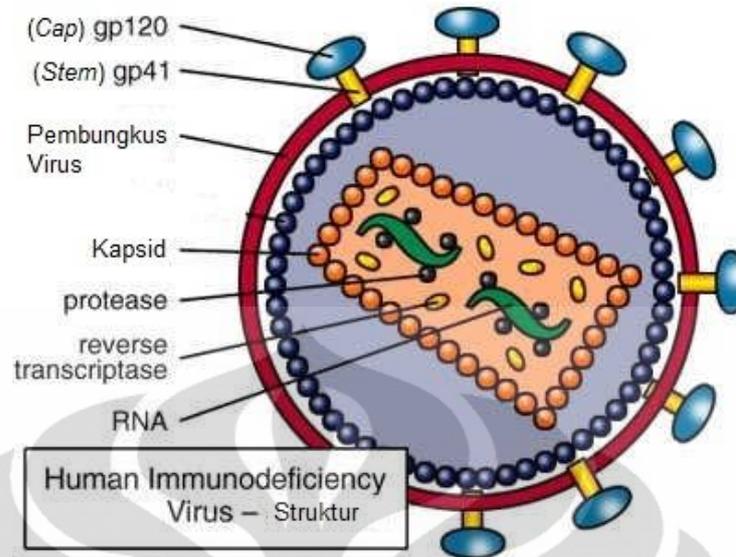
Virus memiliki struktur yang tergolong sederhana dan berukuran kecil. Umumnya, virus hanya tersusun dari rantai genetik (DNA/RNA) yang terselubung oleh protein. Rantai genetik yang berada pada HIV hanya berupa RNA saja, sehingga dikategorikan sebagai retrovirus.

Semua jenis retrovirus, termasuk HIV, tergolong ke dalam virus yang mudah bermutasi. Sehingga jika seseorang yang mulanya kebal oleh suatu virus, ia dapat terjangkit virus yang telah bermutasi. Mutasi terjadi akibat sifat replikasi rantai genetik yang dilakukan dengan tingkat akurasi rendah^[2]. Karena sifat mutasi inilah, HIV menjadi salah satu virus yang sulit ditangani.

Berdasarkan sifat infeksinya HIV termasuk ke dalam lentivirus (lenti berarti lambat). Lentivirus merupakan retrovirus yang memiliki jeda waktu yang cukup lama dari pertama kali seseorang terinfeksi virus hingga akhirnya menunjukkan gejala penyakit akutnya^[12-13]. Umumnya, pasien HIV akan mengalami sindrom pertamanya setelah 20-30 tahun sejak terinfeksi.

Ukuran HIV sendiri cukup kecil bila dibandingkan dengan sel pada umumnya. Jika rata-rata ukuran sel manusia adalah 1/10 mm, ukuran HIV hanya sebesar 1/10000 mm. Struktur dari HIV dapat dilihat pada gambar 2.2. Bagian terluar merupakan pembungkus virus yang tersusun atas membran lipid. Pembungkus virus ini didapatkan oleh HIV dari sel inangnya. Ketika proses replikasi virus berakhir, HIV keluar dengan memecah sel inang dan membungkus dirinya dengan membran lipid sel inang tersebut^[14].

Bagian duri virus yang muncul dari pembungkus virus berperan sebagai reseptor untuk menempel pada sel inang. Duri ini akan menancap di sel inang dan menyatukannya dengan HIV. Dalam satu HIV terdapat sekitar 72 duri yang



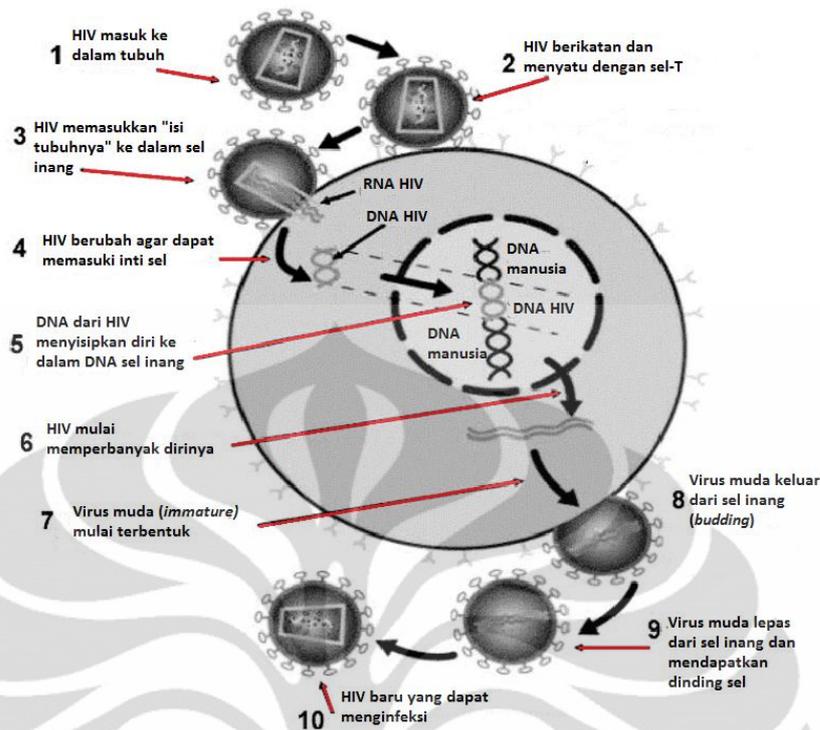
Gambar 2.2 Struktur Virus HIV^[15] (telah diolah kembali)

memiliki dua bagian: *stem* dan *cap*. Setiap *stem* tersusun atas tiga glikoprotein 41 (gp41) dan *cap* tersusun atas tiga glikoprotein 120 (gp120).

Kapsid atau selubung merupakan bagian dalam dari pembungkus virus yang ditemukan pada HIV dewasa. Di dalamnya terdapat dua rantai RNA terpisah yang berisi informasi genetik HIV. Untuk dapat masuk ke dalam inti sel inang dibutuhkan *reverse transcriptase* yang juga terdapat dalam kapsid^[16]. *Reverse transcriptase* (RT) ini berperan dalam menyusun RNA yang merupakan rantai tunggal menjadi DNA^[17].

Virus HIV masuk ke dalam tubuh via cairan tubuh (darah, cairan kemaluan, cairan sendi, dan sejenisnya). Cairan tubuh yang mengandung HIV dapat masuk ke dalam tubuh melalui beberapa cara di antaranya:

- Berhubungan seksual dengan penderita HIV
- Tertusuk atau tergores dengan jarum atau benda tajam lainnya yang memiliki bekas darah penderita HIV
- Menerima transfusi darah atau donor organ dari penderita HIV
- Wanita penderita HIV dapat menularkannya ke anak dalam kandungan selama kehamilan, proses melahirkan, atau saat menyusui



Gambar 2.3 Daur hidup dari HIV^[18] (telah diolah kembali)

Meskipun menyerang sel inang, target utama dari HIV adalah sel-T (Gambar 2.3). Pada sel-T terdapat bagian yang disebut *cluster designation 4* (CD4) dengan sel-T penolong (CD4+) di permukaannya. Sel-T merupakan sejenis limfosit (sel darah putih) yang membantu menjaga kekebalan tubuh dengan cara menyerang sel-sel asing yang masuk ke dalam tubuh. Untuk berikatan dengan sel-T, virus membentuk ikatan kimia dengan CD4 melalui gp120 yang terdapat pada duri HIV.

Setelah berhasil masuk ke dalam sel inang, HIV memasukkan RNA-nya ke dalam inti sel. Data genetik virus yang berupa RNA akan diubah menjadi DNA dengan bantuan RT. Selanjutnya, DNA ini akan dipecah kembali menjadi RNA dan menyusup ke dalam DNA sel inang dengan bantuan enzim *integrase*. Dalam DNA yang dibentuk oleh RT terdapat semacam kode instruksi dari HIV yang mengambil alih sel-T dan mulai memperbanyak diri^[19-20]. Tahap pertama yang dilakukan dalam proses replikasi adalah transkripsi. Pada saat transkripsi, enzim RNA polimerase memecah DNA buatan RT menjadi dua helai RNA. Satu helai RNA digunakan untuk membuat RNA baru yang disebut *messenger RNA*

(mRNA). Selama proses pembacaan RNA dilakukan, sitoplasma dari sel inang menggunakan mRNA sebagai *template* untuk membuat protein dan enzim yang nantinya digunakan untuk membuat HIV baru^[21].

Hasil replikasi yang berupa RNA, protein dan enzim dikumpulkan di dalam sel. Ketiganya kemudian menempel pada membran sel inang dan bersiap keluar dengan mengambil protein pada membran yang akan digunakan sebagai pembungkus virus. Virus HIV yang keluar ini belum dapat menginfeksi sel lain dan harus melalui proses pematangan/maturasi yang dibantu oleh enzim protease yang memotong rantai protein dan enzim pada inti HIV.

2.2. Terapi Antiretroviral

Terapi antiretroviral (ARV) (*Highly Active Antiretroviral Therapy/HAART*) merupakan terapi penyembuhan HIV/AIDS menggunakan obat ARV. Biasanya terapi ini menggunakan tiga obat ARV atau lebih. Meskipun terapi ARV dapat membantu menunjang kesehatan dari penderita HIV/AIDS, namun tidak dapat secara tuntas menyembuhkan penyakit ini. Tujuan utama dari terapi ARV^[22]:

- Mengurangi kematian akibat HIV
- Memperbaiki kualitas hidup
- Mengembalikan fungsi kekebalan tubuh
- Menekan aktivitas partikel viral

Dalam penerapan terapi ARV terdapat empat macam obat ARV:

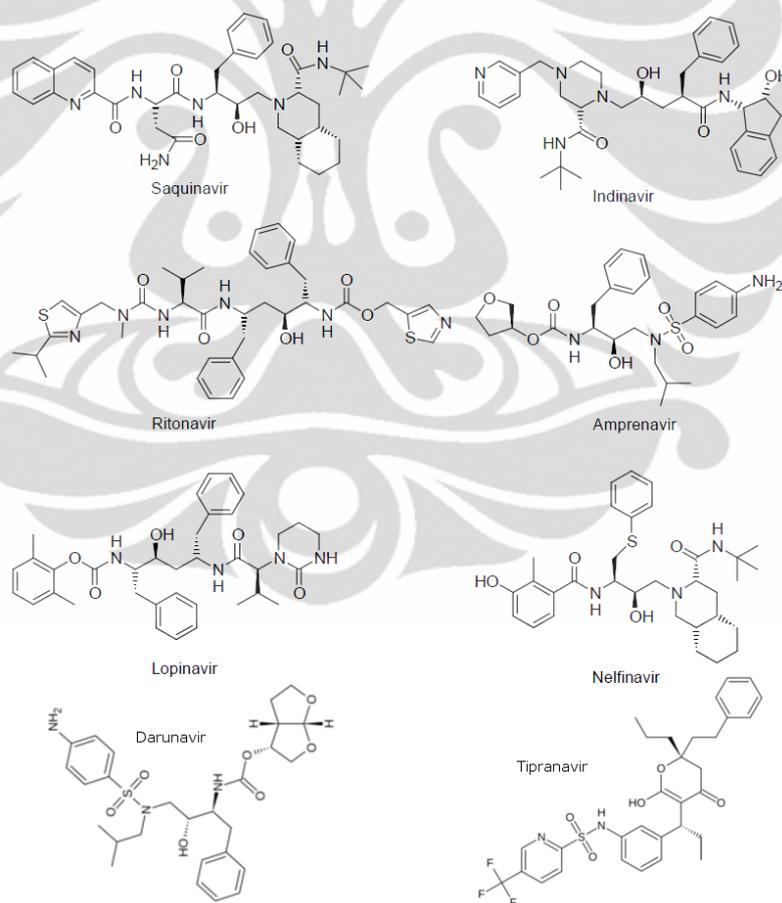
- *Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NRTI)
- *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor* (NNRTI)
- *Protease Inhibitor* (PI)
- *Fusion Inhibitor*

Keempat jenis ARV tersebut berdasarkan jenis obat yang telah disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika^[23].

Peran enzim RT sebagai penduplikasi HIV digantikan oleh NRTI. Ketika akan mengubah RNA menjadi DNA, NRTI ini akan menghasilkan DNA yang

tidak sempurna. Sedangkan NNRTI, akan menghalau aktivitas RT secara langsung tanpa menggantikan fungsi RT. Jenis PI ditujukan untuk dapat berikatan dengan protease. Ikatan antara PI dan PR akan mencegah sisi aktif PR memotong poliprotein dalam proses maturasi. Hal tersebut dapat dilakukan dengan cara menempatkan inhibitor pada sisi aktif HIV.

Pada tahun 2002 terdapat enam obat PI yang disetujui secara klinis oleh FDA^[24] (gambar 5.4): saquinavir (SQV), indinavir (IDV), ritonavir (RTV), amprenavir (APV), lopinavir (LPV), dan nelvinavir (NLV). Pada perkembangannya, PI RTV digunakan sebagai penguat inhibitor lainnya dalam terapi ARV^[25]. Di tahun 2006 darunavir (DRV) dan tipranavir (TPV) menambah daftar PI yang disetujui secara klinis.



Gambar 2.4 Struktur obat yang disetujui FDA pada 2006. Enam obat pertama^[24] tercatat sudah tersedia sejak 2002.

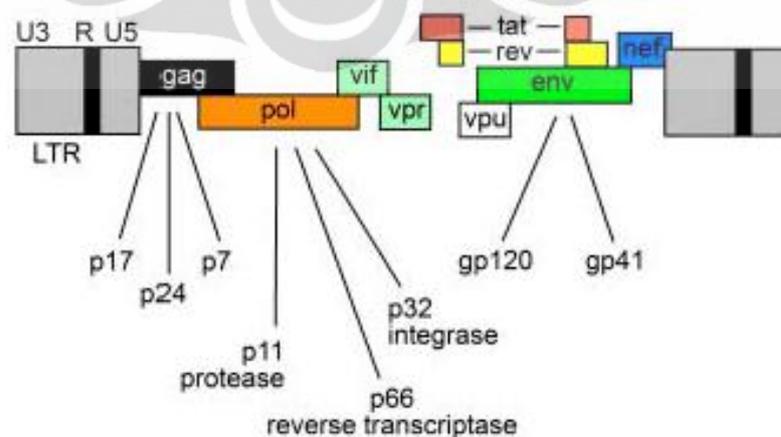
BAB 3

TINJAUAN PUSTAKA

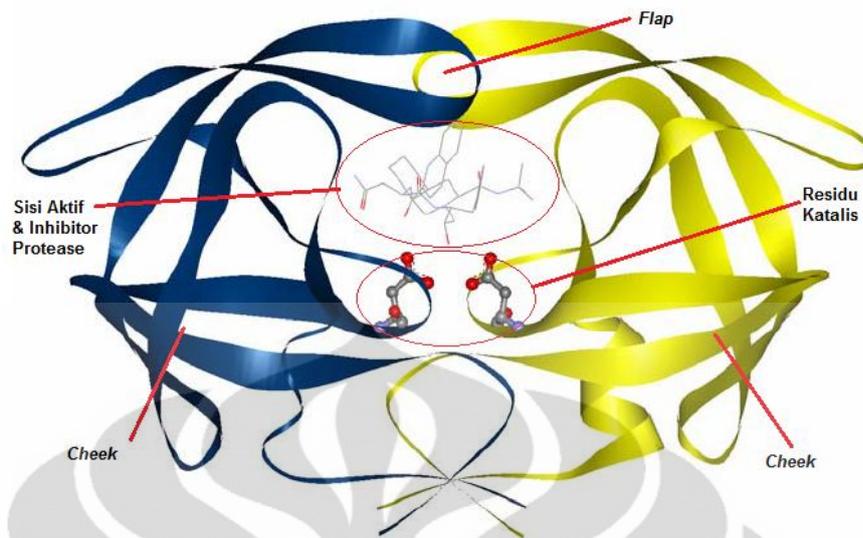
3.1.HIV-1 Protease

Pada studi ini HIV-1 Protease (PR) digunakan untuk mengetahui aktivitas dari PR dan mutasinya terhadap obat *antiretroviral* (ARV) amprenavir (APV). Protease berperan dalam penyebaran infeksi HIV. Data RNA virus yang berupa rantai poliprotein gag-pol (gambar 3.1) terlebih dulu harus “dipotong” oleh PR sehingga menjadi protein aktif. Proses ini dikenal dengan nama maturasi.

Struktur protease sendiri merupakan dua rantai identik (homodimer) yang masing-masing tersusun oleh 99 rantai asam amino^[27] (gambar 3.2). Bagian atas struktur dikenal dengan sebutan *flap*. *Flap* bersifat fleksibel dan akan terbuka ketika protease tidak berikatan. Saat protease berikatan dengan inhibitor atau substrat lain, *flap* akan menutup^[24]. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara *flap* dengan inhibitor akan mencegah *flap* terbuka sehingga poliprotein tidak dapat masuk. Karena interaksinya ini, *flap* menjadi salah satu target daerah interaksi antara protease dengan inhibitor^[28]. Pada bagian tengah struktur terdapat rongga



Gambar 3.1 Poliprotein pada HIV^[26]

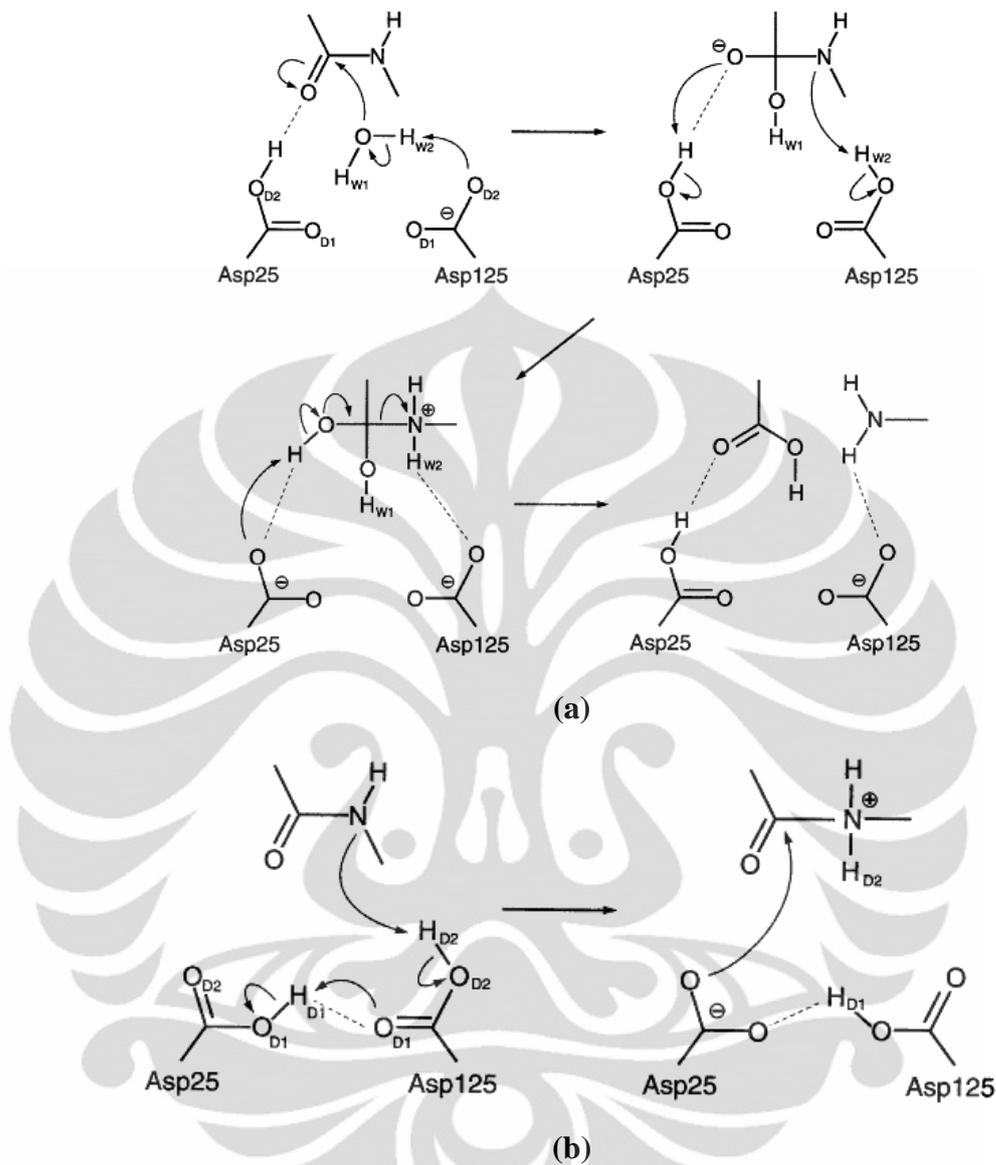


Gambar 3.2 Struktur HIV-1 PR yang menampilkan residu katalis dan inhibitor protease pada sisi aktif^[27] (telah diolah kembali)

yang merupakan sisi aktifnya. Pada sisi aktif ini, inhibitor protease menghambat proses pemotongan poliprotein oleh protease. Daerah sisi aktif memiliki dua residu katalis yang merupakan asam amino aspartat pada urutan residu ke-25 (asp25 dan asp25'). Residu ini berperan dalam proses pemotongan poliprotein gag-pol.

Beberapa proses pemotongan gag-pol telah diajukan dalam beberapa studi. Sebagian besar studi menggunakan pendekatan *General-Acid/General-Base* (GA/GB). Tahap pemotongan gag-pol yang cukup lengkap diberikan pada studi Trylska dkk.^[29] dengan menggunakan pendekatan gabungan kuantum-klasik. Hasil tersebut diperoleh dari simulasi *Molecular Dynamics/Average Valence Bonds* (MD/AVB)^[30-31] yang dikembangkannya. Trylska dkk mengajukan dua model: *nucleophilic-attack by a lytic water molecule* dan *direct nucleophilic-attack*.

Pada *nucleophilic-attack by a lytic water molecule* pemotongan dilakukan dengan bantuan molekul air yang berada di antara protease dengan inhibitor pada sisi aktif (gambar 3.3a). Sedangkan model *direct nucleophilic-attack* menggunakan pemotongan langsung tanpa perantara molekul air (gambar 3.3b).



Gambar 3.3 Proses pemotongan dengan pendekatan^[29] (a) *nucleophilic-attack by a lytic water molecule* dan (b) *direct nucleophilic-attack*

Pada studi ini digunakan pendekatan *direct nucleophilic-attack* karena molekul air tidak diikutsertakan dalam simulasi. Kedua model pemotongan ini menggunakan bantuan proton (berupa atom hidrogen) pada residu katalis.

3.2.Keadaan Terprotonasi

Keberadaan proton pada residu katalis diketahui berperan pada pemotongan poliprotein seperti yang telah dijelaskan pada subbab sebelumnya. Namun, pada

interaksi dengan inhibitor protease, proses pemotongan tidak terjadi. Sebaliknya, keberadaan proton justru membantu membentuk ikatan antara protease dengan inhibitor. Studi mengenai keberadaan proton ini bermula dari atom hidrogen yang hilang akibat mutasi^[32-35].

Keberadaan model protonasi dalam simulasi diperlukan untuk melihat aktivitas dari protease terhadap inhibitor. Pada gambar 3.2, residu katalis asp25 dan asp25' masing-masing memiliki dua atom oksigen yang terbuka ke arah sisi aktif. Karena sifat resonansi ikatan pada kedua atom tersebut, ada dua kemungkinan posisi atom hidrogen di residu katalis. Posisi atom hidrogen ini dapat berbeda tergantung pada inhibitor protease yang digunakan. Dalam studinya, Amit dkk.^[5] mengatakan bahwa mode protonasi ini dapat ditentukan dengan bantuan ikatan hidrogen pada sisi aktif. Dalam menentukan mode protonasi biasa digunakan pendekatan simulasi. Hal ini disebabkan oleh perhitungan pKa dengan pendekatan eksperimen tidak dapat menentukan posisi atom hidrogen pada mode protonasi^[29].

Studi yang dilakukan oleh Kitiyaporn dkk. memberikan prediksi keadaan terprotonasi antara protease dengan enam inhibitor yang berbeda^[36]. Pada studinya digunakan inhibitor APV, LPV (lopinavir), RTV (ritonavir), SQV (saquinavir), IDV (indinavir), dan NLV (nelfinavir). Keenam model PR-inhibitor tersebut disimulasikan hingga total waktu 3 ns. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa monoprotanasi pada asam amino asp25 dimiliki oleh PR dengan inhibitor SQV, LPV, dan IDV. Sedangkan inhibitor APV, NFV, dan RTV menunjukkan keadaan monoprotanasi pada asp25'. Semua prediksi mode protonasi merupakan monoprotanasi. Prediksi ini berdasarkan asumsi bahwa diprotanasi (asp25 dan asp25') memiliki energi total yang cukup tinggi sehingga membutuhkan energi hingga orde 10 kcal/mol dari monoprotanasi. Keadaan terprotonasi pada studi ini mengacu pada hasil prediksi Kitiyaporn dkk. untuk PR dengan inhibitor APV.

3.3. Pengaruh Mutasi pada Resistensi Inhibitor

Salah satu sifat HIV yang menyulitkan pengobatan adalah mutasi yang terjadi. Dalam protease sendiri mutasi dapat terjadi pada residu asam aminonya.

Atazanavir +/- ritonavir	L 10 I F V C	G 16 E R M I T V	K 20 R I	L 24 I	V 32 I F	L 33 I	E 34 Q F	M 36 I L V	M 46 I L	G 48 V	I 50 L	F 53 L Y	I 54 L V M T A	D 60 E	I 62 V	I 64 L M V	A 71 V C S T A	G 73 A	V 82 A T F I	I 84 V	I 85 V	N 88 S	L 90 M	I 93 L M
Darunavir/ ritonavir	V 11 I				V 32 I F	L 33			I 47 V		I 50 V	I 54 M L					T 74 P V	L 76		I 84 V		L 89 V		
Fosamprenavir/ ritonavir	L 10 F I R V				V 32 I			M 46 I L	I 47 V		I 50 V	I 54 L V M					G 73 S	L 76 V	V 82 A F S T	I 84 V		L 90 M		
Indinavir/ ritonavir	L 10 I R V	K 20 M R	L 24 I		V 32 I	M 36 I		M 46 I L			I 54 V					A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 77 I A F T	I 84 V		L 90 M		
Lopinavir/ ritonavir	L 10 F I R V	K 20 M R	L 24 I		V 32 I F	L 33		M 46 I L	I 47 V		I 50 V	F 53 L V L A M T S	I 54			L 63 P	A 71 V T	G 73 S	L 76 V	V 82 A F T S	I 84 V	L 90 M		
Nelfinavir	L 10 F I			D 30 N		M 36 I		M 46 I L									A 71 V T	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	N 88 D	L 90 M S		
Saquinavir/ ritonavir	L 10 I R V		L 24 I						G 48 V		I 54 V	I 62 V				A 71 V T	G 73 S	V 77 I	V 82 A F T S	I 84 V	L 90 M			
Tipranavir/ ritonavir	L 10 V				L 33 F	M 36 I L V		K 43 T	M 46 L	I 47 V		I 54 A M V	Q 58 E		H 69 K R	T 74 P			V 82 L T	N 83 D	I 84 V	L 89 I M V		

Gambar 3.4 Daftar mutasi pada PR yang memiliki pengaruh terhadap interaksinya dengan inhibitor. Ritonavir muncul sebagai penguat inhibitor^[3]

Mutasi tersebut dapat mengakibatkan berubahnya struktur sekunder pada protease ataupun berkurangnya ikatan yang terbentuk antara protease dan inhibitor. Soo-Yon dkk. memberikan susunan residu asam amino dari HIV-1 PR beserta beberapa mutasi yang diketahui^[37]. Di antara mutasi-mutasi tersebut ada yang muncul akibat kemoterapi dengan obat ARV PR. Mutasi L23I diketahui mengurangi suseptibilitas terhadap NLV^[38]. Peningkatan jumlah energi yang dibutuhkan oleh PR untuk berikatan dengan inhibitor juga menjadi akibat adanya mutasi C95F. Lebih spesifik lagi, suseptibilitas terhadap LPV^[39-41] akan berkurang akibat mutasi E34Q, K43T, G48M, I54S, Q58E, T74S, L76V, dan L89I. Pada studi lanjutannya di tahun 2005, Soo-Yon dkk.^[42] mencatat ada dua mutasi yang tidak terkait dengan pengaruh kemoterapi: L33V dan V82I.

Mutasi pada protease dibagi menjadi mutasi mayor dan mutasi minor^[25]. Mutasi mayor membuat ikatan antara protease dengan inhibitor menjadi berkurang. Ini disebabkan karena mutasi mayor mengubah asam amino yang memiliki kontak langsung dengan inhibitor. Sedangkan mutasi minor terjadi pada struktur protease yang tidak memiliki kontak langsung dengan obat. Jika mutasi minor hanya muncul sendiri, tidak memiliki pengaruh yang cukup signifikan terhadap interaksi protease dengan inhibitor. Informasi mengenai mutasi residu terhadap inhibitor masih berkembang hingga saat ini. Untuk daftar mutasi terbaru (2010)^[3] terkait resistensinya terhadap obat dapat dilihat pada gambar 3.4.

3.4. Perbandingan Sekuen

Data asam amino yang diperoleh umumnya hanya memberikan informasi residu mana saja yang bermutasi. Untuk mengetahui tingkat suseptibilitas PR terhadap suatu inhibitor tertentu, diperlukan algoritma lain yang akan mencocokkannya dengan data mutasi. Studi dari Maurizio dkk.^[43] mencoba untuk membandingkan tiga algoritma ini: Stanford HIV Database (HIVdb), Visible Genetics/Bayer Diagnostics Guidelines (VGI), dan AntiRetroScans (ARS).

Studi tersebut menggunakan sampel sebanyak 365 sekuen PR dan 433 sekuen RT. Data tersebut diuji pada masing-masing algoritma. Maurizio dkk. mendapati persentase kesalahan dari tiap algoritma bernilai relatif terhadap nilai saturasi acuan yang digunakan. Ia menambahkan untuk hasil yang diperoleh dari jangkauan data sebesar 0,2 kali lipat lebih tinggi atau lebih rendah dari nilai saturasinya, maka urutan kesalahan dari yang terendah dimiliki oleh ARS, VGI, dan HIVdb.

Namun ia mengingatkan bahwa hasil ini tidak dapat dijadikan acuan. Hasil VGI dan HIVdb pun tidak dapat digunakan untuk memperkuat hasil yang diperoleh ARS. Semua analisa genotip harus dievaluasi lebih lanjut untuk memprediksi respons virologi terhadap penanganan secara *in vivo*.

3.5. Studi Interaksi

Interaksi antara PR dengan inhibitor telah banyak diteliti baik secara eksperimen maupun simulasi. Dua eksperimen mengenai interaksi PR-inhibitor dilakukan oleh Ermolieff dkk.^[44] dan Hiroyasu dkk.^[45] Ermolieff dkk. mencoba mengamati sifat kinetik dari PR dengan empat inhibitor: Ro 31-8959^[46] (SQV), L-735,524^[47] (IDV), ABT-538^[48] (RTV), dan NLV^[49]. Resistensi *in vivo* antara PR-SQV dipilih pada studi mereka karena hanya menghasilkan tiga mutasi resisten: G48V, L90M, dan mutasi ganda G48V/L90M. Dari eksperimen ini data yang diperoleh adalah nilai konstanta inhibisi K_{iapp} dan K_i . Dari nilai konstanta inhibisi tersebut, Ermolieff dkk. mencoba menghubungkannya dengan tingkat resistensi mutan dibandingkan dengan WT.

Metode simulasi menjadi alternatif karena biayanya yang relatif lebih rendah. Dasar dari metode simulasi yang sering digunakan adalah dengan menggunakan medan gaya CHARMM yang dijelaskan dengan detail oleh Brooks dkk.^[50] Metode ini menggunakan energi sistem sebagai fungsi posisi atom PR, termasuk juga model air di sekelilingnya. Sistem yang disimulasikan dapat menggunakan *explicit water* (model air riil) ataupun *implicit water* (model yang hanya mendefinisikan area yang dapat dimasuki oleh molekul air). Penghitungan volum molekul juga diperoleh dengan pendekatan *Generalized Born Molecular Volume* (GBMV)^[51]. Brooks dkk. juga menjabarkan tentang MDS dengan pendekatan klasik. Pendekatan klasik ini banyak digunakan untuk evaluasi struktural akibat pengaruh termodinamika dan juga sifat dinamik dari sistem molekul^[52]. Untuk mengurangi operasi numerik dari simulasi, digunakan algoritma baku *Leap-Frog* karena lebih sederhana dan memberikan hasil dengan presisi tinggi^[53]. Mengingat model PR terdiri atas banyak molekul, penggunaan *SHAKE constraint* diperlukan untuk memperbaiki posisi relatif dari muatan yang tidak terlokalisasi pada atom, termasuk model-model air yang biasa digunakan^[54-55].

Studi interaksi antara protease termutasi (mutan) dengan inhibitor sering dilakukan dengan menggunakan tinjauan interaksi (ikatan hidrogen), energetik (*Binding Free Energy*) atau struktural (RMSD). Tinjauan interaksi jarang dibahas secara khusus seperti yang dilakukan oleh Amit Das dkk.^[5] mengenai *Low Barrier Hydrogen Bond* (LBHB) pada daerah sisi aktif. Ikatan hidrogen yang memiliki

jarak lebih pendek dari 2,5 Å dikategorikan sebagai LBHB. Studinya lebih lanjut juga menunjukkan bahwa residu pada flap dan residu katalis berperan besar dalam interaksi. Selain itu, ikatan hidrogen yang terbentuk pada sisi aktif membantu menentukan keadaan protonasi dari asp25/asp25'.

Meskipun MDS dapat memberikan data dinamika ikatan hidrogen yang terbentuk antara protease dengan inhibitor, namun MDS metode klasik tidak mampu menjawab secara detail sifat-sifatnya. Hal ini karena MDS tidak mampu menentukan tipe ikatan hidrogen. Mekanisme MD/*Average Valence Bonds* (AVB) yang dilakukan oleh Trylska dkk.^[29] mampu memberikan informasi mengenai peran ikatan hidrogen dan proses pemotongan poliprotein oleh protease. Pada studinya tersebut, ia juga mengamati adanya LBHB pada molekul tanpa air. Ketika inhibitor dan substrat berikatan (khususnya pada keadaan tanpa air) daerah di sekitar asp25/asp25' tidak dapat dimasuki oleh molekul air.

Studi tinjauan interaksi dari PR yang cukup lengkap diberikan oleh Alcaro dkk. dengan menggunakan empat inhibitor protease berbeda^[4] (Lopinavir, Amprenavir, Saquinavir, Atazanavir). Studi ini berfokus pada 4 mutasi: M46I, L76V, V82A, dan I84V. Mutasi M46I, V82A, dan I84V diketahui memberikan tingkat resistensi yang berbeda terhadap inhibitor PR yang saat ini tersedia. Sedangkan L76V berkaitan dengan resistensi terhadap LPV^[56] dan DRV^[57]. Pada studinya, Alcaro menemukan ikatan hidrogen yang terbentuk pada residu ke-27 dan ke-29 dengan LPV; residu ke-25, ke-29, dan ke-30 dengan APV; residu ke-25, ke-29, ke-48 dengan SQV; dan residu ke-27, ke-29, dan ke-48 dengan ATV.

Dalam beberapa studi yang berhasil dikumpulkan lebih banyak memberikan tinjauan secara energetik dengan tinjauan interaksi sebagai pendukung argumentasi. Studi yang dilakukan Kitiyaporn dkk^[6]. memperlihatkan bahwa energi dari mutan G48V bernilai lebih positif 3,5 kcal/mol dari WT. Nilai energi tersebut memiliki kecocokan terhadap perubahan K_i pada range nilai yang sama yang ditunjukkan oleh studi Ermolieff dkk. Akibatnya sensitivitas mutan terhadap SQV berkurang 13,5 kali lipat dari WT^[44].

Studi lain yang membahas nilai energetik struktur cukup detail berasal dari Chen dkk. Dengan berfokus pada sisi aktif untuk menunjukkan interaksi utamanya, Chen dkk. memberikan data energi ikat bebas (ΔG) dari struktur WT dan dua struktur mutan lain. Bahkan pada studi yang sama, ia memberikan data yang lebih lengkap dari komponen energi ikat bebas. Data tersebut diberikan untuk setiap residu PR yang berinteraksi dengan inhibitor. Beberapa peneliti seperti Tuomo dkk.^[58] bahkan mencoba melihat interaksi antara PR dengan inhibitor alami seperti substrat gula reaktif (endo-1,4-XylanaseII).

Selain pengamatan energetik, dinamika struktur sepanjang simulasi juga tak luput dari bahan studi. Seperti yang dilakukan oleh Ekachai dkk.^[59] yang melihat struktur dari PR kompleks dengan enam inhibitor (APV, IDV, LPV, NLV, RTV, dan SQV). Dalam studinya diamati fleksibilitas dari struktur setelah dilakukan proses *docking*. Hasilnya menunjukkan bahwa residu val82 dan val82' membantu menstabilkan ikatan yang terbentuk dengan residu hidrofobik P1 dan P1' dari inhibitor. Bahkan substitusi rantai samping residu ke-82 berupa $-\text{CH}_3$ yang dimiliki valin menjadi $-\text{OH}$ yang dimiliki oleh threonin mampu meningkatkan sensitivitas dari mutan ke semua obat. Hanya saja kemunculan mutasi V82T tidak diiringi dengan mutasi pada residu ke-84. Hal tersebut dapat menyebabkan kenaikan nilai K_i pada semua obat. Efek paling jelas terlihat pada interaksinya yang semakin melemah dengan indinavir, baik kemunculannya disertai dengan mutasi lain atau tidak. Sedangkan apabila tidak bermutasi, residu ke-82 dan ke-84 dapat menyebabkan perubahan konformasi struktur pada daerah sisi aktif dan mengakibatkan melemahnya interaksi van der Waals dengan inhibitor. Selain itu ia mencatat mutasi yang sangat mempengaruhi interaksinya dengan APV: I50V, I84V/L90M, dan I54V/V82A/I84V/L90M. Beberapa mutasi juga diketahui tidak mempengaruhi interaksinya dengan APV: D30N, I50L, N88D, L90M, D30N/N88D, I54V/L90M, dan I54M/L90M.

Kebanyakan studi berfokus pada daerah sisi aktif yang berdekatan dengan residu katalitik. Namun Perryman dkk.^[28] mencoba untuk melihat peluang interaksi pada daerah *flap*. Daerah *flap* memegang peranan dalam interaksi inhibitor dengan residu katalitik^[60]. Dari hasil simulasi, Piana dkk.^[61]

menunjukkan bahwa pembukaan *flap* akan mengizinkan substrat memasuki sisi aktif. Fungsi katalitik enzim bekerja dengan memotong substrat dalam proses pematangan virus. Tahap terakhir, *flap* akan membuka kembali dan melepaskan produk yang dihasilkan selama proses katalisasi. Mutasi pada daerah *flap* diyakini dapat mengganggu siklus katalisasi PR ini. Piana dkk. juga menegaskan hal ini dengan mutasi M46I yang menstabilkan *flap* dalam kondisi tertutup. Pengaruh mutasi tersebut sebenarnya sudah diutarakan pada studi Collins dkk.^[62] yang menunjukkan bahwa fleksibilitas *flap* menjadi berkurang karenanya. Ditambahkan oleh studi Mahalingam dkk.^[63-64] bahwa mobilitas *flap* menjadi berkurang akibat mutasi K45I karena pengurangan nilai B-factor.

Studi Perryman dkk. menunjukkan bahwa ketika PR tidak berikatan dengan inhibitor, konformasi *flap* yang muncul cenderung semi-terbuka. *Flap* baru akan terbuka apabila terjadi pemuntiran pada residu katalitik: asp25/asp25'. Pada mutasi ganda V82F/I84V yang disimulasikan, Perryman dkk. mendapati jika semakin sering puntiran terjadi pada residu katalitik, maka pembukaan *flap* akan semakin terlihat. Hal ini membuka jalan untuk penggunaan daerah *flap* sebagai daerah target interaksi dengan inhibitor untuk mencegah pembukaan *flap*.

Hasil studi mutan terhadap inhibitor juga dapat digunakan sebagai dasar *drug design* khususnya dalam pengembangan berbasis inhibitor yang telah ada. Dari seluruh studi yang telah dilakukan, interaksi paling dominan yang ditemukan antara protease dan inhibitor adalah berupa ikatan hidrogen. Dari studi antara PR dengan inhibitor MVT01 ditemukan 12 ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen yang muncul diperkirakan berkontribusi sebesar 56-68% dari total interaksi antara PR-inhibitor^[65]. Melihat data tersebut, Gutschina dkk. menyarankan untuk membuat inhibitor yang dapat meniru ikatan hidrogen yang terbentuk sebagaimana dengan substrat alaminya. Rancangan tersebut juga diharapkan mampu mengurangi mutasi yang muncul karena tekanan obat. Salah satu pengujian interaksi substrat dan analognya telah dicoba dilakukan oleh Rao dkk.^[66]. Bahkan Kitiyaporn dkk.^[6] telah mengarahkan studi dinamika struktur dari kompleks PR-inhibitor kepada *drug design*.

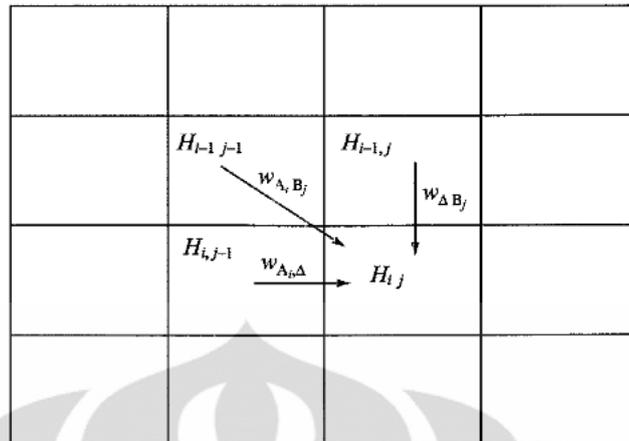
BAB 4

METODE



Gambar 4.1 Bagan Penelitian

Pada studi ini, digunakan metode dinamika molekuler. Beberapa tahapan dalam simulasi dinamika molekuler dilakukan berurutan seperti yang terlihat pada gambar 4.1. Data berupa rantai basa PR dari kedua pasien didapatkan dari *Institute of Human Virology and Cancer Biology (IHVCB)* Jakarta. Data ini kemudian diubah menjadi rantai asam amino menggunakan program *DNAtranslator* dari Matlab 7.0. Data asam amino kemudian dibandingkan dengan rantai asam amino *wildtype* HXB2 (WT) menggunakan protokol *sequence alignment*. Struktur 3D kedua pasien dibuat dengan *build mutan*. Pembuatan ini didasarkan pada struktur 3D WT sebagai *template* acuan. Ketiga struktur inilah yang akan disimulasikan pada studi ini.



Gambar 4.2 Metode untuk mendapatkan nilai tiap komponen matriks^[68]

4.1. Sequence Alignment

Ketika dua atau lebih struktur HIV-1 PR dibandingkan, kita akan mendapati adanya kemiripan struktur pada beberapa bagian asam aminonya. Kemiripan ini dapat diamati secara struktur 3D ataupun dituliskan sebagai deretan kode satu huruf dari asam amino tersebut. Proses perbandingan ini disebut sebagai *sequence alignment* yang bertujuan untuk mencari kemiripan dari sekuen-sekuen yang dibandingkan.

Pada perangkat lunak *Discovery Studio*, *sequence alignment* terdapat dalam salah satu protokolnya. Melalui protokol ini dua sekuen berbeda (dari masing-masing pasien dengan WT) dibandingkan untuk mencari kemiripan. Kemudian asam amino yang sama dan kemungkinan terjadinya perubahan jumlah asam amino dalam sekuen tersebut akan ditandai. Metode yang digunakan adalah algoritma align123 yang menyusun asam amino dalam bentuk matriks BLOSUM. Algoritma tersebut merupakan metode pemrograman dinamik yang terintegrasi dan dikembangkan dari program Clustal W hasil studi Thompson dkk^[67].

Algoritma ini menyusun matriks (H) dengan nilai baris M dan kolom N . Nilai M menunjukkan jumlah asam amino pada sekuen A dan N menunjukkan jumlah asam amino pada sekuen B. Nilai tiap komponen matriks $H_{i,j}$ ditentukan dari nilai maksimum tiga komponen matriks lainnya yaitu $H_{i-1,j-1}$, $H_{i-1,j}$, dan $H_{i,j-1}$ (gambar 4.2) melalui persamaan:

$$H_{i,j} = \max \begin{cases} H_{i-1,j-1} + w_{A_i,B_j} \\ H_{i-1,j} + w_{A_i,\Delta} \\ H_{i,j-1} + w_{\Delta,B_j} \end{cases} \quad (4.1)$$

Simbol Δ merupakan nilai yang merepresentasikan gap yang muncul pada sekuen. Faktor kemiripan residu asam amino ditunjukkan oleh w_{A_i,B_j} yang umumnya memberikan nilai 1 jika asam amino pada posisi tersebut sama dan bernilai 0 jika berbeda. Sedangkan nilai *penalty* diberikan berdasarkan kemunculan gap yang ditandai oleh $w_{A_i,\Delta}$ dan w_{Δ,B_j} pada tiap komponen matriks. Nilai-nilai yang digunakan pada faktor kemiripan maupun *penalty* dapat berbeda sesuai metode yang digunakan.

4.2. Pemodelan Protein Berbasis *Template*

Umumnya pada studi mengenai model molekuler, struktur 3D dari sekuen yang dimiliki tidak diketahui. Pada studi ini pun hanya diketahui data asam amino dari sekuen kedua pasiennya saja. Untuk memperoleh struktur 3D dari kedua pasien, diperlukan struktur lain yang telah diketahui^[69] sebagai *template* acuan. *Template* yang dipakai harus memiliki kemiripan setidaknya 50%^[70] dengan struktur 3D yang diinginkan. Kemiripan ini dapat diperoleh dari hasil *sequence alignment* yang dilanjutkan dengan penilaian^[71] pada beberapa bagian asam amino untuk menentukan ada tidaknya mutasi pada struktur.

Kemiripan yang tinggi dengan *template* akan memberikan struktur 3D yang lebih baik. Hal ini dikarenakan dalam penyusunan strukturnya dilakukan dengan tetap memperhatikan posisi atom karbon alfa ($C\alpha$). Atom $C\alpha$ merupakan penyusun *backbone* struktur protein. Berdasarkan posisi atom $C\alpha$ baru kemudian dilakukan penentuan posisi rantai samping dari residu asam amino mutasi pada struktur sekuen. Sifat fisis dan kimia seperti struktur sekunder dan aksesibilitas pelarut dari sekuen^[72] juga diperhitungkan untuk menentukan struktur sekuen. Pada studi ini pemodelan dilakukan dengan menggunakan *build mutan protocol*.

4.3. Medan Gaya CHARMM

Struktur yang diperoleh dari permodelan homologi umumnya masih memiliki atom hidrogen yang tidak lengkap. Atom hidrogen yang hilang ini ditambahkan dengan mengaplikasikan medan gaya CHARMM (*Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics*). Medan gaya CHARMM diperlukan untuk mendapatkan perhitungan nilai energi dari simulasi mekanika molekuler. Nilai energi tersebut diperoleh dari koordinat atom dan interaksi tanpa ikatan (elektrostatik dan van der waals)^[7-8]. Energi molekul dapat diperoleh dengan persamaan:

$$\begin{aligned}
 E_{pot} &= E_{regang} + E_{sudut} + E_{tors} + E_{bidang} + E_{elek} + E_{vdw} \\
 &= \sum k_b (r - r_0)^2 + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum (|k_\phi| - k_\phi \cos(n\phi)) + \\
 &\quad \sum k_\chi (\chi - \chi_0)^2 + \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} + \sum \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) sw(r_{ij}^2, r_{on}^2, r_{off}^2)
 \end{aligned} \tag{4.2}$$

E_{pot} = energi potensial sistem

E_{regang} = energi peregangan ikatan

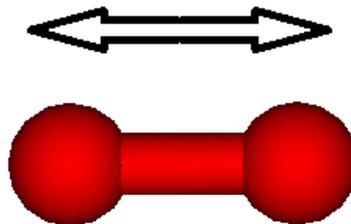
E_{sudut} = energi perubahan sudut

E_{tors} = energi perubahan sudut puntir

E_{bidang} = energi simpangan keluar bidang

E_{elek} = energi elektrostatik

E_{vdw} = energi van der Waals



Gambar 4.3 Peregangan ikatan antara dua atom

Interaksi antara dua atom yang berikatan dapat menyebabkan posisi kedua atom saling mendekat atau menjauh (gambar 4.3). Perubahan posisi yang terjadi secara simultan ini membuat ikatan antara kedua atom menyerupai rapatan dan renggangan yang terjadi pada pegas. Energi ikat antar atom tersebut dapat dituliskan dalam bentuk hukum Hooke:

$$E_{\text{regang}} = \frac{k}{2}(l - l_0)^2 \quad (4.3)$$

k = konstanta peregangan ikatan

l = jarak ikatan

l_0 = jarak ikatan awal

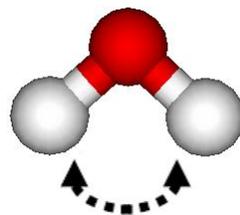
Tiga atom yang berikatan dapat membentuk sebuah sudut θ . Interaksi antara atom-atom yang berada di ujungnya menyebabkan posisi atomnya mendekat atau menjauh (gambar 4.4). Akibatnya terjadi perubahan sudut yang dibentuk oleh ketiga atom. Interaksi tersebut dapat dilihat sebagai elastisitas sebuah pegas yang diikatkan pada tiap ujung atom. Perubahan energi yang terjadi pun cukup signifikan dan dapat dihitung menggunakan pendekatan hukum Hooke seperti pada peregangan ikatan:

$$E_{\text{sudut}} = \frac{k}{2}(\theta - \theta_0)^2 \quad (4.4)$$

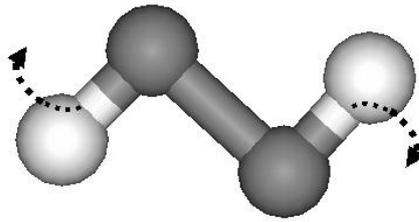
k = konstanta peregangan ikatan

θ = sudut ikatan

θ_0 = sudut ikatan awal



Gambar 4.4 Perubahan sudut yang dibentuk oleh tiga atom



Gambar 4.5 Sudut torsi yang dibentuk oleh empat atom

Ikatan yang dibentuk dari empat atom secara linear dapat mempengaruhi posisi sudut torsi (atau sudut puntir) pada sumbu puntirnya. Pada gambar 4.5, atom berwarna hijau dan kuning yang berada pada ujung-ujung ikatan dapat bergerak dengan bebas dengan dua atom di tengah sebagai sumbunya. Sudut puntir didapat dari kesegarisan antara dua atom yang berada di ujung-ujung molekul. Besar sudut puntir ini berada dalam kisaran 0 hingga $\pm 180^\circ$. Energi yang diakibatkan dari perubahan sudut torsi dapat dihitung berdasarkan:

$$E_{torsi} = \sum_{n=0}^N \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\omega - \gamma)] \quad (4.5)$$

V_n = potensial penghalang

γ = faktor fase

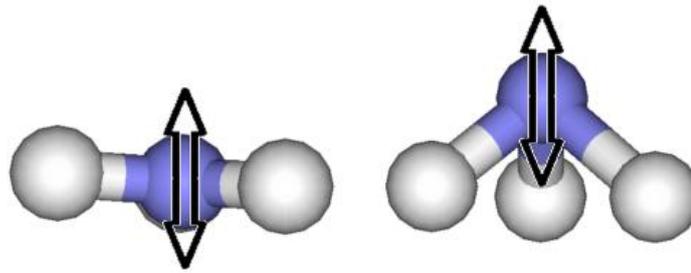
ω = sudut torsi

Jika ikatan yang terbentuk dari empat buah atom atau lebih terpusat pada satu sumbu, maka akan terbentuk kesebidangan antara atom yang berada di ujung-ujung ikatannya. Posisi atom yang menjadi pusatnya dapat berubah sehingga membuatnya keluar-masuk bidang (gambar 4.6). Akibatnya sistem mengalami perubahan energi yang disebut sebagai energi *out-of-plane* atau simpangan keluar bidang, dan dapat dihitung dengan:

$$E_{bidang} = k(1 - \cos 2\omega) \quad (4.6)$$

k = konstanta peregangan ikatan

ω = sudut bidang



Gambar 4.6 Sudut simpangan keluar bidang

Dua atom atau lebih yang tidak berikatan masih dapat memberikan kontribusi interaksi antar muatannya. Energi elektrostatik didapatkan dari interaksi muatan atom. Pada metode mekanika molekuler distribusi elektron tidak dimasukkan ke dalam perhitungan. Energi elektrostatik sistem diperoleh dari hukum Couloumb:

$$E_{elek} = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} \quad (4.5)$$

N = jumlah muatan titik

q = nilai muatan

r = jarak antar muatan

ϵ_0 = permitivitas muatan

Pengkutuban muatan yang terjadi pada molekul menyebabkan munculnya interaksi van der Waals. Energi interaksi van der Waals dapat dihitung dengan menggunakan persamaan potensial Lennard-Jones:

$$E_{vdW} = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (4.6)$$

ϵ = sumur potensial

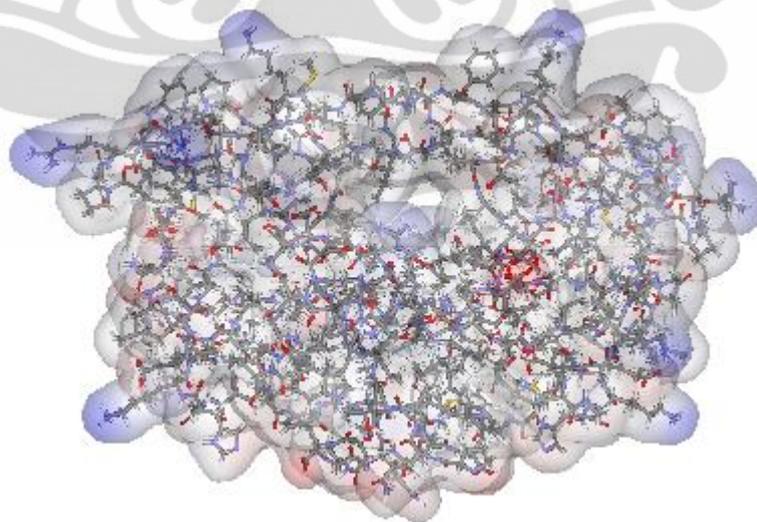
σ = jarak saat nilai energi nol

r = jarak saat energi minimum

4.4. *Implicit Solvent*

Sistem biomolekular umumnya merupakan sebuah kesatuan sistem yang terdiri dari bahan terlarut dan pelarut. Pada studi ini, HIV protease merupakan bahan terlarut, sedangkan yang menjadi bahan pelarut biasanya berupa air dengan sejumlah kadar garam sebagaimana keadaan dalam tubuh manusia. Untuk mendekati keadaan riil tersebut, studi mengenai simulasi biomolekular seringkali menggunakan sistem *explicit solvent* atau menggunakan molekul air yang akan dimasukkan ke dalam interaksi molekular sepanjang simulasi berlangsung. Hanya saja model simulasi dengan *explicit solvent* yang dilakukan pada struktur biomolekular yang cukup besar, akan membutuhkan waktu dan sumber daya yang besar.

Simulasi pada studi ini digunakan metode *implicit solvent*. *Implicit solvent* tidak menggunakan molekul air secara riil, melainkan menggantinya dengan pendekatan medan potensial rata-rata efektif pada daerah permukaan yang terbuka bagi pelarut (SASA) dari sistem. Salah satu keuntungan utama dari penggunaan *implicit solvent* adalah kemampuannya untuk menghitung *solvation free energy* dengan meminimalkan kesalahan akibat faktor statistik yang diakibatkan oleh



Gambar 4.7 Permukaan sistem molekul yang diambil dari radius Born.

Gambar berasal dari struktur WT pada studi ini.

molekul pelarut. Selain itu metode *implicit solvent* mengizinkan pergeseran atom dari sistem biomolekular yang relatif besar tanpa kekhawatiran akibat adanya tumpang tindih dengan pelarut^[8].

Parameter yang digunakan pada studi ini adalah *Generalized Born Molecular Volume* (GBMV). Metode ini memasukkan radius born dari integrasi volum molekulnya yang memiliki konstanta dielektrik internal lebih kecil daripada lingkungan di luar volumnya^[73]. Pada beberapa studi, nilai integral volumenya bisa diperoleh dari integrasi permukaan molekul. Metode ini cukup akurat untuk menghitung energi elektrostatik solvasi, yaitu berkisar antara 0,4%-1%. Penghitungan nilai energi sistem dengan parameter GBMV diberikan dengan persamaan:

$$E_{ij}^{GB} = -kD_{ij} \frac{q_i q_j}{f_{ij}} \quad (4.7)$$

k = konstanta Coulomb

D_{ij} = nilai dielektrik atom

q = nilai muatan

f = fungsi gaya *generalized born*

4.5. Minimisasi

Sebelum simulasi dinamika molekuler dilakukan, energi sistem terlebih dahulu harus diminimisasi. Sistem yang memiliki energi minimum akan memiliki struktur yang lebih stabil. Selama proses minimisasi dilakukan posisi atom-atom pada molekul akan mengalami perubahan hingga mencapai gradien energi yang diinginkan. Perolehan nilai minimisasi berkaitan dengan pencarian nilai maksimum/minimum pada suatu fungsi. Jika model sekuen pada studi ini memiliki fungsi f yang bergantung pada variabel x sejumlah i , maka untuk menentukan nilai energi minimumnya diperlukan syarat turunan pertama nol dan turunan kedua bernilai positif:

$$\frac{\delta f}{\delta x_i} = 0; \frac{\delta^2 f}{\delta x_i^2} > 0 \quad (4.8)$$

Studi ini menggunakan dua tahap minimisasi, yaitu menggunakan algoritma *steepest descent* dan *conjugate gradien*.

4.5.1. *Steepest Descent*

Metode *steepest descent* (SD) merupakan metode yang sederhana. Metode ini hanya menggunakan informasi yang didapatkan melalui turunan pertama fungsi. Pada setiap iterasinya, koordinat yang tersimpan hanyalah koordinat yang didapatkan pada saat itu saja. Konvergensi SD bergerak perlahan dari nilai minimum yang terlokalisasi hingga mencapai energi potensial permukaan dari sekuen kompleks.

Iterasi pada metode ini dilakukan dengan membuat nilai fungsi f berkurang dengan cepat. Arah tersebut berlawanan dengan nilai $\nabla f(x_i)$ atau ke arah gradien negatif. Pencarian nilai minimum berawal dari titik asal x_0 menuruni gradiennya dengan prosedur iterasi:

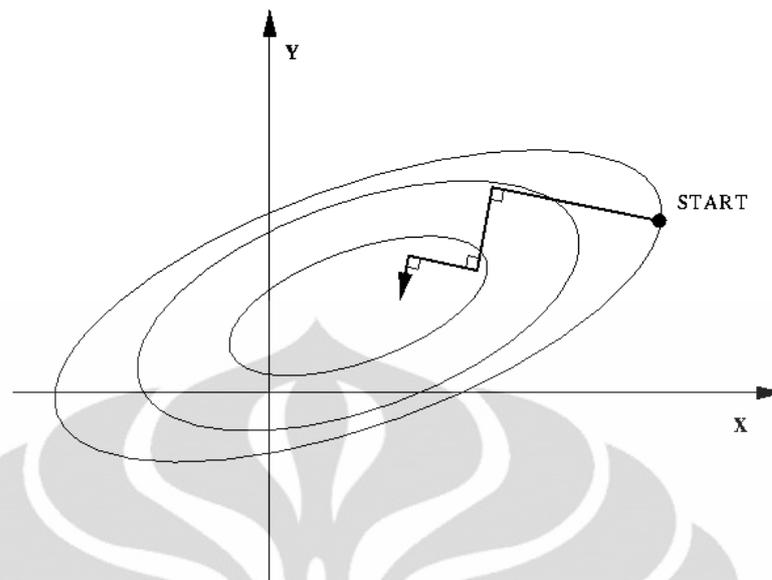
$$x_{k+1} = x_k - \lambda_k \nabla f(x_k) = x_k - \lambda_k g(x_k) \quad (4.9)$$

Nilai $g(x_k)$ merupakan gradien pada titik sembarang. Sedangkan λ_k ditentukan kemudian dengan ketentuan:

$$\frac{d}{d\lambda_k} f(x_{k+1}) = \nabla f(x_{k+1})^T \frac{d}{d\lambda_k} x_{k+1} = \nabla f(x_{k+1})^T g(x_k) = 0 \quad (4.10)$$

Setelah didapati nilai untuk λ_k maka pencarian nilai fungsi dilakukan kembali dengan menggunakan gradien negatif pada titik yang baru ini. Tahapan-tahapan tersebut kembali diulang hingga didapatkan nilai minimum sesuai dengan nilai deviasi yang diinginkan.

Pada dasarnya, konvergensi untuk molekul besar sulit didapatkan melalui metode SD. Namun, metode ini mampu memperbaiki konformasi struktur yang random, khususnya struktur hasil permodelan homologi dengan cara mutasi manual. Jika digambarkan dalam koordinat Cartesian, metode SD akan memberikan lintasan zig-zag yang saling tegak lurus^[74] (gambar 4.8). Sifat lintasan hasil yang tegak lurus membuat proses konvergensi menjadi cukup



Gambar 4.8 Lintasan algoritma *steepest descent* untuk mencari nilai minimum^[75]

lambat. Meskipun secara teoritis metode ini memberikan hasil yang konvergen, namun secara riil belum tentu mencapai konvergen dalam jumlah langkah tertentu.

4.5.2. *Conjugate Gradient*

Metode *conjugate gradient* (CG) memberikan hasil yang lebih baik dari metode SD. Metode CG memperhitungkan iterasi yang diperoleh dengan data sebelumnya untuk menentukan langkah berikutnya. Tidak seperti SD, metode CG kurang tepat digunakan pada struktur sekuen yang masih dalam keadaan acak.

Konjugasi yang menjadi asal kata metode ini berarti dua vektor yang tidak sama (d_i dan d_j) yang saling ortogonal terhadap matriks simetris apapun (Q). Secara matematis:

$$d_i^T \cdot Q \cdot d_j = 0 \quad (4.10)$$

Persamaan 4.10 dapat dilihat sebagai ortogonalitas secara umum sehingga matriks Q dapat dituliskan sebagai matriks satuan. Proses minimisasi dilakukan dengan mencari nilai minimum $f(x)$ pada tiap arah d_i ke seluruh penjuru kemungkinan nilai. Misalnya kita memiliki area nilai berbentuk elips (gambar 4.9 (a)), maka semua pasangan vektor yang terlihat tegak lurus akan bersifat ortogonal. Jika area

ini kita “tarik” sehingga menjadi berbentuk lingkaran (gambar 4.9 (b)), maka pasangan vektor yang tegak lurus akan bersifat Q -ortogonal. Sifat ortogonal ini serupa dengan ortogonalitas terhadap matriks Q pada persamaan 4.10. Arah vektor \mathbf{d}_1 pada gambar 4.9 (b) menuju pusat x yang merupakan nilai minimum CG. Untuk mendapatkan nilainya dapat menggunakan pendekatan tangensial antara dua pasangan vektor.

Vektor pertama diperoleh dari pendekatan gradien negatif SD:

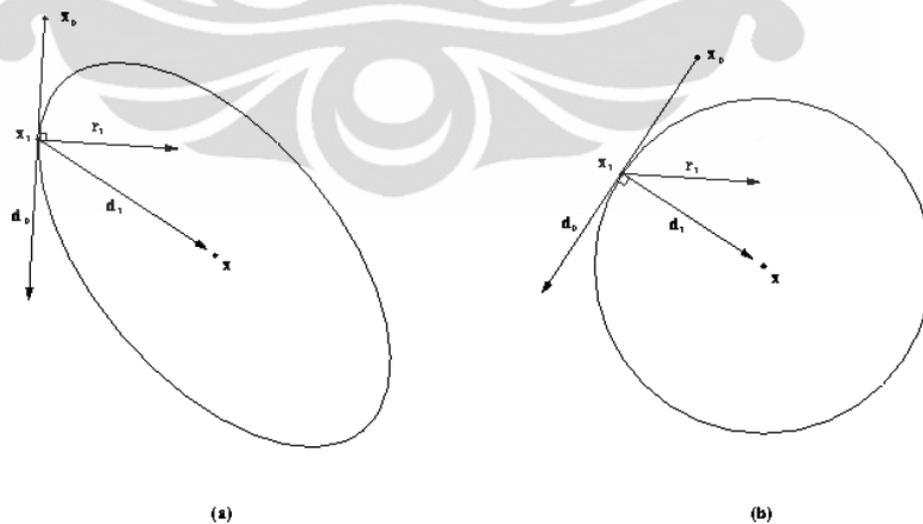
$$\mathbf{d}_0 = -\mathbf{g}(x_0) = -\mathbf{g}_0 \quad (4.11)$$

Pada metode CG, gradien positif juga masuk ke dalam perhitungan mengingat pencarian nilai minimum dilakukan ke seluruh area nilai. Langkah berikutnya ditentukan melalui:

$$\mathbf{d}_{k+1} = -\mathbf{g}_{k+1} + \beta_k \mathbf{d}_k \quad (4.12)$$

Dengan nilai β_k merupakan persamaan Fletcher-Reeves dengan nilai:

$$\beta_k = \frac{\mathbf{g}_{k+1}^T \cdot \mathbf{g}_{k+1}}{\mathbf{g}_k^T \cdot \mathbf{g}_k} \quad (4.13)$$



Gambar 4.9 Penggambaran pencarian nilai minimum x yang menjadi pusat area (a) elips dan (b) lingkaran yang berasal dari area elips yang “ditarik”^[76]

Persamaan 4.12 menguatkan konsep dari metode CG yang memperhitungkan hasil yang didapat dengan hasil sebelumnya untuk menentukan langkah selanjutnya. Penggunaan persamaan 4.13 sendiri sebenarnya dapat mengakibatkan bertambahnya waktu simulasi. Cara termudah untuk menentukan arah *conjugate gradient* adalah dengan mengambil nilai rata-rata dari persamaan Fletcher-Reeves^[77]. Dalam beberapa kasus nilai koefisien β_k yang didapat dari persamaan Fletcher-Reeves tidak memberikan hasil yang kurang baik pada fungsi non-kuadrat. Pada simulasi ini digunakan persamaan Polak-Ribiere sebagai pengganti:

$$\beta_k = \frac{g_{k+1}^T \cdot (g_{k+1} - g_k)}{g_k^T \cdot g_k} \quad (4.14)$$

Tahap minimisasi CG merupakan tahap kedua yang dilakukan untuk memperoleh energi minimum. Jika SD hanya mampu memberikan energi minimum secara lokal, maka CG mencari energi minimum dari struktur kompleks secara keseluruhan.

4.6. Simulasi Dinamika Molekuler

Simulasi dinamika molekuler (MDS) pada dasarnya melakukan perhitungan pada parameter-parameter yang telah diberikan seperti misalnya medan gaya. Perhitungan yang dilakukan pada MDS berasal dari fisika klasik. Terdapat tiga proses MDS yang umum dilakukan pada studi mekanika molekuler: *heating*, *equilibrium*, dan *production*.

Heating bertujuan untuk memasukkan variabel temperatur ke dalam model sekuen. Hal ini perlu dilakukan mengingat mulai dari tahap permodelan homologi hingga minimisasi, struktur berada dalam keadaan tanpa temperatur. Temperatur yang digunakan pada studi ini sebesar 298 K atau 25 °C mengikuti temperatur ruang. Setelah proses *heating* dilakukan kemudian dilanjutkan dengan proses *equilibrium*. Pada tahapan kedua ini molekul dibuat berada dalam keadaan temperatur yang dijaga stabil. Dengan demikian struktur molekul dapat dipertahankan. Tahap terakhir adalah *production* yang memasukkan variabel temperatur dan tekanan bersamaan. Pada tahap ini energi kinetik yang didapatkan berasal dari:

$$E_k = \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i} = \frac{k_B T}{2} (3N - N_C) \quad (4.15)$$

$3N - N_C$ = jumlah derajat kebebasan

k_B = jarak saat nilai energi nol

4.7. Energi Interaksi PR-Inhibitor

Analisa baru dilakukan setelah tahap *production* selesai dilakukan, yaitu berdasarkan tinjauan dinamika struktural dan energi interaksi antara PR dengan inhibitor. Dalam penghitungannya, energi ikat yang diperoleh antara PR dengan inhibitor diperoleh dari persamaan:

$$\Delta G_{bebas} = G_{kompleks} - G_{protease A} - G_{protease B} - G_{inhibitor} \quad (4.16)$$

Dengan:

$$G = E_{MM} + G_{solv} - T\Delta S \quad (4.17)$$

G = energi bebas gibbs rata-rata

E_{mm} = energi mekanika molekuler (didapat dari energi medan gaya)

G_{solv} = energi bebas dari model pelarut

$T\Delta S$ = entropi sistem

Hasil *database* HIV Stanford menunjukkan bahwa data yang digunakan memiliki kemiripan yang cukup tinggi dengan galur AE (persentase kemiripan 97,3% dan 96,6% masing-masing untuk RY1 dan DY1). Sedangkan hasil perbandingan yang diperoleh dari protokol *sequence alignment*, struktur protease RY1 dan DY1 memiliki kemiripan dengan galur B masing-masing sebesar 87,88% dan 85,86%. Pada studi ini, galur B digunakan sebagai acuan, karena galur ini merupakan galur yang paling umum ditemukan. Hasil perbandingan mutasi yang diperoleh dari protokol *sequence alignment* untuk kedua pasien dapat dilihat pada gambar 5.1.

Dari hasil observasi menggunakan protokol *sequence alignment*, diketahui terdapat 12 mutasi untuk RY1 dan 14 mutasi untuk DY1. Daftar mutasi untuk masing-masing sekuen dapat dilihat pada tabel 5.1. Hasil tersebut berbeda dengan daftar mutasi yang diberikan oleh *database* HIV Stanford yang hanya memberikan 10 mutasi untuk RY1 dan 12 mutasi untuk DY1. Setelah dilakukan perbandingan antara kedua hasil (protokol *sequence alignment* dan *database* HIV Stanford), diketahui bahwa pada posisi asam amino ke-3 dan ke-37 ternyata tidak dianggap sebagai mutasi oleh *database* HIV Stanford. Perbedaan ini terjadi karena yang digunakan sebagai pembanding dalam protokol *sequence alignment* adalah galur B. Sedangkan pada *database* HIV Stanford, pembandingnya adalah galur AE.

Dari mutasi tersebut, RY1 dan DY1 memiliki mutasi yang sama pada residu ke 13, 20, 36, dan 89 yang telah diketahui beberapa karakteristiknya. Mutasi I13V diketahui muncul pada protease dengan galur B yang telah mendapatkan peng-

Tabel 5.1 – Daftar mutasi residu untuk kedua protease

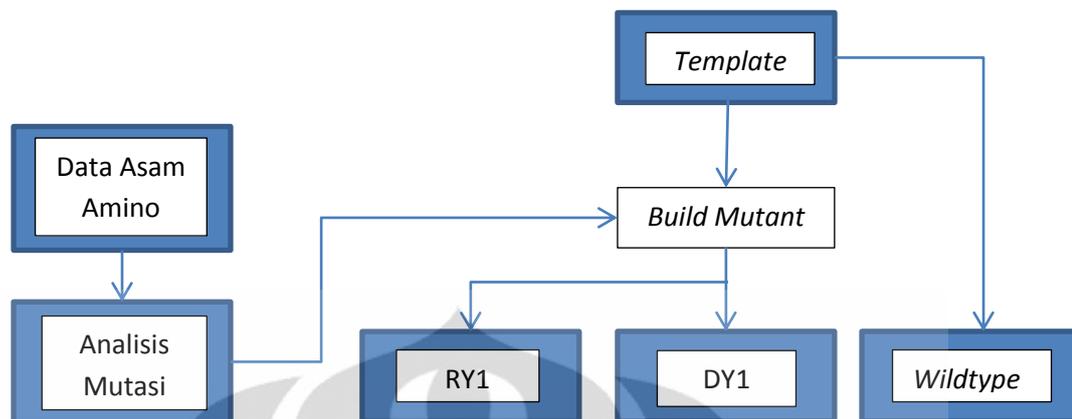
Pasien	Daftar Mutasi
RY1	V3I, I13V, K20R, E35D, M36I, S37N, R41K, K45R, R57K, H69K, L89M, L97I
DY1	V3I, L10I, I13V, G16E, K20R, E35D, M36I, S37N, R41K, I62V, H69K, V77I, L89M, L97I

obatan *antiretroviral*. Mutasi K20R/M/I/T/V merupakan mutasi yang diketahui meningkatkan resistensi terhadap sejumlah inhibitor protease ketika muncul bersamaan dengan mutasi lainnya. Mutasi M36I diketahui sebagai salah satu penyebab resistensi untuk inhibitor tipranavir (TPV)^[79-80] bagi tipe galur B. Sedangkan pengaruh resistensi akibat mutasi L89M masih belum diketahui.

Berdasarkan *database* HIV Stanford, pada protease DY1 ditemukan mutasi minor L10I/V/F/R/Y yang memberikan resistensi terhadap banyak inhibitor protease ketika muncul bersama dengan mutasi lainnya. Mutasi G16E memiliki sedikit pengaruh pada terapi atazanavir (ATV). Sedangkan mutasi V77I memiliki pengaruh terhadap terapi nelfinavir (NFV). Protease DY1 memiliki cukup banyak mutasi terkait dengan kekebalannya terhadap beberapa inhibitor bila dibandingkan dengan pasien RY1. Pada studi ini, mutasi V32I, I47V, I54M/L, I84V yang menurunkan sensitivitas terhadap inhibitor amprenavir (APV) tidak terlihat. Namun, mutasi E35D^[37, 81] diketahui memberikan pengaruh terhadap sensitivitas protease terhadap APV. Sedangkan khusus untuk lopinavir (LPV) memiliki dua jalur tingkat resistensi, yaitu menyerupai inhibitor indinavir (IDV) (M46I/L, I54V/T/A/S, dan V82A/T/F/S) serta menyerupai inhibitor APV (V32I, I47V/A, I50V, I54L/M, dan L76V).

5.1.2. Mutasi Struktur

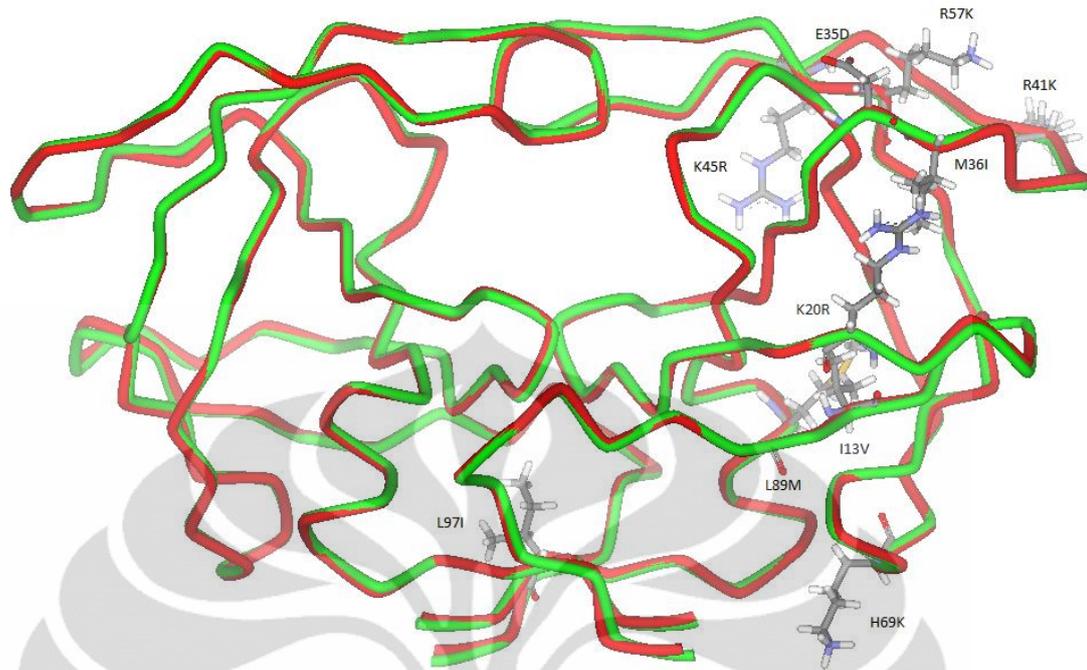
Secara umum, proses preparasi struktur terdiri dari 2 tahap, proses pencarian *template* sebagai model awal (*wildtype*/WT), dan proses mutasi *template* dengan menyesuaikan asam amino protease RY1 dan DY1 (bagan 5.1). Semua *template* yang digunakan diambil dari RCSB^[82] dan termasuk ke dalam galur B. Meski protease RY1 dan DY1 termasuk ke dalam galur AE, *template* tetap dapat digunakan karena memiliki kemiripan residu sebesar 90%. Studi ini memperhatikan interaksi HIV-1 protease dengan inhibitor APV dengan *template* 1T7J yang mengandung mutasi Q7K, K14R, V82T, dan I84V^[83]. *Template* ini kemudian dimutasikan berdasarkan data mutasi dari *database* HIV Stanford. Penggunaan data mutasi ini diperkuat dengan studi Bandaranayake dkk.^[84] yang serupa dengan data analisis *database* HIV Stanford dimana asam amino ke-3 dan 37 pada galur AE bukan merupakan hasil mutasi. Hal ini dilakukan sebagai pen-



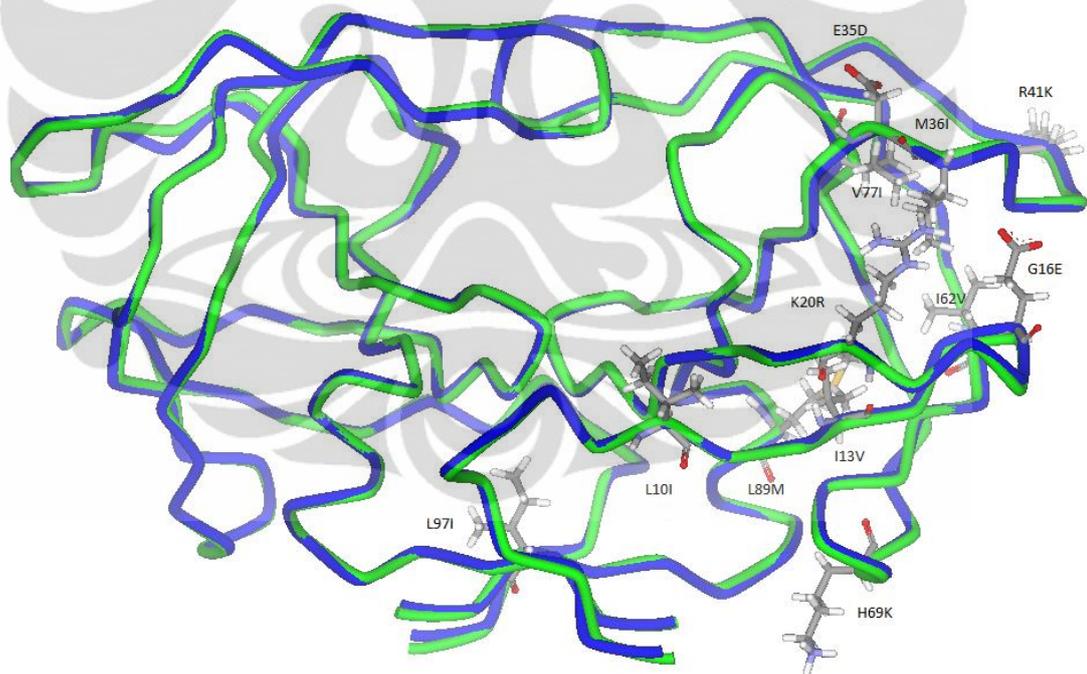
Bagan 5.1 Tahapan proses pemodelan homologi protease RY1 dan DY1

dekatan terhadap galur AE dari kedua protease. Sehingga setelah tahap ini dilalui, tiga model awal kompleks *template* WT, protease RY1 dan DY1 disimulasikan. Perbandingan struktur tiga dimensi antara model RY1 terhadap WT (a) dan model DY1 terhadap WT (b) dapat dilihat pada gambar 5.2.

Setelah dilakukan mutasi struktur didapatkan struktur dasar dari WT, DY1, dan RY1. Struktur kemudian diminimisasi terlebih dahulu sebelum simulasi untuk mendapatkan kestabilan struktur pada energi rendah. Usai minimisasi, dianalisis probabilitas mode protonasi yang terdapat dalam struktur protease. Mode protonasi ini penting untuk studi terhadap data struktur atom hidrogen yang hilang akibat mutasi yang terjadi pada HIV-1 PR^[32-35]. Mode protonasi ini berada pada bagian sisi aktif asp25/25'. Secara keseluruhan, terdapat sembilan mode protonasi yang dapat terjadi (gambar 5.3) dengan tiga tipe protonasi: unprotonasi, monoprotanasi, dan diprotanasi. Penelitian ini mengacu pada studi Kitiyaporn dkk^[6] yang menganalisa empat mode protonasi: unprotonasi (mode 1), monoprotanasi asp25 (mode 2), monoprotanasi asp25' (mode 3), dan diprotanasi (mode 6). Dari empat model ini, dipilih salah satu mode protonasi yang paling stabil secara energi dan struktur untuk disimulasikan. Pada penelitian ini, keempat mode protonasi ini diberikan kepada masing-masing model protease. Analisis dilakukan berdasarkan kondisi pada WT saja, sehingga untuk model protonasi bagi kedua model yang digunakan selanjutnya mengikuti hasil analisis terhadap WT.

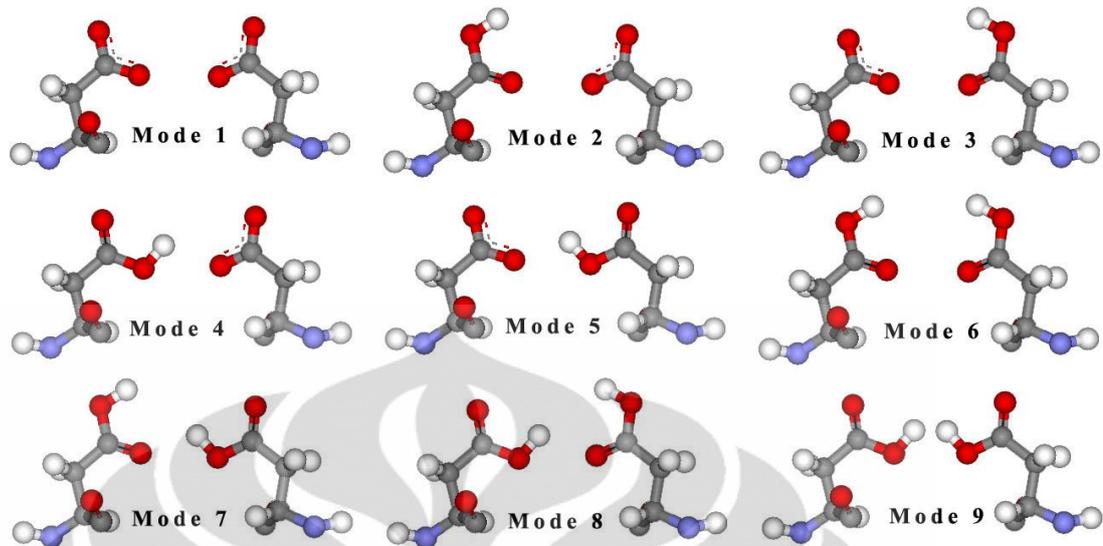


(a)



(b)

Gambar 5.2 Superposisi *backbone* dari (a) WT (hijau) terhadap RY1 (merah); dan (b) WT terhadap DY1 (biru), dengan menampilkan residu termutasi pada kedua protease



Gambar 5.3 Sembilan mode protonasi^[85] pada sisi aktif asp25 dan asp25'. Mode 1 adalah mode unprotonasi, mode 2 hingga mode 5 adalah mode monoprotonasi, dan mode 6 hingga mode 9 adalah mode diprotonasi.

5.1.3. Analisis Mode Protonasi untuk HIV-1 PR dengan APV

Mengacu pada studi yang dilakukan oleh Kitiyaporn dkk., empat mode protonasi pilihan diminimisasi dengan dua tahap. Tahap pertama, dilakukan dengan metode *steepest descent*, yang dilanjutkan dengan metode *conjugate gradient*. Dari hasil minimisasi didapatkan bahwa model protonasi dengan inhibitor APV memiliki 8 ikatan hidrogen antar-residu yang mungkin terbentuk pada sisi aktifnya. Ikatan antar-residu ini tentunya berperan dalam kestabilan struktur dan interaksi antara protease dengan inhibitor. Dari perbandingan jumlah ikatan hidrogen untuk tiap mode, dapat dinyatakan bahwa mode 3 cenderung lebih stabil karena memiliki ikatan hidrogen pada sisi aktifnya paling banyak (7 ikatan hidrogen) dibandingkan dengan mode lainnya. Mode 2 memiliki ikatan hidrogen yang sama dengan mode 1 sebanyak 4 ikatan, dengan jarak ikatan ke-2, ke-7, dan ke-8 berkurang 0,04, 0,05, dan 0,13 Å dan pada ikatan ke-3 bertambah sebesar 0,09 Å.

Pada mode 3 memiliki lima ikatan hidrogen yang sama dengan mode 1, yaitu pada ikatan ke-2, ke-5, ke-7 dan ke-8 yang mendekat masing-masing sebesar

Tabel 5.2 Data jarak ikatan hidrogen yang terbentuk (dalam Å) pada sisi aktif asp25 dan asp25' untuk WT dengan APV

	Ikatan ke-	Mode 1 (unpro)	Mode 2 (mono 25)	Mode 3 (mono 25')	Mode 6 (dipro)
$O_{\delta 2}(\text{asp25})-H_N(\text{thr26})$	1	-	-	2.49	-
$O_{\delta 2}(\text{asp25})-H_N(\text{gly27})$	2	2.05	2.01	2	1.94
$O_{\delta 2}(\text{asp25})-H_N(\text{ala28})$	3	1.99	2.08	2.2	2.14
$O_{\delta 1}(\text{asp25}')-H_N(\text{ala28}')$	4	2.24	-	-	-
$O_{\delta 2}(\text{asp25}')-H_{V1}(\text{thr26})$	5	2.1	-	1.96	-
$O_{\delta 2}(\text{asp25}')-H_{V1}(\text{thr26}')$	6	-	2.48	2.45	-
$O_{\delta 2}(\text{asp25}')-H_N(\text{gly27})$	7	2.1	2.05	2.03	2.16
$O_{\delta 2}(\text{asp25}')-H_N(\text{gly27}')$	8	2.06	1.93	1.9	1.91

0,05, 0,14, 0,07 dan 0,16 Å. Mode 3 memiliki dua ikatan baru yang terbentuk, yaitu pada ikatan ke-1 dan ikatan ke-6. Begitu pula dengan mode 2 meski hanya memiliki satu ikatan baru yang terbentuk, yaitu pada ikatan ke-6 saja.

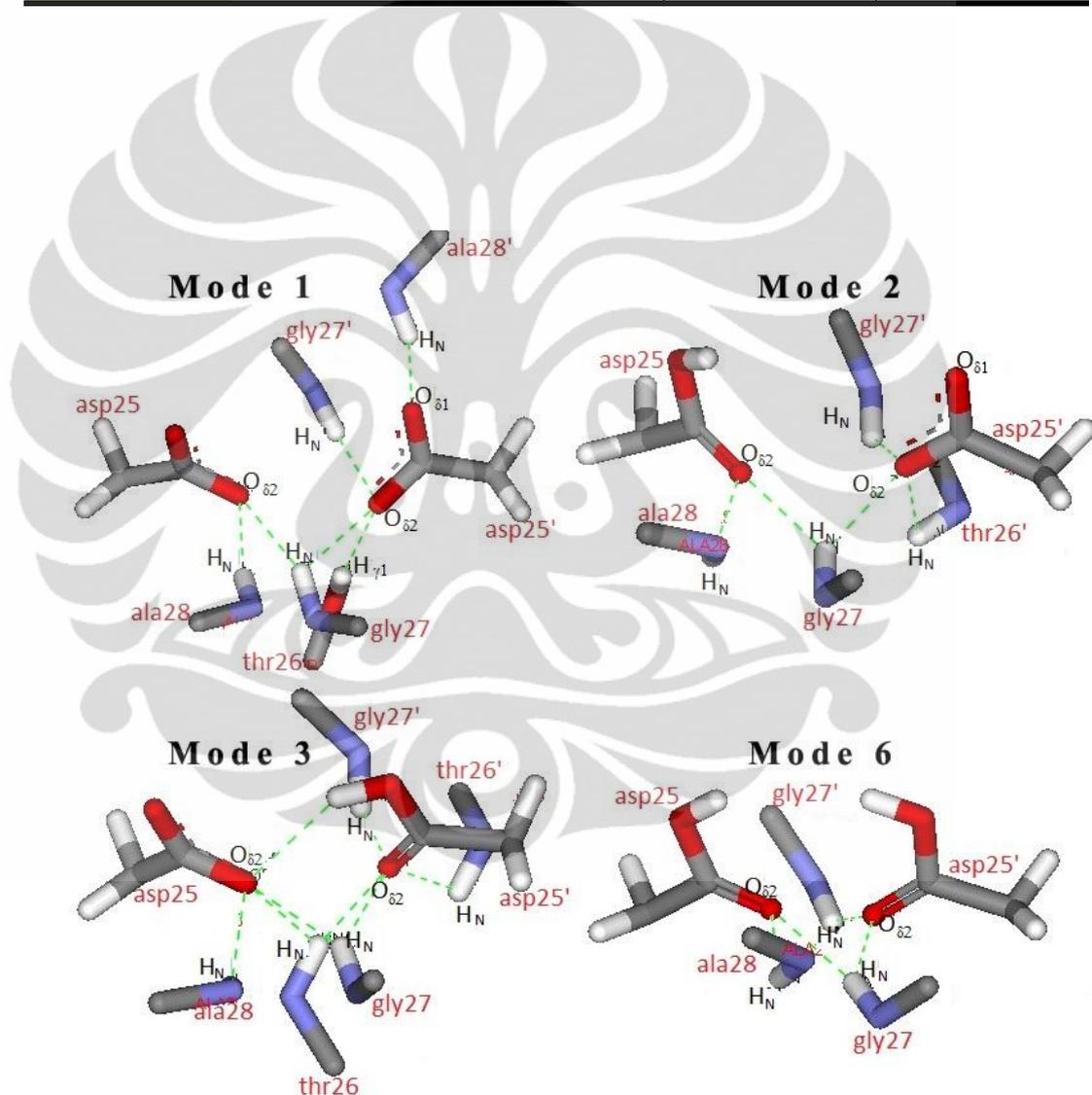
Dari analisa energi minimisasi, nilai potensial akhir yang dimiliki oleh mode 3 memiliki nilai -10671,36 kcal/mol atau lebih rendah 6,38 dan 15,06 kcal/mol jika dibandingkan masing-masing dengan mode 2 dan mode 6. Pola yang sama ditemukan pada energi elektrostatik dengan energi terendah dimiliki oleh mode 3 sebesar -8169,32 kcal/mol atau lebih rendah 37,62 kcal/mol dari mode 1 dan lebih rendah 34,25 kcal/mol dari mode 6. Sedangkan pada energi van der Waals nilai terendahnya dimiliki oleh mode 6 sebesar -1793,90 kcal/mol atau lebih rendah 34,38 kcal/mol dari mode 1 dan lebih rendah 31,75 kcal/mol dari mode 6. Energi yang minimum dari mode 3 menunjukkan bahwa secara energetik mode ini cukup stabil. Oleh karena itu untuk model dengan inhibitor APV digunakan mode 3 untuk simulasi. Hasil ini memiliki kesesuaian dengan studi yang dilakukan oleh Kitiyaporn dkk.

5.2.Simulasi Dinamika Molekuler

Studi ini dilakukan melalui tiga tahapan simulasi: *heating*, *equilibration*, dan *production*. Pada tahap penentuan mode protonasi dilakukan dengan cara meminimisasi energi sistem, sehingga struktur berada dalam keadaan optimal.

**Tabel 5.3 Data energi dari setiap mode protonasi untuk WT dengan APV
(dalam kcal/mol)**

Mode	E_{pot}	E'_{pot}	E_{vdw}	E_{elec}
Mode 2	-10487,66	-10664,98	-1759,42	-8131,70
Mode 3	-10478,20	-10671,36	-1762,15	-8169,32
Mode 6	-10468,31	-10656,30	-1793,90	-8135,07



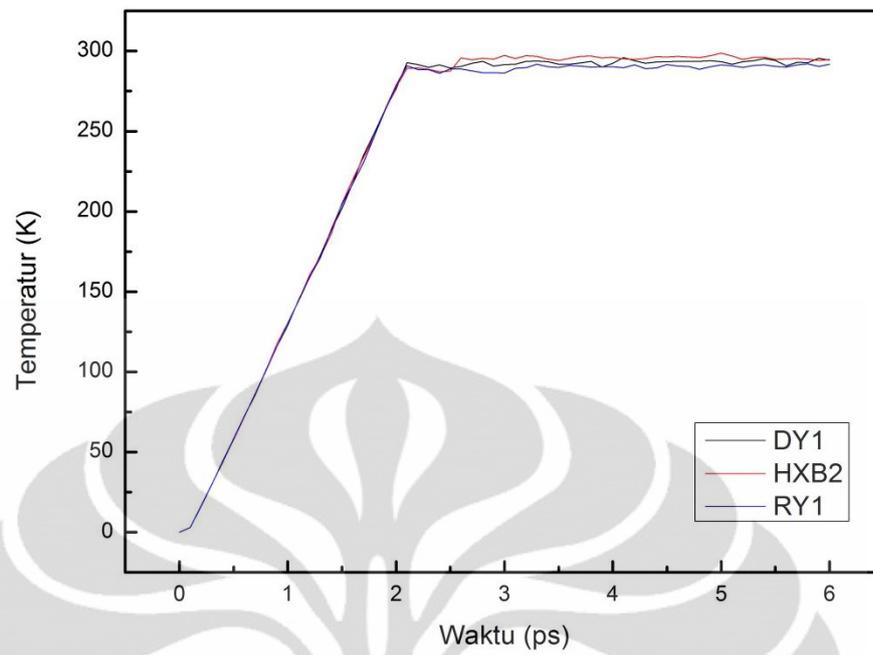
Gambar 5.4 Ikatan hidrogen yang terbentuk pada tiap mode protonasi untuk WT dengan APV

Pada subbab 4.5, diperlihatkan bahwa minimisasi dilakukan hanya berdasarkan fungsi posisi dan energi. Sehingga struktur diasumsikan berada dalam keadaan ideal tanpa ada pengaruh eksternal seperti temperatur. Untuk mendapatkan hasil simulasi yang mendekati keadaan riil, pengaruh lingkungan sistem seperti temperatur dimasukkan dalam perhitungan. Pada proses *heating* selama 6 ps, temperatur sistem dinaikkan dari 0 K hingga mencapai temperatur ruang sebesar 298 K. Kemudian sistem dipertahankan dalam keadaan temperatur setimbang selama 34 ps proses *equilibration*, hingga akhirnya perhitungan MDS dilakukan pada tahapan *production* selama 60 ps dari simulasi. Analisis dari sistem secara keseluruhan dilakukan setelah semua tahap simulasi berakhir. Waktu simulasi 100 ps dipilih untuk menyesuaikan dengan kemampuan sumber daya komputer yang digunakan dan dengan pertimbangan ukuran model yang akan disimulasikan.

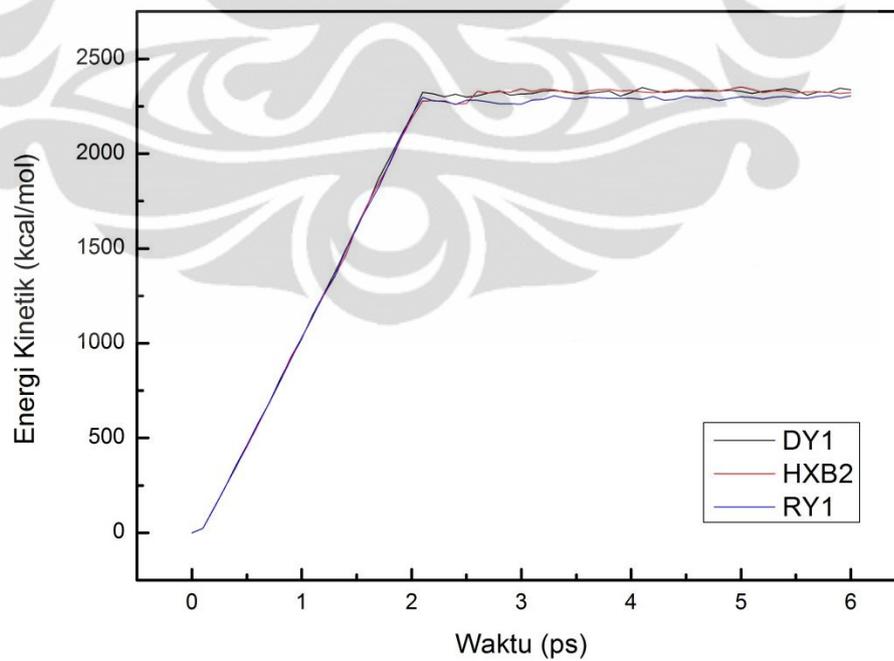
5.2.1. *Heating*

Pada tahapan *heating*, sistem tidak langsung mencapai temperatur 298 K. Kenaikan temperatur dari keadaan 0 K terjadi selama 2 ps pada simulasi dengan nilai yang hampir sama untuk ketiga model (gambar 5.5). Ketika mendekati nilai temperatur ruang, kenaikan temperatur pada sistem mulai stabil dan mendapatkan kesetimbangan temperatur yang diinginkan. Kesetimbangan yang terjadi tidak tepat berada pada temperatur 298 K, namun terjadi fluktuasi untuk mendekati model dengan keadaan riil. Sepanjang kestabilan temperatur pada proses *heating* ini, terlihat bahwa fluktuasi yang dialami oleh model RY1 memberikan nilai temperatur yang cenderung lebih rendah bila dibandingkan dengan WT ataupun DY1.

Seiring dengan terjadinya kenaikan temperatur sistem, energi kinetik yang dimiliki sistem juga naik hingga 2250 kcal/mol (gambar 5.6). Kenaikan energi kinetik hingga waktu simulasi 2 ps sesuai dengan kenaikan temperatur yang teramati pada gambar 5.5. Setelah waktu simulasi 2 ps, nilai energi kinetik dari model RY1 terlihat lebih rendah bila dibandingkan dengan model WT dan model DY1. Pada akhir simulasi *heating* juga didapatkan nilai energi kinetik model DY1 yang lebih tinggi dari model WT. Hasil ini memperlihatkan adanya kecocokan antara kurva temperatur dengan energi kinetik sistem. Hubungan antara



Gambar 5.5 Kurva temperatur sistem sepanjang simulasi pada proses *heating* untuk ketiga model (WT, RY1 dan DY1)

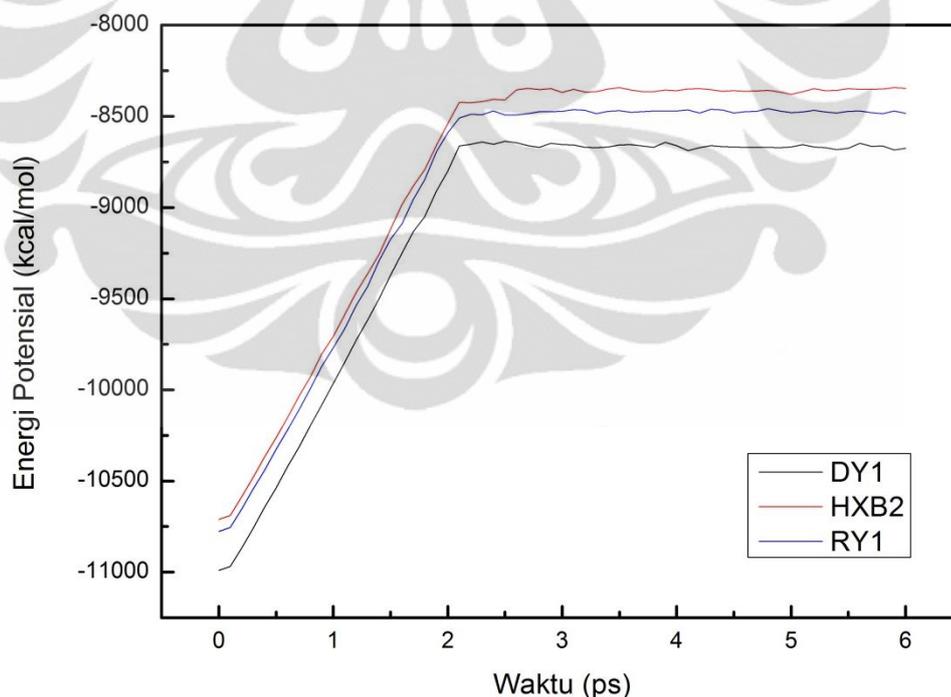


Gambar 5.6 Kurva energi kinetik sistem sepanjang simulasi pada proses *heating* untuk ketiga model (WT, RY1 dan DY1)

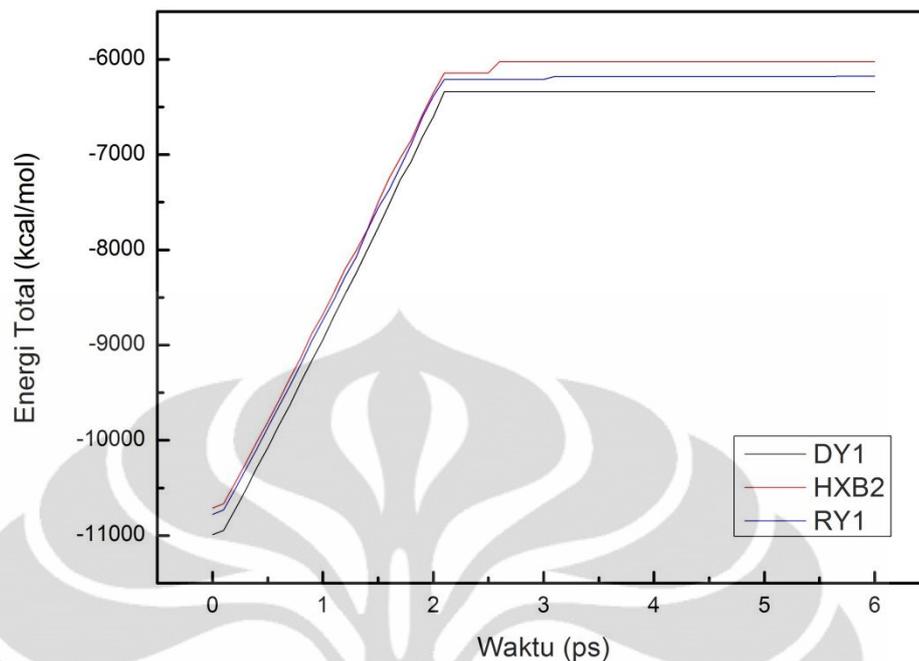
temperatur dan energi kinetik sistem juga dapat diamati melalui kemiripan fluktuasi kurva pada saat sistem mencapai 2 ps.

Energi potensial pada ketiga model sepanjang tahap *heating* (gambar 5.7) menunjukkan bahwa energi potensial sistem tidak dipengaruhi secara langsung oleh kenaikan temperatur. Energi potensial sistem sejak awal simulasi memberikan nilai yang berbeda untuk model WT, RY1, dan DY1. Nilai energi potensial sistem ini dipengaruhi oleh interaksi dan posisi antar atom pada sistem. Perubahan energi yang teramati pada kurva menunjukkan pergerakan (perubahan posisi atom-atom) yang terjadi pada sistem sepanjang terjadinya perubahan temperatur. Pergerakan ini juga mengurangi kestabilan sistem yang ditandai dengan fluktuasi yang terlihat pada gambar 5.7.

Dari gambar 5.7 juga dapat diamati bahwa sejak awal simulasi, nilai energi potensial dari model DY1 memiliki energi yang paling minimum dan berfluktuasi pada nilai -8750 kcal/mol. Sedangkan energi potensial untuk model WT dan RY1,



Gambar 5.7 Kurva energi potensial sistem sepanjang simulasi pada proses *heating* untuk ketiga model (WT, RY1 dan DY1)

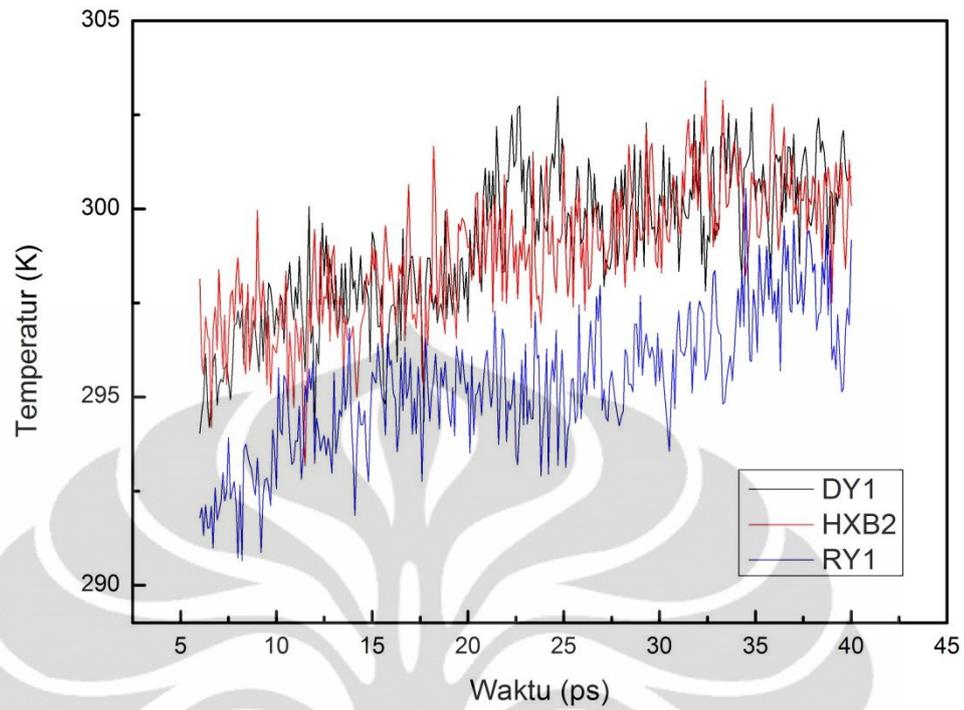


Gambar 5.8 Kurva energi total sistem sepanjang simulasi pada proses *heating* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

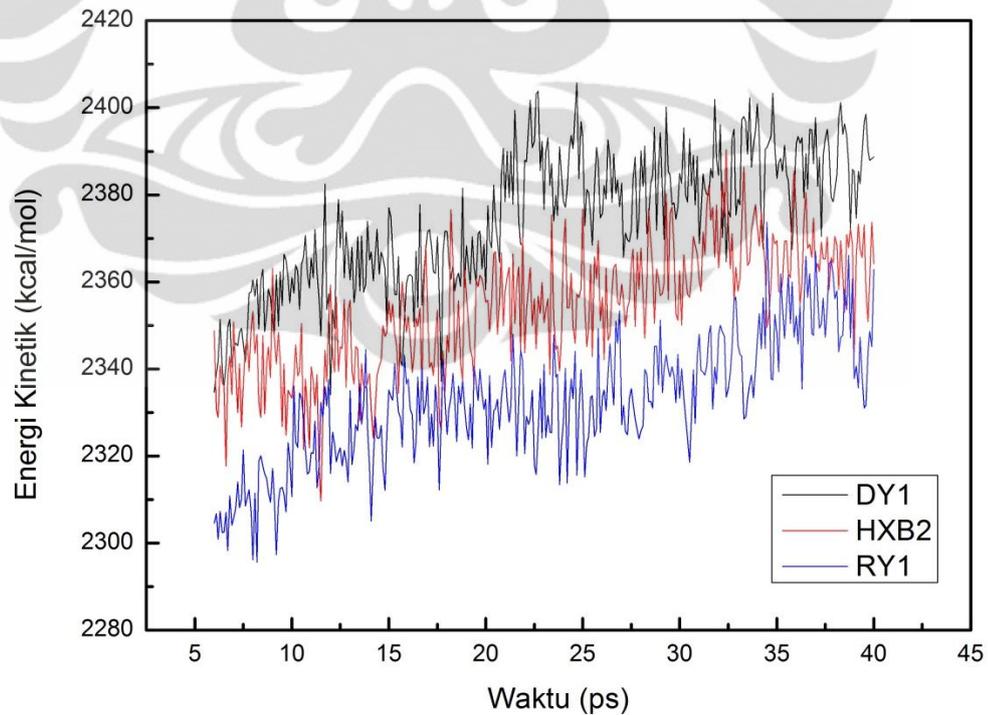
masing-masing berada pada fluktuasi energi -8300 dan -8500 kcal/mol. Nilai energi total sistem cukup dipengaruhi oleh energi potensialnya. Sedangkan energi kinetik sistem tidak mempengaruhi energi totalnya secara signifikan. Energi total sistem DY1 juga memiliki nilai yang paling minimum bila dibandingkan dengan dua model lainnya. Fluktuasi nilai energi total berada pada nilai -6000, -6100, dan -6250 kcal/mol untuk model WT, RY1, dan DY1 secara berturut-turut (gambar 5.8).

5.2.2. Equilibration

Setelah tahap *heating* dilakukan, simulasi dilanjutkan dengan tahap *equilibration* yang bertujuan untuk mendapatkan nilai temperatur yang lebih stabil. Kurva pada gambar 5.9 memperlihatkan fluktuasi nilai temperatur antara 6 ps hingga 40 ps. Kurva tersebut menunjukkan bahwa fluktuasi temperatur dari model RY1 ternyata cukup rendah, dan mencapai nilai temperatur tertingginya pada 7 ps terakhir dari tahap *equilibration*. Selama 7 ps terakhir, range temperatur dari ketiga model ini juga mulai berhimpit menuju satu nilai yang sama dan semakin stabil mendekati nilai 298 K.



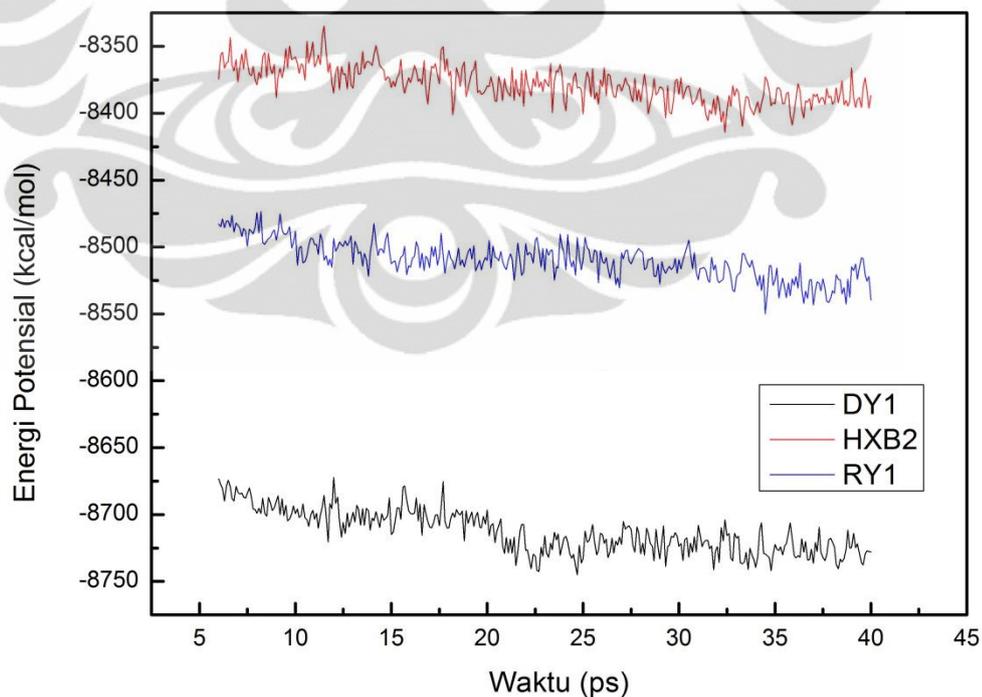
Gambar 5.9 Kurva temperatur sistem pada proses *equilibration* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)



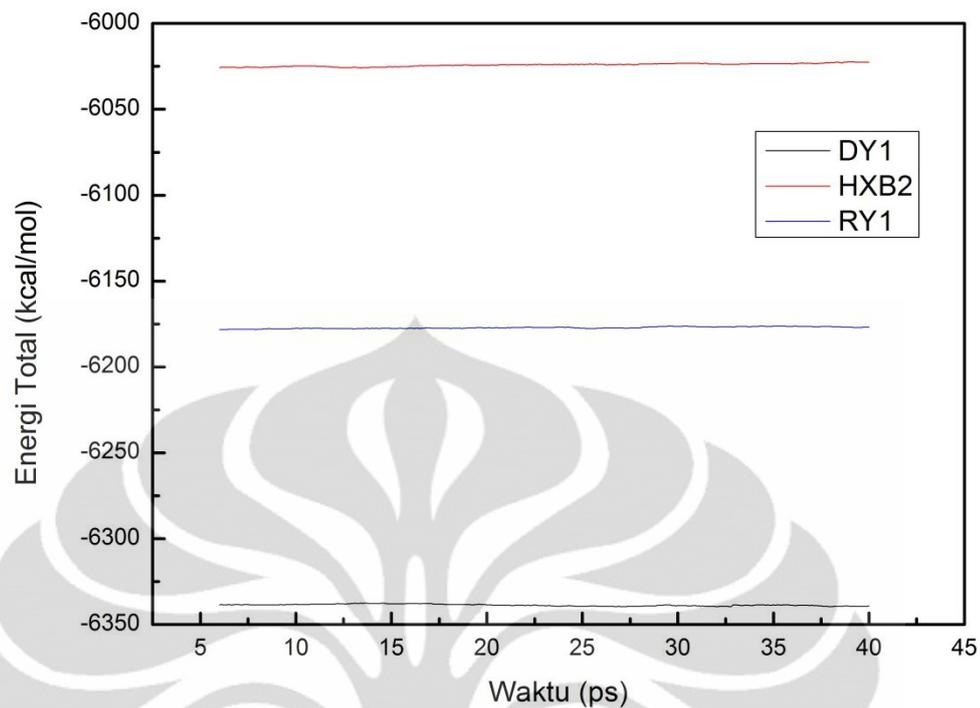
Gambar 5.10 Kurva energi kinetik sistem pada proses *equilibration* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

Energi kinetik sistem (gambar 5.10) pada tahap ini juga menunjukkan fluktuasi energi yang terlihat akibat adanya fluktuasi temperatur pada tahap *equilibration*. Energi kinetik tertinggi juga dimiliki oleh model DY1, WT, dan RY1 secara berturut-turut. Hasil ini sesuai dengan kurva temperatur pada gambar 5.9. Namun, fluktuasi energi kinetik pada gambar 5.10 memperlihatkan tahap *equilibration* ini memberikan pergerakan yang tidak serupa dengan tahap *heating*. Hal ini disebabkan karena variabel tekanan pada sistem mulai dimasukkan kedalam perhitungan. Energi kinetik untuk model WT dan pasien RY1 mulai berada pada nilai -2360 kcal/mol pada 7 ps terakhir, sedangkan energi kinetik untuk model DY1 stabil pada nilai -2390 kcal/mol.

Gambar 5.11 memperlihatkan kurva energi potensial dengan nilai terendah dimiliki oleh model DY1, RY1, dan WT secara berturut-turut. Urutan nilai energi potensial ini masih sesuai dengan hasil yang didapatkan sebelumnya pada tahap *heating*. Energi potensial untuk masing-masing model DY1 berada pada nilai



Gambar 5.11 Kurva energi potensial sistem pada tahap *equilibration* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)



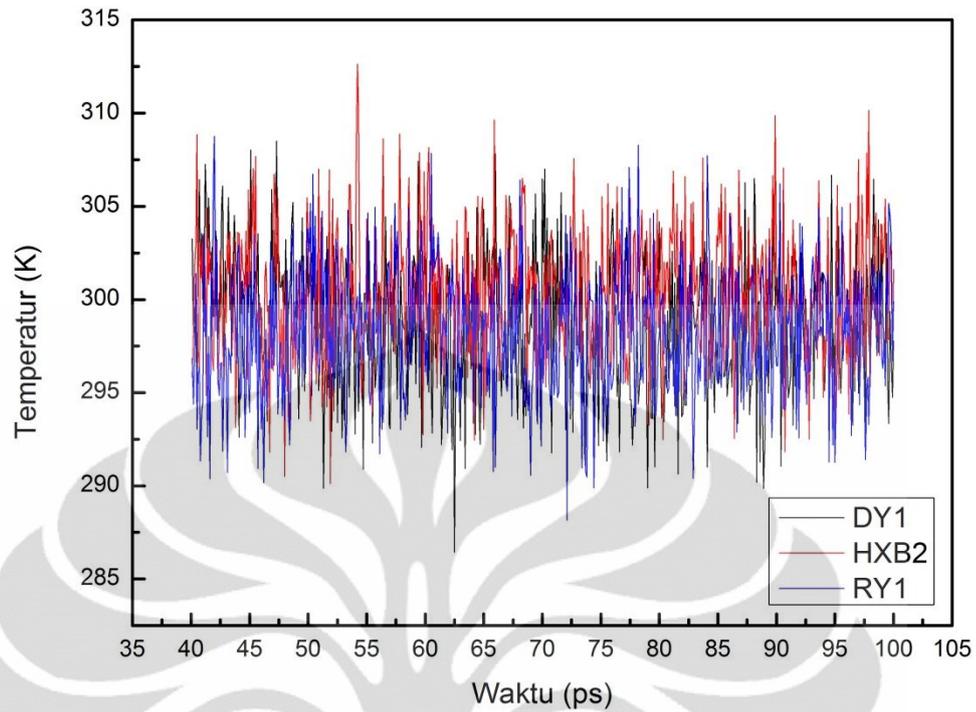
Gambar 5.12 Kurva energi total sistem pada tahap *equilibration* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

-8725 kcal/mol, model RY1 pada nilai -8500 kcal/mol, dan model WT pada nilai -8375 kcal/mol. Energi potensial dari ketiga model juga terlihat mempengaruhi energi total dari ketiga model simulasi (gambar 5.12). Ketiga model simulasi memberikan urutan energi total terendah yang sama untuk ketiga model: DY1, RY1, dan WT berturut-turut. Energi total untuk model DY1 stabil pada nilai -6335 kcal/mol, model RY1 pada -6175 kcal/mol, dan model WT pada -6025 kcal/mol.

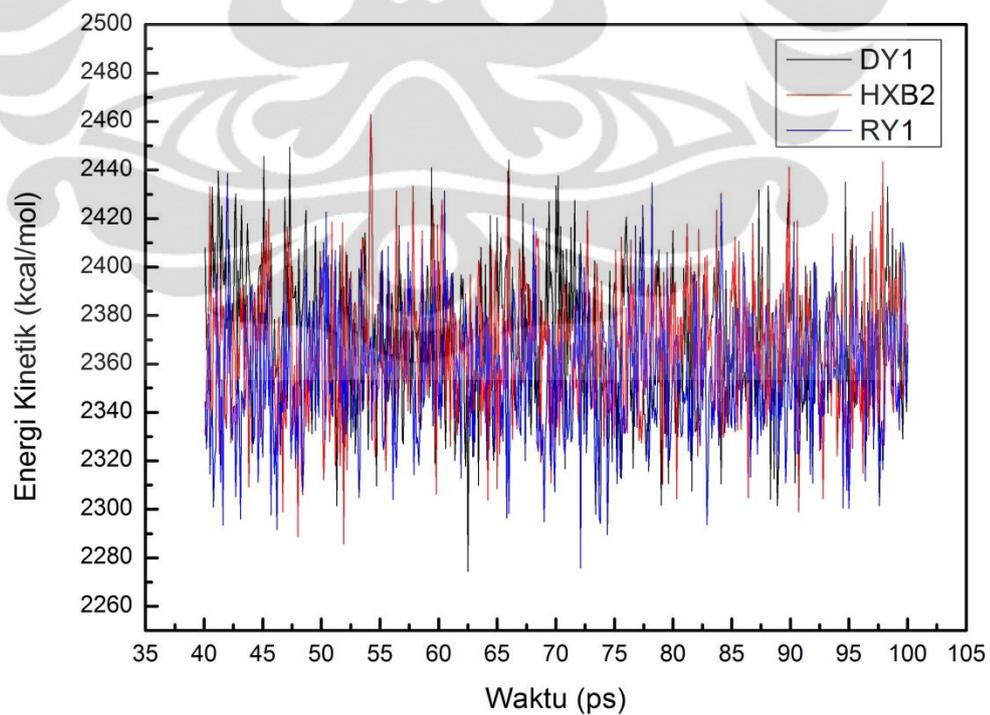
5.2.3. Production

Setelah tahap *equilibration*, simulasi dilanjutkan dengan tahap *production*. Pada tahap ini, sistem diberikan parameter dinamika NVT untuk keperluan simulasi dinamika molekuler (MDS). Parameter ini membuat temperatur dan volum sistem konstan, yaitu dengan mempertahankan sistem pada temperatur target dengan volum yang terkonservasi.

Temperatur sistem sepanjang waktu simulasi *production* menunjukkan nilai 298 K sesuai dengan nilai yang diinginkan (gambar 5.13). Energi kinetik sistem



Gambar 5.13 Kurva temperatur sistem pada tahap *production* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

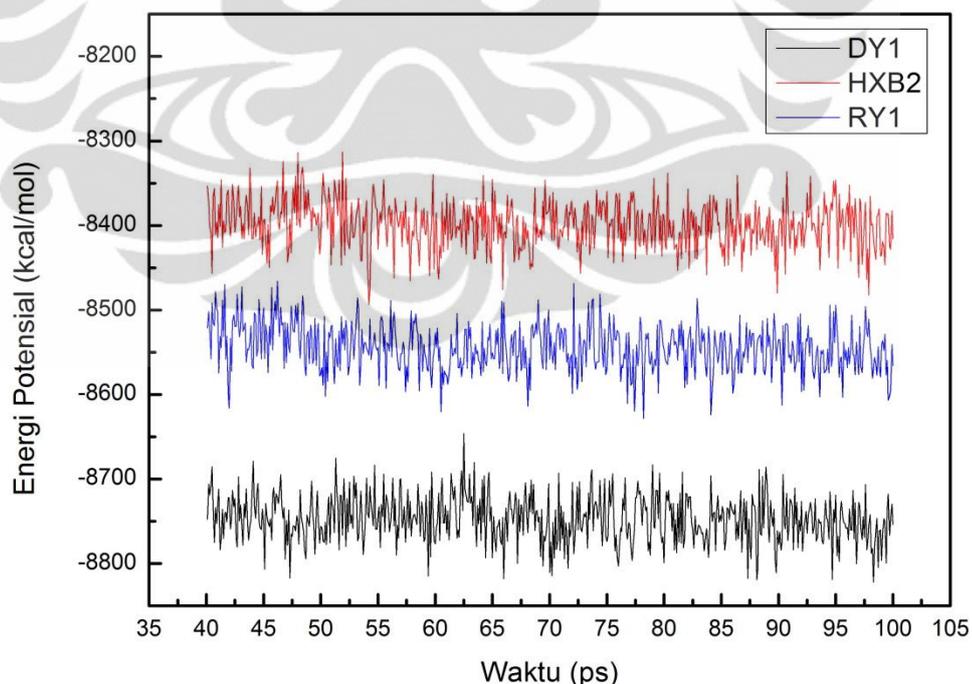


Gambar 5.14 Kurva energi kinetik sistem pada tahap *production* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

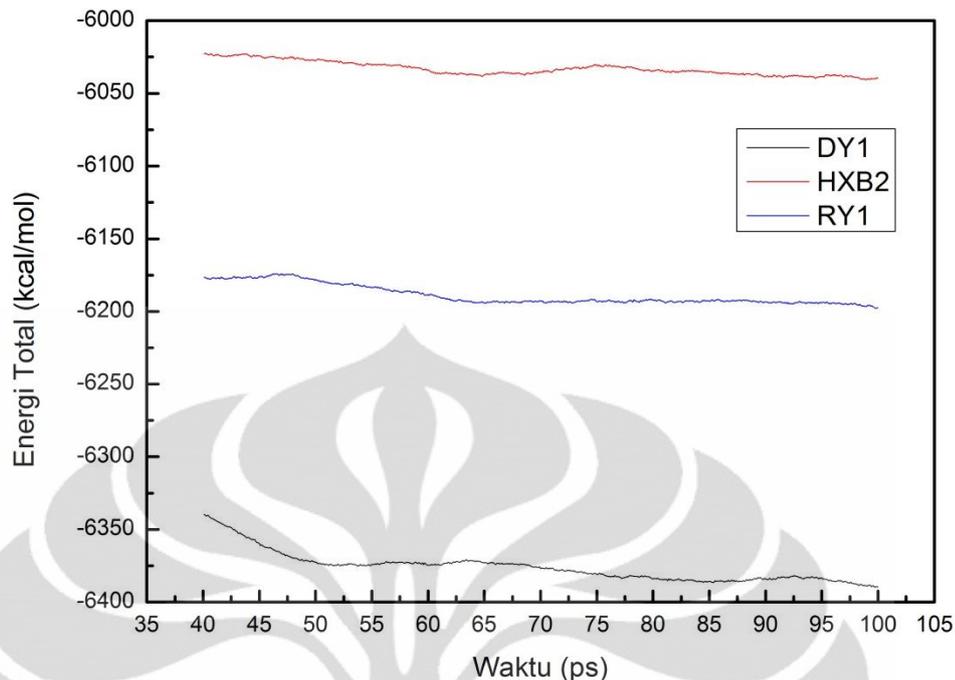
juga menunjukkan nilai yang stabil pada gambar 5.14. Hasil yang serupa juga didapatkan dari dua tahap simulasi sebelumnya, *heating* dan *equilibration*. Data energi kinetik ini menegaskan adanya hubungan antara energi kinetik dengan temperatur seperti yang telah dijelaskan pada bab 4. Dari gambar 5.14 ditunjukkan bahwa nilai energi kinetik sistem untuk ketiga model berada pada nilai -2360 kcal/mol.

Energi potensial sistem sepanjang tahap *production* (gambar 5.15) masih memiliki perbedaan nilai. Model DY1 tetap memiliki nilai lebih rendah bila dibandingkan dengan model RY1 dan WT. Nilai energi potensial model DY1 berada pada nilai -8750 kcal/mol, model RY1 pada nilai -8550 kcal/mol, dan model WT pada nilai -8400 kcal/mol. Nilai tersebut lebih rendah pada dua tahap sebelumnya.

Energi potensial ini berkaitan dengan struktur model. Semakin rendah energi potensial mengindikasikan struktur yang semakin stabil. Sebelum simulasi dilakukan, semua struktur berada dalam keadaan ideal, yaitu tanpa adanya



Gambar 5.15 Kurva energi potensial sistem pada tahap *production* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)



Gambar 5.16 Kurva energi total sistem pada tahap *production* untuk ketiga model (WT, RY1, dan DY1)

pengaruh temperatur. Untuk mendekati simulasi dengan keadaan riil pada eksperimen, parameter temperatur ditambahkan sejak tahap *heating*. Karena pemberian temperatur, terjadi pergerakan struktur yang dapat mempengaruhi interaksi antar molekul. Oleh karena itu untuk mendapatkan hasil analisa yang baik diperlukan keadaan struktur yang cukup stabil.

Energi total sistem berbeda untuk ketiga model, dengan model DY1 memiliki energi total terendah bila dibandingkan dengan model RY1 dan WT (gambar 5.16). Nilai ini berkaitan dengan rendahnya nilai potensial dari ketiga sistem. Model DY1 memiliki energi total sistem berada pada nilai -6375 kcal/mol, model RY1 berada pada nilai -6175 kcal/mol, dan model WT sebesar -6025 kcal/mol.

Setelah tahap *production* dilakukan, perubahan nilai energi memperlihatkan bahwa keadaan sistem semakin stabil. Pada akhir simulasi, energi akhir total sistem memberikan nilai energi terendahnya pada model DY1 dengan -6389,69 kcal/mol. Nilai tersebut lebih rendah 350,25 kcal/mol dari WT dan 192,08

Tabel 5.4 Data energi ketiga model pada akhir simulasi

	Energi Total Akhir (E_{tot}) (kcal/mol)	Energi Potensial Akhir (E_{pot}) (kcal/mol)	Energi Kinetik Akhir (E_{kin}) (kcal/mol)	Energi Ikatan Bebas (ΔG) (kcal/mol)
WT	-6039,44	-8415,64	2376,20	-83,12
RY1	-6197,61	-8566,29	2368,69	-89,98
DY1	-6389,69	-8754,10	2364,41	-87,96

kcal/mol dari pasien RY1. Berdasarkan nilai energi total tersebut, model kedua pasien memberikan kestabilan yang lebih baik dari WT.

Hasil pengamatan dari nilai energi potensial ketiga model, model DY1 memiliki energi terendah yaitu sebesar -8754,10 kcal/mol. Untuk energi kinetik, model WT memiliki nilai energi yang paling tinggi 2376,20 kcal/mol, sedangkan model DY1 memiliki nilai energi yang paling rendah 2364,41 kcal/mol. Nilai energi kinetik yang tinggi menunjukkan bahwa pergerakan struktur tersebut semakin tinggi dan dapat dikaitkan dengan kestabilan struktur yang kurang baik.

Energi bebas ikatan (Gibbs) berkaitan dengan kuat-lemahnya interaksi antara HIV protease dengan inhibitor protease. Dari hasil akhir simulasi diperoleh nilai energi bebas ikatan paling minimum dimiliki oleh model RY1 dengan -89,98 kcal/mol, dan diikuti oleh model DY1 sebesar -87,96 kcal/mol. Dalam studinya Ohtaka dkk.^[45] melihat nilai energi bebas ikatan dari WT dan dua mutan (I50V, V82F/I84V) terhadap APV secara eksperimental. Berdasarkan studinya, energi bebas ikatan WT yang didapatnya sebesar -13,2 kcal/mol. Perbedaan nilai Ohtaka dkk. dengan hasil studi ini dapat dipahami mengingat studi komputasi ini menggunakan simulasi model molekuler dengan pendekatan volume molekul (GBMV). Metode GBMV hanya memperhitungkan nilai konstanta dielektrik berdasarkan lingkup volume sistem. Akibatnya interaksi Coulomb jarak jauh antara PR-inhibitor akan memperbesar kesalahan perhitungan energi bebas ikatan. Hal ini dikarenakan tidak diperhitungkannya konsentrasi ion pada pelarut yang dapat berperan sebagai *shielding* terhadap interaksi elektrostatik tersebut.^[86] Pendekatan sejenis (PBSA) juga diperhitungkan oleh Kitiyaporn dkk.^[6] antara

WT dengan inhibitor SQV dan memberikan nilai energi bebas ikatan dalam orde yang mencapai -90 kcal/mol. Sehingga dapat dikatakan energi bebas ikatan menggunakan pendekatan studi ini masih dapat diterima.

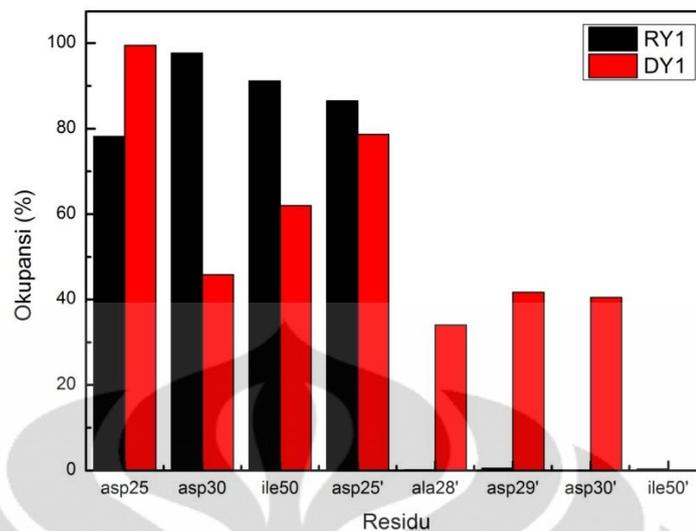
Dalam analisisnya, Kitiyaporn dkk.^[6] menggunakan pendekatan kelipatan K_i ^[44] dari energi bebas ikatan hasil simulasinya. Untuk nilai K_i dari WT-APV, telah diberikan pada studi Shen dkk.^[87] yaitu 0,6 nM. Jika mengacu pada nilai ini, maka RY1 lebih dapat menerima APV daripada WT dalam orde 11-kali lipat, sedangkan DY1 dalam orde 8-kali lipat. Orde ini didapatkan dari selisih nilai energi bebas ikatan dibagi dengan nilai K_i .

Inhibitor protease yang diberikan pada studi ini akan berinteraksi dengan beberapa residu yang terdapat pada sisi aktif HIV-1 PR. Interaksi ini dapat diamati dalam bentuk ikatan hidrogen antara inhibitor dengan residu HIV protease. Ikatan hidrogen ini tidak muncul di sepanjang simulasi, diakibatkan gerak antar molekul karena pengaruh temperatur. Hal ini dapat mempengaruhi eksistensi ikatan hidrogen karena perubahan jarak.

5.2.4. Pengaruh Struktural Model Kedua Mutan Terhadap Ikatan Hidrogen

Kuat-lemahnya ikatan hidrogen yang terbentuk dapat diamati melalui persentase okupansinya. Ikatan hidrogen dapat dikatakan kuat jika memiliki persentase okupansi yang tinggi ($\geq 80\%$)^[88]. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ikatan hidrogen stabil terbentuk di sepanjang simulasi. Pada model RY1, terdapat tujuh residu yang memiliki ikatan hidrogen selama simulasi berlangsung. Tiga dari tujuh residu: asp30, ile50, dan asp25' merupakan residu dengan okupansi tinggi (gambar 5.17). Ketiga residu tersebut diketahui memiliki kontribusi pada awal dan akhir simulasi (gambar 5.18 (a)). Untuk ikatan hidrogen pada residu asp25, diketahui muncul pada awal simulasi, namun ikatan tersebut tidak muncul pada akhir simulasi. Ikatan hidrogen yang muncul pada residu ala28', asp29', dan ile50' memiliki persentase okupansi yang sangat kecil untuk dapat memberikan pengaruh yang signifikan pada interaksi yang dimiliki oleh model RY1.

Berbeda pada model DY1, persentase okupansi tinggi hanya dimiliki oleh ikatan hidrogen pada residu asp25. Ikatan hidrogen pada residu ile50, asp25' dan

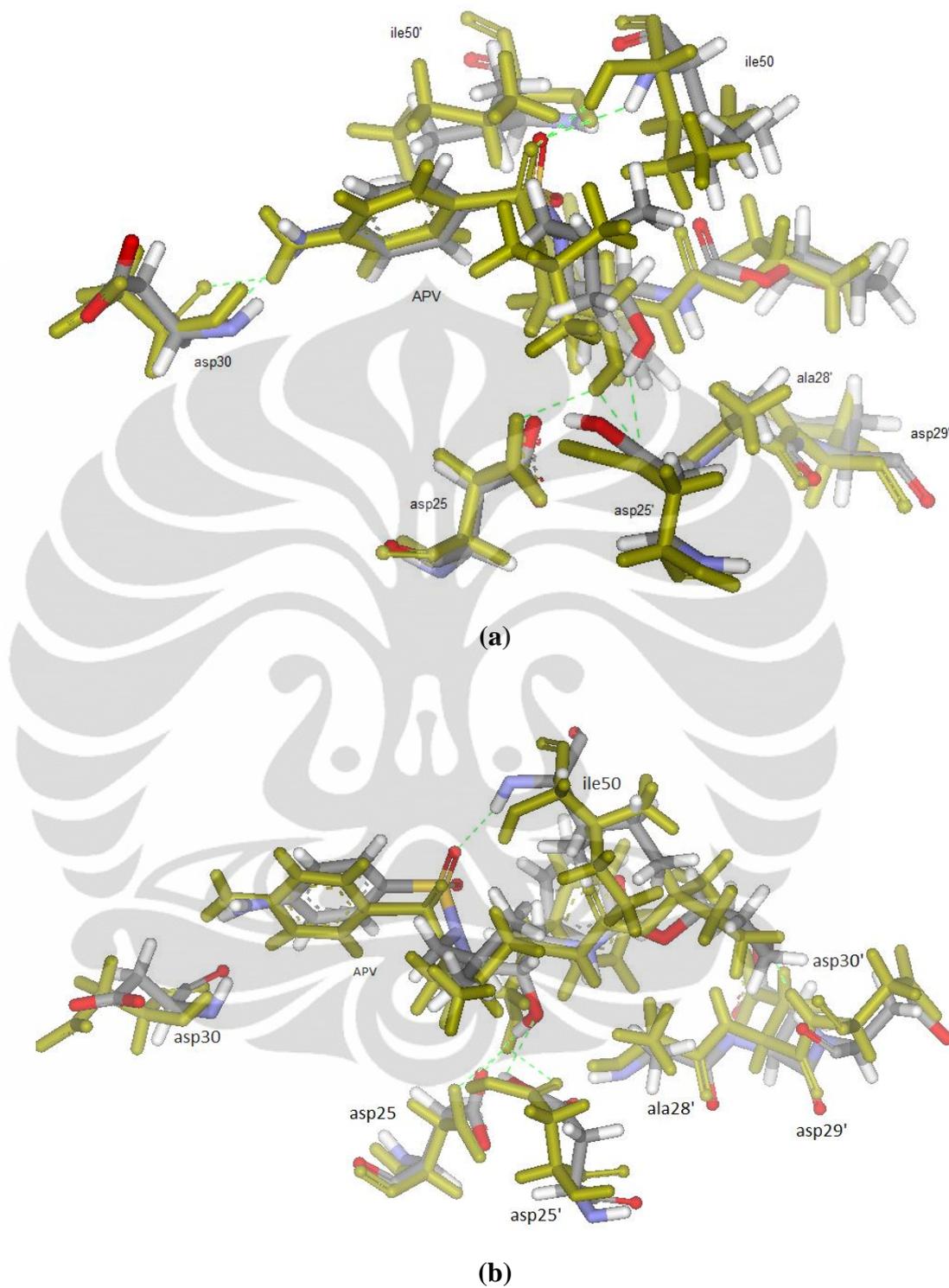


Gambar 5.17 Persentase okupansi pada RY1 dan DY1. Persentase okupansi tinggi ditandai dengan nilainya yang lebih besar dari 80%

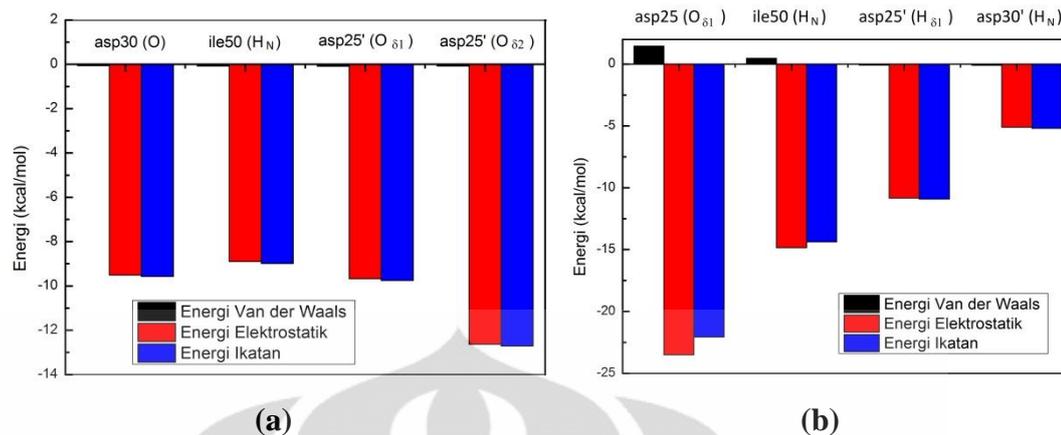
asp30' memiliki persentase okupansi di bawah 80% namun diketahui memberikan pengaruh bagi interaksi antara DY1 dengan APV. Pada awal simulasi ikatan hidrogen hanya terbentuk pada residu asp25 dan asp25' saja (gambar 5.18 (b)). Namun ketika simulasi selesai, ikatan hidrogen yang terbentuk menjadi empat ikatan hidrogen yang berada pada residu asp25, ile50, asp25' dan asp30'.

Dari tinjauan energi ikatan hidrogen yang terbentuk pada model RY1, ikatan yang stabil ditunjukkan pada seluruh residu (gambar 5.19 (a)). Ikatan hidrogen paling stabil dimiliki oleh residu asp25'. Hal ini ditandai dengan nilai energinya yang bernilai paling negatif, serta memiliki dua ikatan hidrogen pada posisi atom yang berbeda. Interaksi yang muncul pada atom $O_{\delta 1}$ dari residu asp25 hanya memberikan pengaruh pada awal simulasi. Hal ini ditandai dengan menghilangnya ikatan hidrogen antara atom $O_{\delta 1}$ asp25 dengan APV.

Sedangkan untuk model DY1, berdasarkan tinjauan energinya ikatan hidrogen paling stabil dimiliki oleh atom $O_{\delta 1}$ pada residu asp25. Residu asp25' yang memiliki okupansi tinggi ternyata memiliki ikatan hidrogen yang tidak terlalu kuat pada atom $H_{\delta 1}$. Hal ini disebabkan ikatan hidrogen yang muncul



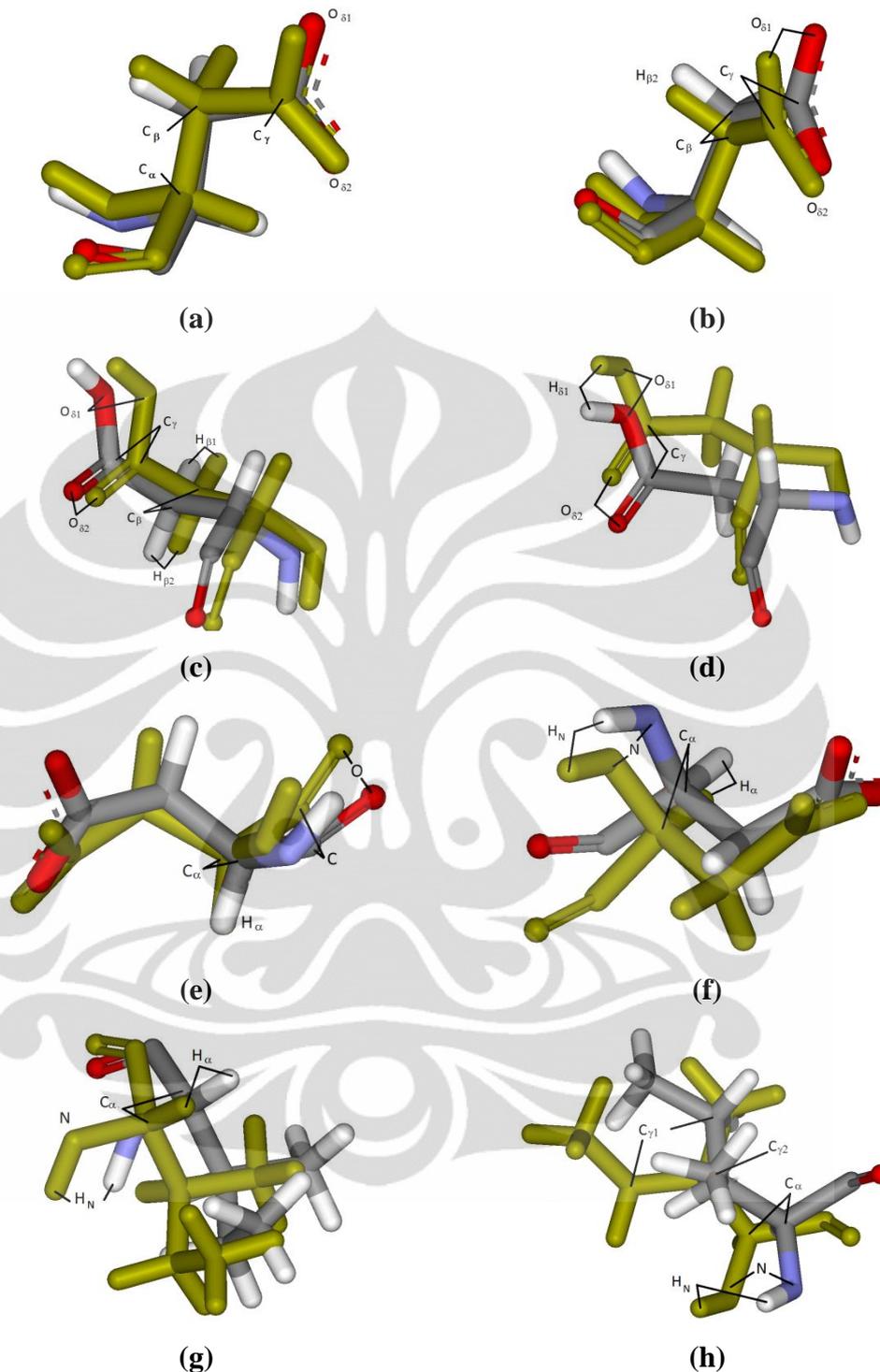
Gambar 5.18 Merupakan bagian sisi aktif dari protease. Yang ditampilkan pada gambar hanyalah APV dan residu protease yang berikatan dengan APV dari (a) RY1 dan (b) DY1.



Gambar 5.19 Komponen energi dari ikatan hidrogen yang terbentuk antara APV dengan (a) RY1 dan (b) DY1 di akhir simulasi

sebelumnya berada pada posisi O_{δ2}. Nilai energi interaksi H_{δ1} menunjukkan bahwa ikatan hidrogen mulai menstabilkan diri sehingga mampu menggantikan ikatan hidrogen pada O_{δ2} yang hilang. Untuk okupansi dan energi interaksi yang rendah dari atom H_N (ile50) dan H_N (asp30') menunjukkan bahwa ikatan hidrogen baru terbentuk pada saat mendekati akhir simulasi.

Pada residu asp25, ikatan hidrogen terbentuk antara atom O_{δ1} pada model RY1 dengan atom H₃₅ pada APV. Ketika awal simulasi, ikatan hidrogen masih ditemukan. Namun, ketika simulasi berakhir ikatan tersebut hilang. Jarak antara kedua atom menjadi 2,86 Å atau mengalami perubahan sebesar 0,71 Å dari posisi semula. Jika diperhatikan pada gambar 5.20 (a), posisi atom O_{δ1} pada residu asp25 bergerak mendekat ke arah inhibitor APV sejauh 0,7 Å. Sudut yang dibentuk oleh atom-atom C_αC_βC_γ melebar ke sisi APV sebesar 2,68°. Selain itu bidang yang dibentuk oleh O_{δ1}C_γO_{δ2} juga terpuntir pada acuan O_{δ1}C_γC_βC_α sebesar 20,72°. Perubahan ini menyebabkan atom O_{δ1} semakin mendekat dengan APV. Puntiran ini muncul akibat adanya ikatan hidrogen yang terbentuk antara atom O_{δ2} (asp25) dengan atom H_N (thr26) dan atom H_N (gly27). Hanya saja pergerakan dari atom H₃₅ pada inhibitor pada APV membuat jarak antara atom OD1 dengan H₃₅ menjadi semakin jauh. Secara struktural, residu asp25 tidak mengalami banyak pergeseran. Hal ini diindikasikan dari RMSD-nya yang hanya sebesar 0,2 Å.



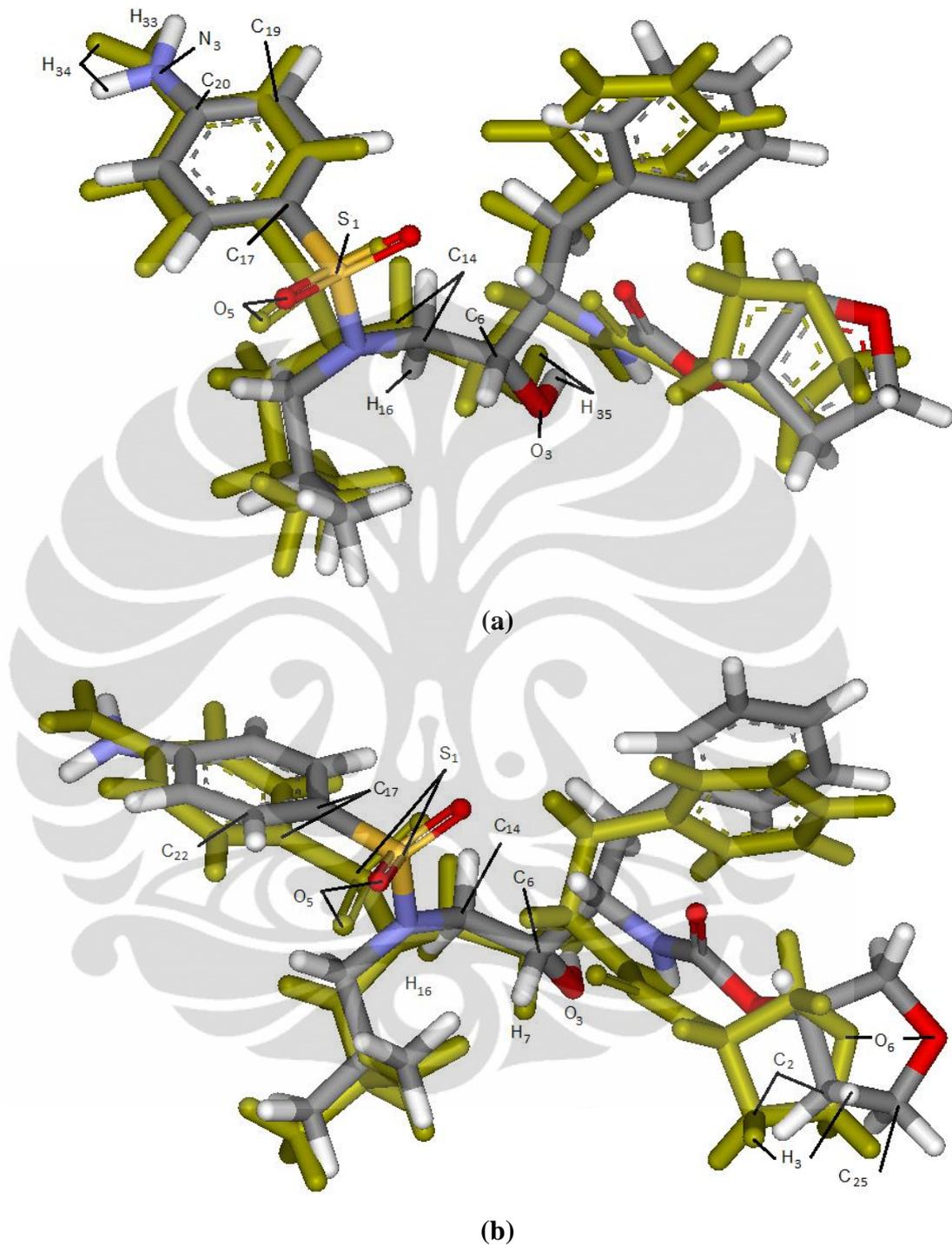
Gambar 5.20 Struktur residu yang berikatan hidrogen dengan APV. Kolom di sisi kiri berasal dari RY1 dan di sisi kanan berasal dari DY1. Gambar (a) dan (b) adalah residu asp25; (c) dan (d) adalah residu asp25'; (e) adalah residu asp30; (f) adalah residu asp30'; (g) dan (h) adalah residu ile50.

Atom H_{35} pada APV (gambar 5.21 (a)) memberikan pengaruh yang cukup tinggi terhadap interaksi antara model RY1 dengan APV. Hal ini dapat diamati dari tiga interaksi yang muncul berupa ikatan hidrogen dengan RY1, yaitu pada residu asp25 ($O_{\delta 1}$), dan residu asp25' ($O_{\delta 1}$ dan $O_{\delta 2}$). Atom H_{35} bergeser menjauh diakibatkan oleh sudut puntir $H_{35}O_3C_6C_{14}$ yang berubah sebesar $7,16^\circ$. Sedangkan sudut yang dibentuk oleh $O_3C_6C_{14}$ mengalami penyusutan sebesar $3,5^\circ$ yang memberikan kontribusi bagi atom H_{35} untuk mendekati model RY1. Perubahan sudut puntir cukup dominan sehingga mampu menggeser posisi atom H_{35} sejauh $0,96 \text{ \AA}$.

Untuk model DY1, ikatan hidrogen terbentuk antara atom $O_{\delta 1}$ (asp25) dengan atom H_{35} dari APV. Ikatan hidrogen pada awal simulasi terbentuk dengan jarak ikatan sebesar $2,02 \text{ \AA}$ dan menjadi $1,84 \text{ \AA}$ pada akhir simulasi atau memendek sebesar $0,18 \text{ \AA}$. Ikatan hidrogen ini memendek karena sudut puntir $O_{\delta 1}C_\gamma O_{\delta 2}$ yang melebar sejauh $5,57 \text{ \AA}$ disertai dengan melebarnya sudut puntir $O_{\delta 1}C_\gamma C_\beta H_{\beta 2}$ sejauh $16,6 \text{ \AA}$. Perubahan sudut puntir tersebut menggeser posisi atom $O_{\delta 1}$ sebesar 1 \AA mendekat ke arah APV. Struktur asp25 dari model DY1 tidak mengalami banyak perubahan selain perubahan sudut yang melibatkan atom $O_{\delta 1}$ (gambar 5.20 (b)). Hal ini dibuktikan dari pergeseran RMSD yang hanya sebesar $0,2 \text{ \AA}$.

Model APV yang berikatan dengan DY1 ditunjukkan pada gambar 5.21 (b). Atom H_{35} pada amprenavir berikatan dengan atom $O_{\delta 1}$ (asp25) dan $O_{\delta 2}$ (asp25') di awal simulasi. Hanya saja ikatan dengan atom $O_{\delta 2}$ menghilang pada akhir simulasi. Bidang $H_{35}O_3C_6H_7$ diketahui memiliki perubahan sudut puntir sebesar $93,06^\circ$. Perubahan sudut puntir ini sangat mempengaruhi posisi atom H_{35} terhadap model DY1. Sudut yang dibentuk oleh $H_{35}O_3C_6$ juga tercatat membesar $2,47^\circ$. Perubahan ini membuat atom H_{35} bergeser sejauh $0,74 \text{ \AA}$, namun ikatan hidrogen antara atom $O_{\delta 1}$ dan H_{35} tetap terbentuk. Sebaliknya, pergeseran ini menyebabkan hilangnya ikatan hidrogen yang terbentuk antara atom $O_{\delta 2}$ dengan H_{35} .

Pada residu asp25' dari RY1, ditemukan dua ikatan hidrogen yang terbentuk pada atom $O_{\delta 1}$ dan $O_{\delta 2}$. Kedua atom tersebut memiliki ikatan hidrogen dengan



Gambar 5.21 Struktur APV yang berada pada sisi aktif (a) RY1 dan (b) DY1

atom H_{35} dari APV. Jarak ikatan hidrogen yang terbentuk pada atom $O_{\delta 1}$ mengalami perubahan sebesar $0,02 \text{ \AA}$. Jika diamati pada gambar 5.20 (c) posisi atom $O_{\delta 1}$ mengalami pergeseran yang cukup signifikan yaitu sebesar $0,85 \text{ \AA}$. Pergeseran atom $O_{\delta 1}$ lebih dipengaruhi oleh sudut puntir $O_{\delta 1}C_{\gamma}C_{\beta}H_{\beta 2}$ sebesar

19,44°. Sedangkan sudut yang dibentuk oleh $O_{\delta 1}C_{\gamma}C_{\beta}$ mengalami perubahan sebesar 2,89° hanya memberikan sedikit pengaruh mendekatnya $O_{\delta 1}$ terhadap APV.

Untuk ikatan hidrogen yang terbentuk pada atom $O_{\delta 2}$ (model RY1), tercatat mengalami pergeseran sebesar 0,41 Å. Pergeseran tersebut akibat sudut puntir $O_{\delta 2}C_{\gamma}C_{\beta}H_{\beta 1}$ yang menjadi lebih besar sejauh 11,41°. Sudut yang dibentuk oleh $O_{\delta 2}C_{\gamma}C_{\beta}$ juga mengalami perubahan sebesar 3,37°. Pengaruh perubahan sudut ini mengakibatkan atom $O_{\delta 2}$ bergeser sejauh 0,57 Å dari posisi semula. Secara struktural, RMSD dari residu asp25' sebesar 0,21 Å tidak mempengaruhi posisi atom $O_{\delta 1}$ dan $O_{\delta 2}$ secara signifikan.

Pada model DY1, residu asp25' memiliki ikatan hidrogen yang terbentuk pada atom $H_{\delta 1}$ dan $O_{\delta 2}$ yang muncul secara bergantian pada awal dan akhir simulasi. Ikatan hidrogen pada atom $H_{\delta 1}$ baru terbentuk pada akhir simulasi dengan jarak 2,23 Å dengan atom O_3 pada APV. Jarak antara $H_{\delta 1}$ dengan O_3 berkurang 0,98 Å dari jarak awal 3,21 Å (gambar 5.20 (d)). Pergeseran ini disebabkan oleh sudut yang dibentuk oleh $H_{\delta 1}O_{\delta 1}C_{\gamma}$ yang berkurang 6,78°. Perubahan sudut puntir sebesar 34,61° dari $H_{\delta 1}O_{\delta 1}C_{\gamma}O_{\delta 2}$ juga berperan dalam mengubah posisi atom $H_{\delta 1}$ sebesar 1,04 Å.

Atom $O_{\delta 2}$ dari residu yang sama memiliki ikatan hidrogen yang menjauh 0,3 Å menjadi 2,77 Å. Pergeseran ini menyebabkan ikatan hidrogen yang terbentuk menghilang. Perubahan sudut dari $O_{\delta 2}C_{\gamma}O_{\delta 1}$ tercatat berubah 0,8° menjadi 122,16°. Perubahan tersebut menyebabkan pergeseran atom $O_{\delta 2}$ menjauhi APV hingga 1,14 Å. Pergeseran residu asp25' terhadap $H_{\delta 1}$ dan $O_{\delta 2}$ hanya berkontribusi sebesar 0,25 Å yang terlihat dari RMSD-nya.

Atom H_{35} dari APV memiliki ikatan hidrogen dari $O_{\delta 2}$ pada asp25' menjadi berikatan dengan $O_{\delta 1}$ pada asp25. Posisi atom H_{35} ini diketahui bergeser 1,32 Å dari posisi semula. Perubahan sudut puntir dari $O_3C_6C_{14}H_{16}$ sebesar 41,93° memberikan pengaruh yang sangat signifikan. Akibat sudut puntir ini terjadi perubahan posisi atom H_{35} dan atom O_3 pada APV sehingga mempengaruhi tiga ikatan hidrogen yang terbentuk dengan asp25 dan asp25'. Perubahan sudut yang

dibentuk oleh $O_3C_6C_{14}$ sebesar $2,09 \text{ \AA}$ juga memberikan pengaruh posisi O_3 terhadap $H_{\delta 1}$ untuk membentuk ikatan hidrogen.

Residu ke-30 dari model RY1 memiliki ikatan hidrogen yang terbentuk pada awal dan akhir simulasi. Ikatan ini terbentuk pada atom O dengan atom H_{33} pada APV. Ikatan hidrogen ini berubah jaraknya dari $1,88 \text{ \AA}$ pada awal simulasi menjadi $2,19 \text{ \AA}$ atau menjauh $0,31 \text{ \AA}$. Perubahan ini disebabkan oleh pergeseran atom O sebesar $0,94 \text{ \AA}$ menjauhi APV (gambar 5.20 (e)). Perubahan sudut puntir $OCC_{\alpha}H_{\alpha}$ sebesar $0,33^{\circ}$ memberikan pengaruh terhadap pergeseran atom O pada residu ini. Ikatan hidrogen tetap muncul karena sudut OCC_{α} yang melebar $0,55^{\circ}$ berperan mempertahankan posisi atom O terhadap atom H_{33} . Analisa ini diperkuat dengan nilai RMSD residu asp30 yang hanya sebesar $0,3 \text{ \AA}$.

Atom H_{33} pada APV yang memiliki ikatan hidrogen dengan atom O asp30 (RY1) mengalami pergeseran sebesar $0,64 \text{ \AA}$. Pergeseran ini tidak disebabkan oleh perpindahan bidang $H_{33}N_3H_{34}$, karena posisi atom N_3 sebelum dan sesudah simulasi berhimpit. Pergeseran yang terjadi muncul akibat perubahan sudut puntir $H_{33}N_3C_{19}C_{20}$ sebesar $65,36^{\circ}$ menjauhi residu asp30. Sudut yang dibentuk oleh $H_{33}N_3H_{34}$ diketahui memiliki perubahan sebesar $5,84^{\circ}$. Namun atom H_{33} mengalami pergeseran yang cukup kecil terhadap asp30, sehingga masih terbentuk ikatan hidrogen.

Berbeda dengan model DY1, ikatan hidrogen terbentuk bukan pada residu ke-30 rantai A. Ikatan hidrogen terbentuk pada asp30' yang terletak pada rantai B. Pada asp30', ikatan hidrogen terbentuk menjelang akhir simulasi antara atom H_N dengan atom O_6 (APV). Posisi kedua atom mendekat $0,52 \text{ \AA}$. Sehingga pada akhir simulasi jarak kedua atom menjadi $2,42 \text{ \AA}$ dan ikatan hidrogen dapat terbentuk. Atom H_N yang bergeser $1,02 \text{ \AA}$ dari posisi semula lebih diakibatkan oleh pergeseran RMSD residu asp30' sebesar $0,9 \text{ \AA}$ (gambar 5.20 (f)). Pergerakan atom H_N yang mendekat ke atom O_6 juga dipengaruhi oleh perubahan sudut puntir $H_NNC_{\alpha}H_{\alpha}$ sebesar $3,73^{\circ}$. Sedangkan sudut yang dibentuk oleh H_NNC_{α} tidak mempengaruhi pergeseran atom H_N secara signifikan karena perubahannya tercatat hanya sebesar $0,51^{\circ}$.

Pergerakan atom O_6 pada APV diketahui tercatat sejauh $1,7 \text{ \AA}$. Perubahan besar sudut yang dibentuk oleh $O_6C_{25}C_2$ mengecil $0,18^\circ$, dan diperkirakan tidak mempengaruhi pergerakan O_6 secara signifikan. Perubahan sudut puntir yang langsung melibatkan atom O_6 ($O_6C_{25}C_2H_3$) sebesar $23,92^\circ$ ternyata juga tidak berkontribusi dalam pergeseran tersebut. Perpindahan atom O_6 lebih diakibatkan adanya puntiran pada sumbu C_5C_6 sehingga mempengaruhi seluruh atom yang berada di sisi kanan APV (gambar 5.21 (b)) termasuk O_6 . Pergerakan dari atom H_N (asp30' DY1) dan atom O_6 membuat posisi kedua atom tersebut saling mendekat sehingga ikatan hidrogen dapat terbentuk.

Residu ile50 (RY1) berikatan melalui atom H_N dengan atom O_5 pada APV. Ikatan hidrogen yang terbentuk sebelum simulasi berjarak $1,94 \text{ \AA}$, namun pada akhir simulasi menjauh sebesar $0,52 \text{ \AA}$. Posisi atom H_N yang menjauh ini disebabkan oleh pergeseran posisi residu ile50 (gambar 5.20 (g)) sehingga membuat atom H_N bergeser sejauh $0,78 \text{ \AA}$. Nilai ini sangat dipengaruhi oleh pergeseran rata-rata struktur residu ile50 sebesar $0,78 \text{ \AA}$. Meskipun menjauh, ikatan hidrogen tetap terbentuk karena APV juga bergeser pada arah yang sama. Selain itu sudut yang dibentuk oleh H_NNC_α yang melebar $8,43^\circ$ berperan mempertahankan ikatan hidrogen antara ile50 dan APV. Sedangkan sudut puntir $H_NNC_\alpha H_\alpha$ yang mengalami perubahan $1,48^\circ$ hanya memberikan sedikit kontribusi perubahan posisi H_N .

Untuk residu ile50 pada model DY1 (gambar 5.20 (h)), ikatan hidrogen antara atom H_N dengan atom O_5 tidak terbentuk pada awal simulasi. Ikatan hidrogen baru muncul pada akhir simulasi dengan jarak $1,91 \text{ \AA}$ atau mendekat sejauh $0,71 \text{ \AA}$ dari posisi semula. Mendekatnya jarak kedua atom ini sangat dipengaruhi oleh pergeseran residu. Dugaan ini diperkuat dengan nilai RMSD residunya yang juga bernilai $0,71 \text{ \AA}$. Sudut puntir terhadap sumbu $C_\alpha C_\beta$ membuat bidang yang dibentuk oleh $C_{\gamma 1}$ dan $C_{\gamma 2}$ berpindah cukup jauh. Meski begitu, sudut puntir $H_NNC_\alpha C_\beta$ tercatat hanya sebesar $35,18^\circ$, bersamaan dengan sudut bidang H_NNC_α yang menyempit $7,62^\circ$. Perubahan sudut ini membuat atom H_N menjadi lebih dekat dengan atom O_5 sejauh $1,62 \text{ \AA}$ sehingga masih dapat terbentuk ikatan hidrogen.

Residu ile50 dari kedua struktur memiliki ikatan dengan atom O₅ pada APV. Pada model APV yang berikatan dengan RY1, sudut yang dibentuk oleh O₅S₁C₇ mengecil 0,93° dari keadaan semula. Sudut ini membuat atom O₅ mendekat dengan atom H_N pada residu ile50. Pergeseran atom O₅ sendiri tercatat sebesar 0,78 Å. Pergeseran ini lebih dipengaruhi oleh perubahan sudut puntir H₃₃N₃C₂₀C₁₉ sebesar 6,73° yang juga membuat posisi atom S₁ ikut bergeser. Pergeseran atom O₅ pada APV membuat ikatan hidrogen tetap terbentuk. Hal ini dikarenakan pergeseran tersebut mengimbangi perubahan posisi atom H_N pada ile50 yang juga bergerak menjauhi APV.

Hal yang sama juga ditemui pada APV yang berikatan dengan DY1. Atom O₅ mengalami pergeseran yang membuat posisinya terhadap atom H_N (ile50) menjadi lebih dekat sehingga terbentuk ikatan hidrogen. Tercatat posisi atom O₅ bergeser 1,29 Å dari posisi semula. Pergeseran ini terkait dengan perubahan sudut puntir O₅S₁C₁₇C₂₂ sebesar 26,03°. Sedangkan sudut yang dibentuk oleh O₅S₁C₁₇ diketahui berkurang sebesar 2,97° namun tidak memberikan pengaruh yang cukup signifikan terhadap O₅.

5.3. Analisa Struktural dari Mutasi Residu

Mutasi yang terjadi pada model RY1 dan DY1 hanya memiliki kemiripan pada delapan residu (tabel 5.5). Selain itu terdapat mutasi yang hanya dimiliki oleh RY1 saja atau DY1 saja. Susunan dari HIV-1 PR yang merupakan rangkaian homodimerik juga membuat mutasi yang terjadi berlaku untuk rantai A dan rantai B dari protease. Kedua faktor ini membuat pengaruh aktivitas dari kedua model menjadi berbeda.

5.3.1. L10I

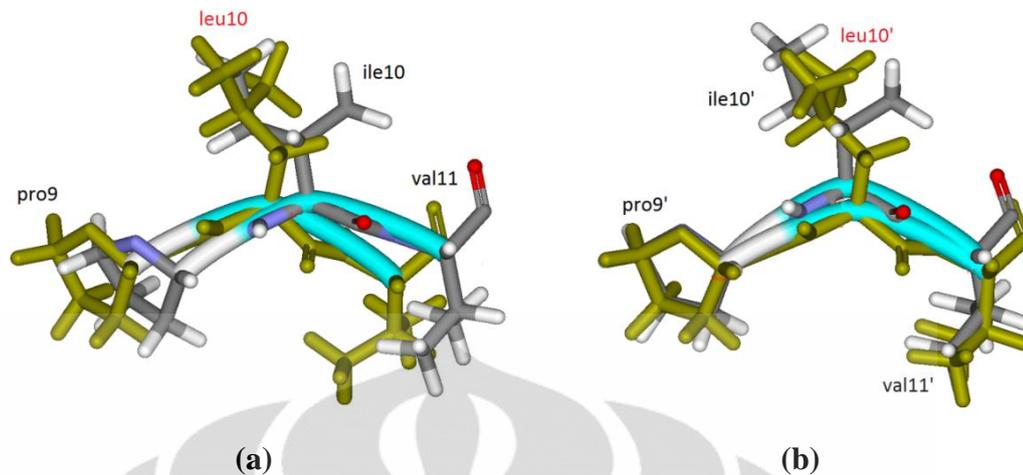
Residu ke-10 mengalami mutasi dari asam amino leusin menjadi isoleusin (L10I). Mutasi pada residu ke-10 hanya ditemukan pada PR DY1. Tercatat bahwa mutasi L10I termasuk ke dalam mutasi minor yang dapat menyebabkan meningkatnya resistensi protease terhadap obat bila muncul bersamaan dengan mutasi lain. Mutasi ini tidak menyebabkan terjadinya perubahan jumlah atom, baik leusin maupun isoleusin memiliki 22 atom. Selain jumlah atom yang sama volum,

**Tabel 5.5 Data sifat dari seluruh mutasi yang ditemukan pada model PR.
Keberadaan mutasi pada tiap PR ditandai dengan tanda centang (√)**

RY1	DY1	Mutasi	Polaritas	Hidrofobisitas	Muatan Rantai Samping
	√	L10I	nonpolar/nonpolar	3,8/4,5	netral/netral
√	√	I13V	nonpolar/nonpolar	4,5/4,2	netral/netral
	√	G16E	nonpolar/polar	-0,4/-3,5	netral/negatif
√	√	K20R	polar/polar	-3,9/-4,5	positif/positif
√	√	E35D	polar/polar	-3,5/-3,5	negatif/negatif
√	√	M36I	nonpolar/nonpolar	1,9/4,5	netral/netral
√	√	R41K	polar/polar	-4,5/-3,9	positif/positif
√		K45R	polar/polar	-3,9/-4,5	positif/positif
√		R57K	polar/polar	-4,5/-3,9	positif/positif
	√	I62V	nonpolar/nonpolar	4,5/4,2	netral/netral
√	√	H69K	polar/polar	-3,2/-3,9	netral/positif
	√	V77I	nonpolar/nonpolar	4,2/4,5	netral/netral
√	√	L89M	nonpolar/nonpolar	3,8/1,9	netral/netral
√	√	L97I	nonpolar/nonpolar	3,8/4,5	netral/netral

molekul dan massa molekul keduanya pun sama yaitu $166,7 \text{ \AA}^3$ dan 131 Da. Namun tingkat hidrofobisitas residu ini meningkat dari 3,8 menjadi 4,5. Asam amino leu dan ile juga diketahui memiliki sifat nonpolar dan memiliki muatan rantai samping yang bernilai netral.

Mutasi ini menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} dari residu ke-10 pada rantai A sejauh $1,01 \text{ \AA}$ (gambar 5.22 (a)). Asam amino pro9 tercatat hanya mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar $1,35 \text{ \AA}$. Selain pergeseran atom C_{α} , tidak ditemukan pengaruh lain seperti perubahan sudut puntir pada struktur pro9.



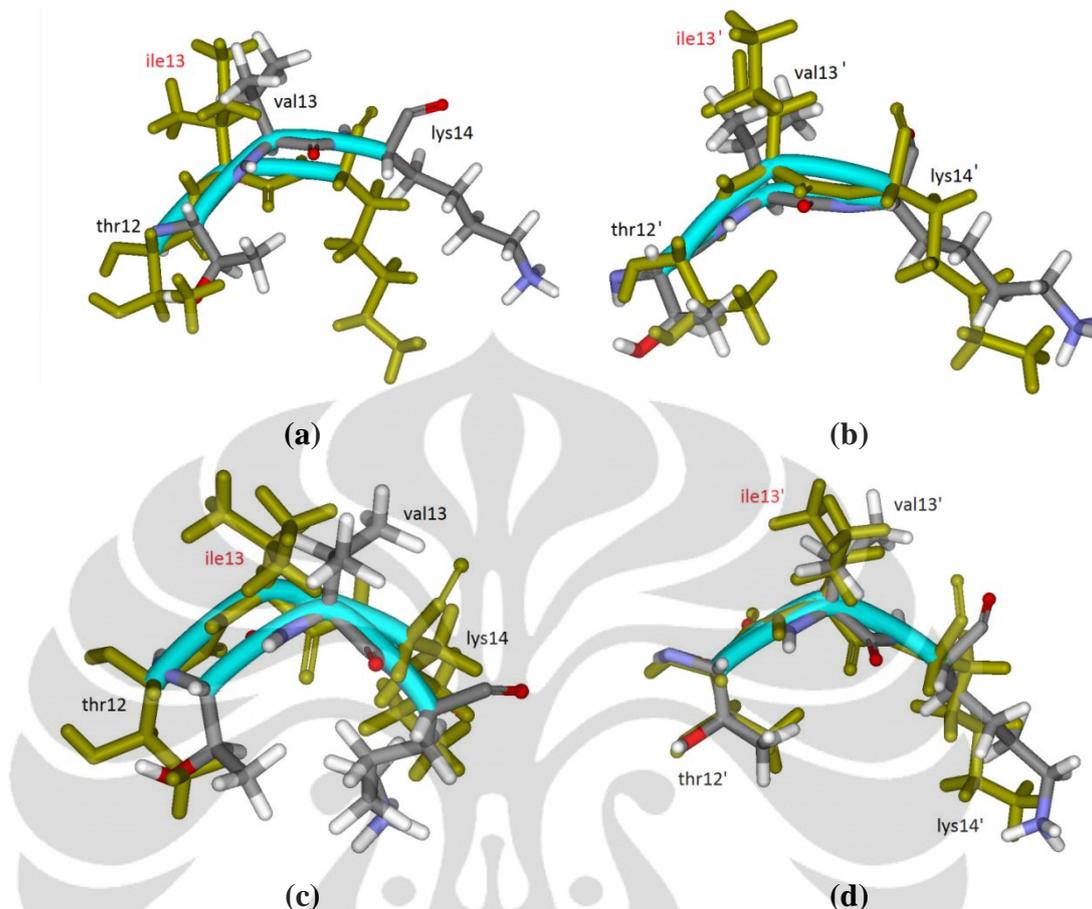
Gambar 5.22 Struktur residu 9-11 (DY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

Pergeseran paling besar teramati pada asam amino val11, yaitu sebesar 1,71 Å. Berbeda dengan pro9, asam amino val11 memiliki dua perubahan sudut puntir. Sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma 1}$ memiliki perubahan sebesar $20,96^{\circ}$, sedangkan sudut puntir terbesar berada pada $NC_{\alpha}CO$ sebesar $75,38^{\circ}$.

Gambar 5.22 (b) menunjukkan perubahan struktur yang terjadi pada rantai B. Berdasarkan pengamatan struktur *backbone*, perubahan struktur rantai B kurang signifikan bila dibandingkan dengan rantai A. Pada residu ke-10' terjadi pergeseran atom C_{α} yang tercatat sebesar 0,78 Å. Asam amino pro9' juga mengalami pergeseran atom karbon akibat mutasi yang terjadi. Pergeseran pada atom C_{α} yang tercatat pada pro9 sebesar 0,40 Å. Selain itu, terdapat perubahan sudut puntir pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta}$ sebesar $7,62^{\circ}$. Pergeseran yang terjadi pada asam amino val11' sebesar 0,55 Å. Sedangkan perubahan sudut puntir val11' terjadi pada sumbu NC_{α} sebesar $49,72^{\circ}$. Perubahan sudut puntir yang terjadi pada masing-masing residu pro9' dan val11' membantu mempertahankan posisi *backbone*.

5.3.2. I13V

Residu ke-13 mengalami mutasi dari asam amino isoleusin menjadi valin (I13V). Mutasi ini terjadi pada kedua PR. Atom penyusun residu berkurang dari 22 atom menjadi 19 atom. Pengurangan ini membuat massa molekul berkurang



Gambar 5.23 Struktur residu 12-14 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

dari 131 Da menjadi 117 Da dan volum molekul dari $166,7 \text{ \AA}^3$ menjadi 140 \AA^3 . Kedua asam amino ini diketahui bersifat nonpolar. Hanya saja mutasi I13V menyebabkan nilai hidrofobisitas yang berkurang dari 4,5 menjadi 4,2. Muatan rantai samping isoleusin dan valin tercatat memiliki nilai netral sehingga mutasi ini tidak memberikan perubahan interaksi dengan residu lain di sekitarnya.

Mutasi I13V pada rantai A dan rantai B memiliki pergeseran yang berbeda untuk kedua pasien. Gambar 5.23 (a) menunjukkan struktur mutasi I13V untuk rantai A dari PR RY1. Pada gambar tersebut menunjukkan terjadi pergeseran *backbone* ke arah asam amino lys14. Mutasi pada residu ke-13 membuat atom C_{α} pada bagian ini bergeser sejauh $2,02 \text{ \AA}$. Residu ini juga diketahui memiliki perputaran sudut puntir dari sumbu ikatan $C_{\alpha}C_{\beta}$ karena adanya perubahan asam amino ile menjadi val. Atom C_{α} dari asam amino thr12 juga diketahui bergeser sejauh

1,76 Å, dengan pengaruh mutasi pada residu ke-13 hanya membuat sudut puntir $C_{\beta}C_{\alpha}NH_N$ berubah sebesar $12,63^{\circ}$ mengarah pada residu ke-13. Atom C_{α} dari asam amino lys14 juga bergeser sejauh sekitar 1,69 Å akibat mutasi yang terjadi. Namun pengaruh terbesar pada asam amino lys14 adalah sudut puntir $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta 1}$ yang berubah $114,66^{\circ}$. Sehingga rantai atom $C_{\gamma}C_{\delta}C_{\epsilon}$ menjauhi residu ke-13. Perubahan puntir dari lys14 diduga berkontribusi terhadap pergeseran backbone yang terjadi pada residu ke-12, 13, dan 14 untuk rantai A pada PR.

Untuk rantai A dari PR DY1 (gambar 5.23 (c)) terlihat adanya pergeseran atom C_{α} dari posisi awal sejauh 1,78 Å untuk residu ke-13. Pengaruh mutasi terhadap asam amino thr12 membuat atom C_{α} bergeser sejauh 1,56 Å dari posisi semula dan menyebabkan perubahan sudut puntir sejauh $51,07^{\circ}$ pada sumbu CC_{α} . Sedangkan pada asam amino lys14 terjadi pergeseran atom C_{α} sejauh 1,90 Å dan perubahan sudut puntir sejauh $93,37^{\circ}$ pada $C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta}C_{\epsilon}$. Perubahan sudut puntir pada sumbu $C_{\gamma}C_{\delta}$ ternyata cukup mempengaruhi pergeseran residu lys14. Jika dibandingkan dengan lys14 pasien RY1 yang hanya bergeser 1,69 Å akibat sudut puntir pada sumbu $C_{\alpha}C_{\beta}$.

Pada rantai B, pergeseran *backbone* PR RY1 tidak sebesar yang dialami oleh rantai A (gambar 5.23 (b)). Tercatat bahwa pergeseran atom C_{α} dari residu ke-13' yang hanya sebesar 1,13 Å, lebih kecil bila dibandingkan dengan rantai A. Asam amino thr12' rantai B juga mengalami pergeseran sebesar 1,18 Å dengan perubahan sudut puntir $C_{\beta}C_{\alpha}NH_N$ sebesar $41,26^{\circ}$. Perubahan sudut puntir ini cukup besar sehingga membuat atom H_N mendekati residu ke-13', meski tidak berakibat pada pergeseran *backbone* karena letaknya bukan berada di rantai utama. Posisi atom H_N di akhir simulasi terlihat mendekati residu ke-13 untuk kedua rantai, terlihat dari kemiripan struktur akhir untuk rantai A dan rantai B. Asam amino lys14' pada rantai B bergeser sebesar 0,96 Å dari posisi semula. Perubahan sudut puntir juga terjadi pada $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta}$ sebesar $84,83^{\circ}$. Nilai-nilai tersebut menguatkan fakta bahwa pergeseran struktur *backbone* residu 12'-14' relatif lebih kecil.

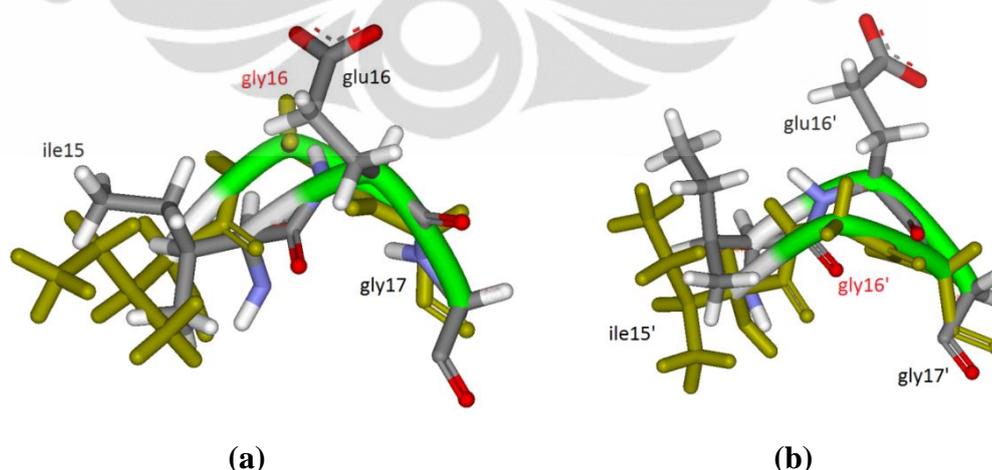
Untuk PR DY1, mutasi pada residu ke-13' juga terlihat tidak memberikan pergeseran *backbone* yang signifikan (gambar 5.23 (d)). Hal ini cukup masuk akal

mengingat hasil yang didapatkan pada residu asam amino ke-9' hingga ke-11' juga tidak memberikan pergeseran yang melebar. Pada residu ke-13' sendiri hanya memberikan pergeseran atom C_{α} sejauh 0,31 Å. Sedangkan pada asam amino thr12' menunjukkan terjadinya pergeseran atom CA sejauh 0,73 Å dan mengalami perubahan sudut puntir sebesar $40,69^{\circ}$ pada $CC_{\alpha}NH_N$. Asam amino lys14' juga tercatat mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 0,44 Å dari posisi semula. Perubahan sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ tercatat sebesar $87,99^{\circ}$.

5.3.3. G16E

Residu ke-16 mengalami mutasi dari asam amino glisin menjadi asam glutamat (G16E) dan hanya terjadi pada PR DY1. Mutasi ini menyebabkan terjadinya perubahan jumlah atom dari 10 atom menjadi 19 atom. Perubahan jumlah atom ini juga menyebabkan peningkatan volum molekul dari $60,1 \text{ \AA}^3$ menjadi $134,8 \text{ \AA}^3$ dan juga massa molekul dari 75 Da menjadi 147 Da. Sifat rantai samping residu ini juga mengalami perubahan dari nonpolar menjadi polar dan muatannya menjadi negatif dari netral. Perubahan ini akan menyebabkan interaksinya dengan residu lainnya menjadi terpengaruh. Tingkat hidrofobitasnya tercatat berkurang dari -0,4 menjadi -3,5.

Mutasi residu ke-16 pada rantai A menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} sebesar 2,84 Å seperti pada gambar 5.24 (a). Residu ile15 mengalami



Gambar 5.24 Struktur residu 15-17 (DY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

pergeseran 1,90 Å, atau berselisih hampir 1 Å dengan residu ke-16. Jika diperhatikan pada pergeseran struktur residu lys14 sebelumnya sebesar 1,97 Å, pergeseran struktur *backbone* pada daerah ini disebabkan oleh mutasi G16E. Perbedaan sebesar 0,07 Å dengan lys14 disebabkan oleh perubahan sudut puntir dari lys14 dan pada ile15 sebesar 36,99° terhadap $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma1}C_{\delta1}$. Pergeseran yang dialami oleh gly17 adalah 1,97 Å. Terlihat bahwa pergeseran *backbone* ini cenderung berkurang. Pelebaran sudut puntir HNNCAC sebesar 199,74° sangat mempengaruhi gly17 sehingga tidak membuat pergeseran *backbone* lebih besar.

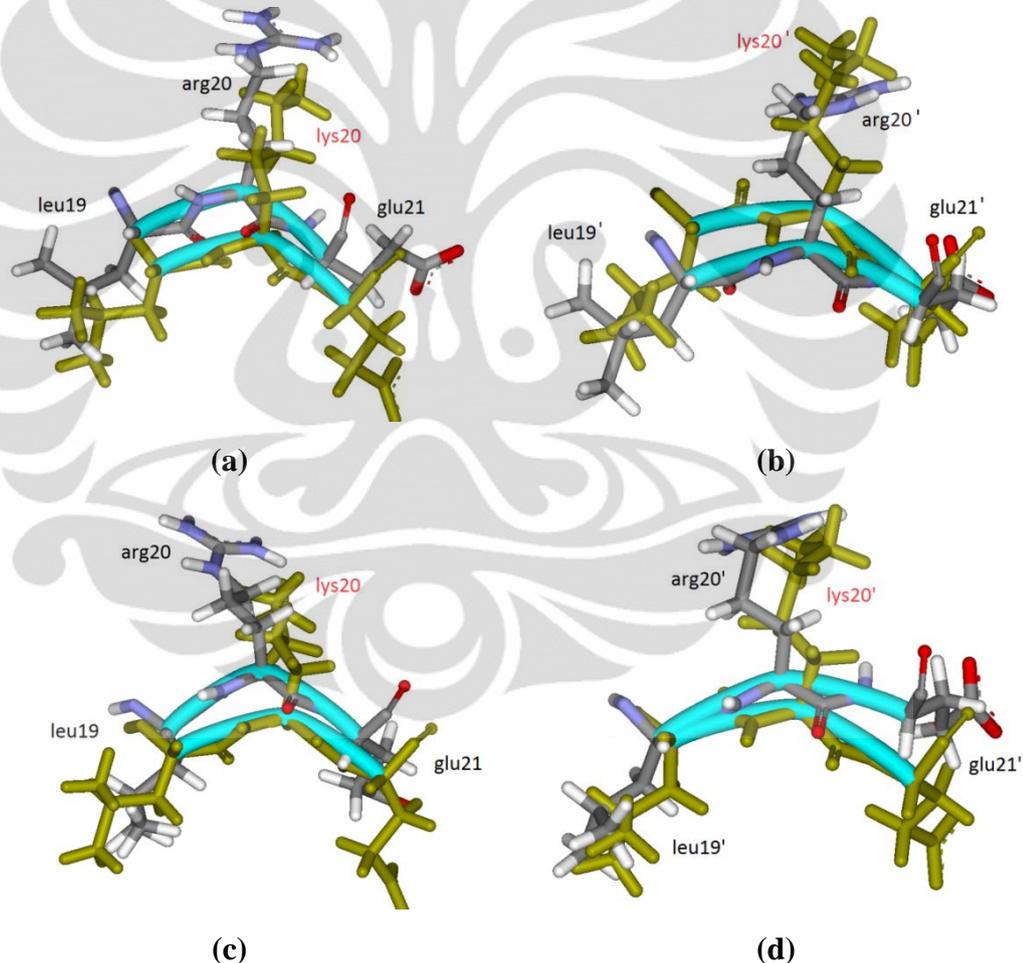
Perubahan struktur pada rantai B juga terlihat pada gambar 5.24 (b). Tercatat pergeseran akibat mutasi G16E sebesar 2,74 Å. Atom C_{α} dari asam amino ile15' diketahui bergeser sejauh 1,82 Å, dan mengalami perubahan sudut puntir pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma1}C_{\delta1}$ sebesar 1,34°. Berbeda dengan rantai A, perubahan sudut puntir dari ile15' tidak mampu menahan pengaruh mutasi G16E dan perubahan sudut puntir dari lys14'. Sehingga terdapat selisih cukup besar dari pergeseran struktur *backbone* antara lys14' dengan ile15'. Namun asam amino gly17' tercatat hanya memiliki pergeseran atom C_{α} sebesar 0,90 Å. Perubahan sudut puntir pada residu tersebut terjadi pada sumbu NC_{α} sebesar 0,55°. Meski kecil, namun perubahan sudut puntir ini mampu menjaga pergeseran *backbone* pada asam amino gly17'.

5.3.4. K20R

Residu ke-20 untuk kedua mutan bermutasi dari lisin yang memiliki 24 atom menjadi arginin yang memiliki 26 atom (K20R). Bertambahnya jumlah atom mengakibatkan ukuran dan massa molekular ikut berubah. Ukuran volum molekul dari residu ke-20 bertambah dari 168,6 Å³ menjadi 173,4 Å³. Massa molekul residu juga bertambah dari 146 Da menjadi 174 Da. Mutasi yang terjadi pada residu ini juga berakibat pada sifat molekul asam aminonya. Mutasi ini tidak mengakibatkan perubahan sifat polar dari kedua residu asam amino. Selain itu tingkat hidrofobitasnya juga menurun dari -3,9 menjadi -4,5, namun tidak terjadi perubahan muatan rantai samping karena tetap bernilai positif.

Gambar 5.25 (a) menunjukkan rantai asam amino ke-19 sampai ke-21 dari PR RY1. Residu ke-20 yang mengalami mutasi dari lys menjadi arg mengakibatkan-

kan posisi atom C_α bergeser sejauh 2,03 Å. Mutasi ini berpengaruh pada pergeseran posisi atom C_α dari asam amino leu19 sejauh 1,49 Å. Perubahan sudut puntir juga terjadi cukup signifikan, hal ini ditandai dengan terdapat dua sumbu putar leu19 pada $NC_\alpha C_\beta C_\gamma$ (berubah sebesar $47,60^\circ$) dan pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma C_{\delta 1}$ (berubah sebesar $112,41^\circ$ atau $64,81^\circ$ jika sumbu ini mengalami pengaruh dari perputaran puntir $NC_\alpha C_\beta C_\gamma$). Pergeseran yang terjadi pada asam amino glu21 lebih besar dari leu19, namun untuk perubahan puntirnya tidak terlalu signifikan. Pergeseran atom C_α tercatat 1,81 Å, dengan sudut puntir $CC_\alpha C_\beta C_\gamma$ sebesar $115,39^\circ$.



Gambar 5.25 Struktur residu 19-21 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

Untuk PR DY1 (gambar 5.25 (c)), mutasi residu ke-20 menyebabkan atom C_{α} bergeser sejauh 1,76 Å. Pada asam amino leu19, atom C_{α} bergeser sejauh 2,14 Å. Pergeseran pada atom ini masih dipengaruhi oleh pergeseran akibat mutasi dari L10I. Adanya pergeseran sudut puntir dari $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}H_{\gamma}$ sebesar $16,97^{\circ}$ juga mempengaruhi besarnya pergeseran *backbone* pada leu19. Asam amino glu21 sendiri hanya memiliki pergeseran atom C_{α} sebesar 1,62 Å. Nilai ini menunjukkan bahwa pergeseran yang terjadi mulai berkurang kembali, juga diakibatkan oleh adanya perubahan sudut puntir dari $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar $17,82^{\circ}$.

Untuk rantai B, pergeseran *backbone* yang terjadi pada PR RY1 lebih kecil dari pergeseran rantai A (gambar 5.25 (b)). Akibat dari mutasi rantai ke-20' pada rantai B menyebabkan bergesernya atom C_{α} sejauh 1,14 Å. Atom C_{α} pada asam amino leu19 mengalami pergeseran 1,83 Å, dan disertai dengan perubahan sudut puntir $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta 2}$ sebesar $95,9^{\circ}$. Untuk asam amino glu21', terjadi pergeseran atom C_{α} sebesar 0,75 Å atau hanya setengah dari pergeseran yang dialami oleh glu21' rantai A. Perubahan sudut puntir yang terjadi pada asam amino ke-21 ini juga tercatat hanya $8,02^{\circ}$ untuk sudut yang dibentuk oleh $CC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$. Perubahan sudut puntir yang lebih besar terjadi pada puntiran terhadap sumbu NC_{α} dengan nilai $12,13^{\circ}$.

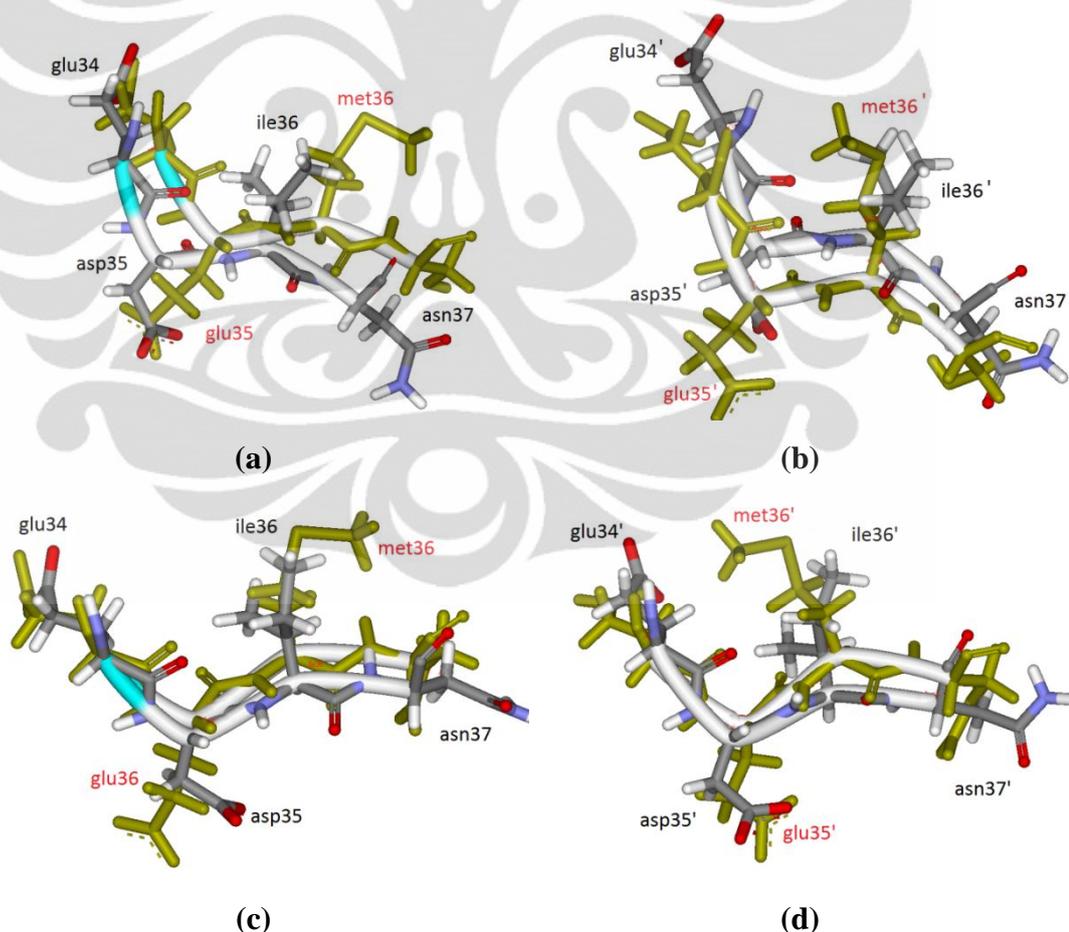
Gambar 5.25 (d) menunjukkan rantai B dari PR DY1. Mutasi pada residu ke-20' menunjukkan adanya pergeseran pada atom C_{α} sejauh 1,02 Å. Asam amino leu19' tercatat memiliki pergeseran sebesar 0,35 Å dan perubahan sudut puntir pada sumbu CC_{α} sebesar $47,44^{\circ}$. Asam amino glu21' yang mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 1,96 Å menunjukkan terjadinya pergeseran *backbone* yang terjadi akibat mutasi K20R. Selain itu perubahan sudut puntir yang terjadi akibat mutasi pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar $20,05^{\circ}$ ikut berkontribusi dalam pergeseran struktur *backbone*.

5.3.5. E35D & M36I

Residu ke-35 pada kedua PR bermutasi dari asam amino asam glutamat menjadi asam aspartat (E35D). Mutasi ini menyebabkan terjadinya penurunan jumlah atom dari 19 atom menjadi 16 atom. Berkurangnya jumlah atom juga berakibat pada perubahan massa molekul dari 147 Da menjadi 133 Da, serta

perubahan volum molekul dari $138,4 \text{ \AA}^3$ menjadi $111,1 \text{ \AA}^3$. Tingkat hidrofobitasnya tercatat tetap bernilai $-3,5$. Kedua asam amino ini juga tercatat memiliki muatan rantai samping yang bernilai negatif, serta bersifat polar.

Mutasi juga terjadi pada residu ke-36 yang mengubah asam amino metionin menjadi isoleusin (M36I). Akibat mutasi ini, terjadi penambahan jumlah atom dari 20 atom menjadi 22 atom. Penambahan jumlah atom juga mengakibatkan bertambahnya volum molekul dari $162,9 \text{ \AA}^3$ menjadi $166,7 \text{ \AA}^3$, namun massa molekulnya berkurang dari 149 Da menjadi 131 Da. Tingkat hidrofobitas residu ini tercatat meningkat dari 1,9 menjadi 4,5. Sedangkan muatan rantai sampingnya tetap netral dan bersifat nonpolar.



Gambar 5.26 Struktur residu 34-37 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

Mutasi yang terjadi pada residu ke-35 mengakibatkan terjadinya pergeseran atom C_{α} dari rantai A RY1 sebesar 2,20 Å (gambar 5.26 (a)). Asam amino glu34 mengalami pergeseran C_{α} sebesar 1,40 Å akibat mutasi yang terjadi pada residu ke-35. Asam amino glu34 juga mengalami puntiran pada $CC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sehingga mengalami perubahan sudut puntir sebesar 18,6°. Atom C_{α} dari residu ke-36 juga tercatat mengalami pergeseran sebesar 2,13 Å akibat mutasi. Asam amino asn37 mendapatkan pengaruh dari mutasi tersebut sehingga membuat atom C_{α} bergeser sejauh 2,70 Å. Perubahan yang terjadi pada struktur asn37 menjadi sangat besar karena puntiran pada $CC_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta 2}$ berubah sebesar 127,88°.

Perubahan struktur yang muncul pada rantai A DY1 terlihat pada gambar 5.26 (c). Pada residu mutasi E35D dan M36I sendiri, terjadi pergeseran atom C_{α} sebesar 0,77 Å dan 1,12 Å. Pada asam amino glu34, pergeseran hanya terjadi sebesar 0,55 Å tanpa adanya perubahan sudut yang terjadi di struktur glu34. Sedangkan untuk struktur asam amino asn37 mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 1,30 Å yang menunjukkan terjadinya pergeseran struktur *backbone* akibat adanya mutasi pada residu ke-35 dan ke-36. Mutasi juga menyebabkan terjadinya perubahan sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sehingga berubah sebesar 112,63° dan memberikan kontribusi pada pergeseran *backbone* struktur pada rantai A.

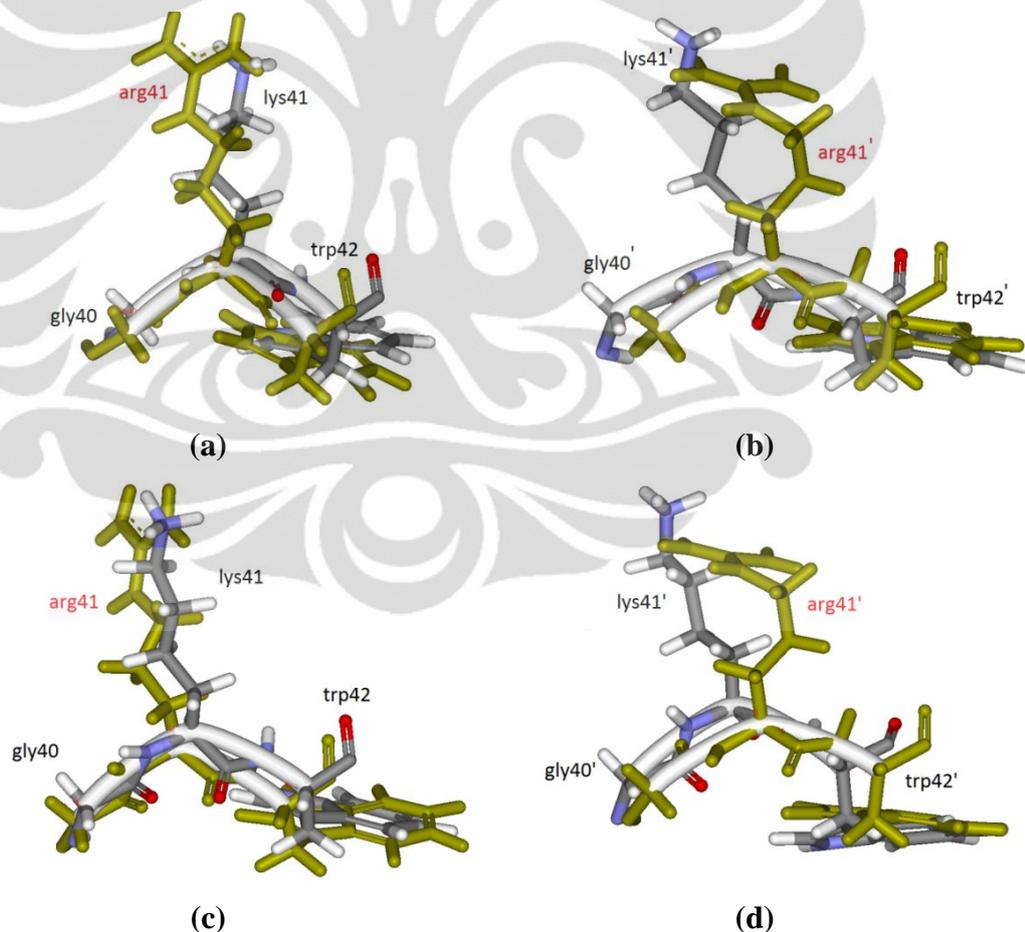
Perubahan yang terjadi pada residu ke-35' dari RY1 relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan rantai A (gambar 5.26 (b)). Atom C_{α} pada residu ke-35' bergeser sejauh 1,84 Å akibat mutasi yang terjadi. Pengaruh mutasi ini juga menyebabkan pergeseran atom C_{α} dari glu34' sebesar 1,65 Å. Perubahan sudut puntir paling besar terjadi pada $H_{\gamma 1}C_{\gamma}C_{\delta}O_{e1}$ yaitu sebesar 89,61°. Mutasi pada residu ke-36' membuat struktur C_{α} bergeser sebesar 1,64 Å, dan menyebabkan atom C_{α} dari asam amino asn37' bergeser sejauh 1,52 Å. Mutasi ini juga mengakibatkan terjadinya puntiran pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ yang cukup besar sehingga sudut puntirnya berubah 126,16°.

Sedangkan untuk DY1 perubahan strukturnya dapat terlihat pada gambar 5.26 (d). Atom C_{α} residu ke-35' dan ke-36' mengalami perpindahan sebesar 1,89 Å dan 1,50 Å. Asam amino glu34' cukup terpengaruh oleh mutasi E35D. Selain pergeseran atom C_{α} sebesar 0,99 Å juga terdapat dua perubahan sudut puntir yang

terjadi pada residu ini. Pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma C_\delta$ terjadi perubahan sebesar $9,32^\circ$, dan pada $C_\beta C_\gamma C_\delta O_{\varepsilon_1}$ terjadi perubahan sebesar $48,59^\circ$. Atom C_α dari $asn37'$ diketahui mengalami pergeseran sebesar $1,16 \text{ \AA}$. Pada bagian $NC_\alpha C_\beta C_\delta$ diketahui mengalami perubahan sudut puntir sebesar $120,04^\circ$. Mutasi E35D pada rantai B membuat *backbone* menyimpang cukup jauh dari posisi semula. Sedangkan mutasi M36I dan pergeseran sudut puntir pada $asn37'$ berperan dalam mengurangi pengaruh simpangan yang terjadi akibat mutasi E35D terhadap struktur *backbone*.

5.3.6. R41K

Residu ke-41 yang bermutasi dari asam amino arginin menjadi lisin (R41K) menyebabkan jumlah atom berkurang dari 26 atom menjadi 24 atom. Volum molekul berkurang dari $173,4 \text{ \AA}^3$ menjadi $168,6 \text{ \AA}^3$ dan membuat massa molekul-



Gambar 5.27 Struktur residu 40-42 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

nya ikut berkurang dari 174 Da menjadi 146 Da. Tingkat hidrofobisitas residu ini diketahui meningkat dari -4,5 menjadi -3,9. Namun, rantai samping residu ini tetap bersifat polar dan bermuatan positif, meski terjadi mutasi. Mutasi R41K terjadi pada kedua struktur mutan.

Pengaruh yang terjadi akibat mutasi R41K pada RY1 ternyata hanya pada pergeseran *backbone* struktur residu ke-40 sampai residu ke-42 (gambar 5.27 (a)). Pada residu mutasi, pergeseran C_{α} terjadi cukup jauh, yaitu sekitar 2,12 Å. Pergeseran paling besar terjadi pada atom C_{α} dari asam amino gly40 sebesar 2,88 Å. Sedangkan pergeseran pada atom C_{α} trp42 hanya sebesar 1,36 Å.

Residu ke-41 dari PR DY1 mengalami mutasi dari arg menjadi lys dan juga dapat ditemui pada PR RY1. Pada rantai A dari PR DY1 (gambar 5.27 (c)), mutasi R41K menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} sebesar 0,92 Å. Asam amino gly40 diketahui hanya mengalami pergeseran atom C_{α} sejauh 1,01 Å akibat mutasi. Sedangkan pada asam amino trp42 mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 0,94 Å disertai dengan adanya perubahan sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar 4,35°. Mutasi R41K tidak menyebabkan perubahan struktur *backbone* secara langsung. Pengaruh mutasi ini terhadap struktur asam amino ke-40 dan ke-42 memiliki peran lebih besar terhadap simpangan yang terjadi pada *backbone*.

Pengaruh mutasi R41K pada rantai B RY1 cukup besar (gambar 5.27 (b)). Secara langsung mutasi ini menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} pada residu ke-41' sejauh 2,69 Å. Pada asam amino gly40', atom C_{α} bergeser sejauh 2,41 Å akibat mutasi. Asam amino gly40' juga memiliki perubahan sudut putar sebesar 39,12° pada sumbu CC_{α} . Perpindahan yang lebih kecil terjadi pada asam amino trp42' yang mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 1,82°. Pada trp42' juga ditemui perubahan sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar 14,09°. Mutasi R41K pada rantai B memberikan pengaruh langsung terhadap pergeseran *backbone*. Selain itu mutasi ini juga mempengaruhi struktur asam amino ke-40 dan ke-42 sehingga ikut menyebabkan pergeseran *backbone* pada kedua asam amino itu.

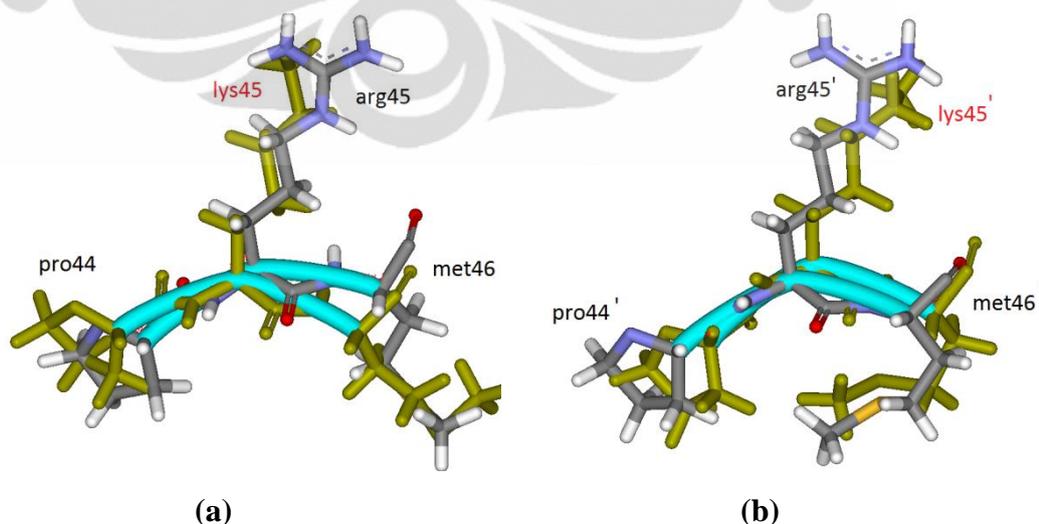
Pada rantai B DY1, pengaruh mutasi juga hanya berpengaruh pada pergeseran *backbone* strukturnya saja (gambar 5.27 (d)). Mutasi pada residu ke-41'

menyebabkan pergeseran atom C_{α} sebesar 1,83 Å. Sedangkan untuk asam amino gly40' dan trp42' atom C_{α} bergeser sejauh 2,09 Å dan 1,82 Å. Pada asam amino gly40', terlihat adanya perbedaan posisi yang cukup mencolok pada atom H_N seperti mengalami perubahan sudut puntir akibat adanya pemuntiran. Namun ketika diamati lebih seksama, sudut puntir dari $NC_{\alpha}CN$ hanya berubah sebesar 1,71°.

5.3.7. K45R

Perubahan sifat dan struktur mutasi K45R sama seperti yang telah dijelaskan sebelumnya untuk mutasi yang terjadi pada K20R. Mutasi residu ini hanya muncul pada PR RY1 saja. Pengaruh mutasi residu ke-45 untuk rantai A secara struktural dapat dilihat pada gambar 5.28 (a). Mutasi ini mengakibatkan terjadinya pergeseran atom C_{α} dari residu ke-45 sebesar 0,60 Å. Atom C_{α} dari asam amino pro44 juga bergeser sebesar 0,91 Å. Pada pro44 juga terjadi sedikit perubahan sudut puntir $CC_{\alpha}NC_{\delta}$ sebesar 7,38°. Sedangkan untuk asam amino met46, terjadi pergeseran posisi atom C_{α} sebesar 1,39 Å. Selain itu juga nampak perubahan sudut puntir dari $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ yang cukup besar, yaitu 121,82°.

Untuk rantai B, perubahan struktur yang terjadi akibat mutasi menyebabkan atom C_{α} residu ke-45' bergeser sejauh 0,88 Å (gambar 5.28 (b)). Pergeseran atom C_{α} dari pro44 tercatat sebesar 0,95 Å tanpa adanya pengaruh perubahan sudut



Gambar 5.28 Struktur residu 44-46 (RY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B.

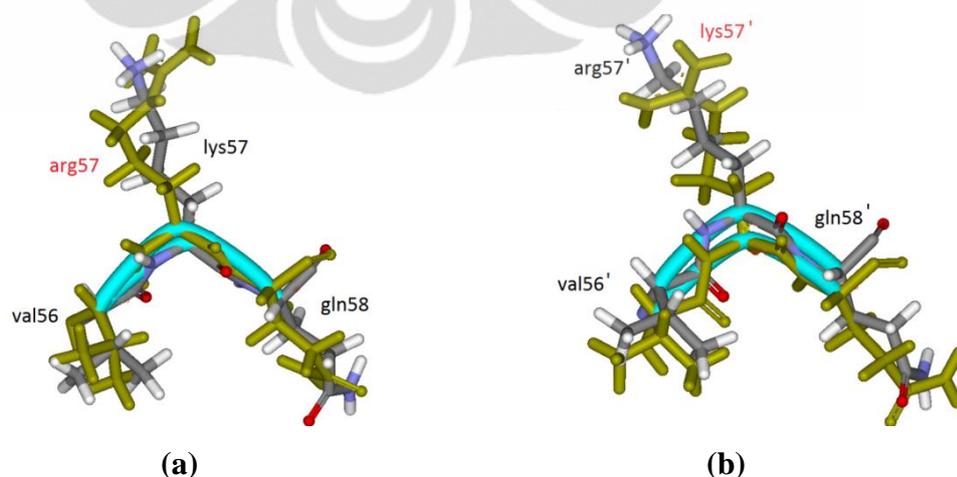
Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

puntir yang dapat mengubah struktur. Pergeseran atom C_{α} pada asam amino met46' lebih besar dari pergeseran pada rantai A, yaitu sebesar 1,62 Å. Mutasi pada residu ke-45' juga menyebabkan terjadinya dua perubahan sudut puntir dari asam amino met46'. Pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}S_{\delta}$ terjadi perubahan sudut puntir sebesar $4,26^{\circ}$, dan pada $C_{\beta}C_{\gamma}S_{\delta}C_{\epsilon}$ sebesar $5,45^{\circ}$.

Akibat dari mutasi residu ke-45, memberikan pengaruh yang lebih signifikan secara struktur terhadap rantai B. Hal yang berbeda terjadi pada asam amino met46 yang memiliki perubahan sudut puntir cukup besar. Perubahan ini memberikan pengaruh pada pergeseran struktur RY1 secara keseluruhan (akan dibahas di akhir bab ini) Meski met46' memiliki dua sudut puntir pada bagian berbeda, namun nilainya jauh lebih kecil dari perubahan yang terjadi pada met46.

5.3.8. R57K

Sifat mutasi yang muncul pada residu ke-57 sama seperti pada mutasi residu ke-41. Mutasi ini termasuk mutasi yang hanya muncul pada PR RY1. Perubahan struktur yang terjadi akibat mutasi pada asam amino ke-56 sampai ke-58 untuk rantai A ditunjukkan pada gambar 5.29 (a). Perubahan dari arg menjadi lys menyebabkan terjadinya pergeseran pada atom C_{α} residu ke-57 sebesar 0,78 Å. Mutasi pada residu ke-57 menyebabkan pergeseran atom C_{α} dari asam amino val56 sebesar 0,24 Å. Mutasi juga menyebabkan terjadinya perubahan sudut puntir pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}C$ sebesar $51,43^{\circ}$. Pada asam amino gln58, pergeseran



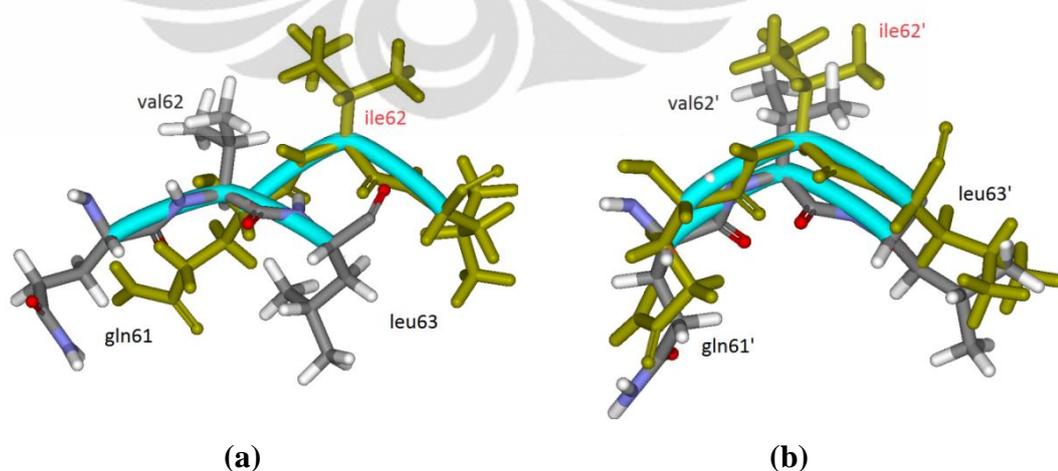
Gambar 5.29 Struktur residu 56-58 (RY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

muncul pada atom C_{α} sebesar $0,89 \text{ \AA}$. Asam amino gln58 juga mengalami perubahan sudut puntir pada $C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta}N_{\epsilon 2}$ sebesar $95,19^{\circ}$ akibat mutasi.

Mutasi yang terjadi pada residu ke-57' pada rantai B (gambar 5.29 (b)) menyebabkan posisi atom C_{α} bergeser sebesar $0,93 \text{ \AA}$. Asam amino val56' bergeser sejauh $0,98 \text{ \AA}$ pada posisi atom C_{α} namun tidak memiliki perubahan sudut puntir pada struktur akibat mutasi residu ke-57'. Akibat mutasi lebih terlihat pada asam amino gln58' yaitu dengan adanya dua perubahan sudut puntir meskipun perpindahan atom C_{α} hanya sebesar $0,73 \text{ \AA}$. Perubahan sudut torsi pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar $17,95^{\circ}$, dan pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta}$ sebesar $16,78^{\circ}$.

5.3.9. I62V

Sifat mutasi I62V sama seperti sifat mutasi I13V yang telah dijelaskan sebelumnya. Pada rantai A dari PR DY1, pergeseran *backbone* terjadi cukup besar (gambar 5.30 (a)). Pada residu ke-62 sendiri atom C_{α} mengalami pergeseran sejauh $4,07 \text{ \AA}$. Akibat mutasi tersebut, asam amino gln61 mengalami perubahan struktur pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}H_{\gamma}$ sehingga sudut puntirnya berubah sebesar $103,23^{\circ}$. Perubahan sudut puntir ini memberikan pengaruh pada atom C_{α} sehingga menggeser *backbone* sejauh $4,31 \text{ \AA}$. Sedangkan pada asam amino leu63, perubahan sudut puntir sumbu NC_{α} sebesar $43,39^{\circ}$ mengurangi pengaruh



Gambar 5.30 Struktur residu 61-63 (DY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

pergeseran *backbone* akibat mutasi. Tercatat besarnya pergeseran atom C_α pada asam amino ini adalah 3,67 Å.

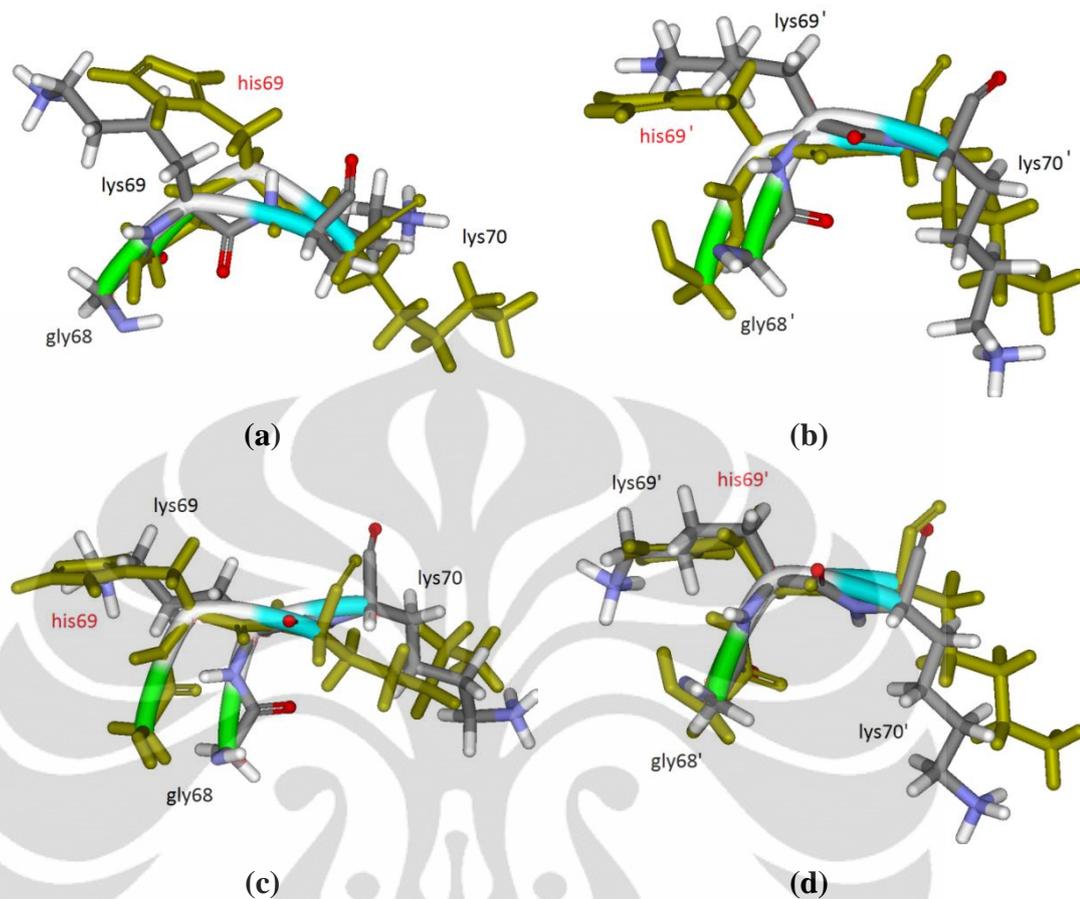
Pada rantai B pergeseran *backbone* akibat mutasi I62V tidak sebesar yang dialami oleh rantai A (gambar 5.30 (b)). Pada residu ke-62' sendiri hanya terjadi pergeseran atom C_α sejauh 1,24 Å. Perubahan sudut puntir dari asam amino gln61' pada $C_\beta C_\gamma C_\delta N_{\epsilon 2}$ sebesar $177,3^\circ$ ikut memberikan pengaruh pergeseran atom C_α gln61' sebesar 1,83 Å. Asam amino leu63' juga diketahui memiliki perubahan sudut puntir pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma H_\gamma$ sebesar $73,35^\circ$. Pergeseran ini diketahui mempengaruhi pergeseran atom C_α leu63' sejauh 1,39 Å. Pada rantai B, pergeseran *backbone* yang lebih besar terjadi diakibatkan oleh pengaruh asam amino gln61' dan leu63' yang memiliki perubahan sudut puntir akibat munculnya mutasi I62V.

5.3.10. H69K

Residu ke-69 mengalami mutasi dari asam amino histidin menjadi lisin (H69K). Mutasi ini menyebabkan penambahan jumlah atom dari 20 atom menjadi 24 atom, dan volum molekul dari $153,2 \text{ \AA}^3$ menjadi $168,6 \text{ \AA}^3$. Sedangkan massa molekul berkurang dari 155 Da menjadi 146 Da. Asam amino histidin dan lisin sama-sama bersifat polar. Tingkat hidrofobisitas residu ini diketahui menurun dari -3,2 menjadi -3,9. Sedangkan muatan rantai sampingnya berubah dari netral menjadi positif. Mutasi H69K tercatat muncul pada kedua mutan.

Dari PR RY1, mutasi yang terjadi mengakibatkan posisi C_α pada residu ke-69 dari rantai A (gambar 5.31 (a)) bergeser sejauh 1,98 Å. Asam amino gly68 juga mengalami perubahan posisi atom C_α sejauh 2,12 Å. Perubahan struktur pada gly68 paling besar terjadi pada perubahan sudut puntir dari $CC_\alpha NH_N$ yang mencapai $119,74^\circ$. Sedangkan pada asam amino lys70, atom C_α mengalami pergeseran struktur sejauh 1,78 Å. Terjadinya puntiran pada $NC_\alpha C_\beta C_\gamma$ sebesar $125,29^\circ$ mengakibatkan berpindahannya posisi atom C_δ dan C_ϵ ke arah berlawanan sehingga memberikan pengaruh terhadap konformasi lokal.

Gambar 5.31 (c) menunjukkan residu ke-68 sampai ke-70 dari rantai A DY1. Mutasi H69K yang terjadi pada PR DY1 menunjukkan adanya pergeseran atom



Gambar 5.31 Struktur residu 68-70 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

C_{α} residu tersebut sebesar $2,04 \text{ \AA}$. Asam amino gly68 yang memiliki perubahan sudut puntir dari $CC_{\alpha}NH_N$ sebesar $70,6^{\circ}$ tercatat memiliki pergeseran atom C_{α} yang lebih besar yaitu $2,67 \text{ \AA}$. Pada asam amino lys70 pergeseran terjadi sebesar $1,71 \text{ \AA}$ dengan perubahan sudut puntir pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar $125,6^{\circ}$. Hasil ini menunjukkan bahwa mutasi yang terjadi disertai dengan perubahan sudut puntir pada dua asam amino tetangganya, khususnya pada lys70 mengurangi pengaruh pergeseran *backbone* yang terjadi akibat mutasi pada residu ke-62 sebelumnya.

Residu ke-69' yang mengalami mutasi pada PR RY1 (gambar 5.31 (b)) membuat atom C_{α} bergeser $1,54 \text{ \AA}$, lebih kecil dari pergeseran yang dialami oleh rantai A. Asam amino gly68' mengalami pergeseran sejauh $1,48 \text{ \AA}$ karena ter-

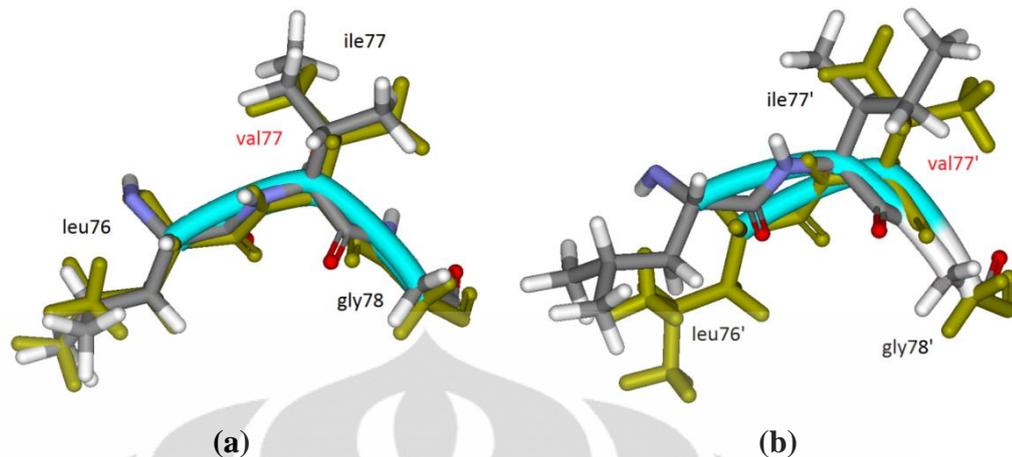
pengaruh oleh mutasi. Puntiran terjadi hanya pada sisi residu $CC_{\alpha}NH_N$, meski perubahan yang terjadi cukup besar $132,72^{\circ}$. Perubahan sudut puntir ini hanya berpengaruh pada perubahan posisi atom H_N pada asam amino, dan tidak berpengaruh banyak pada konformasi lokal. Perubahan yang terjadi pada asam amino lys70' akibat mutasi hanya berupa pergeseran posisi C_{α} sejauh $1,40 \text{ \AA}$. Secara keseluruhan pengaruh bagi rantai B lebih kecil bila dibandingkan rantai asam amino ke-68 sampai ke-70.

Pergeseran *backbone* yang tercatat pada residu ke-69' DY1 tidak sebesar yang dialami oleh rantai A (gambar 5.31 (d)). Hal ini mengingat pengaruh mutasi pada residu ke-62' juga relatif lebih kecil. Akibat mutasi H69K yang terjadi menyebabkan munculnya pergeseran atom C_{α} sejauh $0,75 \text{ \AA}$. Pada asam amino gly68' pergeseran terjadi sebesar $1,22 \text{ \AA}$. Perubahan sudut puntir dari $CC_{\alpha}NH_N$ sebesar $151,72^{\circ}$ diperkirakan memberikan pengaruh terhadap besarnya pergeseran atom C_{α} tersebut. Pergeseran pada atom C_{α} asam amino lys70' tercatat sebesar $0,87 \text{ \AA}$. Perubahan sudut puntir juga teramati pada $C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta}C_{\epsilon}$ sebesar $18,26^{\circ}$. Pergeseran pada rantai B akibat mutasi H69K juga masih dipengaruhi secara tidak langsung akibat perubahan sudut puntir yang terjadi pada asam amino ke-68' dan ke-70' yang dipengaruhi oleh mutasi.

5.3.11. V77I

Residu ke-77 dari PR DY1 mengalami mutasi dari valin menjadi isoleusin (V77I). Sifat mutasi ini berkebalikan dengan mutasi I13V. Atom pada residu ke-77 bertambah dari 19 atom menjadi 22 atom. Massa molekul dan volumenya juga mengalami penambahan dari 117 Da menjadi 131 Da dan dari 140 \AA^3 menjadi $166,7 \text{ \AA}^3$. Hidrofobisitas residu ini pun meningkat dari 4,2 menjadi 4,5 akibat mutasi. Sedangkan sifat dan muatan rantai sampingnya tetap nonpolar dan netral.

Pada rantai A, terjadi pergeseran atom C_{α} akibat mutasi sejauh $0,66 \text{ \AA}$ (gambar 5.32 (a)). Pada asam amino leu76 pergeseran atom C_{α} juga berada dalam nilai $0,54 \text{ \AA}$. Yang menarik pada asam amino ini, terdapat tiga perubahan sudut puntir yang ditemukan. Pada posisi $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}C_{\delta 1}$ terjadi perubahan sudut puntir sebesar $16,86^{\circ}$, pada $H_{\gamma}C_{\gamma}C_{\delta 1}H_{\delta 11}$ sebesar $105,62^{\circ}$, dan pada $H_{\gamma}C_{\gamma}C_{\delta 2}H_{\delta 21}$ sebesar $48,89^{\circ}$. Asam amino gly78 tercatat memiliki pergeseran atom C_{α} sebesar $0,44 \text{ \AA}$



Gambar 5.32 Struktur residu 76-78 (DY1) pada (a) rantai A dan (b) rantai B.

Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

dari posisi semula. Pada sumbu NC_{α} juga diketahui mengalami perubahan sudut puntir sebesar $23,27^{\circ}$. Simpangan *backbone* terbesar hanya berada pada residu mutasi V77I. Sedangkan pada dua residu lainnya cenderung lebih kecil bila dibandingkan dengan residu ke-77. Kecilnya simpangan ini juga menunjukkan bahwa pada residu ke-76 hingga ke-78 pengaruh simpangan *backbone* terhadap mutasi sudah mulai berkurang bila dibandingkan dengan akibat mutasi residu ke-62 dan ke-69.

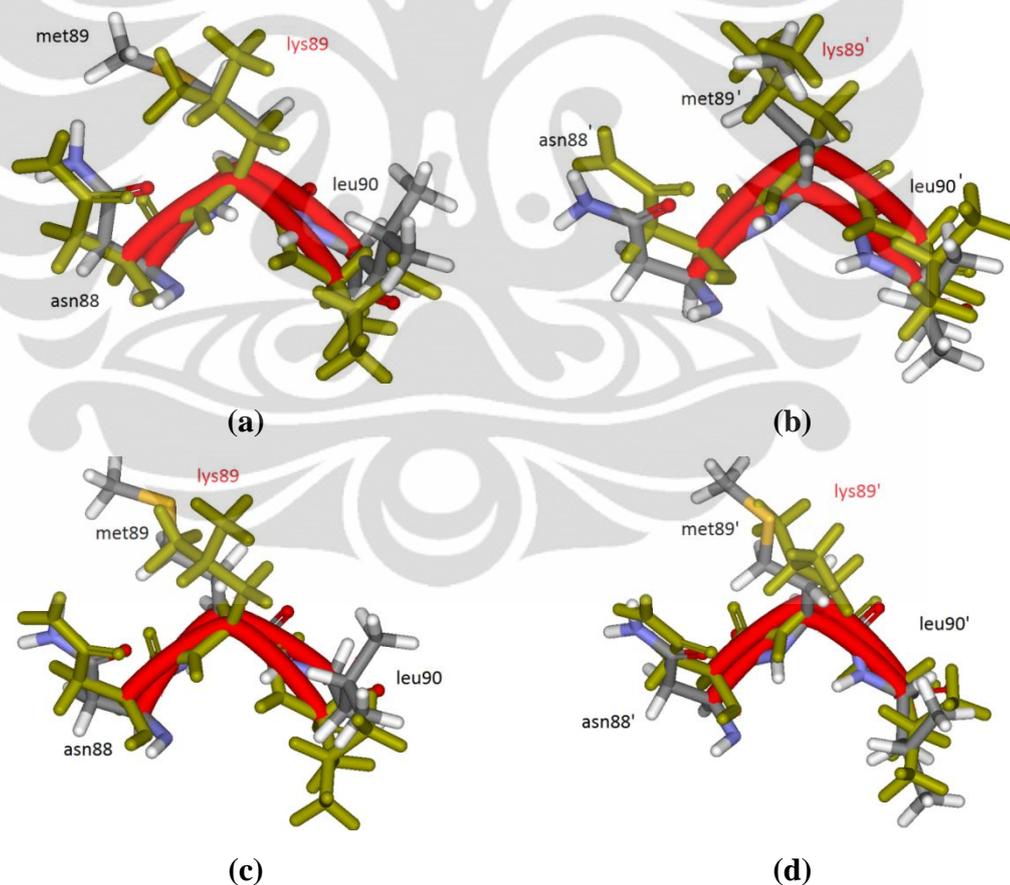
Gambar 5.32 (b) menunjukkan perubahan struktur akibat mutasi V77I dari rantai B. Pada residu ke-77', pergeseran atom C_{α} menunjukkan nilai $1,19 \text{ \AA}$. Pergeseran pada asam amino leu76' tercatat lebih besar yaitu $2,10 \text{ \AA}$. Dengan perubahan sudut puntir yang terjadi pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}H_{\gamma}$ sebesar $48,97^{\circ}$. Sedangkan untuk asam amino gly78' terjadi pergeseran atom C_{α} sebesar $0,91 \text{ \AA}$. Data tersebut menunjukkan bahwa pergeseran yang muncul akibat pengaruh mutasi residu ke-62' dan ke-69' baru mulai berkurang pada residu ke-76' hingga ke-78'.

5.3.12. L89M

Residu ke-89 dari kedua mutan diketahui mengalami mutasi dari asam amino lisin menjadi asam amino metionin (L89M). Mutasi ini mengakibatkan perubahan jumlah atom penyusun asam amino dari 22 atom menjadi 20 atom. Berkurangnya jumlah atom akibat mutasi juga menyebabkan berkurangnya volum molekul dari $166,7 \text{ \AA}^3$ menjadi $162,9 \text{ \AA}^3$. Namun massa molekul akibat mutasi

tercatat bertambah dari 131 Da menjadi 149 Da. Hidrofobisitas mutasi L89M tercatat berkurang dari 3,8 menjadi 1,9. Sedangkan rantai sampingnya tetap bermuatan netral dan bersifat nonpolar.

Pada gambar 5.33 (a) mutasi residu ke-89 pada rantai A RY1 yang terjadi menyebabkan pergeseran atom C_{α} sejauh 1,02 Å. Pengaruh mutasi bagi asam amino asn88 juga membuatnya mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 0,76 Å. Pengaruh lainnya hanya berupa perubahan sudut puntir yang sangat kecil pada $CC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ yaitu $4,09^{\circ}$. Asam amino leu90 juga mengalami pergeseran posisi atom C_{α} sejauh 1,01 Å dari posisi awal. Pengaruh lainnya bagi leu90 berupa perubahan sudut puntir pada sumbu NC_{α} sebesar $5,63^{\circ}$.



Gambar 5.33 Struktur residu 88-90 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

Untuk model DY1 (gambar 5.33 (c)), terdapat simpangan atom C_α pada residu mutasi ke-89 sebesar 1,21 Å. Pada asam amino asn88, simpangan atom C_α tercatat sebesar 0,89 Å. Perubahan sudut puntir pada $CC_\alpha C_\beta C_\gamma$ tercatat relatif kecil yaitu $7,2^\circ$. Pergeseran atom C_α yang lebih besar ditemukan pada asam amino leu90 sebesar 1,25 Å. Asam amino ini juga mengalami perubahan sudut puntir pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma H_\gamma$ sebesar $17,6^\circ$. Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa mutasi ke-89 mulai memberikan pengaruh kembali pada pergeseran *backbone* rantai A.

Mutasi pada residu ke-89' RY1 (gambar 5.33 (b)) menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_α dari posisi awal sejauh 1,03 Å. Posisi asam amino asn88' tercatat mengalami perubahan posisi atom C_α sebesar 0,85 Å. Asam amino asn88' juga mengalami perubahan sudut puntir pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma N_{\delta 2}$ sebesar $13,06^\circ$. Sedangkan pada asam amino leu90', pergeseran atom C_α terjadi sebesar 1,07 Å. Perubahan sudut puntir dari leu90' tidak terjadi pada sumbu NC_α seperti pada rantai A, tapi pada sumbu $C_\alpha C_\beta$ sebesar $27,71^\circ$.

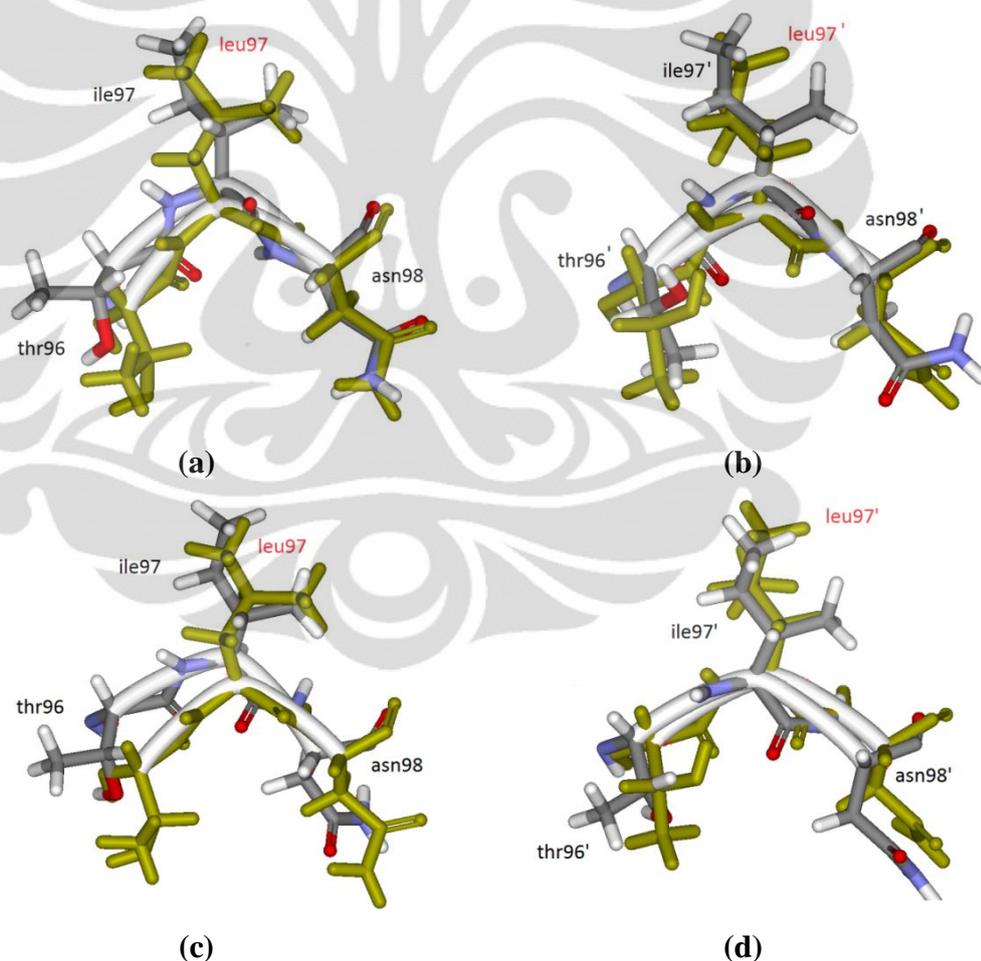
Sedangkan untuk PR DY1 (gambar 5.33 (d)), mutasi pada residu ke-89' memberikan pergeseran atom C_α sebesar 0,87 Å. Asam amino asn88' diketahui memiliki pergeseran sebesar 0,93 Å. Pada asam amino ini juga diketahui memiliki perubahan sudut torsi sebesar $24,79^\circ$ pada $CC_\alpha C_\beta C_\gamma$. Untuk asam amino leu90' pergeseran atom C_α terjadi sebesar 0,54 Å. Pada $C_\alpha C_\beta C_\gamma C_{\delta 2}$ juga diketahui mengalami perubahan sudut puntir sebesar $38,46^\circ$. Data tersebut menunjukkan bahwa residu ke-88' hingga ke-90' hanya mendapatkan pengaruh dari mutasi residu dalam perubahan struktur *backbone*.

5.3.13. L97I

Mutasi terakhir yang tercatat adalah residu ke-97 yang bermutasi dari asam amino leu menjadi ile. Mutasi yang muncul pada kedua mutan ini tidak menyebabkan terjadinya perubahan jumlah atom. Asam amino leu maupun ile keduanya memiliki 22 atom. Selain jumlah atom yang sama, volum dan massa molekul keduanya pun sama yaitu $166,7 \text{ \AA}^3$ dan 131 Da. Namun, tingkat hidrofobitas residu ini meningkat dari 3,8 menjadi 4,5. Asam amino leu dan ile juga diketahui memiliki sifat polar dan memiliki muatan rantai samping yang bernilai netral.

Pada PR RY1 (gambar 5.34 (a)) mutasi residu ke-97 menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} sejauh 0,85 Å. Pergeseran atom C_{α} yang lebih tinggi justru dialami oleh asam amino thr96 sejauh 1,39 Å. Perubahan struktur juga terjadi pada sumbu CC_{α} yang menyebabkan terjadinya perubahan sudut puntir sebesar $12,41^{\circ}$. Untuk asam amino asn98, pergeseran atom C_{α} terjadi hanya sebesar 0,35 Å. Sudut puntir pada asam amino asn98 hanya terjadi pada $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ sebesar $4,58^{\circ}$.

Mutasi residu ke-97 dari DY1 ditunjukkan pada gambar 5.34 (c). Pada residu ke-97 terlihat bahwa mutasi memberikan pengaruh terhadap pergeseran atom C_{α} sebesar 1,10 Å. Sedangkan pada asam amino ke-96 perubahan struktur



Gambar 5.34 Struktur residu 96-98 dari RY1 (a dan b) dan DY1 (c dan d). Kolom kiri menunjukkan rantai A, sedangkan kolom kanan menunjukkan rantai B. Tulisan berwarna merah menunjukkan residu sebelum bermutasi.

yang teramati hanya pergeseran atom C_{α} sejauh 2,25 Å tanpa disertai dengan adanya perubahan sudut puntir pada struktur. Untuk asam amino asn98, pergeseran atom C_{α} tercatat sebesar 1,02 Å. Pada asam amino ini juga terdapat perubahan sudut puntir sebesar 134,22° pada $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}N_{\delta 2}$. Data ini menunjukkan bahwa pengaruh pergeseran struktur *backbone* akibat mutasi residu ke-89 mulai berkurang.

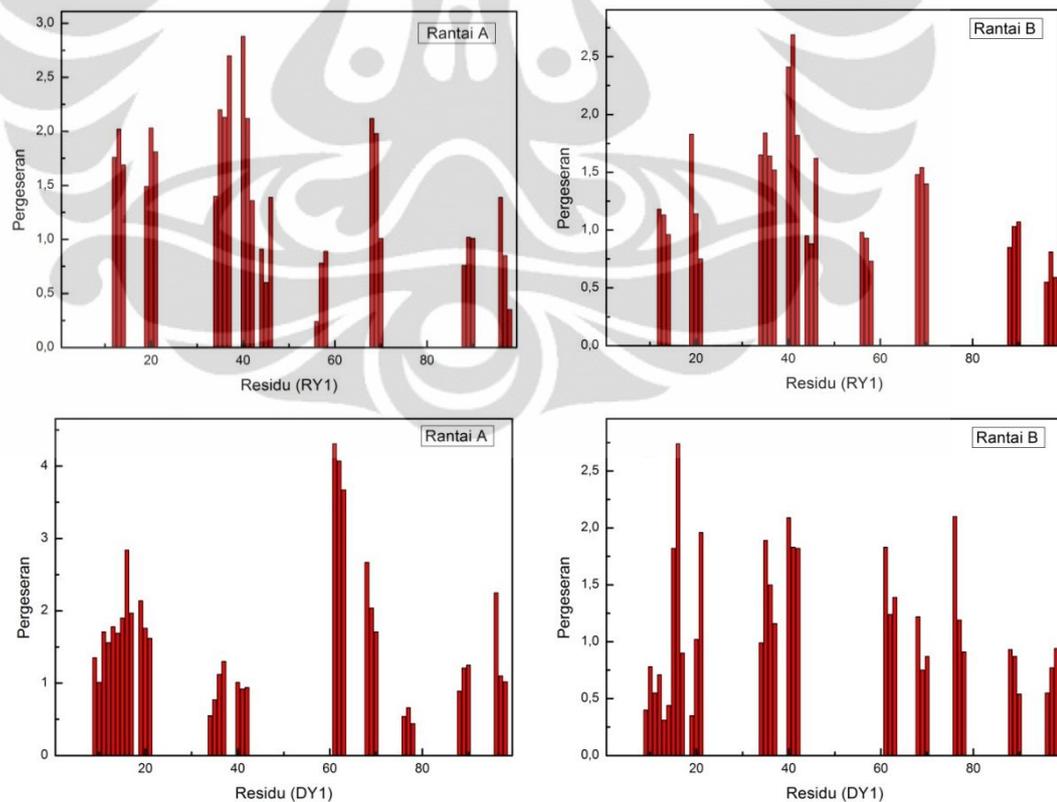
Residu ke-97' dari RY1 (gambar 5.34 (b)) menyebabkan terjadinya pergeseran atom C_{α} sejauh 0,81 Å dari posisi awal. Asam amino thr96' diketahui mengalami pergeseran atom C_{α} sebesar 0,55 Å akibat mutasi. Mutasi juga mempengaruhi terjadinya perubahan sudut puntir dari $CC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma 2}$ sebesar 15,31°. Selain itu, perubahan sudut puntir lainnya yang tercatat cukup besar terjadi pada $C_{\alpha}C_{\beta}O_{\gamma 1}H_{\gamma 1}$ sebesar 82,4°. Asam amino asn98' juga diketahui mengalami pergeseran sebesar 0,59 Å pada atom C_{α} . Perubahan sudut puntir yang terjadi berada pada dua lokasi, yaitu $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$ dan $C_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}N_{\delta 2}$ masing-masing sebesar 22,3° dan 63,16°. Pengaruh mutasi lebih menyebabkan perubahan struktur pada rantai B.

Pada rantai B (gambar 5.34 (d)), pergeseran atom C_{α} pada residu ke-97 akibat mutasi tercatat sebesar 0,77 Å. Asam amino thr96 diketahui memiliki pergeseran atom C_{α} yang lebih kecil yaitu 0,55 Å. Dengan perubahan sudut puntir yang terjadi pada $CC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma 2}$ sebesar 93,5°. Namun, pada asam amino asn98, hanya ditemukan pergeseran sebesar 0,94 Å tanpa disertai dengan perubahan sudut puntir pada strukturnya. Terlihat bahwa mutasi residu ke-97 menyebabkan terjadinya simpangan *backbone* yang semakin melebar.

Dari seluruh data pengamatan struktur residu yang bermutasi, dapat diperkirakan pengaruh residu mutasi terhadap struktur secara keseluruhan. Mutasi yang mempengaruhi interaksi PR dengan APV yang diketahui adalah I50V, V82F/I84V (Ohtaka dkk. 2002)^[45] dan M46I/I47V/I50V (Shenderovich dkk. 2003)^[89]. Studi Ohtaka dkk. memperlihatkan kedua mutasi tersebut dapat membuat energi ikat bebas menjadi berkurang bila dibandingkan dengan WT. Energi ikat bebas dari mutan I50V dan V82F/I84V masing-masing berbeda sebesar 2,7 dan 3 kcal/mol. Nilai tersebut menunjukkan bahwa kedua mutant memiliki

interaksi yang kurang baik dibandingkan dengan WT. Sedangkan studi Shenderovich dkk. memprediksi keberadaan tiga mutasi M46I/I47V/I50V dapat meningkatkan resistensi PR terhadap APV berdasarkan tinjauan fenotip struktur. Namun pada kedua pasien, mutasi tersebut tidak ditemui. Gambar 5.35 menunjukkan data pergeseran dari residu mutasi dan dua residu tetangganya. Data residu lainnya tidak diamati pada studi ini.

Pada PR RY1 aktivitas struktur rantai A menunjukkan adanya peningkatan gerak residu dengan nilai tertingginya berada pada residu ke-40. Mutasi R41K yang terjadi diperkirakan mengurangi aktivitas struktur. Namun pada residu ke-46 mulai terlihat peningkatan aktivitas kembali. Hal ini disebabkan mutasi yang terjadi pada residu ke-45 meskipun pergeserannya sendiri hanya sebesar 0,6 Å. Keberadaan mutasi ini mengurangi fleksibilitas dari flap dan APV, serta berkontribusi dalam peningkatan stabilitas struktur dan interaksinya dengan obat^[63].



Gambar 5.35 Nilai pergeseran struktur dalam bentuk diagram batang untuk tiap rantai pada kedua mutan

Berkurangnya aktivitas flap juga dapat mencegah terlepasnya obat dari sisi aktif PR.^[28]

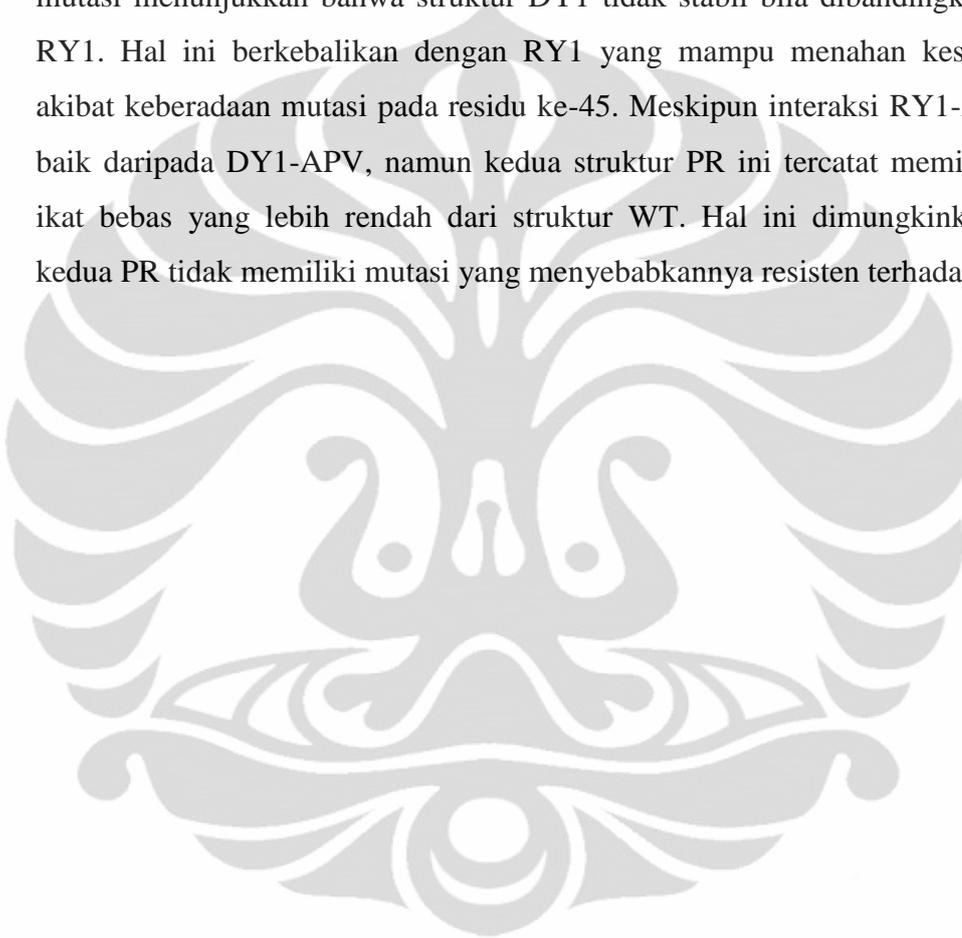
Untuk rantai B sendiri memiliki kemiripan topografi dari nilai pergeseran struktur residu dengan rantai A. Namun perpindahan dari residu ke-19' yang mencapai 1,8 Å membuat ikatan hidrogen antara APV dengan ala28' dan asp29' menjadi tidak stabil. Hal tersebut sudah dibuktikan dengan presentase okupansi yang rendah pada kedua residu. Mutasi di residu ke-45' memiliki pengaruh yang sama dengan mutasi residu ke-45. Secara keseluruhan aktivitas PR RY1 cukup dipengaruhi oleh mutasi residu ke-45. Hal ini dibuktikan dengan energi ikat bebasnya yang bernilai paling rendah.

Protease DY1 memberikan hasil yang cukup berbeda. Pada rantai A mutasi residu ke-10 yang termasuk mutasi minor ternyata memiliki pergeseran yang lebih kecil bila dibandingkan dengan residu tetangganya. Hal ini menunjukkan bahwa mutasi residu ke-10 berperan untuk menahan aktivitas residu ke-9 hingga ke-17 yang mengalami peningkatan. Mutasi tersebut juga diduga berperan dalam mempertahankan ikatan hidrogen pada asp25. Mutasi G16E tercatat memiliki nilai pergeseran paling tinggi di antara sembilan residu tersebut, yaitu mencapai 3 Å. Pergeseran yang cukup signifikan juga terlihat oleh residu ke-61 akibat mutasi I62V, dan residu ke-68 akibat mutasi H69K. Namun karena posisi kedua residu tersebut berada di sisi terluar PR, pengaruhnya tidak dirasakan langsung di sisi aktif. Hanya ikatan yang berada di residu ke-30 yang terpengaruh. Ikatan hidrogen pada residu ke-50 muncul kemudian karena jarak antara residu dengan APV mendekat.

Untuk rantai B PR DY1 aktivitas tertinggi justru dialami oleh residu mutasi sendiri. Hal ini terlihat dari nilai pergeseran residu mutasi ke-16' yang mencapai 2,7 Å. Pergeseran struktur juga teramati pada residu ke-14' dan ke-15. Akibat dari aktivitas ini berpengaruh pada ikatan hidrogen yang terbentuk pada residu ke-28' dan ke-29' sehingga menjadi tidak stabil. Keadaan pada residu ke-25' yang cukup stabil mampu mempertahankan ikatan hidrogen yang terbentuk dengan APV. Ikatan baru antara APV dengan asp30' juga teramati dikarenakan posisi residu

dengan APV yang mendekat. Aktivitas tinggi lainnya juga ditemui pada residu ke-61' dan 68' namun tidak mempengaruhi keadaan di sisi aktif.

Meskipun DY1 memiliki ikatan hidrogen baru yang terbentuk di akhir simulasi, namun nilai okupansinya menunjukkan bahwa ikatan hidrogen tersebut tidak termasuk ke dalam ikatan hidrogen kuat. Pergerakan struktur pada residu mutasi menunjukkan bahwa struktur DY1 tidak stabil bila dibandingkan dengan RY1. Hal ini berkebalikan dengan RY1 yang mampu menahan kestabilannya akibat keberadaan mutasi pada residu ke-45. Meskipun interaksi RY1-APV lebih baik daripada DY1-APV, namun kedua struktur PR ini tercatat memiliki energi ikat bebas yang lebih rendah dari struktur WT. Hal ini dimungkinkan karena kedua PR tidak memiliki mutasi yang menyebabkannya resisten terhadap APV.



BAB 6

KESIMPULAN

Beberapa hasil simulasi yang dilakukan pada studi ini, memiliki kesesuaian dengan beberapa literatur. Pada tahap awal simulasi, didapatkan keadaan terprotonasi dari struktur PR berada pada residu asp25'. Hasil tersebut sesuai dengan prediksi yang diajukan oleh Kitiyaporn dkk. pada 2008^[36]. Hasil ini juga menguatkan validitas struktur 3D yang digunakan pada studi ini.

Dari nilai energi hasil simulasi kedua model pasien ternyata didapatkan lebih rendah dari model WT, dengan model pasien DY1 paling rendah nilainya diantara ketiga model pada studi ini, yaitu sebesar -6389,69 kcal/mol. Secara dinamika struktural, diketahui bahwa mutasi yang terdapat pada struktur DY1 berperan dalam proses kestabilan struktur.

Meskipun demikian, keberadaan mutasi residu ke-10 dan 10' pada DY1 menyebabkan interaksi PR dengan APV berkurang. Hal ini sesuai dengan Stanford database^[78] yang menyatakan bahwa mutasi tersebut termasuk dalam mutasi minor. Berbeda dengan model RY1, mutasi-mutasi yang muncul justru menyebabkan ketidakstabilan pada strukturnya. Namun interaksinya dengan APV dipertahankan dengan adanya mutasi pada residu ke-45 dan 45'.

Kesimpulan terhadap interaksi tersebut diperkuat dengan melihat nilai okupansi ikatan hidrogen yang terbentuk antara PR-APV. Diketahui bahwa RY1 memiliki 3 ikatan hidrogen kuat, yaitu pada residu ke-30, ke-50, dan ke-25', sedangkan DY1 hanya pada residu ke-25 saja. Keberadaan ikatan hidrogen kuat pada residu ke-30 dan ke-50 tidak lepas dari keberadaan mutasi residu ke-45 dan 45' seperti yang dipaparkan oleh studi Perryman dkk^[28] sehingga menjaga daerah PR di sekitar *flap* menjadi lebih kaku dan mampu mempertahankan ikatan hidrogen yang terbentuk dengan obat.

Secara keseluruhan dari hasil studi ini terdapat beberapa kesimpulan yang dapat diperoleh:

1. Berdasarkan nilai energi dan struktur setelah simulasi memperlihatkan bahwa model DY1 lebih stabil bila dibandingkan dengan RY1 maupun WT. Kestabilan ini terkait dengan dinamika struktur PR selama simulasi berlangsung.
2. Mutasi pada DY1 menyebabkan interaksi DY1-APV berkurang, sedangkan mutasi pada RY1, khususnya mutasi residu ke-45 dapat mempertahankan interaksi RY1-APV.
3. Dari hasil simulasi, kedua pasien RY1 dan DY1 dapat menerima APV dalam orde 11 dan 8-kali lipat bila dibandingkan dengan WT. Berdasarkan pada studi Wang dan Kollman^[90] orde penerimaan yang nilainya 10-kali lipat lebih negatif menunjukkan struktur tersebut (RY1) sensitif terhadap obat. Namun struktur DY1 tidak dapat dikatakan sensitif meskipun nilai energinya lebih rendah dari WT.

Mengingat studi ini dilakukan dengan sejumlah keterbatasan, khususnya dalam sumber daya komputasi, maka beberapa saran yang dapat menjadi pertimbangan bagi kelanjutan studi ini:

1. Dilakukan peninjauan lebih lanjut terhadap pengaruh keberadaan tiap mutasi tunggal yang tercatat pada PR, khususnya mutasi pada RY1 dan DY1.
2. Diharapkan simulasi dapat dilakukan dengan beberapa inhibitor lain, ataupun dengan struktur PR dengan mutasi lain.

Dari hasil studi ini, diharapkan dapat membantu menentukan inhibitor terbaik yang dapat digunakan pada penderita HIV. Ke depannya simulasi ini dapat dilakukan dengan berorientasi pada struktur PR sehingga dapat membantu dalam pembuatan desain inhibitor yang dapat digunakan pada penderita HIV.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). "Regional HIV and AIDS statistics, 2010 and 2001." *World AIDS Day Report 2011 – How to Get to Zero: Faster. Smarter. Better.* Switzerland: UNAIDS Publisher, 2011. 10-11.
- [2] Devlin, T.M., ed. *Textbook of Biochemistry*. Canada: Wiley-Liss, 2002. 183.
- [3] Victoria, A. et al. *Special Contribution: Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2010*. Topics in HIV Medicine (2010) 18:156-163.
- [4] Alcaro, Stefano, et al. *Molecular Dynamics and Free Energy Studies on the Wild-Type and Mutated HIV-1 Protease Complexed with Four Approved Drugs: Mechanism of Binding and Drug Resistance*. J. Chem. Inf. Model. (2009) 49:1751-1761.
- [5] Das, Amit, et al. *Crystal Structure of HIV-1 Protease In Situ Product Complex and Observation of a Low-Barrier Hydrogen Bond Between Catalytic Aspartates*. PNAS (2006) 103:18464-18469.
- [6] Wittayanarakul, K., et al. *Insight into Saquinavir Resistance in the G48V HIV-1 Protease: Quantum Calculations and Molecular Dynamic Simulations*. Biophysical Journal (2005) 88:867-879.
- [7] Brooks, B. R., et al. *CHARMM: A program for macromolecular energy minimization and dynamics calculations*. J. Comp. Chem. (1983) 4:187-217.
- [8] Brooks, B. R., et al. *CHARMM: The Biomolecular Simulation Program*. Journal of Computational Chemistry (2009) 30:1545-1614.
- [9] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). "Asia Regional HIV and AIDS statistics, 1990-2010." *Global HIV/AIDS Response: Epidemic Update and Health Sector Progress Towards Universal Access*. Switzerland: UNAIDS Publisher, 2011. 28.

- [10] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). "Safe Behaviour in Key Populations at Higher Risk." *HIV in Asia and the Pasific: Getting to Zero*. Switzerland: UNAIDS Publisher, 2011. 21.
- [11] Ditjen PP & PL Kementrian Kesehatan. "Persentase Kasus AIDS di Indonesia Berdasarkan Kelompok Umur Pada Triwulan 2 Tahun 2011." *Laporan Perkembangan Situasi HIV & AIDS di Indonesia*. Jakarta: Kementrian Kesehatan, 2011. 2.
- [12] Anderson K. (Ed.). *Mosby's Medical, Nursing, and Allied Health Dictionary 4th Ed*. St. Louis, Mosby-Year Book 1992.
- [13] Kuan-Teh Jeang. *HIV Molecular Biology and Pathogenesis: Viral Mechanism*. Academic Press 2010. 1-22.
- [14] Josefina J.C., et al. *The Complete HIV/Aids Teaching Kit*. Springer Publishing Company 2008. 25-35.
- [15] <http://www.aids-india.org/hivbasics2.htm>. Retrieved January 24, 2012.
- [16] Bethesda M.D.. *How HIV Causes AIDS*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (INAIDS) 2001.
- [17] Josefina J.C., et al. "The Capsid and Its Contents: RNA and Reverse Transcriptase." *The Complete HIV/Aids Teaching Kit*. Springer Publishing Company 2008. 26.
- [18] AIDS InfoNet. (2005, April 20). *Fact sheet 106, HIV life cycle*. Retrieved December 7, 2006, from http://www.aidsinonet.org/factsheet_detail.php?fsnumber=106
- [19] GlaxoSmithKline. *How HIV Works in Your Body*. Research Triangle Park 2001.
- [20] Pieribone, D. *The HIV Life Cycle*. ACRIA Update 12(1) 2002.
- [21] Josefina J.C., et al. "HIV Begins to Copy Itself." *The Complete HIV/Aids Teaching Kit*. Springer Publishing Company 2008. 28-29.
- [22] Office of AIDS Research Advisory Council. *Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1 Infected Adults and Adolescents*. OARAC 2006.
- [23] *Approved Medications to Treat HIV Infection*. DHHS 2005.

- [24] Schaal, Wesley. "Clinically Approved HIV Protease Inhibitors." *Computational Studies of HIV-1 Protease Inhibitors*. Uppsala 2002. 23.
- [25] Victoria A.J., et al. *Update of the Drug Resistance Mutation in HIV-1: Fall 2006*. Topics in HIV Medicine (2006) 14(3):125-128.
- [26] Hoffmann, C., Rockstroh, J.K., Kamps, B.S.. "HIV and its genes." *HIV Medicine 2006*. Flying Publisher 2006.
- [27] Lindgren M.T.. *Exploring Inhibitor of HIV-1 Protease: Interaction Studies with Applications for Drugs Discovery*. Uppsala 2004.
- [28] Perryman, A.L., Jung-Hsin Lin, McCammon, J.A.. *HIV-1 Protease Molecular Dynamics of a Wild-type and of the V82F/I84V Mutant: Possible Contributions to Drug Resistance and a Potential New Target Site for Drugs*. Protein Science (2004) 13:1108-1123.
- [29] Trylska J., et al. *The Role of Hydrogen Bonding in the Enzymatic Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease*. Protein Science (2004) 13:513-528.
- [30] Trylska J., et al. *Parameterization of the Approximate Valence Bond (AVB) Method to Describe Potential Energy Surface in the Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease*. Intl. J. Quantum Chem. (2001) 82:86-103.
- [31] Trylska J., et al. *Molecular Dynamics Simulations of the First Steps of the Reaction Catalyzed by HIV-1 Protease*. Biophysical Journal (2002) 83:794-807.
- [32] Smith et al.. *Ionization States of the Catalytic Residues in HIV-1 Protease*. Natl. Struc. Bio. (1996) 3:946-950.
- [33] Wlodawer, A., Vondrasek, J.. *Inhibitors of HIV-1 Protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design*. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Stru. (1998) 27:249-284.
- [34] Vondrasek, J., van Buskirk, C.P., Wlodawer, A.. *Database of Three-Dimensional Structures of HIV Proteinases*. Nat. Struct. Biol. (1997) 4:8.
- [35] Yamazaki, T., et al. *NMR and X-ray Evidence that the HIV Protease Catalytic Aspartyl Group are Protonated in the Complex Formed by the Protease and a Non-Peptide Cyclic Urea-Based Inhibitor*. J. Am. Chem. Soc. (1994) 116:10791-10792.

- [36] Wittayanarakul, K., Hannongbua, S., Feig, M.. *Accurate Prediction of Protonation State as a Prerequisite for Reliable MM-PB(GB)SA Binding Free Energy Calculations of HIV-1 Protease Inhibitor*. J. Comput Chem (2008) 29:673-685.
- [37] Soo-Yon Rhee, et al. *Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database*. Nucleic Acid Research. Oxford University Press (2003) 31(1):298-303.
- [38] Johnson, V.A., et al. *Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: 2004*. Top. HIV. Med. (2004) 12:119-124.
- [39] Parkin, N.T., Chappey, C., Petropoulos, C.J.. *Improving Lopinavir Genotype Algorithm Through Phenotype Correlations: Novel Mutation Patterns and Amprenavir Cross-Resistance*. AIDS (2003) 17:955-961.
- [40] Loutfy, M.R.. *Predictive Value of HIV-1 Protease Genotype and Virtual Phenotype on the Virological Response to Lopinavir/Ritonavir-Containing Salvage Regimens*. Antiviral Therapy (2004) 9:595-602.
- [41] Hentig, N.V., et al. *Pharmacokinetics and Tolerability of a Combination of Indinavir, Lopinavir and Ritonavir in Multiply Pretreated HIV-1 Infected Adults*. Eur. J. Med. Res. (2006) 11:236-244.
- [42] Soo-Yon Rhee, et al. *HIV-1 Protease and Reverse-Transcriptase Mutations: Correlations with Antiretroviral Therapy in Subtype B Isolates and Implications for Drug Resistance Surveillance*. Journal of Infectious Diseases (2005) 192:456-465.
- [43] Zazzi, M., et al. *Comparative Evaluation of Three Computerized Algorithms for Prediction of Antiretroviral Susceptibility from HIV Type 1 Genotype*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2004) 53:356-360.
- [44] Ermolieff, J., Xinli Lin, Tang, J.. *Kinetic Properties of Saquinavir-Resistant Mutants of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease and Their Implications in Drug Resistance in Vivo*. Biochemistry (1997) 36:12364-12370.
- [45] Ohtaka, H., et al. *Overcoming Drug Resistance in HIV-1 Chemotherapy: The Binding Thermodynamics of Amprenavir and TMC-126 to Wild-Type*

- and Drug Resistant Mutants of the HIV-1 Protease*. Protein Science (2002) 11:1908-1916.
- [46] Craig, J.C., et al. *Antiviral Properties of Ro 31-8959, an Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Protease*. Antiviral Research (1991) 16:295-305.
- [47] Dorsey, B.D.. *L-735,524: The Design of a Potent and Orally Bioavailable HIV Protease Inhibitor*. J. Med. Chem (1994) 37:3443-3451.
- [48] Kempf, D.J.. *ABT-538 is a Potent Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Protease and has High Oral Bioavailability in Humans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:2484-2488.
- [49] Patick, A.K., et al.. *Antiviral and Resistance Studies of AG1343, an Orally Bioavailable Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Protease*. Antimicrob. Agents Chemother. (1996) 40:292-297.
- [50] Brooks, B.R., et al. *CHARMM: The Biomolecular Simulation Program*. J. Comput Chem (2009) 30:1545-1614.
- [51] Lee, M.S., et al.. *New Analytic Approximation to the Standard Molecular Volume Definition and its Application to Generalized Born Calculations*. J. Comput Chem (2003) 24:1348-1356.
- [52] McCammon, J.A., Gelin, B.R., Karplus, M.. *Dynamics of Folded Proteins*. Nature (1977) 267:585-590.
- [53] Allen, M.P., Tildesley, D.J.. *Computer Simulation of Liquid Crystals*. J. Computer Simulation of Liquids (1989) 3:335-353.
- [54] Stillinger, F.H., Rahman, A.. *Improved Simulation of Liquid Water by Molecular Dynamics*. J. Chem Phys (1974) 60:1545-1558.
- [55] Jorgensen, W.L., et al.. *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. J. Chem Phys (1983) 79:926-936.
- [56] Poveda, E., et al. *Evidence for Different Susceptibility to Tipranavir and Darunavir in Patients Infected with Distinct HIV-1 Subtypes*. AIDS (2008) 22:611-616.
- [57] Hirsch, M.S., et al. *Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008*. Clin. Infect. Dis. (2008) 47: 266-285,

- [58] Laitinen, T., Rouvinen, J., Perakyla, M.. *MM-PBSA Free Energy Analysis of endo-1,4-xylanase II (xynII)-Substrate Complexes: Binding of the Reactive Sugar in a Skew Boat and Chair Conformation*. *Org. Biomol. Chem.* (2003) 1:3535-3540.
- [59] Jenwitheesuk, E., Samudrala, R.. *Prediction of HIV-1 Protease Inhibitor Resistance Using a Protein-Inhibitor Flexible Docking Approach*. *Antiviral Therapy* (2005) 10:157-166.
- [60] Piana, S., Carloni, P., Parrinello, M.. *Role of Conformational Fluctuations in the Enzymatic Reaction of HIV-1 Protease*. *J. Mol. Biol.* (2002a) 319:567-583.
- [61] Piana, S., Carloni, P., Rothlisberger, U.. *Drug Resistance in HIV-1 Protease: Flexibility-Assisted Mechanism of Compensatory Mutations*. *Protein Science* (2002b) 11:2393-2402.
- [62] Collins, J.R., Burt, S.K., Erickson, J.W.. *Flap Opening in HIV-1 Protease Simulated by "Activated" Molecular Dynamics*. *Nat. Struct. Biol.* (1995) 2:334-338.
- [63] Mahalingam, B., et al. *Structural Implications of Drug-Resistant Mutants of HIV-1 Protease: High-resolution Crystal Structures of the Mutant Protease/Substrate Analogue Complexes*. *Proteins Struct. Funct. Genet.* (2001) 43:455-464.
- [64] Mahalingam, B., et al. *Combining Mutations in HIV-1 Protease to Understand Mechanism of Resistance*. *Proteins Struct. Funct. Genet.* (2002) 48:107-116.
- [65] Gustchina, A., et al.. *Energy Calculations and Analysis of HIV-1 Protease-Inhibitor Crystal Structures*. *Protein Engineering.* (1994) 7:309-316.
- [66] Rao, B.G., Mucko, M.A.. *Free Energy Perturbation Studies on Binding of A-74704 and its Diester Analog to HIV-1 Protease*. *Protein Engineering* (1996) 9:767-771.
- [67] Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson T. J. *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acid Research* (1994) Vol 22:4673-4680.

- [68] Leach, A.R.. “The three moves used in dynamic programming to update the matrix element H_{ij} .” *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Prentice Hall, 2005. 527.
- [69] Leach, A.R.. “Introduction to Comparative Modelling.” *Molecular Modelling: Principles and Applications*. Prentice Hall, 2005. 522.
- [70] <http://www.umass.edu/molvis/workshop/homolmod.htm>
- [71] http://caligari.dartmouth.edu/doc/insightII/homology/01_Introduction.html
- [72] Daga, R.P., Patel, R.Y., Doerksen, R.J.. *Template-Based Protein Modeling: Recent Methodological Advances*. Current Topics in Medicinal Chemistry (2010) 10:84-94.
- [73] <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.8b1/ug/node29.html>
- [74] Snyman, J.A.. “First Order Line Search Descent Method.” *Practical Mathematical Optimization*. Springer, 2005. 40-49.
- [75] <http://trond.hjorteland.com/thesis/node26.html>
- [76] <http://trond.hjorteland.com/thesis/node27.html>
- [77] Fletcher, R., Reeves, C.M.. *Function minimization by conjugate gradients*. Computer Journal (1964) 7:140-154.
- [78] <http://hivdb.stanford.edu>
- [79] Baxter, J., et al.. *Genotypic Changes in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Associated with Reduced Susceptibility and Virologic Response to the Protease Inhibitor Tipranavir*. Virology (2006) 80:10794-10801.
- [80] Schapiro, J., et al.. *Genotypic Tipranavir Scores as Predictors of Response*. EACS (2007) Poster number P3,4/16.
- [81] Johnson, V.A., et al.. *Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: Fall 2006*. IASUSA (2006) 14:125-130.
- [82] <http://www.rcsb.org>
- [83] Surleraux, D.L., et al. *Discovery and Selection of TMC 114, a Next Generation HIV-1 Protease Inhibitor*. J. Med. Chem. (2005) 48:1813-1822.

- [84] Bandaranayake, R.M., et al. *The Effect of Clade-Specific Sequence Polymorphisms on HIV-1 Protease Activity and Inhibitor Resistance Pathways*. *Virology* (2010) 84:9995-10003.
- [85] Piana, S.. "Possible Protonation States and Protonation Pattern un Free HIV-1 PR." *Ab Initio Molecular Dynamics Studies on HIV-1 Protease*. SISSA ISAS, 2000. 51.
- [86] Mitomo, D., et al. *Calculation of Protein-Ligand Binding Free Energy Using Smooth Reaction Path Generation (SRPG) Method; A Comparison of The Explicit Water Model, GB/SA Model, and Docking Score Function*. *Genome Inform.* (2009) 23(1):85-97.
- [87] Shen, C.H., et al. *Amprenavir Complexes with HIV-1 Protease and Its Drug-Resistant Mutants Altering Hydrophobic Clusters*. *FEBS Journal* (2010) 277:3699-3714.
- [88] Mao Shu, et al. *Molecular Dynamics Simulation of Oseltamivir Resistance in Neuraminidase of Avian Influenza H5N1 Virus*. *J. Mol. Model.* (2010) DOI 10.1007/s00894-010-0757-x
- [89] Shenderovich, M.D., et al. *Structure-Based Phenotyping Predicts HIV-1 Protease Inhibitor Resistance*. *Protein Science* (2003) 12:1706-1718.
- [90] Wei Wang and Peter A. Kollman, *Computational Study of Protein Specificity: The Molecular Basis of HIV-1 Protease Drug Resistance*. *PNAS* (2001) 98(26): 14937-14942.