

DIHYDROPTEROATE SYNTHASE (DHPS) TERHADAP EFEKTIFITAS TERAPI PNEUMOCYSTIS

Conny Riana Tjampakasari

Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta
Jl. Salemba Raya No. 6, Jakarta Pusat 10430
connyrianat@yahoo.com

Abstrak

Dihydropteroate synthase (DHPS) merupakan target enzimatis atau target gen untuk sulfonamid yang merupakan obat utama untuk profilaksis atau pengobatan terhadap infeksi oleh jamur *Pneumocystis*. Kombinasi dari trimetoprim sulfametoksazol banyak digunakan untuk lini pertama profilaksis dan pengobatan pneumonia karena *Pneumocystis jirovecii* serta untuk mikroba patogen lainnya seperti *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* dan *Streptococcus pyogenes*. Genom DHPS terletak pada kromosom 19p132 dengan ukuran 9045 basis, memiliki 9 ekson dan membentang sekitar 5 kb. Mutasi gen DHPS berdasarkan penelusuran SNP terjadi perubahan dari Arginin (R) menjadi Cystein (C) pada posisi protein 174 dan 44. Sedangkan berdasarkan analisis komparatif protein struktur sekunder, protein DHPS yang normal, posisi asam amino ke 622 adalah Prolin dengan struktur sekunder asam amino berbentuk coil, sedang pada protein DHPS yang mutan, posisi asam amino ke 622 adalah Leusin dengan struktur sekunder asam amino berbentuk coil pula. Hal ini menyebabkan tidak ada perbedaan struktur sekunder pada protein DHPS normal dan mutan. Dengan ditemukannya gen mutasi tersebut maka target enzimatis atau target gen untuk sulfonamid yang merupakan obat utama untuk profilaksis atau pengobatan *Pneumocystis* menjadi terhambat.

Kata kunci: DHPS, efektifitas, terapi *pneumocystis*

Pendahuluan

Dihydropteroate synthase (DHPS) merupakan target enzimatis atau target gen untuk sulfonamid yang merupakan obat utama untuk profilaksis atau pengobatan *Pneumocystis*.

Kombinasi dari trimetoprim sulfametoksazol banyak digunakan untuk lini pertama agen profilaksis dan pengobatan pneumonia karena *P. jirovecii*, serta untuk mikroba patogen lainnya seperti *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus pyogenes*.

Kombinasi trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat dua enzim utama dalam jalur metabolisme folat yaitu *enzyme dihydropteroate synthase* (DHPS) dan *dihydrofolate reductase* (DHFR).

Obat sulfa mengganggu biosintesis asam folat dengan cara bersaing dengan *p-aminobenzoate* (PABA) yang merupakan ko-substrat dari *dihydropteroate synthase* (DHPS) yang secara struktural terkait. DHPS mengkatalisis kondensasi PABA dan *hydroxymethyl dihydropterin-pyrophosphate* untuk menghasilkan *dihydropteroate* yang kemudian diubah menjadi *dihydrofolate* oleh *dihydrofolate synthase*. *Dihydrofolate* selanjutnya direduksi oleh *dihydrofolate reductase* menjadi *tetrahydrofolate*, sebuah

kofaktor penting untuk berbagai jalur biokimia. Multidomain Fasp *P. jirovecii* memiliki aktivitas DHPS serta dua kegiatan enzimatis lainnya yang terlibat dalam jalur asam folat (*dihydroneopterin aldolase* dan *hydroxymethyl dihydropterin pyrophosphokinase*).

Synthase Deoxyhypusine merupakan enzim yang pada manusia dikodekan oleh gen DHPS. Joe et al. (1995) menyatakan bahwa hypusine asam amino tidak biasa terbentuk pasca translasi dan hanya ditemukan di protein selular tunggal (eukariotik inisiasi translation faktor-5A) (EIF5A, lihat 600187). Biosintesis Hypusine melibatkan 2 langkah enzimatis. Pada langkah pertama, deoxyhypusine synthase (EC 2.5.1.46) mengkatalisis transfer NAD dari bagian butylamine spermidine ke grup epsilon-amino, residu lisin spesifik dari protein EIF5A prekursor untuk membentuk residu deoxyhypusine intermediat.

Pada langkah kedua, dimediasi oleh hidrosilase deoxyhypusine (611.262), konversi residu deoxyhypusine untuk residu hypusine melengkapi EIF5A. Hypusine ditemukan di pada semua Eukariota dan dalam beberapa Archaeobacteria, tapi tidak di Eubacteria. Urutan asam amino dari EIF5A sangat lestari, terutama di wilayah sekitar residu hypusine, Wilayah ini

menunjukkan fungsi fundamental yang penting untuk protein ini sepanjang evolusi eukariotik. Hypusine dan EIF5A penting untuk proliferasi sel pada eukariot.

Sintesa dihidropteroat (DHPS) adalah enzim yang terlibat dalam jalur sintesis folat *Bacillus anthracis*. Enzim ini memiliki dua pengikat, yaitu : yang mengikat pirofosfat dihydropterin (DHPP) dan lainnya mengikat asam benzoat p-amino (PABA). DHPS mengkatalisis reaksi yang menghasilkan 7,8-dihidropteroat dari dua substrat tersebut.

Jalur sintesis folat adalah jalur penting untuk sintesis asam amino. Tanpa asam amino bakteri tidak dapat berfungsi, sehingga hal ini merupakan metode yang efisien untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Di masa lalu, ikatan PABA dari DPHS telah ditargetkan menggunakan sulfonamid. Namun, karena penggunaan sulfonamid yang tinggi untuk kepentingan klinis maka populasi bakteri telah bersifat resisten terhadap golongan ini. Cara yang paling logis untuk memerangi resistensi bakteri ini adalah dengan hanya menargetkan situs pengikatan enzim lain, yang disebut dengan pterin.

Pterin didefinisikan sebagai senyawa heterosiklik yang menyerupai dihydropterin pirofosfat (DHPP), salah satu dari dua substrat alami enzim tersebut. Unsur-unsur farmakope kunci dari DHPP adalah dua cincin aromatik nitrogen dengan gugus amino dan gugus para karbonil.

Gen DHPS yang diperoleh dari situs NCBI dengan kode Gene ID: 170704

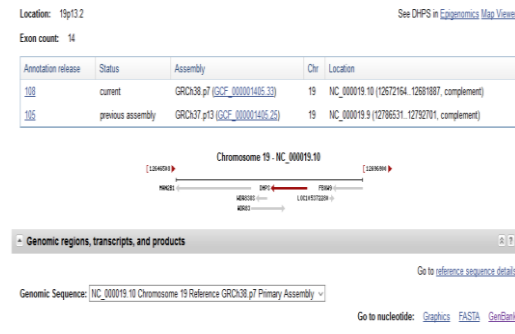
Metode Penelitian

Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: (1) Analisis struktur, fungsi gen dengan menggunakan database bioinformatika dari situs NCBI, Uniprot dan ensemble; (2) Analisis mutasi gen dan protein DHPS dengan menggunakan situs SNP; (3) Analisis sekuen homolog pada organisme lain dan struktur Kristal yang homolog dengan protein DHPS dengan menggunakan BLAST; (4) Analisi sekuen protein DHPS serta analisis komparatif dengan sekuen mutan dengan menggunakan situs Psipred dan Expasy; dan (5) Analisis struktur 3D protein dengan menggunakan PDB, Protein model portal dan Pymol.

Hasil dan Pembahasan

Lokasi, struktur, fungsi, mutasi, implikasi klinis dan homolog gen DHPS

Lokasi gen DHPS terletak pada kromosom 19p132

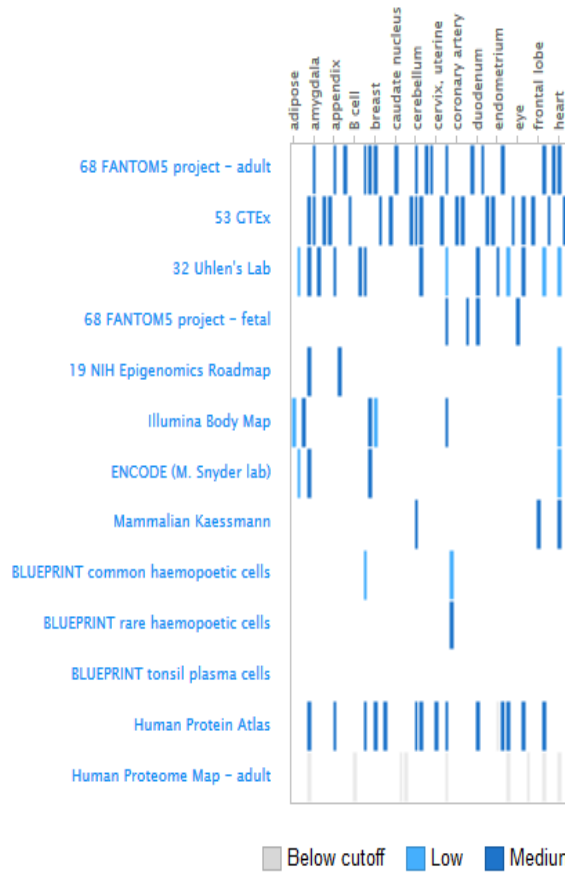


Gambar 1
Lokasi Gen DHPS

Su et al. (2012) melaporkan bahwa gen DHPS memiliki 9 ekson dan membentang sekitar 5 kb. Gen WDR83 dan DHPS saling tumpang tindih di ujung 3-prime dan ditranskripsi dari untai berlawanan. Bevec et al. (1996) menunjukkan bahwa DHPS rekombinan menunjukkan aktivitas katalitik yang signifikan dalam sintesis *deoxyhypusine* setelah transkripsi dan translasi in vitro sebaik ekspresi dalam *Escherichia coli*. Hauber et al. (2005) menunjukkan bahwa penghambatan DHPS oleh obat percobaan CNI-1493 atau interferensi RNA efisien menekan replikasi retroviral dalam kultur sel dan sel primer tanpa efek samping. Obat tersebut diinduksi pada siklus sel transisi, apoptosis atau sitotoksitas umum. Percobaan ini menunjukkan bahwa efek antivirus dari CNI-1493 karena penghambatan HIV-1 Rev protein regulator, dimana EIF5A membutuhkan hypusine sebagai kofaktor.

Su et al. (2012) menemukan bahwa DHPS dan WDR83 (616.850) mRNA tumpang tindih dengan cara *tail to tail* dalam 3-prime UTRs, termasuk 113 nukleotida yang saling melengkapi penuh. *Full-length* DHPS mRNA atau wilayah UTR 3-prime terisolasi stabil pada WDR83 mRNA dan ekspresi protein. Demikian pula, *full-length* WDR83 mRNA atau terisolasi 3-prime *end* terisolasi stabil DHPS mRNA dan ekspresi protein. Menipisnya baik WDR83 atau DHPS melalui interfensi RNA mengurangi ekspresi dari transkrip lain dalam sel kanker lambung M803. Studi *knockdown* dan over ekspresi menunjukkan bahwa kedua gen WDR83 dan DHPS berpartisipasi dalam

mengatur ekspresi dari regulator E2F1 transkripsi (189.971) dan stimulasi agonis sinyal ERK. Studi *knockdown* baik WDR83 atau DHPS menghambat proliferasi sel MGC803. Sebaliknya, overekspresi baik WDR83 atau DHPS dapat meningkatkan proliferasi sel. Reseptor DHPS dinyatakan dalam adiposa dan secara signifikan diekspresikan dalam gambar di bawah ini :

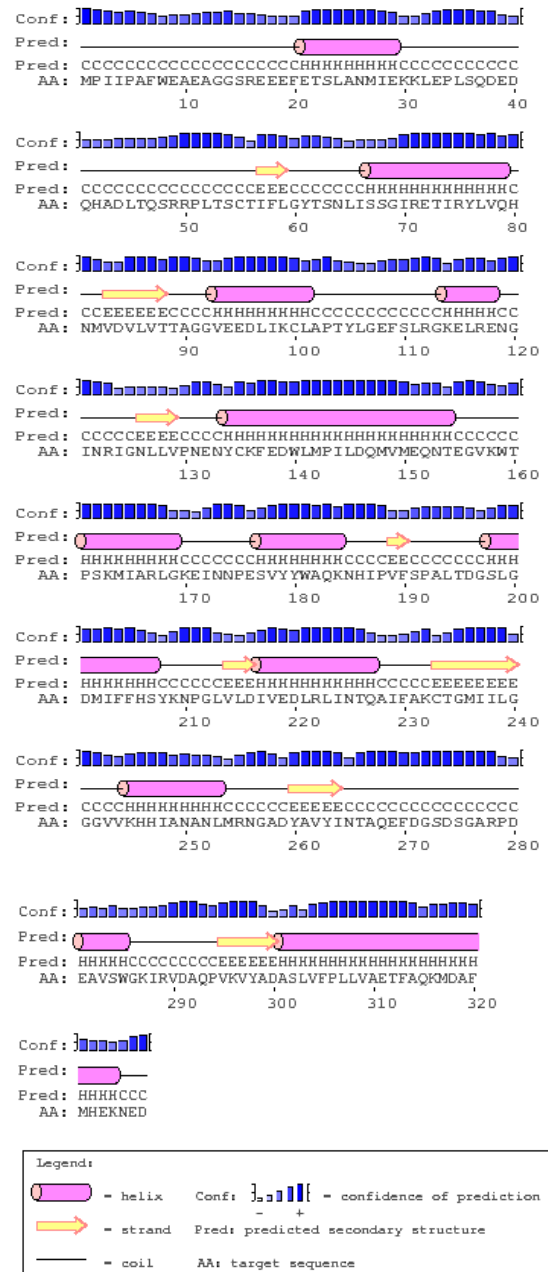


Gambar 2
Ekspresi gen DHPS

Homolog dari gen DHPS: Gen DHPS lestari pada simpanse, rhesus monyet, anjing, sapi, mouse, tikus, ikan zebra, lalat buah, nyamuk, *C.elegans*, *S.cerevisiae*, *K.lactis*, *E.gossypii*, *S. pombe*, *M.oryzae*, *N.crassa*, *A.thaliana*, beras dan katak. Ortholog dari Anotasi Pipeline: 146 organisme memiliki orthologs dengan DHPS gen manusia. Gen ini memiliki 23 transkrip (varian splicing), 67 ortolog dan merupakan anggota dari 1 keluarga protein Ensemble.

Analisis Komparatif Protein DHPS Analisis struktur sekunder (*Psipred*)

Pada protein DHPS yang normal, posisi asam amino ke 622 adalah Prolin dengan struktur sekunder asam amino tersebut adalah bentuk coil, sedang pada protein DHPS yang mutan, posisi asam amino ke 622 adalah Leusin dengan struktur sekunder asam amino tersebut tetap berbentuk coil, sehingga tidak ada perbedaan struktur sekunder pada protein DHPS normal dan mutan sebagaimana gambar berikut :



Gambar 3
Struktur Sekunder Pada Protein DHPS Normal Dan Mutan

Karakteristik Fisiko-Kimia (Protparam)

Berdasarkan analisis fisiko-kimia antara protein Protein DHPS :

Tabel 1.
Karakteristik Fisiko-Kimia

| | Normal | Mutasi |
|-------------------------|---|--|
| Berat molekul | 36582.6 | 36637.7 |
| Residu muatan negatif | (Asp + Glu): 46 | (Asp + Glu): 46 |
| Residu muatan positif | (Arg + Lys): 29 | (Arg + Lys): 30 |
| Komposisi atom | Carbon C 1629 Hydrogen H 2543 Nitrogen N 431 Oxygen O 494 Sulfur S 16 | Carbon C 1631 Hydrogen H 2548 Nitrogen N 434 Oxygen O 493 Sulfur S 16 |
| Formula | Formula: C ₁₆₂₉ H ₂₅₄₃ N ₄₃₁ O ₄₉₄ S ₁₆ Total number of atoms: 5113 | Formula: C ₁₆₃₁ H ₂₅₄₈ N ₄₃₄ O ₄₉₃ S ₁₆ Total number of atoms: 5122 |
| Estimasi waktu paruh | N-terminal dari sekuen dipertimbangkan adalah M (Met) 30 jam (retikulosit mamalia, in vitro). > 20 jam (ragi, in vivo). > 10 jam (Escherichia coli, in vivo). | N-terminal dari sekuen dipertimbangkan adalah M (Met).30 jam (retikulosit mamalia, in vitro). > 20 jam (ragi, in vivo). > 10 jam (Escherichia coli, in vivo). |
| Instability index | Ketidakstabilan Indeks (II) dihitung menjadi 44,67 Ini mengklasifikasikan protein sebagai tidak stabil | Ketidakstabilan Indeks (II) dihitung menjadi 45,74 Ini mengklasifikasikan protein sebagai tidak stabil |
| Aliphatics index | Indeks alifatik 89.48 Rata-rata hydrophaticity (SAUS): -0,201 | Indeks alifatik 89.48 Grand rata-rata hydrophaticity (SAUS): -0,213 |
| Extinction coefficients | berada di unit M-1 cm-1, pada 280 nm diukur dalam air. Ext. koefisien 42.650 Abs 0,1% (=1 g/l) 1,166, dengan asumsi semua pasangan residu Cys membentuk sistein Ext. koefisien 42.400 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1,159, dengan asumsi semua residu Cys dikurangi | berada di unit M-1 cm-1, pada 280 nm diukur dalam air. Ext. koefisien 42.650 Abs 0,1% (= 1 g / l) 1,164, dengan asumsi semua pasangan residu Cys membentuk sistein Ext. koefisien 42.400 Abs 0,1% (= 1 g/l) 1,157, dengan asumsi semua residu Cys dikurangi |

Pemotongan Protein (peptide cutter)

Pada protein DHPS terjadi beberapa jumlah situs pemotongan pada protein diantaranya terjadi pada enzim-enzim (Asp-N endopeptidase, Asp-N endopeptidase, BNPS-skatole, Chemotrypsin-high specificity, clostripain CNBR, formic acid, Glutamyl endopeptidase, Hydroxylamine, Iodosobenzoic acid, LysC, LysN, NTCB, dan Proteinkinase K.

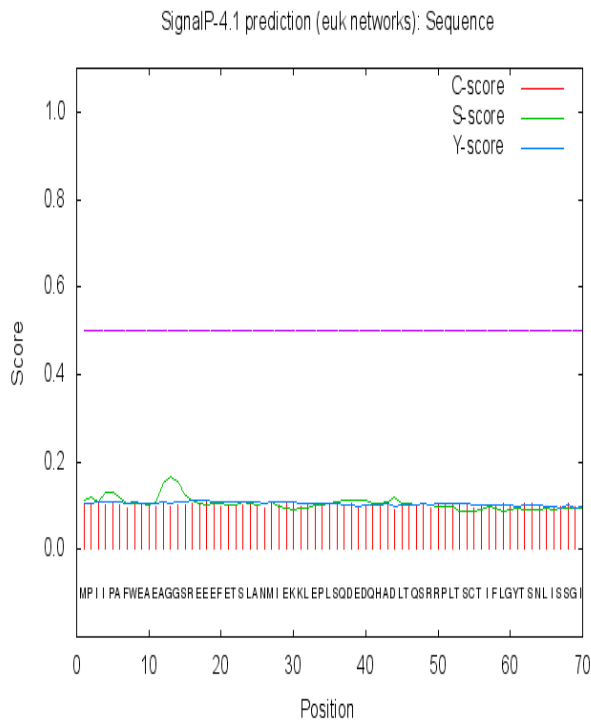
Situs pemotongan antara DHPS mutasi dan DHPS normal terjadi perbedaan pada pemotongan enzim arg-C proteinas. Pada DHPS normal ada 13 situs sedangkan DHPS mutasi ada 14 situs. Enzim clostripain pada DHPS normal terjadi 13 situs dan pada DHPS mutasi ada 14 situs, enzim proteinase K pada normal terjadi 170 pemotongan dan pada DHPS mutasi ada 169 situs. Jumlah situs pemotongan dari masing-masing enzim sebagaimana tabel berikut:

Tabel 2.
Jumlah Situs Pemotongan Dari Masing-Masing Enzim-Enzim DHPS

| No. | Enzim | DHPS Normal | DHPS Mutasi |
|-----|---|-------------|-------------|
| 1 | Arg-C proteinase | 13 | 14 |
| 2 | Asp-N endopeptidase | 19 | 19 |
| 3 | Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu | 46 | 46 |
| 4 | BNPS-Skatole | 5 | 5 |
| 5 | CNBr | 12 | 12 |
| 6 | Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) | 27 | 27 |
| 7 | Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYW], not before P) | 74 | 74 |
| 8 | Clostripain | 13 | 14 |
| 9 | Formic acid | 19 | 19 |
| 10 | Glutamylendopeptidase | 27 | 27 |
| 11 | Hydroxylamine | 2 | 2 |
| 12 | Iodosobenzoic acid | 5 | 5 |
| 13 | LysC2 | 16 | 16 |
| 14 | LyN | 16 | 16 |
| 15 | NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid) | 4 | 4 |
| 16 | Pepsin (pH1.3) | 62 | 62 |
| 17 | Pepsin (pH2) | 81 | 81 |
| 18 | Proline-endopeptidase [*] | 2 | 2 |
| 19 | Proteinase K | 170 | 169 |
| 20 | Staphylococcal peptidase I | 24 | 24 |
| 21 | Thermolysin | 100 | 100 |
| 22 | Trypsin | 27 | 28 |

Prediksi Daerah Ujung Protein Yang Membawa Kode Lokasi Protein dan Cleavage (SignalP)

Untuk mengetahui apakah pada protein DHPS mempunyai *signal peptide* atau tidak dilakukan analisis dengan menggunakan SignalP. Protein DHPS normal tidak memiliki *signal peptide*, begitu juga pada protein DHPS mutan karena memberikan hasil yang sama, lokasi protein *cleavage* antara protein normal dan mutan tidak ada perbedaan. Hasil analisis prediksi ujung protein sebagaimana grafik berikut:

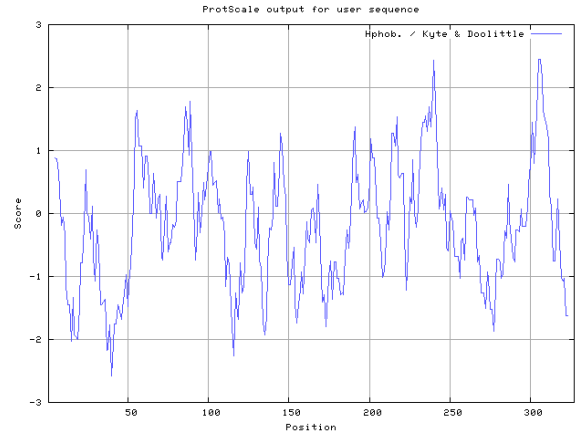


Gambar 4

Hasil analisis signal peptide pada protein DHPS dengan SignalP

Prediksi Skala Protein DHPS (ProtScale)

Untuk melihat hidrofobisitas sekuens asam amino gen DHPS normal dan mutan dilakukan analisis menggunakan ProtScale (Hphob. HPLC / Parker & al). Skala asam amino penyusun DHPS hasil prediksi menunjukkan antara protein normal dan protein mutan tidak ada perbedaan. Hasil analisis sebagaimana gambar dibawah ini :

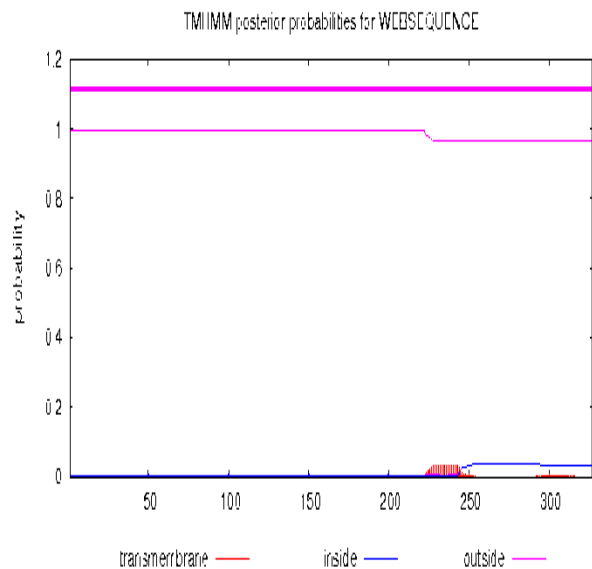


Gambar 5

Hasil analisis ProtScale untuk DHPS mutan dan normal

Prediksi Daerah Transmembran

Protein DHPS bukan berlokasi di trans membran maka hasilnya tidak menunjukkan adanya puncak. Hasil analisa prediksi daerah transmembran : protein DHPS bukan merupakan protein *trans membrane* (gambar 6). Protein DHPS tidak terletak di mitokondria dan bukan merupakan protein sekresi. Protein ini terletak di dalam inti sel (nukleus). Begitu juga untuk protein DHPS mutan memberikan hasil yang sama.



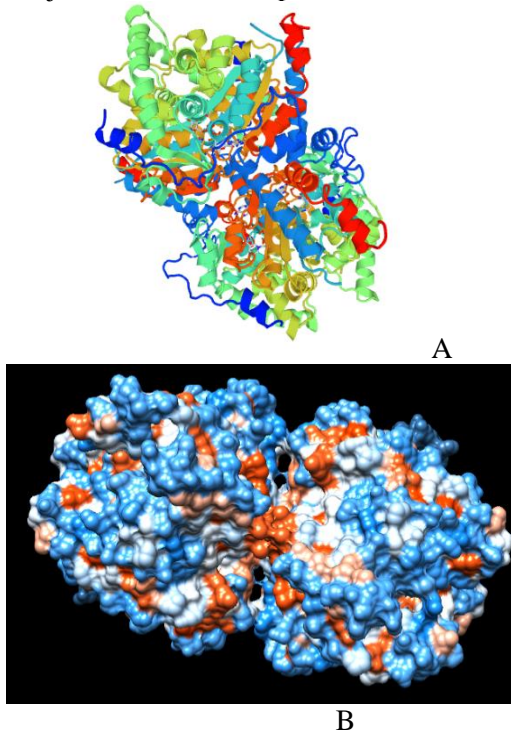
Gambar 6

Hasil analisa prediksi daerah transmembran protein DHPS

Struktur 3 Dimensi Protein DHPS

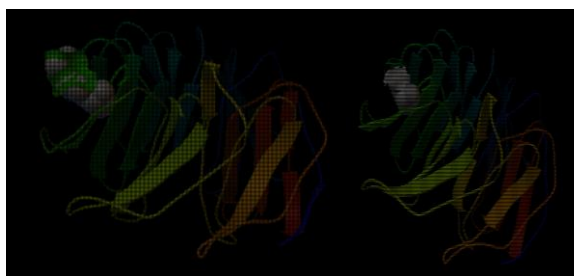
Struktur 3D hasil pemodelan

Homologi modeling dari protein DHPS dengan menggunakan software *swiss model*. Dari software ini diperoleh : Identity: 100% Sequence Template= 1rlz Coverage= 1,00 (data tidak ditampilkan). Gambar 7 menunjukkan struktur 3D protein DHPS.



Gambar 7

(A) Struktur 3D protein DHPS; (B) Struktur 3D Sisi katalitik dan hidrofobik protein DHPS



A. DHPS Normal B. DHPS Mutasi

Gambar 8

Struktur 3 dimensi 1 subunit protein DHPS

Sisi Mutasi DHPS

Fungsi DHPS Protein

Hypusine asam amino yang tidak biasa terbentuk pascatranslasi dan hanya ditemukan di protein selular tunggal merupakan eukariotik inisiasi translasi faktor 5A. Pada langkah pertama dari biosintesis *hypusine*, sintase *deoxyhypusine*

mengkatalisis transfer NAD tergantung bagian butylamine spermidine ke grup epsilon-amino dari residu lisin spesifik dari protein EIF5A prekursor untuk membentuk residu deoxyhypusine menengah. Gen ini terdiri dari 9 ekson mencakup 6,6 kb. Tiga varian transkrip telah diisolasi. Namun, hanya transkrip varian 1 mengkodekan protein aktif. Varian pendek dapat bertindak sebagai modulasi aktifitas DHPS.

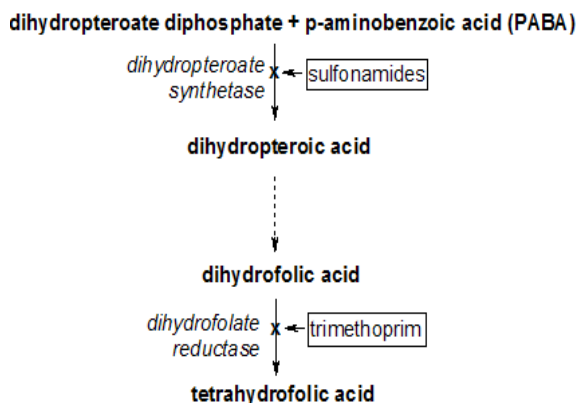
Untuk mengkatalisis pembelahan oksidatif NAD tergantung dari spermidine dan transfer berikutnya dari bagian butylamine dari spermidine ke grup epsilon-amino dari residu lisin spesifik dari protein EIF-5A prekursor untuk membentuk residu deoxyhypusine menengah

Proses biosistem : proses metabolisme protein selular; translasi; regulasi positif proliferasi sel; proses biosintesis *hypusine* dari peptidil-lisin; regulasi positif proliferasi sel T; homeostasis glukosa; modifikasi protein pascatranslasi; proses spermidin untuk *deoxyhypusine* menggunakan *deoxyhypusine* sintase; homotetramerization protein.

Skema Jalur DHPS

Sintase dihidropteroat adalah enzim yang diklasifikasikan dalam EC 2.5.1.15. Enzim ini ini menghasilkan dihidropteroat pada bakteri, tetapi tidak dinyatakan dalam kebanyakan eukariota termasuk manusia. Hal ini membuat target yang berguna untuk sistem *sulfonamide*, yang bersaing dengan sistem PABA (2-amino-4-hidroksi-7,8-dihidropteridin-6-il) metil difosfat + 4-aminobenzoate (PABA) difosfat + dihidropteroat.

Semua organisme membutuhkan reduksi kofaktor folat untuk sintesis berbagai metabolit. Kebanyakan mikroorganisme harus mensintesis folat *de novo* karena tidak memiliki sistem transportasi aktif dari sel vertebrata yang lebih tinggi sehingga memungkinkan organisme ini untuk menggunakan folat diet. Protein mengandung domain ini termasuk synthase dihidropteroat (EC 2.5.1.15) serta kelompok enzim methyltransferase termasuk methyltetrahydrofolate, corrinoid methyltransferase protein besi-sulfur (metr) Q46389 yang mengkatalisis langkah yang menjadi kunci ini dalam Wood-Ljungdahl jalur fiksasi karbon dioksida.



Gambar 10
Jalur DHPS

Keuntungan untuk menargetkan situs pterin daripada situs PABA adalah pertama, semua mutasi diketahui bahwa resistansi terhadap obat sulfa terjadi dalam ikatan PABA. Oleh karena itu, senyawa penghambat yang mengikat ke situs pterin dapat memperoleh beberapa metode umum dari resistensi bakteri. Kedua, situs PABA merupakan situs fleksibel, sedangkan situs pterin sangat dibatasi oleh integritas struktural. Dengan kata lain, ada potensi jauh lebih sedikit untuk mutasi bakteri ke situs pterin yang berhasil mempertahankan fungsi yang tepat dari protein. Ketiga situs pterin sangat kekal di banyak spesies bakteri, sehingga memberikan peluang untuk menciptakan obat yang berpotensi menjadi efektif untuk berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri.

Namun, ada beberapa kelemahan diantaranya yaitu senyawa pterin cenderung sukar larut sehingga pterin lebih stabil dalam bentuk kristal. Hevener et al mengatakan masalah ini dapat diatasi dengan menambahkan kelompok fungsional anionik. *Dihydropteroat* sintase (EC 2.5.1.15) (DHPS) mengkatalisis kondensasi pirofosfat 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropteridine untuk para-aminobenzoic acid membentuk 7,8-dihidropteroat. Ini adalah langkah kedua dalam jalur tiga langkah terkemuka dari 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin untuk 7,8-dihidrofolat. DHPS adalah target sulfonamid, yang merupakan analog substrat yang bersaing dengan para-aminobenzoic acid. DHPS bakteri (gen *sul* atau *folP*) [1] adalah protein yang mengandung sekitar 275-315 residu asam amino yang dikode baik oleh kromosom atau ditemukan di berbagai plasmid resisten antibiotik. Pada eukariota lebih rendah seperti, *Pneumocystis carinii*, DHPS

adalah domain C-terminal dari enzim sintesis folat multifungsi (fas gen).

Desain Primer

Primer merupakan salah satu bagian dari reaksi PCR (*Polymerase Chain Reaction*), merupakan teknik perbanyakan sample DNA yang mempunyai kegunaan mulai dari sekuensing sebagai teknik biomolekuler yang sangat bermanfaat untuk mengetahui ada tidaknya mutasi. Dari hasil analisis desain primer dilakukan pada NC_005117.4 panjang basa 17171 bp terletak didaerah basa 4097011....5314639 menggunakan “software primer 3” kemudian dikonfirmasi dengan BLAST NCBI untuk melihat spesifisitas primer. Untuk melihat struktur sekunder (hairpin loop, dimer) yang dihasilkan oleh primer dilakukan analisis dengan menggunakan PerlPrimer. Hasil desain primer dengan menggunakan Primer 3 sebagai berikut:

F 5'-CCTGGGCGAAATACCAACAGT-3'
pada posisi basa 8503, sedangkan primer
R: 5'-GTTGACAGGTGGTGGTAGTC-3'
pada posisi basa 8665.

Analisis primer dengan menggunakan software online melalui alamat web:
<http://sg.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Tabel 3

Ringkasan hasil analisis primer DNA DHPS

| Keterangan | Primer 1 | | Primer 2 | | Primer 3 | | Primer 4 | | Primer 5 | |
|-------------------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|----------|-------|
| | F1 | R1 | F2 | R2 | F3 | R3 | F4 | R4 | F5 | R5 |
| Hairpin | - | - | V | - | - | V | V | V | - | V |
| Dimer | - | - | V | V | - | - | V | - | - | V |
| Palindrome | - | - | - | - | V | - | - | - | - | - |
| Repeat & run | V | V | - | - | V | V | V | - | V | - |
| % GC | 45 | 45 | 55 | 55 | 50 | 50 | 58 | 60 | 60 | 60 |
| Panjang basa (bp) | 20 | 20 | 22 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 21 | 20 |
| Tm (°C) | 59.99 | 60.00 | 60.02 | 60.04 | 58.89 | 59.99 | 60.01 | 60.05 | 66.09 | 60.03 |

Dari hasil analisis yang memenuhi syarat dalam primer 1 yang memiliki ukuran produk 163 bp dimulai pada basa ke 8503. Forward Primer 1 ini memiliki panjang 20 basa, T_m 59.99°C, dan % GC 45%. Reverse primer 1 memiliki panjang 20 basa, T_m 60.00°C, dan % GC 45%. Primer ini tidak membentuk hairpin loop, dimer, maupun palindrome setelah dianalisis dengan menggunakan software <http://sg.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

Kesimpulan

Genom DHPS terletak pada kromosom 19p132 dengan ukuran 9045 basis, memiliki 9 ekson dan membentang sekitar 5 kb. Mutasi gen DHPS berdasarkan penelusuran SNP terjadi perubahan dari Arginin (R) menjadi Cystein (C) pada posisi protein 174 dan 44.

Berdasarkan penelusuran analisis komparatif struktur sekunder protein, protein DHPS yang normal, posisi asam amino ke 622 adalah Prolin dengan struktur sekunder asam amino berbentuk coil, sedang pada protein DHPS yang mutan, posisi asam amino ke 622 adalah Leusin dengan struktur sekunder asam amino berbentuk coil pula. Hal ini menyebabkan tidak ada perbedaan struktur sekunder pada protein DHPS normal dan mutan. Dengan ditemukannya gen mutasi tersebut maka target enzimatik atau target gen untuk sulfonamid yang merupakan obat utama untuk profilaksis atau pengobatan *Pneumocystis* menjadi terhambat.

Daftar Pustaka

Andersson B, Wentland MA, Ricafrente JY, et al. (1996). "A "double adaptor" method for improved shotgun library construction". *Anal. Biochem.* 236 (1): 107–113. doi:10.1006/abio.1996.0138. PMID 861 9474.

Bevec D, Kappel B, Jaksche H, et al. (1996). "Molecular characterization of a cDNA encoding functional human deoxyhypusine synthase and chromosomal mapping of the corresponding gene locus". *FEBS Lett.* 378 (2): 195–8. doi:10.1016/0014-5793(95)01456-X. PMID 8549832.

Biol. Chem. 278(15): 12805–12. doi:10.1074/jbc.M207112200. PMID 12 562768.

Crawford IP, Slock J, Stahly DP, Six EW, Han CY (1990). "An apparent *Bacillus subtilis* folic acid biosynthetic operon containing pab, an amphibolic trpG gene, a third gene required for synthesis of para-aminobenzoic acid, and the dihydropteroate synthase gene". *J. Bacteriol.* 172 (12): 7211–7226. PMC 210846. PMID 2123867.

Joe YA, Wolff EC, Taman MH (Oktober 1995). "Kloning dan ekspresi cDNA deoxyhypusine synthase manusia studi Struktur-fungsi dengan enzim rekombinan dan protein mutan." *J Biol Chem* 270 (38):22.386-92 doi : 10,1074 / jbc.270.38.22386 . PMID 7.673.224

Jones T, Sheer D, Kapetanopoulos A, et al. (1996). "The gene coding for human deoxyhypusine synthase (DHPS) maps to chromosome 19p13.11-p13.12". *Genomics.* 35 (3): 635–7. doi:10.1006/geno.1996.0416. PMID 8812 510.

Klier H, Csonga R, Steinkasserer A, et al. (1995). "Purification and characterization of human deoxyhypusine synthase from HeLa cells". *FEBS Lett.* 364 (2): 207–10. doi:10.1016/0014-5793(95)00394-O. PMID 7750572.

Kutty, G. Huang, NS. Kovacs, AJ. Characterization of thioredoxin reductase genes (trr1) from *Pneumocystis carinii* and *Pneumocystis jiroveci*. *Gene.* 2003; 310, p. 175-83.

Munoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobon A, Cano E, Gonzalez A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jiroveci* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 2012 (72): 204-13.

Nimri, Laila F.; Moura, Iaci N. S.; Huang, Laurence; et al. 2002. Genetic Diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis Based on Variations in Nucleotide Sequences of Internal Transcribed Spacers of rRNA Genes. *J. Clin. Microbiol.*

Steven R, Meshnick, Paul AH, Kyle S, Enger, Powel K, Joshua R, David M, BZ Li, Chao HL, Nimri, Jane LC, Benjamin B, Carlos DR, Laurence. Distribution of DHPS Mutations Among ITS Subtypes of *P. carinii*.

Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard CJ, Jounieaux V, Raccurt, C et al. *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, amiens, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2004 (10): 667-73.

Tsolaki, Anthony G.; Miller, Robert F.; Underwood, Anthony P.; et.al.. Genetic Diversity at the Internal Transcribed Spacer Regions of the rRNA Operon among Isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS Patients with Recurrent Pneumonia. *J. Infect.Dis.* 1996

Volpe F, Dyer M, Scaife JG, Darby G, Stammers DK, Delves CJ (1992). "The multifunctional folic acid synthesis *fas* gene of *Pneumocystis carinii* appears to encode dihydropteroate synthase and hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase". *Gene* 112 (2): 213–218. doi:10.1016/0378-1119(92)90378-3. PMID 1313386

Yan YP, Tao Y, Chen KY (1996). "Molecular cloning and functional expression of human deoxyhypusine synthase cDNA based on expressed sequence tag information". *Biochem. J.* 315 (2): 429–34. PMC 1217213. PMID 8615810.

Yu W, Andersson B, Worley KC, et al. (1997). "Large-scale concatenation cDNA sequencing". *Genome Res.* 7(4): 353–358 doi:10.1101/gr.7.4.353.PMC 139146. PMID 9110174.