

# Pengaruh Hidrasi pada Protein Kompleks Azurin menggunakan Metode *Coarse-Grained* dan Analisis *Free Energy*

Dian Fitrasari<sup>1,a)</sup> dan Acep Purqon<sup>1,b)</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Fisika Bumi,  
Kelompok Keilmuan Fisika Bumi dan Sistem Kompleks,  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung,  
Jl. Ganesha no. 10 Bandung, Indonesia, 40132

<sup>a)</sup> dianfitrasari30@gmail.com (*corresponding author*)

<sup>b)</sup> acep@fi.itb.ac.id

## Abstrak

*Protein memegang peranan penting dalam metabolisme tubuh. Interaksi kompleks antara protein dan hidrasi akan banyak menghabiskan biaya komputasi khususnya untuk perhitungan all-atom. Metode coarse-grained merupakan salah satu solusi potensial yang dapat menyederhanakan perhitungan dan waktu komputasi. Penelitian ini menggunakan metode coarse-grained untuk menyelidiki pengaruh hidrasi, konformasi dan stabilitas. Penelitian ini, menggunakan protein kompleks azurin karena azurin merupakan salah satu protein yang memiliki stabilitas tinggi sehingga berpotensi dalam pengobatan kanker. Penelitian ini menganalisis sistem konformasi free-energy untuk menemukan struktur stabil yang memungkinkan. Nilai RMSD yang didapatkan berkisar pada rentang 0.7 - 1.2 Å. Hal ini berarti, bahwa sistem protein dalam keadaan dinamis dan telah cukup stabil dalam konformasinya.*

*Kata-kata kunci: Pengaruh Hidrasi, Protein Kompleks Azurin, Metode Coarse-Grained, Analisis Free Energy*

## PENDAHULUAN

Protein melakukan sebagian besar fungsi dalam kehidupan. Air juga berperan penting dalam kehidupan dan kerja protein[1]. Hidrasi merupakan proses dimana ion dikelilingi molekul air yang tersusun dalam keadaan tertentu. Hidrasi untuk menstabilkan ion-ion dalam larutan dan mencegah kation untuk bergabung kembali dengan anion[2]. Hidrasi sangat penting untuk struktur, sifat fisika dan biologi dari protein[3]. Tetapi, penelitian mengenai pengaruh hidrasi pada protein masih kurang. Penelitian ini mengenai pengaruh hidrasi dan stabilitasnya pada protein kompleks dibutuhkan sebagai acuan untuk eksperimen laboratorium.

Penelitian protein kompleks azurin ini dilakukan dengan pendekatan simulasi. Studi variasi parameter keadaan yang dapat menyesuaikan (struktur, koordinat, temperatur), parameter simulasi (*force field*), parameter integrator (*time step*, *rigid bonds*), kontrol temperatur konstan, *periodic boundary condition*, *particle mesh ewald*, kontrol tekanan konstan. Karakterisasi protein kompleks azurin dapat dihitung dengan metode komputasi berbasis metode *coarsed-grained*. Penelitian ini menggunakan paket perangkat lunak NAMD 2.11 dengan perhitungan *CHARM++* dan *pseudo atoms* digunakan sebagai perhitungan. Struktur protein kompleks akan diterapkan untuk mencari stabilitas protein kompleks dengan variasi

hidrasi. Kemudian dilakukan simulasi dengan berbagai macam parameter keadaan seperti suhu, struktur dan koordinat hidrasi.

## METODE

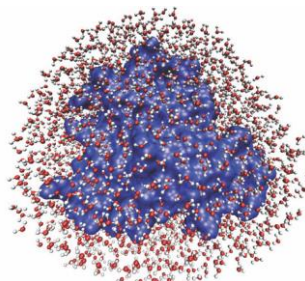
### Protein Kompleks Azurin

Penggunaan mikroorganisme dan produknya memungkinkan sebagai agen terapi, dalam kontrol kanker yang dimulai pada abad 19. Pencarian obat baru dari sumber mikrobial melawan infeksi penyakit yang teraugmentasi terjadi ketika Alexander Fleming (1928) menemukan penisilin [4]. Metabolisme sekunder mikroorganisme memainkan fungsi penting pada pengembangan antibiotik dan kemoterapi [5,6]. Beberapa penelitian melaporkan berbagai macam molekul antikanker dari sumber mikrobial berbeda [7]. Walaupun kemoterapi secara efisien meningkatkan ketahanan pasien dengan kasus tumor utama lanjut telah menghilangkan prognosis. Kemajuan yang cepat pada bidang antibiotik telah menginspirasi harapan baru bahwa penelitian diantara sistem biologis akan memperlihatkan agen kimia yang dapat mendesak efek destruktif pada penumbuhan neoplastik tanpa secara serius mempengaruhi sel normal. Penggunaan bakteri patogenik hidup yang teratenuasi maupun metabolismenya dalam pengobatan kanker mempengaruhi ekresi racun diantara pasien. Protein redoks azurin saat ini menarik peneliti biomedis sebagai agen terapi antikanker yang masuk pada sel kanker payudara manusia dan menyebabkan apoptosis tanpa banyak efek yang merugikan bagi pasien kanker [8].

Metabolisme sekunder azurin diperoleh dari spesies bakteri khusus, khususnya dari *Pseudomonas aeruginosa* yang berfungsi sebagai donor pada proses transfer elektron terminal [9]. Azurin juga diketahui merupakan protein yang memiliki kandungan tembaga dengan kestabilan tinggi di alam. Keberadaan ion tembaga dalam rantai polipeptida berkontribusi pada stabilitas protein [9-11]. Azurin dilaporkan sebagai protein anti kanker yang potensial melawan garis sel kanker payudara yang menyebabkan penelitian metode baru untuk meningkatkan sintesis azurin yang telah terpasang. *P. aeruginosa* secara alami ditemukan sebagai bakteri patogenik oportunistik gram negatif oportunistik [12]. Bakteri ini dianggap sebagai penumbuh kondisi anaerobik fakultatif parsial atau kondisi deplesi kultural total  $O_2$ . Organisme ini dapat mencapai pertumbuhan anaerobik dengan nitrat sebagai akseptor terminal elektron. *P. aeruginosa* mensekresi berbagai pigmen, termasuk pikosianin, pioverdin dan piorubin. Penelitian sebelumnya [13] mengadaptasi teknik genetika dan spesies bakterial lain untuk memurnikan azurin. Penambahan tembaga akan meningkatkan sintesis azurin dan juga menampakkan perbedaan stabilitas azurin pada struktur sekunder [14].

### Hidrasi Protein

Protein melakukan sebagian besar fungsi yang diperlukan untuk kehidupan. Sebuah pemahaman kuantitatif tentang bagaimana protein bekerja dan bagaimana fungsinya dapat dikendalikan, penting untuk banyak tujuan seperti *biodefense*. Air juga penting untuk kehidupan dan untuk kerja protein, tetapi pemahaman yang benar tentang mengapa air sangat penting masih sangat kurang. Protein dikelilingi oleh *shell* hidrasi dengan satu sampai dua lapisan air (Gambar. 1).



Gambar 1. *Myoglobin* protein terhidrasi (permukaan biru) dengan 1.911 molekul air (merah dan putih), perkiraan jumlah yang dibutuhkan untuk fungsi optimal ( $h = 2$ ). Air membentuk *shell* sekitar  $5 \text{ \AA}$  disekitar protein. [1]

Air ini sangat penting untuk fungsi protein, karena protein dalam keadaan dehidrasi tidak bekerja. Cara kerja dari *shell* hidrasi belum diklarifikasi [15]. Peran *shell* hidrasi dapat dipahami dan bagaimana mengontrol gerakan protein internal yang terlibat dalam fungsi-fungsinya [16]. Cairan pembentuk kaca menunjukkan dua jenis utama dari fluktuasi,  $\alpha$  dan  $\beta$  [3]. Fluktuasi  $\alpha$  merupakan perubahan struktural yang mempengaruhi sebagian besar gerakan dari protein, tetapi tidak bergantung pada hidrasi. Fluktuasi  $\beta$  dalam *shell* hidrasi bergantung pada hidrasi dan terjadi bahkan jika lingkungan kaku. Peran fluktuasi  $\beta$  adalah mengontrol gerakan protein internal.

**Metode Coarse-Grained**

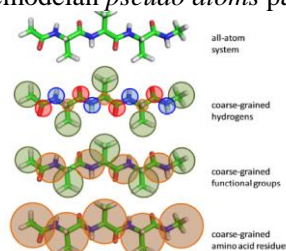
Pendekatan *bottom-up* merupakan pendekatan dimana informasi pada skala yang lebih kecil digunakan untuk menginformasikan model pada skala yang lebih besar. Model skala besar umumnya disebut *coarse-grained*. *Coarse-grained* merupakan model dimana rincian *fine* (halus) telah dihaluskan atau dirata-ratakan. Penggantian deskripsi *fine-grained* dengan model resolusi rendah disebut *coarse graining*. Tantangan pembuatan model ini ialah untuk mengembangkan model CG yang secara signifikan lebih mudah untuk disimulasikan tapi yang dapat mereproduksi perilaku fisik yang sama sebagai satu acuan *all-atom*. Model CG dapat dirancang dengan tiga jenis cara:

- Model CG biasanya memerlukan *pseudo atoms sites* yang dirancang untuk mewakili gabungan kelompok dari beberapa atom. *Pseudo atoms sites* harus dipilih dan cara *pseudo atoms sites* dapat terhubung pada model yang lebih rinci harus ditentukan.
- Definisi fungsi energi yang efektif  $U_{CG}$  untuk model CG. Fungsi energi ini mendefinisikan interaksi antara *pseudo atoms* dan dipilih untuk mereproduksi sifat termodinamika (statis) yang sama dari acuan rincian sistem.
- Persamaan dinamik yang efektif ditentukan apabila ingin mengetahui sifat dinamis. Persamaan ini untuk menggambarkan saat evolusi dari sistem CG.

Beberapa tujuan penting yang digunakan dalam pemilihan *pseudo atoms*, antara lain, untuk mengembangkan model yang lebih murah, lebih mudah untuk disimulasikan pada sistem CG, untuk mengembangkan model CG yang memiliki dasar lanskap energi yang halus, lebih cepat dan untuk *time steps* yang lebih besar serta untuk mempertahankan (perkiraan) sifat fisika yang benar. [18]

**Pseudo atoms**

Biasanya *pseudo atoms* didefinisikan sebagai kelompok atom dari kimia umum, seperti metil atau karbonil, kelompok yang mengandung banyak unit fungsional. *Pseudo atoms* merupakan strategi umum dalam pemodelan polimer. Ada banyak cara untuk mengembangkan *pseudo atoms* dari berbagai resolusi. Gambar 2 merupakan salah satu pemodelan *pseudo atoms* pada polialanin.



Gambar 2. Simulasi *pseudoatom* [18]

Perkembangan deskripsi pseudoatom sistem membutuhkan definisi dari fungsi pemetaan  $\mathbf{M}$ . Fungsi pemetaan ini diambil sebagai masukan satu set koordinat atom dalam sistem rinci dan pemetaan ini untuk konfigurasi *pseudo atoms* yang unik dalam sistem CG. Untuk kesederhanaan notasi, didefinisikan

$$\mathbf{R} \equiv \mathbf{r}_{CG}^{N_{CG}} \tag{1}$$

$$\mathbf{R} \equiv \mathbf{r}_A^{N_A} \tag{2}$$

dimana *subscript 'A'* menunjukkan sistem referensi *all-atom*. Sehingga, fungsi pemetaan memiliki bentuk:

$$\mathbf{R} = \mathbf{M}(\mathbf{r}) \tag{3}$$

Terdapat lebih dari satu pemetaan konfigurasi atomistik pada salah satu konfigurasi *coarse-grained*.

*Pseudo atoms sites* didefinisikan sebagai koordinat pusat dalam representasi *all-atom*:

$$\mathbf{R}_I = \left( \sum_{j \in \text{atom untuk } I} m_j \mathbf{r}_j \right) \left( \sum_{j \in \text{atom untuk } I} m_j \right)^{-1} \tag{4}$$

ungkapan seperti ini menimbulkan koordinat *CG* yang selalu dapat dinyatakan sebagai kombinasi linear dari koordinat atom. Dalam hal ini, fungsi pemetaan menjadi matriks pemetaan:

$$\mathbf{R} = \mathbf{M}\mathbf{r} \tag{5}$$

$\mathbf{R}$  dan  $\mathbf{r}$  memiliki panjang  $3N_A$  dan  $3N_{CG}$  vector. Matriks  $\mathbf{M}$  memiliki dimensi  $(3N_{CG}, 3N_A)$

### Metode untuk mendapatkan $U_{CG}$

Ada beberapa metode untuk mendekati masalah ini yang digunakan dalam literatur. Semua ini mengharuskan simulasi referensi dari sistem atomistik. Hal ini merupakan langkah yang pertama dilakukan sehingga  $U_{CG}$  dapat dioptimalkan untuk itu. Parameterisasi model *CG* dikembangkan untuk mewakili sistem atomistik sangat kecil. Kemudian, digunakan untuk melakukan simulasi dengan ukuran sistem yang jauh lebih besar daripada yang dapat dicapai skala atomistik.

### Optimasi Entropi Relatif

Salah satu kelemahan dari pendekatan inversi *Monte Carlo (MC)* dan *force matching* adalah bahwa pendekatan-pendekatan tersebut tidak memberikan metrik universal untuk kualitas model *CG*. Artinya, tidak ada cara untuk membandingkan kualitas relatif dari beberapa model *CG* dengan penomoran yang berbeda dari setiap *pseudo atoms sites*. Selain itu, ada keterbatasan tertentu, pendekatan inversi *MC* hanya menghasilkan potensial *discretized pairwise* secara halus dan pendekatan *force matching* terbatas pada potensial kontinyu.

Kerangka kerja baru diperkenalkan untuk optimalisasi model *CG* berdasarkan anggapan metrik universal untuk kualitas model *CG* yang disebut entropi relatif [18]. Kuantitas ini berasal dari teori informasi dan memiliki bentuk sistem diskrit sebagai berikut:

$$S_{rel} = \sum_m \wp_A(m) \ln \left[ \frac{\wp_A(m)}{\wp_{CG}(m)} \right] + S_{map} \tag{6}$$

Penjumlahan hasil semua konfigurasi *microstates (m)* dalam sistem atomistik dan dua set probabilitas yang sesuai dengan probabilitas konfigurasi baik dalam atomistik atau ensemble *CG*, merupakan probabilitas yang diharapkan jika simulasi yang dilakukan menggunakan  $U_A$  atau  $U_{CG}$ . Istilah  $S_{map}$  hanya mengukur degenerasi dari pemetaan:

$$S_{map} = \ln(\text{avg\#atomistic configs mapping to a single CG config}) \tag{7}$$

$S_{map}$  bukan merupakan fungsi dari fungsi energi *coarse-grained*. Untuk sistem kontinyu, dapat dituliskan:

$$S_{rel} = \int \wp_A(\mathbf{r}) \ln \left[ \frac{\wp_A(\mathbf{r})}{\wp_{CG}(\mathbf{M}(\mathbf{r}))} \right] d\mathbf{r} + S_{map} \tag{8}$$

Entropi relatif dapat diturunkan atas dasar argumen kemungkinan maksimum. Derivasi lebih lanjut secara rinci tidak dipertimbangkan, meskipun akan dicatat bahwa hal tersebut memiliki dasar masalah hubungan inversi dalam mekanika statistik.

Entropi relatif adalah metrik keseimbangan tumpang tindih, dan memiliki beberapa sifat:

1. Nilai-nilai yang lebih tinggi menunjukkan kurangnya *overlap* dari model *CG* dengan satu *all-atom*.
2. Pada optimalitas model,  $S_{rel}$  minimum dan nol dalam kasus model yang sempurna tereproduksi.
3.  $S_{rel}$  selalu positif atau nol, konstruksi konsekuensi matematis dari dua distribusi probabilitas dan hubungannya dengan kemungkinan *log*.

**Ensemble Kanonik**

Dalam ensambel kanonik, dapat digantikan

$$\wp_{CG}(\mathbf{R}) = \frac{e^{-\beta U_{CG}(\mathbf{R})}}{Z_{CG}} \tag{9}$$

$$\wp_A(\mathbf{R}) = \frac{e^{-\beta U_A(\mathbf{R})}}{Z_A} \tag{10}$$

untuk menemukan

$$S_{rel} = \beta \langle U_{CG} - U_A \rangle_A - \beta (A_{CG} - A_A) + S_{map} \tag{11}$$

Istilah pertama pada *RHS* merupakan perata-rataan yang dilakukan dalam ensambel *all-atom*, yaitu, menggunakan semua lintasan atom. Pendekatan entropi relatif mengatakan bahwa harus ditemukan nilai optimal dari parameter pada fungsi energi *CG* dengan meminimalkan  $S_{rel}$ , sehubungan dengan beberapa referensi simulasi lintasan *all-atom*. Optimasi dari parameter  $\lambda$  tunggal dapat dipertimbangkan untuk menjadi parameter Lennard-Jones  $\epsilon$  atau  $\sigma$ , atau sebagian muatan, misalnya. Pada keadaan minimum, diperlukan

$$\begin{aligned} 0 &= \frac{\partial S_{rel}}{\partial \lambda} \\ &= \beta \frac{\partial \langle U_{CG} \rangle_A}{\partial \lambda} - \beta \frac{\partial A_{CG}}{\partial \lambda} \\ &= \beta \left\langle \frac{\partial U_{CG}}{\partial \lambda} \right\rangle_A - \beta \left\langle \frac{\partial U_{CG}}{\partial \lambda} \right\rangle_{CG} \end{aligned} \tag{12}$$

**Optimasi Fungsional dalam Ensambel Kanonik**

$U_{CG}$  optimal satu-satunya yang secara fungsional meminimalkan entropi relatif:

$$\frac{\delta S_{rel}[U_{CG}(\mathbf{R})]}{\delta U_{CG}(\mathbf{R}')} = 0 \tag{13}$$

Untuk melakukan turunan fungsional,  $S_{rel}$  diekspresikan dalam syarat integral konfigurasional:

$$S_{rel} = \beta \int \wp_A(\mathbf{r}) [U_{CG}(M(\mathbf{r})) - U_A(\mathbf{r})] d\mathbf{r} + \ln \int e^{-\beta U_{CG}(\mathbf{R})} d\mathbf{R} - \ln \int e^{-\beta U_A(\mathbf{r})} d\mathbf{r} + S_{map} \tag{14}$$

Perhatikan bahwa entropi pemetaan tidak bergantung  $U_{CG}$  (contohnya, hanya tergantung pada pilihan *pseudo atoms* dan fungsi pemetaan). Hal ini kemudian dapat menunjukkan bahwa turunan fungsional dari entropi relatif memberikan [18],

$$\frac{\delta S_{rel}[U_{CG}]}{\delta U_{CG}} = \beta \int \wp_A(\mathbf{r}) \delta[M(\mathbf{r}) - \mathbf{R}'] d\mathbf{r} - \wp_{CG}(\mathbf{R}') \tag{15}$$

Sehingga didapatkan,

$$\wp_A(\mathbf{R}') = \wp_{CG}(\mathbf{R}') \tag{16}$$

$U_{CG}$  optimal (untuk yang  $S_{rel}$  minimum) sesuai dengan kasus dimana direproduksi energi bebas permukaan di ensambel *all-atom* sepanjang pengurangan derajat kebebasan  $\mathbf{R}$ :

$$U_{CG}(\mathbf{R}) = -k_B T \ln \int e^{-\beta U_A(\mathbf{r})} \delta[M(\mathbf{r}) - \mathbf{R}] d\mathbf{r} + \text{const} \tag{17}$$

Bukti ini menunjukkan bahwa entropi relatif fundamental mengharuskan kesamaan permukaan energi bebas dasar  $U_{CG}$  dengan *all-atom*.

### Implementasi Numerik

Optimasi model  $CG$  menggunakan pendekatan Newton-Raphson untuk meminimalkan  $S_{rel}$ :

$$\lambda^{k+1} = \lambda^k - \chi \frac{\left( \frac{\partial S_{rel}}{\partial \lambda} \right)}{\left( \frac{\partial^2 S_{rel}}{\partial \lambda^2} \right)} \tag{18}$$

$$= \lambda^k - \chi \left[ \frac{\left\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \right\rangle_A - \left\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \right\rangle_{CG}}{\left\langle \frac{\partial^2 U}{\partial \lambda^2} \right\rangle_A - \left\langle \frac{\partial^2 U}{\partial \lambda^2} \right\rangle_{CG} + \left\langle \left( \frac{\partial U}{\partial \lambda} \right)_{CG}^2 \right\rangle - \beta \left( \left\langle \frac{\partial U}{\partial \lambda} \right\rangle_{CG} \right)^2} \right]$$

$k$  merupakan indeks iterasi untuk mengoptimalkan nilai-nilai yang berurutan dari parameter  $\lambda$  dan  $\chi$  yang merupakan pencampuran parameter antara 0 dan 1 yang menjamin stabilitas. Persamaan ini menyiratkan suatu iterasi lebih dari nilai yang berbeda dari parameter yang konvergen ke nilai optimal pada entropi relatif minimum. Pada setiap iterasi,

- Ensemble *all-atom* rata-rata  $\langle \dots \rangle_A$  dihitung dengan menggunakan *pre-saved trajectory* tunggal, sebagai acuan simulasi.
- Ensemble  $CG$  rata-rata  $\langle \dots \rangle_{CG}$  dihitung dengan menggunakan simulasi singkat dalam ensemble kanonik menggunakan nilai saat ini dari fungsi energi  $CG$ , yaitu, menggunakan  $U_{CG}$  untuk nilai saat ini dari parameter.

Meskipun pendekatan ini menyiratkan simulasi berulang dari model  $CG$ , sistem ini didesain dengan cepat untuk mensimulasikan.

### Entropi Relatif Absolut

Hal yang penting, nilai entropi relatif dapat digunakan sebagai metrik universal untuk kualitas model *coarse-grained*, terlepas dari jumlah *pseudo atoms sites* atau bentuk fungsional dari  $U_{CG}$ . Untuk menghitung nilai  $S_{rel}$  dapat dirumuskan perbedaan energi bebas pada ekspresi di atas menggunakan teknik standar *free energy perturbation (FEP)*,

$$-\beta(A_{CG} - A_A) + S_{map} = \ln \left\langle e^{-\beta(U_{CG} - U_A)} \right\rangle_A \tag{19}$$

Penyertaan suku  $S_{map}$  berasal dari perluasan hubungan *FEP* ke sistem dengan jumlah derajat kebebasan berbeda, dapat dituliskan,

$$S_{rel} = \beta \langle U_{CG} - U_A \rangle_A + \ln \left\langle e^{-\beta(U_{CG} - U_A)} \right\rangle_A$$

$$= \ln \left\langle e^{-\beta(U_{CG} - U_A) + \beta \langle U_{CG} - U_A \rangle_A} \right\rangle_A \tag{20}$$

Sehingga mudah untuk menentukan perbedaan energi berdimensi

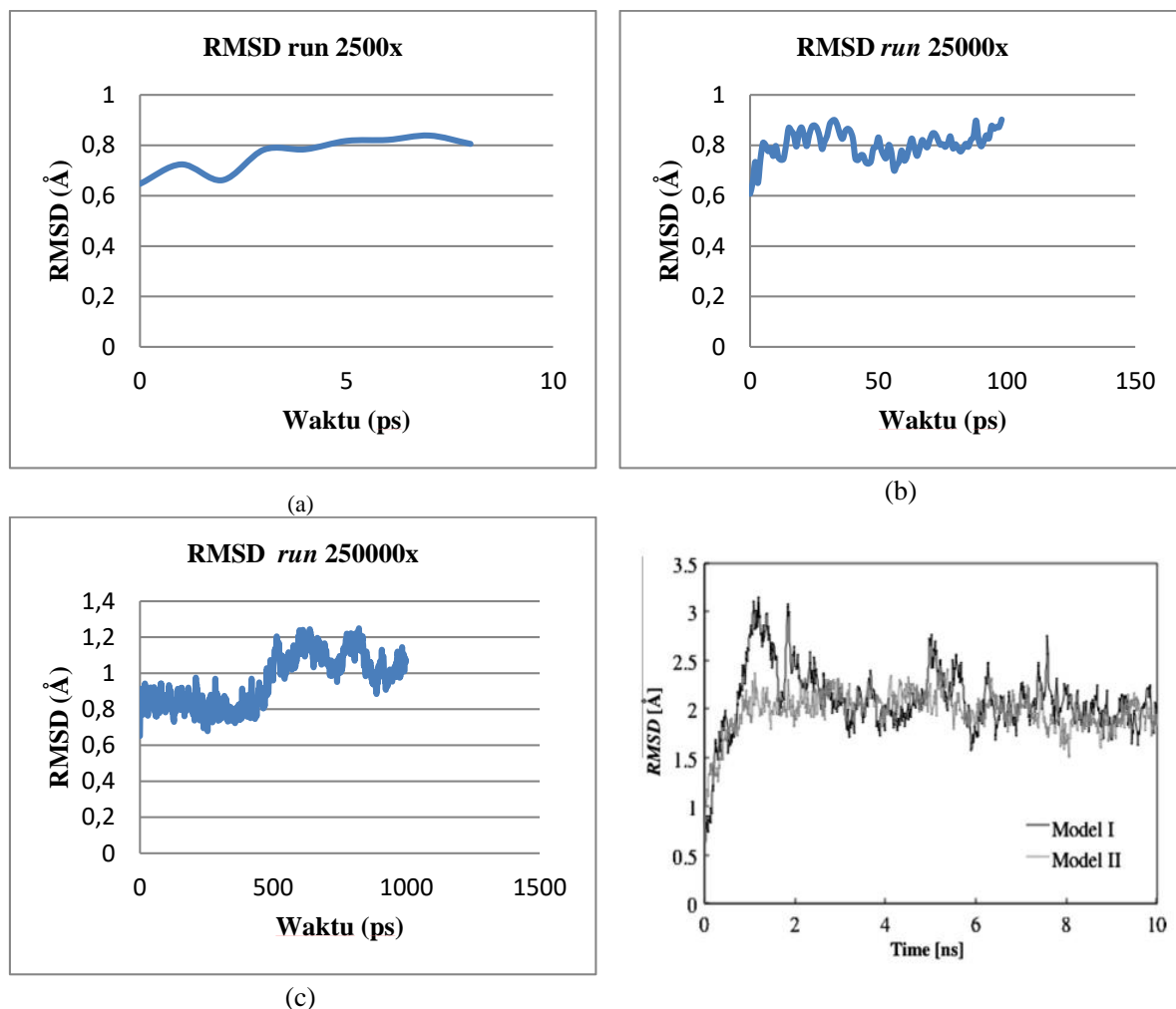
$$\delta \equiv \beta(U_A - U_{CG}) \tag{21}$$

Selanjutnya,

$$S_{rel} = \ln \left\langle e^{\delta - \langle \delta \rangle_A} \right\rangle_A \tag{22}$$

Persamaan ini menunjukkan bahwa entropi relatif mengukur fluktuasi perbedaan energi antara  $CG$  dan ensemble atomistik. Hal ini memungkinkan perhitungan mutlak  $S_{rel}$  menggunakan lintasan atomistik, menghitung nilai  $\delta$  untuk setiap konfigurasi dan kemudian melakukan perata-rataan untuk persamaan ini.

HASIL PERHITUNGAN DAN PERBANDINGAN DENGAN DATA REFERENSI



Gambar 3. (a) Grafik *Root Mean Square Deviation (RMSD)* terhadap waktu *run 2500x* (a). (b) Grafik *RMSD* terhadap waktu *run 25000x*. (c) Grafik *RMSD* terhadap waktu *run 250000x* (d) Grafik *RMSD* terhadap waktu dengan model simulasi berbeda, sebagai pembandingan [19]

Berdasarkan kurva RMSD tersebut dapat dilihat selama waktu 400 ps, pada suhu 300 K protein belum mengalami *unfolding*. Dari kurva RMSD pada suhu 300 K dapat dilihat puncak dan lembah yang menentukan mekanisme perubahan struktur protein dari *folded state* menjadi *unfolded state*. Dari gambar di atas, didapat titik-titik penting untuk menentukan mekanisme *unfolding* protein yaitu : 0 ps, 200 ps, 400 ps, 600 ps, dan 800 ps.

Berdasarkan referensi yang ada, terdapat lima tahap penting dalam denaturasi protein. Tahap pertama di 0 ps adalah tahap awal simulasi ketika protein masih dalam *folded state*. Tahap kedua di 200 ps, mulai terjadi pembukaan struktur protein. Struktur *α-helix* mulai berubah sebagai menjadi struktur *turn*. Empat buah struktur *β-sheet* mulai berubah sebagian menjadi struktur *turn* dan *coil*. Tahap ketiga di 400 ps, struktur *α-helix* benar-benar habis berubah menjadi *turn* dan *coil*. Sedangkan struktur *β-sheet* masih bertahan empat buah. Hal ini diperkuat pada kurva RMSD yang seharusnya mengalami lonjakan, akan tetapi pada perhitungan penelitian ini belum ditemukan lonjakan RMSD yang signifikan hanya berkisar 1.2 Å di titik 600 ps.

Kemudian di tahap keempat, kurva RMSD menurun kembali tepatnya di titik lembah 800 ps. Terbentuk kembali struktur *α-helix*. Pada titik ini diprediksi sebagai keadaan transisi/intermediet. Keadaan transisi ini akan mengantarkan kita untuk menemukan residu-residu yang dicurigai sebagai residu-residu simpul kestabilan protein. Setelah keadaan transisi ini terlewati, protein dengan mudahnya mengalami denaturasi dengan ditandai kurva RMSD yang semakin menanjak. Pada titik 1000 ps,

protein azurin belum terdenaturasi sempurna menjadi *unfolded state*. Hal ini terlihat dari menurunnya grafik *RMSD*.

Berdasarkan perbedaan perhitungan terdapat akurasi yang berbeda dalam menghitung *RMSD*. Saat waktu *running* ditambah, maka akurasi dari nilai *RMSD* semakin besar, terlihat dari grafik yang semakin rapat. Pada penelitian ini dibutuhkan waktu yang lebih lama untuk dalam perhitungan agar didapatkan struktur stabil yang memungkinkan. Variasi dari temperatur juga harus dilakukan agar didapatkan temperatur maksimum yang memungkinkan *azurin* mengalami proses *folding* menjadi *unfolding*. Saat protein mengalami proses *folding* berdasarkan gambar 4, seharusnya didapatkan nilai *RMSD* yang meningkat. Hal ini terlihat dari belum terbentuknya struktur *turn* dan *coil* pada gambar 4.a., berbeda dengan gambar 4.b yang telah terlihat struktur *turn* dan *coil* dari *azurin*.



Gambar 4. (a) Simulasi Azurin *waterbox*, (b) Struktur *turn* dan *coil* Azurin (*Pseudomonas aeruginosa*), sebagai pembandingan [20]

## KESIMPULAN

Metode *coarsed-grained* memberikan alternatif metode agar perhitungan simulasi *all-atom* untuk sistem kompleks seperti protein dapat lebih cepat. Hasil perhitungan *RMSD* dengan metode ini memperlihatkan keadaan protein *azurin* yang cukup stabil dengan nilai *RMSD* berkisar antara 0.7-1.2 Å.

## REFERENSI

- Chen, G., Fenimore, P.W., Berendzen, J., Frauenfelder, McMahon, B. H., The Role of the Hydration Shell of Proteins, Los Alamos National Library, 74-75 (2009).
- Chang R., General Chemistry: The Essential Concepts, (2003).
- Jeffrey, G. A., Saenger W., Hydrogen Bonding in Biological Structures, 459 (1994).
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. British Journal Experimental Pathology 1929;10 226- 236.
- Ambler RP, Brown LH. The Amino Acid Sequence of *Pseudomonas fluorescens azurin*. Journal of Biochemistry 1967;104 784-825.
- Chakrabarty AM. Microorganisms and Cancer: Quest for a Therapy. Journal of bacteriology 2003;185 2683-2686.
- Apiyo D, Wittung-Stafshede P. Presence of the cofactor speeds up folding of *Desulfovibrio desulfuricans flavodoxin*. Protein Science 2002;11 1129-1135.
- Yamada T, Goto M, Punj V, Zaborina O, Chen ML, Kimbara K, Majumdar D, Cunningham, E, Das Gupta TK, Chakrabarty AM. Bacterial redox protein azurin, tumor suppressor protein p53, and regression of cancer. PNAS 2002;99 14098-14103.
- Pozdnyakova I, Guidry J, Wittung-Stafshede P. Copper stabilizes azurin by decreasing the unfolding rate. Archives of Biochemistry and Biophysics 2001;390 146-148.
- Pozdnyakova I, Guidry J, Wittung-Stafshede P. Studies of *Pseudomonas aeruginosa azurin* mutants: cavities in  $\beta$ -barrel do not affect refolding speed. Biophysical Journal 2002;82 2645-2651.
- Pozdnyakova I, Wittung-Stafshede P. Copper binding before polypeptide folding speeds up formation of active (holo) *Pseudomonas aeruginosa azurin*. Biochemistry 2001;40 13728-13733.
- Sankar R, Mandal M. Inhibitory effect of azurin synthesized from *P. aeruginosa* MTCC 2453 against Dalton's lymphoma ascites model. Biomedicine & Pharmacotherapy 2011; 65 461-466.
- Goto M, Yamada T, Kimbara K, Horner J, Newcomb M, Gupta TK, Chakrabarty AM. Induction of apoptosis in macrophages by *Pseudomonas aeruginosa azurin*: tumor suppressor protein p53 and



- reactive oxygen species, but not redox activity, as critical elements in cytotoxicity. *Biochemistry (Mosc)* 2003;68 958-962.
14. Ramachandran, S., et al., Purification of Azurin from *Pseudomonas Aeuroginosa* Sankar, dx.doi.org/10.5772/51891.
  15. I. Brovchenko, A. Oleinikova, *Chem. Phys. Chem.* 9, 2695-2702 (2008).
  16. H. Frauenfelder et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* (in press 2009).
  17. E. Donth, *The Glass Transition*, Springer Series in Materials Science 48 (2001).
  18. Shell, M.S., 2008, The Relative Entropy is Fundamental to Multiscale and Inverse Thermodynamics Problem, *J. Chem. Phys.*, 129 (14), 144108.
  19. Saito, H. et al., 2013, Molecular dynamics study on binding free energy of Azurin–Cytochrome c551 complex, *Chemical Physics Letters* 556 (2013) 297–302.
  20. Kamalakannan, T. et al., Analysis of Azurin Protein from Different *Pseudomonas* sp Using Proteomic Tools, *Journal of Communication and Computer* 8 (2011) 727-730.