

STUDI INTERAKSI LIGAN PEPTIDOID DAN PEPTIDA DENGAN ENZIM PROTEASE NS3/NS2B VIRUS *DENGUE*

Fitri Amelia

*Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang
Jl. Prof. Dr. Hamka Air Tawar Barat Padang, 25131
Email : fitri.amelia2@gmail.com*

ABSTRACT

Peptide has a high bioactivity and specificity, possess low interaction to other drugs and has a low toxicity values . However, peptide -based drugs have drawbacks, which are rapidly degraded in the digestive system due to the activity of the protease enzyme that peptide drugs are not suitable to be developed as an oral medication. The purpose of this study to determine whether the value of K_i peptidoid is higher than the peptide and to analyze the influences between interaction and K_i . ΔG of Peptidoid KGPE is the higher than its peptide, -16.13874 kkal/mol. The high number of hydrogen donor for Hydrogen bonding derived ligand can lower the value of K_i

Key words: peptidoid,peptide-base drug, protease NS3/NS2B

PENDAHULUAN

Dengue virus (DENV) merupakan salah satu virus yang berasal dari genus Flavivirus yang telah menjadi masalah kesehatan dunia. Hal ini disebabkan hampir 50 juta orang yang terinfeksi dan menyebabkan 20.000 orang meninggal setiap tahunnya (Guzman, Halstead et al. 2010).

Berdasarkan serotipenya, DENV terdiri atas DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4. Morfologi dan genom keempat serotipe tersebut sama, namun jenis antigen yang merangsang respon imun tubuh berbeda (Whitehorn and Farrar 2010). Infeksi DENV dapat menyebabkan *Dengue Fever* (DF), *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) dan *dengue shock syndrome* (DSS). Sampai saat ini, belum ada vaksin maupun obat khusus berlisensi untuk mengatasi infeksi DENV yang tersedia di pasaran. Hal ini dikarenakan banyaknya rancangan obat DENV yang belum memiliki efektifitas yang tinggi untuk mengurangi jumlah titer DENV pada pasien. Disamping itu, beberapa obat yang diketahui telah dapat menurunkan titer DENV dalam darah belum melewati tahap *clinical trial* pada manusia (Hammamy, Haase et al. 2013).

Salah satu strategi yang dapat dilakukan untuk membuat *antiviral* adalah dengan cara menghambat protein yang dibutuhkan oleh virus untuk menginfeksi ataupun memperbanyak diri di dalam tubuh manusia. Protein NS3 (yang dibantu oleh NS2B sebagai kofaktor) merupakan salah satu protein yang memiliki peranan penting dalam proses proteolitik paska translasi, replikasi virus dan pematangan virion dengue. Pentingnya peranan protein NS3 dan telah diketahuinya sisi katalitik enzim pada His51, Asp75, and Ser135 membuat protein ini merupakan target untuk desain agen terapeutik untuk infeksi DENV (Yin, Patel et al. 2006).

Penggunaan peptida sebagai obat/antiviral merupakan strategi yang sangat menjanjikan. Hal ini dikarenakan obat berbasis peptida memiliki bioaktivitas dan spesifisitas yang tinggi, memiliki interaksi yang rendah terhadap obat lain dan memiliki nilai toksisitas yang rendah (Tambunan, Zahroh et al. 2014).

Yin (2006) telah mensintesis 21 peptida untuk menghambat aktifitas NS3 DENV. Dari 21 peptida yang telah disintesis, terdapat 3 peptida yaitu Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-H, Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-CF₃, Bz-Nle-Lys-Arg-Arg-B(OH)₂

merupakan peptida yang efektif untuk menghambat aktifitas NS3. Senada dengan penelitian tersebut, Velmurugan (2013) telah melaporkan tetrapeptide (Lys-Gly-Pro-Glu), pentapeptide (Ser-Ile-Lys-Phe-Ala) and hexapeptide (Ala-Ile-Lys-Lys-Phe-Ser) dapat dijadikan sebagai kandidat obat untuk menghambat aktifitas NS3 ditinjau dari nilai K_i (konstanta inhibisi)

Obat berbasis peptida memiliki kelemahan, yaitu mudah terdegradasi dalam sistem pencernaan akibat aktivitas enzim protease sehingga obat peptida tidak cocok dikembangkan sebagai obat oral (Tan, Chan et al. 2012). Untuk itu, pada penelitian ini dilakukan modifikasi peptida hasil penelitian Velmurugan menjadi peptidoid. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui apakah nilai K_i peptidoid hasil rancangan lebih tinggi daripada peptida utama dan mengetahui pengaruh interaksi yang terbentuk antara ligan dengan protein NS3 terhadap nilai K_i dengan *molecular docking*. (Velmurugan, Mythily et al. 2013)

METODE PENELITIAN

Perancangan Peptidoid

Peptidoid dirancang dengan melakukan modifikasi peptida ligan hasil penelitian Velmurugan (2013). Ligan peptidoid dan peptida dirancang menggunakan *software* ChemSketch yang dibuat dalam bentuk bentuk *zwitter* ionnya. Hasil perancangan ligan dalam bentuk dua dimensi kemudian disimpan dalam format MDL Mofile (Gambar 1). Format penyimpanan ligan kemudian dirubah menjadi MDL Mol dengan menggunakan *software* Vega ZZ.

Ligan dioptimasi dengan meminimalisasikan energi ligan menggunakan *software* MOE. Proses optimasi dilakukan dengan beberapa tahap yaitu 1) proses *wash* pada *database*. 2) Pengaturan muatan parsial menggunakan *tool compute>partial charge* dengan parameter *method* : MMFF94x, *solvation*: *gas phase*. 3) minimisasi energi dengan *tool compute>energy minimize* dengan parameter RMS gradient 0.001 kcal/Å mol yang dilakukan pada ligan. Parameter yang lainnya menggunakan *default* dan *file output* dalam format *mdb*.

Preparasi Protein NS3/NS2B

Struktur 3D Protein NS3/NS2B dengan kode PDB 2FOM diunduh pada situs RSCB www.rcsb.org. Struktur 3D NS3/NS2B diop-

timasi dengan cara 1) penghilangan molekul air pada protein, 2) protonasi menggunakan *tool compute>protonate* 3D, 3) penambahan atom hidrogen pada dengan *hydrogen fix* dan pengaturan muatan parsial enzim menggunakan *partial charge*, dengan parameter *method* yang digunakan adalah *current force field*. 4) Minimisasi energi dengan *force field* MMFF94x, solvasi yang digunakan selama proses optimasi adalah *gas phase*, dan RMS gradient 0.05 kcal/Å mol. Parameter yang lainnya menggunakan *default* dan *file output* dalam format *moe*.

Molecular Docking

Proses *docking* dilakukan dengan *software* MOE 2008.10 *tool simulation>dock*. *Placement method* yang digunakan adalah *triangle matcher* dengan banyaknya jumlah putaran 1000. Fungsi *scoring* yang digunakan adalah London dG dengan menampilkan data terbaik sebesar 100. Selanjutnya dari 100 tampilan data terbaik tersebut dilakukan pengukuran ulang (*refinement*) dengan menggunakan *refinement force field* dengan konfigurasi ukuran pengulangan populasi sebesar 1000 sesuai dengan *default* MOE. Tampilan hasil keseluruhan proses *docking* yang dipilih adalah 1 data terbaik. Parameter lainnya sesuai dengan *default* dari MOE dan *file output* dalam format *.mdb*.

Analisis Docking

Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG binding)

Energi bebas ikatan hasil *docking* dilihat pada *output* dalam format *mdb*. Kompleks enzim-ligan yang dipilih adalah kompleks yang memiliki nilai energi bebas ikatan terkecil untuk kemudian dilakukan analisis lebih lanjut.

Interaksi Protein-Ligan

Interaksi antara protein dan ligan yang akan dianalisis adalah ikatan hidrogen dan kontak residu antara enzim-ligan. Ikatan hidrogen yang terjadi pada kompleks enzim-ligan terbaik hasil *docking* diidentifikasi menggunakan *software* MOE 2009.10. Format *file input* yang digunakan untuk identifikasi dan analisis adalah *mdb*. Kontak residu kompleks enzim-ligan hasil *docking* diidentifikasi dan kemudian dilakukan visualisasi dengan menggunakan *software* MOE 2009.10 pada *tool ligan interaction* (LigX).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nilai Energi Bebas Ikatan (ΔG binding)

Secara termodinamika, interaksi intermolekuler dan pembentukan kompleks protein-ligan ditentukan oleh perubahan energi bebas gibbs (ΔG). Jika harga bernilai negatif, maka keseluruhan proses atau reaksi berlangsung se-

cara spontan (Sotriffer 2011). Berdasarkan data Tabel 1 terlihat bahwa ligan peptidoid dan peptida bernilai negatif sehingga dapat disimpulkan bahwa interaksi antara peptidoid NS3/NS2B dengan ligan berlangsung secara spontan.

Tabel 1 Data Energi Bebas Ikatan (ΔG) Hasil *Molecular Docking*

Peptidoid			Peptida		
No	Ligan	ΔGZ (kkal/mol)	No	Ligan	ΔG (kkal/mol)
1	Peptidoid KGPE	-16.14	1	Peptida KGPE	-15.35
2	Peptidoid SIKFA	-14.57	2	Peptida SIKFA	-18.54
3	Peptidoid AIKKFS	-15.35	3	Peptida AIKKFS	-17.44

Peptidoid SIKFA dan AIKKFS memiliki nilai ΔG yang lebih rendah daripada peptidanya, sedangkan peptidoid KGPE memiliki ΔG yang lebih tinggi dari peptidanya. Pada keadaan setimbang diketahui bahwa :

Enzim + Inhibitor \rightleftharpoons Enzim-Inhibitor
 Nilai ΔG inhibisi = $-RT \ln K_i$ atau $K_i = \text{Exp}(\Delta G / (RT))$ (Chang 2003). Semakin tinggi tinggi nilai ΔG , maka nilai K_i (konstanta Inhibisi) akan semakin rendah dan kemampuan ligan untuk berinteraksi dengan enzim akan semakin besar. Berdasarkan teori tersebut, dida-

patkan bahwa hanya peptidoid KGPE yang memiliki K_i yang rendah.

Ikatan Hidrogen dan kontak residu

Pada ligan yang digunakan sebagai obat, ikatan ligan-protein biasanya terjadi melalui interaksi nonkovalen. Interaksi fisik ini didasarkan pada teori gaya elektromagnetik atau kuantum mekanik. Interaksi nonkovalen dipengaruhi oleh gaya elektrostatis seperti pembentukan jembatan garam, ikatan hidrogen, dan gaya van der waals (Sotriffer 2011).

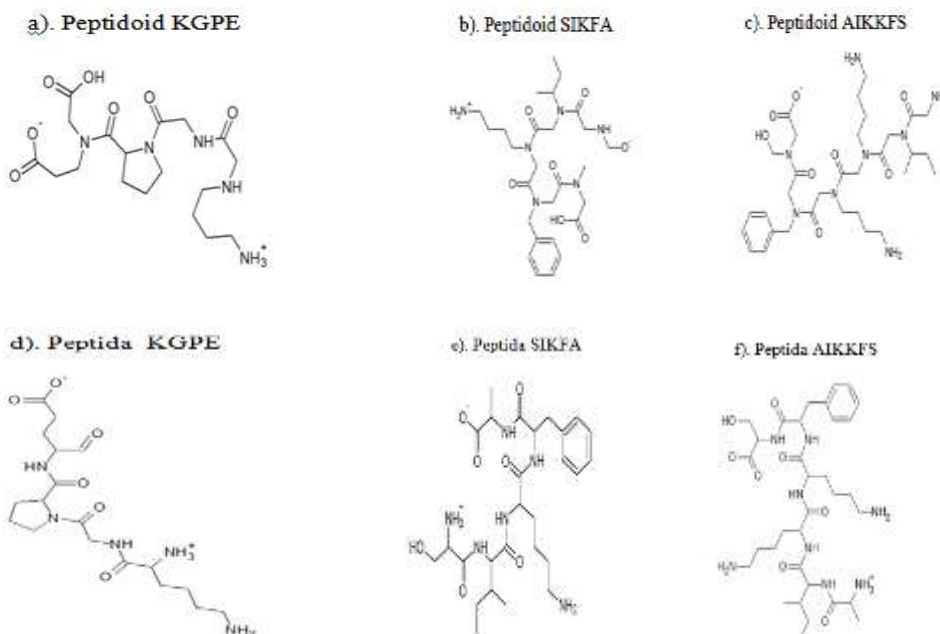
Tabel 2 Interaksi Ikatan Hidrogen Ligan-Protein

No	Ligan	Jumlah Ikatan Hidrogen	Donor H Protein	Donor H pada Ligan	Kontak Residu Asam Amino
1	Peptidoid KGPE	6	1	5	Ala38, Thr48, His51, Ser135, Asn152, Asp75,
2	Peptidoid SIKFA	7	4	3	His51, Ala164, Lys74, Asp75, Asn152, Gly153,
3	Peptidoid AIKKFS	7	2	5	Lys74, Asp75, Val126, Ser135, Asn152, Tyr150, Ser163
4	Peptida KGPE	5	1	4	Thr48, Asp75, Lys74, Gly153, asn152
5	Peptida SIKFA	5	1	4	Thr48, Thr53, Asp75, Lys74
6	Peptida AIKKFS	13	5	8	Tyr23, Tyr23, Val40, Ala38, Asp75, Lys74, Met49, Thr48, Thr48, Ile36, Gly39, Ser137

Keterangan: dicetak tebal merupakan penyumbang Hidrogen dari protein

Berdasarkan Tabel 1 diketahui hanya nilai ΔG ligan peptidoid KGPE yang lebih tinggi dari peptidanya. Hal ini dimungkinkan karena jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk pada peptidoid KGPE lebih banyak dari peptidanya (Tabel 2). Berbeda halnya dengan peptidoid AIKKFS, ligan peptidoid AIKKFS memiliki ikatan hidrogen lebih banyak dibandingkan peptidanya namun nilai ΔG pada interaksi peptidoid AIKKFS lebih rendah dari peptidanya. Hal ini disebabkan karena jumlah penyumbang

hidrogen pada ikatan yang terbentuk pada umumnya berasal dari protein. Berdasarkan hasil penelitian ini diasumsikan bahwa jumlah penyumbang hidrogen yang berasal dari ligan lebih banyak dari penyumbang hidrogen dari protein dapat menurunkan nilai K_i . Banyaknya hidrogen yang berasal dari protein yang potensial membentuk ikatan hidrogen dapat mengganggu fleksibilitas ligan dalam menemukan sisi terbaik dalam berikatan.

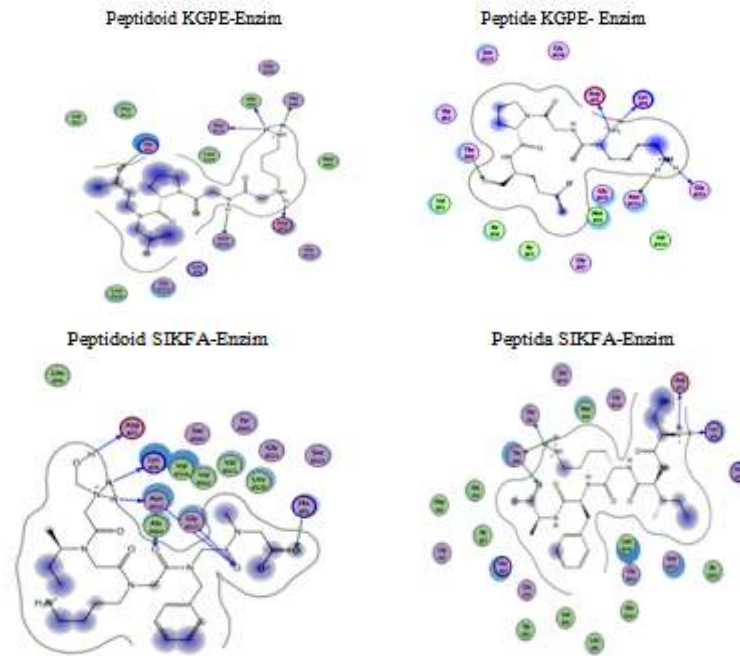


Gambar 1 Struktur Peptidoid

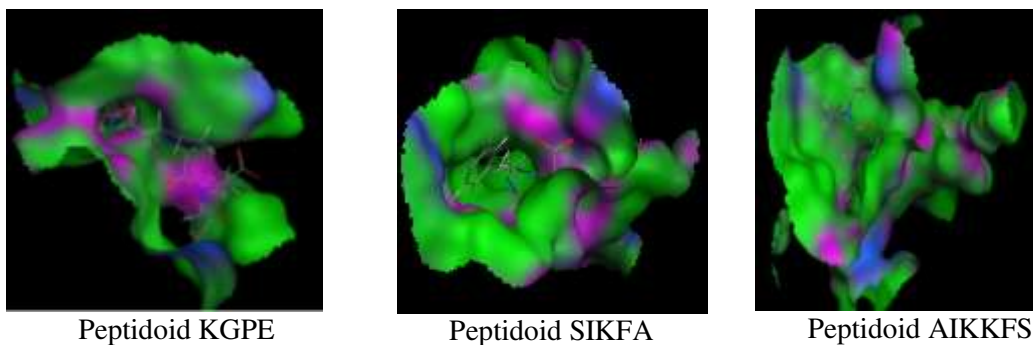
Pada penelitian ini, diketahui bahwa sisi katalitik pada NS2B/NS3 yang selalu berinteraksi dengan ligan adalah Asp75. Atom elektronegatif yang terlibat pada Asp adalah atom Oksigen (O) pada gugus karbonil yang berada pada R asam amino tersebut.

Ketiga peptidoid yang dianalisis berada di dalam sisi aktif enzim (Gambar 3). Hal ini

dapat dilihat dari terbentuknya ikatan hidrogen pada salah satu sisi aktif (catalytic triad: His51, Asp75, and Ser135) yaitu pada Asp 75 (Gambar 2). Dengan adanya ikatan hidrogen yang terbentuk dengan protein pada sisi aktif enzim diharapkan fleksibilitas protein menjadi berkurang dan perubahan konformasi enzim menjadi terganggu.



Gambar 2 Interaksi ligan dengan protein enzim protease NS3/NS2B



Keterangan : Ikatan hidrogen (■) Interaksi hidrofobik (■)
 Gambar 3 Posisi Ligan pada Sisi Aktif Enzim

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil *molecular docking* diketahui bahwa nilai ΔG peptidoid KGPE lebih tinggi dari peptidanya sehingga nilai konstanta inhibisinya menjadi lebih rendah. Hal ini me-

nyiratkan bahwa interaksi antara peptidoid KGPE dengan enzim jauh lebih mudah terjadi dibandingkan dengan peptidanya.

Jumlah ikatan hidrogen yang terbentuk pada peptidoid KGPE lebih banyak dari pepti-

danya. Peptida AIKKFS juga memiliki ikatan hidrogen lebih banyak dibandingkan peptidoidnya. Tingginya nilai ΔG pada peptidoid KGFE dan peptida AIKKFS disebabkan jumlah penyumbang hidrogen yang berasal dari ligan lebih banyak dari penyumbang hidrogen dari protein sehingga dapat menurunkan nilai K_i . Keenam ligan yang dianalisis berada di dalam sisi aktif enzim dan berinteraksi pada sisi katalitik enzim Asp 75. Ikatan hidrogen terbentuk dengan atom oksigen pada gugus karbonil pada rantai R Asp.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- Chang R. 2003. *Kimia Dasar: Konsep-konsep inti*. Jakarta: Erlangga.
- Guzman MS, Halstead et al. 2010. Dengue: A Continuing Global Threat. *Nat Rev Microbiol* 8: 7-16.
- Hammamy MZ, Haase C et al. 2013. Development and Characterization of New Peptidomimetic Inhibitors of the West Nile Virus NS2B-NS3 Protease. *ChemMedChem* 8(2): 231-241.
- Sottriffer C. 2011. *Virtual Screening: Principles, Challenges, and Practical Guidelines*, Jhon Wiley VCH.
- Tambunan USF, Zahroh H, et al. 2014. Screening of commercial cyclic peptide as inhibitor NS5 methyltransferase of Dengue virus through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. *Bioinformation* 10(1): 23-27.
- Tan CW, Chan YF, et al. 2012. Inhibition of Enterovirus 71 (EV-71) Infections by a Novel Antiviral Peptide Derived from EV-71 Capsid Protein VP1. *PLoS ONE* 7(5): e34589.
- Velmurugan DU, Mythily et al. 2013. Design and Docking Studies of Peptide Inhibitors as Potential Antiviral Drugs for Dengue Virus NS2B/NS3 Protease. *Protein Pept Lett* 20(7).
- Whitehorn J and Farrar J2010. Dengue. *British Medical Bulletin*. 95: 161-173.
- Yin ZS, Patel J, et al. 2006. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(1): 36-39