

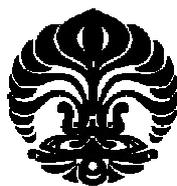
**UNIVERSITAS INDONESIA**

**DESAIN PENINGKATAN TERMOSTABILITAS LIPASE B *Candida antarctica* DENGAN REKAYASA PENAMBAHAN IKATAN DISULFIDA PADA ENZIM**

**TESIS**

**AHMAD RANDY  
0906651214**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI ILMU KIMIA  
DEPOK  
DESEMBER 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**DESAIN PENINGKATAN TERMOSTABILITAS LIPASE B *Candida antarctica* DENGAN REKAYASA PENAMBAHAN IKATAN DISULFIDA PADA ENZIM**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains**

**AHMAD RANDY  
0906651214**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI ILMU KIMIA  
DEPOK  
DESEMBER 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

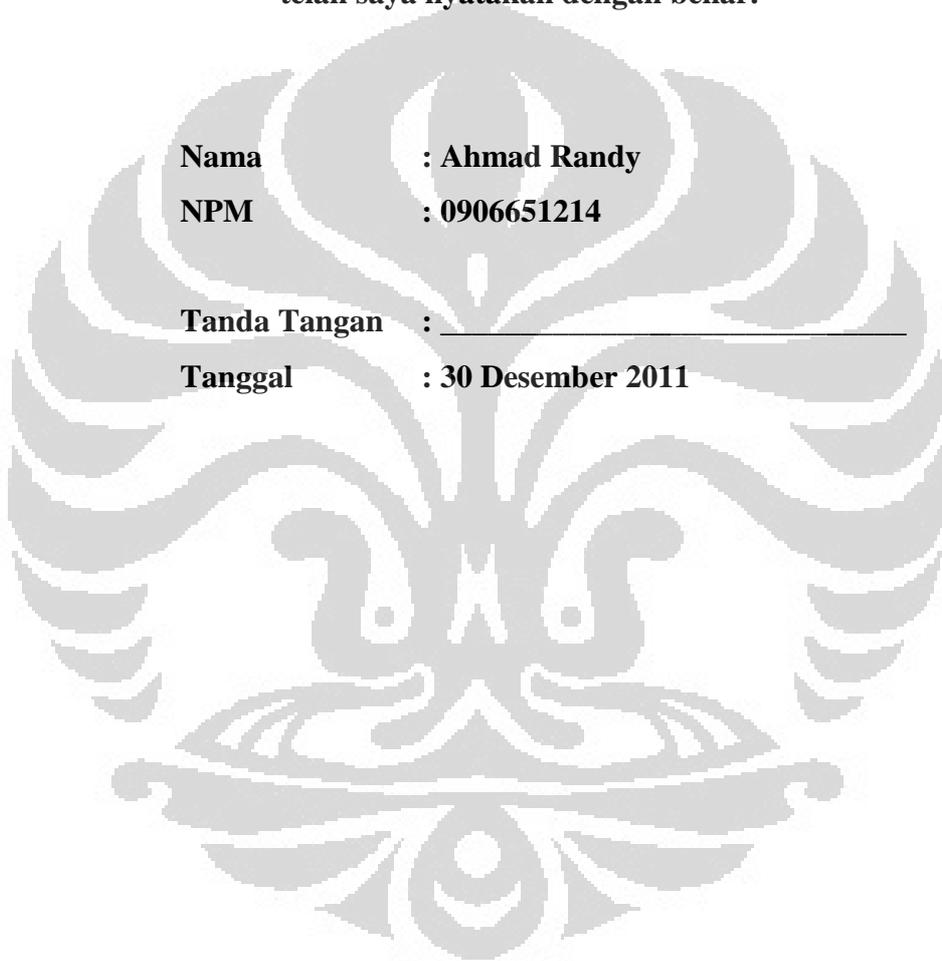
**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : Ahmad Randy**

**NPM : 0906651214**

**Tanda Tangan : \_\_\_\_\_**

**Tanggal : 30 Desember 2011**



**HALAMAN PENGESAHAN**

Tesis ini diajukan oleh:

Nama : Ahmad Randy

NPM : 0906651214

Program Studi : Ilmu Kimia

Judul Skripsi : DESAIN PENINGKATAN TERMOSTABILITAS LIPASE  
B *Candida antarctica* DENGAN REKAYASA  
PENAMBAHAN IKATAN DISULFIDA PADA ENZIM

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

**DEWAN PENGUJI**

Pembimbing : Prof. Dr. Usman Sumo Friend Tambunan (.....)

Penguji : (.....)

Penguji : (.....)

Penguji : (.....)

Penguji : (.....)

Ditetapkan di : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tanggal : Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Segala puji adalah milik Allah SWT. Rasa syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT atas terselesaikannya penelitian dan penulisan tesis sebagai syarat menempuh ujian akhir program studi Magister Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi sivitas akademika Universitas Indonesia serta perkembangan ilmu pengetahuan secara umum.

Selama penelitian, penulis telah mendapatkan bantuan berbagai pihak, oleh karena itu dalam pengantar ini penulis ingin menghaturkan terimakasih yang setinggi-tingginya kepada orangtua penulis, Mama dan Papa yang telah mendoakan, mendukung, mendidik, dan mencurahkan segala perhatian dan kasih sayangnya kepada penulis. Juga kepada keluarga di rumah: Oma dan Nesa, yang selalu mendoakan dan memberi semangat.

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Prof. Usman Sumo Friend Tambunan, sebagai pembimbing penelitian yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, dan mendukung penulis selama penelitian. Terimakasih atas bimbingan, diskusi, dan saran yang diberikan selama perkuliahan yang semakin memperluas dan mencerahkan pikiran.

Terimakasih penulis sampaikan kepada seluruh staff akademik dosen-dosen Departemen Kimia FMIPA-UI, terutama dosen-dosen Program Studi Magister Ilmu Kimia. Penulis juga berterimakasih kepada Dr. Yuni Krisnandi sebagai pembimbing akademis, Dr. Endang Saepudin sebagai Ketua Program Studi Magister Ilmu Kimia FMIPA-UI, Dr. Asep Saefumillah sebagai Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Kimia FMIPA-UI, dan Dr. Ridla Bakri sebagai Ketua Departemen Kimia FMIPA-UI. Terimakasih pula kepada seluruh staff administrasi Departemen Kimia FMIPA-UI terutama Pak Hadi, Pak Mardji, dan Pak Tris atas bantuan fasilitasi yang diberikan selama penulis menempuh studi.

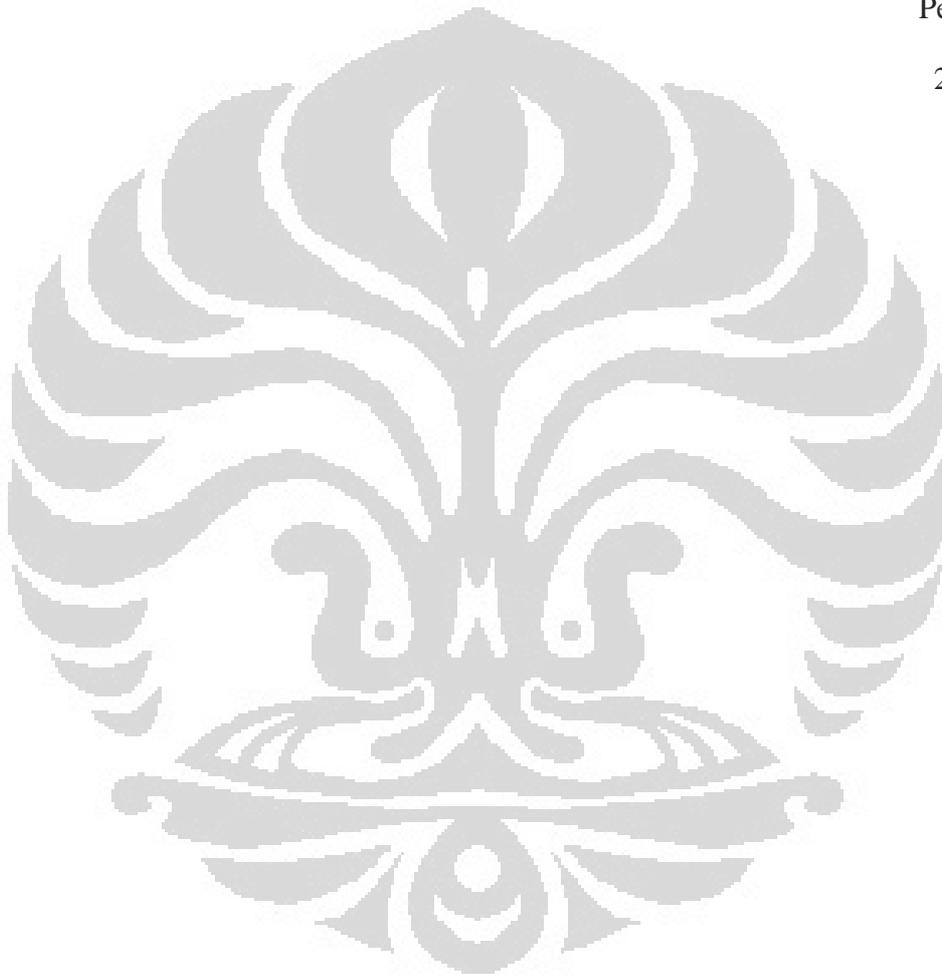
Penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada rekan-rekan mahasiswa/i Program Studi Magister Ilmu Kimia FMIPA-UI tahun 2009-2011 atas diskusi, bantuan, dan kenangan yang diberikan. Terimakasih kepada Dr. Bimo A. Tejo (UPM, Malaysia) atas diskusi dan saran selama penulisan proposal, Suminto

Winardi dan Agus Ismail atas bantuan literatur, dan forum [gmx-users] atas diskusi teknis tentang GROMACS dan simulasi dinamika molekul.

*Last but not least*, terimakasih dan penghargaan penulis sampaikan kepada rekan-rekan Tim Lab Bioinformatik Departemen Kimia (William, Pak Idrus, Iki, Tyas, Jojo, Tirta, Firman, Hanum, Adi, Ardilla, dan Yona) atas persahabatan serta kenangan pahit-manis, suka-duka, jalan-jalan, dan makan-makan.

Penulis

2011



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA  
ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Ahmad Randy  
NPM : 0906651214  
Program Studi : Ilmu Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Tesis

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

**DESAIN PENINGKATAN TERMOSTABILITAS LIPASE B  
*Candida antarctica* DENGAN REKAYASA PENAMBAHAN  
IKATAN DISULFIDA PADA ENZIM**

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 30 Desember 2011  
Yang menyatakan

(Ahmad Randy)

## ABSTRAK

Nama : Ahmad Randy  
Program Studi : Ilmu Kimia  
Judul : Desain Peningkatan Termostabilitas Lipase B *Candida antarctica* dengan Rekayasa Penambahan Ikatan Disulfida pada Enzim

Lipase B *Candida antarctica* (CALB) secara ekstensif dipelajari dalam produksi biodiesel, produk farmasi, deterjen, dan senyawa lainnya secara enzimatis. Salah satu kekurangan penggunaan CALB adalah suhu optimumnya yang relatif rendah pada 40°C (313 K). Tujuan penelitian ini adalah untuk merancang mutan CALB yang lebih termostabil dibanding CALB *wild type* dengan rekayasa penambahan ikatan disulfida. Simulasi dinamika molekul dilakukan untuk mengamati proses *unfolding* atau denaturasi termal CALB. Denaturasi termal CALB dipercepat dengan melakukan simulasi pada suhu tinggi. Simulasi dinamika molekul CALB dilakukan dengan perangkat lunak GROMACS pada suhu 300-700 K. Prediksi pasangan residu yang dapat dimutasi menjadi sistein dilakukan dengan perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>”. Pemilihan residu yang dimutasi, didasarkan pada hasil analisis fleksibilitas CALB. Berdasarkan hasil analisis tersebut dirancang tiga mutan enzim CALB yaitu Mutan-1 (Leu73Cys/Ala151Cys), Mutan-2 (Trp155Cys/Glu294Cys), dan Mutan-3 (Thr43Cys/Ser67Cys). Parameter yang digunakan untuk membandingkan termostabilitas enzim mutan dengan *wild type* adalah RMSD, SASA (*solvent accessible surface area*), jari-jari girasi ( $R_g$ ), dan struktur sekunder. Simulasi dinamika molekul yang dilakukan pada ketiga mutan tersebut menunjukkan bahwa Mutan-1 memiliki termostabilitas yang lebih baik dibanding CALB *wild type*. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan saran rancangan mutasi yang dapat diimplementasikan ke dalam laboratorium basah (*wet experiment*).

**Kata Kunci:** Lipase B *Candida antarctica*, termostabilitas, simulasi dinamika molekul, GROMACS, mutasi, ikatan disulfida.

xiii + 93 halaman; 28 gambar; 4 tabel  
Daftar Pustaka : 82 (1980-2011)

## ABSTRACT

Name : Ahmad Randy  
Title : Design of *Candida antarctica* Lipase B Thermostability Improvement by Introducing Extra Disulfide Bond into the Enzyme

*Candida antarctica* lipase B (CALB) is extensively studied in enzymatic production of biodiesel, pharmaceutical products, detergents, and other chemicals. One drawback of using CALB is its relatively low optimum temperature at 313 K (40°C). The objective of this research is to design CALB mutant with improved thermostability by introducing extra disulfide bond. Molecular dynamic simulation was conducted to get better insight on the process of thermal denaturation or unfolding in CALB. Thermal denaturation of CALB was accelerated by conducting simulation at high temperature. Molecular dynamic simulation of CALB was performed with GROMACS software package at 300-700 K. Prediction of possible mutation was conducted using “Disulfide by Design™” software. Selection of mutated residues was based on flexibility analysis of CALB. From those analyses, three mutants were designed, which are Mutant-1 (73LeuCys/151AlaCys), Mutant-2 (155TrpCys/294GluCys), and Mutant-3 (43ThrCys/67SerCys). Parameters that were used to compare the thermostability of mutant with *wild type* enzyme were RMSD, SASA (solvent accessible surface area), radius of gyration (Rg), and secondary structure. Molecular dynamic simulation conducted on those three mutants showed that Mutant-1 have better thermostability compared to *wild type* CALB. The resulted mutant design will be used as a suggestion to engineer CALB mutant in wet experiment.

**Key words:** *Candida antarctica* lipase B, thermostability, molecular dynamic simulation, GROMACS, mutation, disulfide bond.

xiii + 93 pages; 28 pictures; 4 tables  
Bibliography : 82 (1980-2011)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xiv</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
<b>BAB 2 tinjauan pustaka .....</b>	<b>5</b>
2.1. Lipase .....	5
2.2. Lipase B <i>Candida antarctica</i> .....	7
2.3. Rekayasa Protein .....	9
2.4. Stabilitas Termal Protein .....	11
2.4.1. Definisi Stabilitas Termal Protein .....	11
2.5. Ikatan Disulfida .....	12
2.6. Simulasi Dinamika Molekul.....	14
2.6.1. Gaya Intramolekul .....	15
2.6.2. Parameter Simulasi .....	16
<b>BAB 3 Metodologi .....</b>	<b>20</b>
3.1. Metodologi .....	20
3.2. Alat dan Perangkat Lunak .....	20
3.3. Cara Kerja .....	21
3.3.1. Preparasi Sistem Simulasi .....	21
3.3.2. Simulasi Dinamika Molekul.....	24
3.3.3. Analisis Simulasi Dinamika Molekul.....	26
3.3.4. Prediksi Pasangan Residu yang akan Dimutasi Menjadi Sistein... 28	28

3.3.5. Simulasi Dinamika Molekul Mutan CALB.....	28
<b>BAB 4 hasil dan pembahasan .....</b>	<b>30</b>
4.1. Simulasi CALB <i>Wild Type</i> .....	30
4.1.1. Validasi Metode Simulasi Dinamika Molekul .....	31
4.1.2. Analisis RMSD.....	33
4.1.3. Analisis Jari-jari Girasi ( $R_g$ ) .....	35
4.1.4. Analisis SASA ( <i>Solvent Accessible Surface Area</i> ) .....	37
4.1.5. Analisis Ikatan Hidrogen .....	39
4.1.6. Analisis Struktur Sekunder.....	45
4.1.7. Analisis RMSF .....	47
4.2. Prediksi Mutasi.....	50
4.3. Pemilihan Mutan .....	51
4.4. Simulasi Dinamika Molekul Enzim Mutan.....	52
4.4.1. Mutan-1 .....	53
4.4.2. Mutan-2 .....	58
4.4.3. Mutan-3 .....	61
<b>BAB 5 kesimpulan dan saran.....</b>	<b>66</b>
5.1. Kesimpulan.....	66
5.2. Saran.....	67
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>69</b>

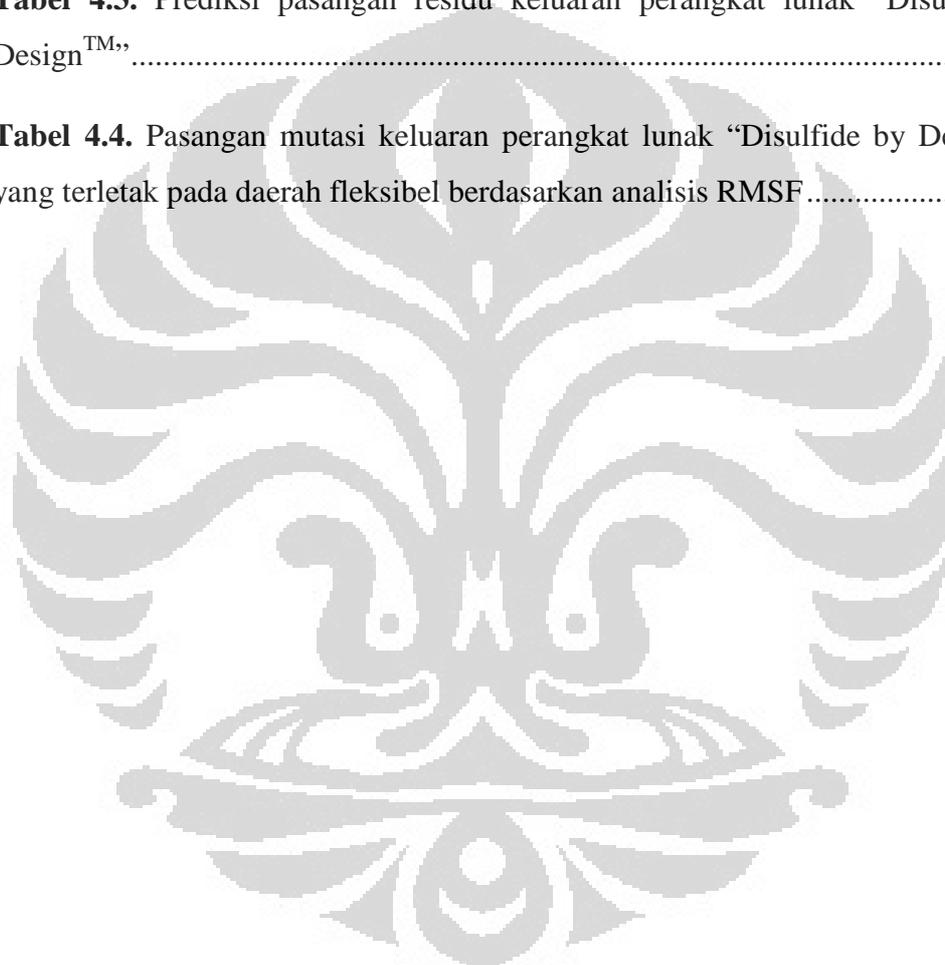
## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b> Diagram struktur sekunder $\alpha/\beta$ <i>hydrolase fold</i> .....	6
<b>Gambar 2.2.</b> Diagram struktur sekunder CALB .....	7
<b>Gambar 2.3.</b> Mekanisme katalisis oleh CALB .....	9
<b>Gambar 4.1.</b> Perbandingan nilai <i>B-factors</i> kristal 1TCA dengan <i>B-factors</i> simulasi suhu 300 K. ....	32
<b>Gambar 4.2.</b> Nilai RMSD selama simulasi suhu 300-700 K. ....	34
<b>Gambar 4.3.</b> Jari-jari girasi ( $R_g$ ) selama simulasi suhu 300-700 K. ....	37
<b>Gambar 4.4.</b> Rerata nilai jari-jari hirasi ( $R_g$ ) pada tiap suhu simulasi. ....	37
<b>Gambar 4.5.</b> <i>Solvent accessible surface area</i> (SASA) selama simulasi suhu 300-700 K. ....	38
<b>Gambar 4.6.</b> Rerata nilai SASA pada tiap suhu simulasi. ....	39
<b>Gambar 4.7.</b> Jumlah Ikatan hidrogen intramolekular selama simulasi suhu 300-700 K. ....	40
<b>Gambar 4.8.</b> Rerata jumlah ikatan hidrogen intramolekular pada tiap suhu simulasi. ....	42
<b>Gambar 4.9.</b> Jumlah Ikatan hidrogen antara protein-pelarut selama simulasi suhu 300-700 K. ....	43
<b>Gambar 4.10.</b> Rerata jumlah ikatan hidrogen antara protein-pelarut pada tiap suhu simulasi. ....	44
<b>Gambar 4.11.</b> Analisis RMSF simulasi suhu 300-700 K. ....	48
<b>Gambar 4.12.</b> Analisis RMSF simulasi suhu 300-400 K. ....	49
<b>Gambar 4.13.</b> Target mutasi pada enzim <i>wild type</i> dan mutan-mutan yang dihasilkan .....	52

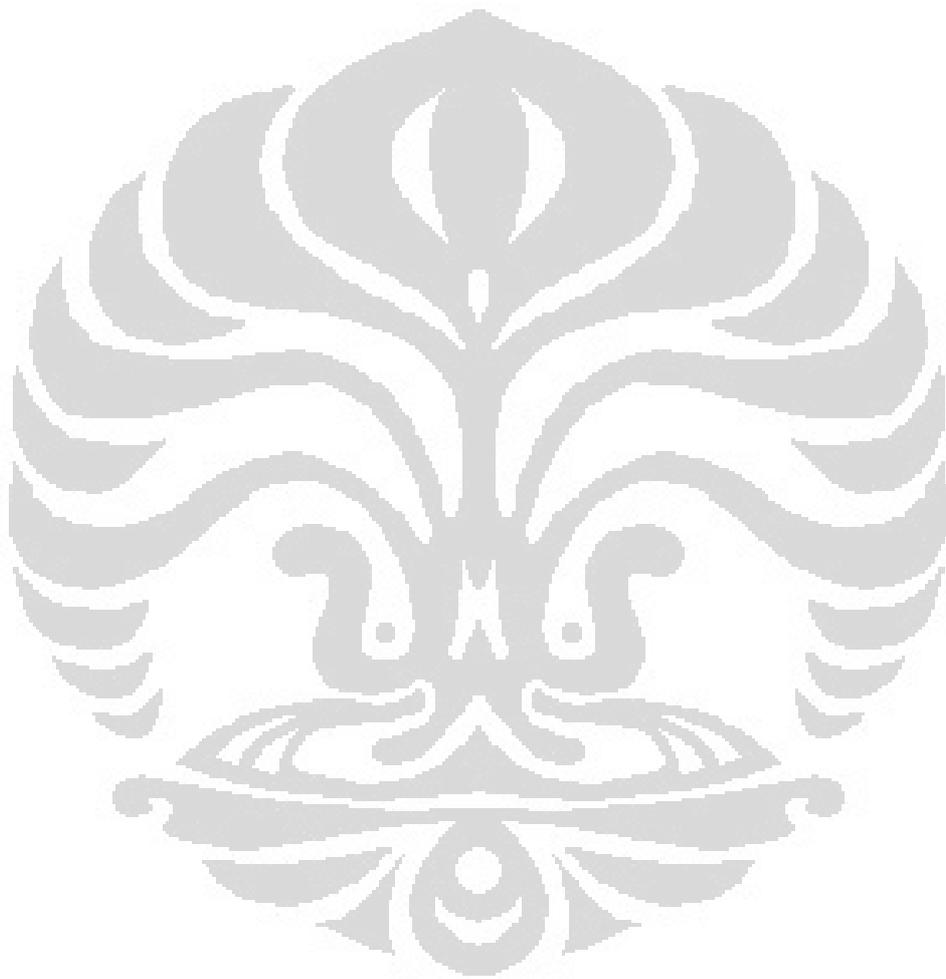
<b>Gambar 4.14.</b> Nilai RMSD Mutan-1 dan <i>wild type</i> pada simulasi 450 dan 550 K .....	54
<b>Gambar 4.15.</b> SASA Mutan-1 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	55
<b>Gambar 4.16.</b> Jari-jari girasi (Rg) Mutan-1 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	56
<b>Gambar 4.17.</b> Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-1 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	57
<b>Gambar 4.18.</b> Nilai RMSD Mutan-2 dan <i>wild type</i> pada simulasi 450 dan 550 K .....	59
<b>Gambar 4.19.</b> SASA Mutan-2 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	60
<b>Gambar 4.20.</b> Jari-jari girasi (Rg) Mutan-2 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	60
<b>Gambar 4.21</b> Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-2 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	61
<b>Gambar 4.22.</b> Nilai RMSD Mutan-3 dan <i>wild type</i> pada simulasi 450 dan 550 K .....	62
<b>Gambar 4.23.</b> SASA Mutan-3 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	64
<b>Gambar 4.24.</b> Jari-jari girasi (Rg) Mutan-3 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	64
<b>Gambar 4.25.</b> Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-3 dan <i>wild type</i> pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).....	65

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 4.1.</b> Persentase penurunan jumlah ikatan hidrogen intramolekular tiap simulasi. ....	41
<b>Tabel 4.2.</b> Persentase penurunan jumlah ikatan hidrogen antara protein-pelarut tiap simulasi. ....	43
<b>Tabel 4.3.</b> Prediksi pasangan residu keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design <sup>TM</sup> ”, .....	50
<b>Tabel 4.4.</b> Pasangan mutasi keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design <sup>TM</sup> ” yang terletak pada daerah fleksibel berdasarkan analisis RMSF.....	51



**DAFTAR LAMPIRAN**



**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran 1.</b> Analisis struktur sekunder konformasi akhir simulasi. ....	76
<b>Lampiran 2.</b> Analisis struktur sekunder selama waktu simulasi. ....	77
<b>Lampiran 3.</b> Konformasi akhir simulasi. ....	82
<b>Lampiran 4.</b> Prediksi mutasi hasil keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design <sup>TM</sup> ”. ....	86
<b>Lampiran 5.</b> Konformasi Mutan-1, Mutan-2, dan Mutan-3 serta posisi ikatan disulfida baru terhadap sisi aktif CALB. ....	87
<b>Lampiran 6.</b> Kantung pengikatan substrat pada Mutan-1, Mutan-2, Mutan-3 dan <i>wild type</i> . ....	89
<b>Lampiran 7.</b> Analisis struktur sekunder Mutan-1, Mutan-2, dan Mutan-3. ....	90
<b>Lampiran 8.</b> Diagram alir metode penelitian. ....	93

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Lipase adalah salah satu enzim yang banyak digunakan dalam beberapa bidang aplikasi seperti pada proses produksi deterjen, surfaktan, pangan, produk farmasi, kosmetik, industri kertas, dan nutrisi (Sharma et al., 2001). Lipase B yang berasal dari *Candida antarctica* (CALB) banyak dipelajari pada aplikasi proses kimia enzimatis seperti pemisahan senyawa rasemat (Patel et al., 2000), sintesis biodiesel (Zhao et al., 2007), esterifikasi dalam pembuatan surfaktan, dan polimerisasi pembukaan cincin (Peeters et al., 2005). CALB digunakan secara luas karena enansioselektifitas yang tinggi, keragaman substrat yang dapat digunakan, dan kestabilannya dalam pelarut organik (Trodler dan Pleiss, 2008). Namun kelemahan dari CALB adalah termostabilitasnya yang rendah. CALB diketahui bekerja optimum pada suhu 40°C, kemudian stabilitas dan aktivitasnya menurun pada suhu di atas 40°C (Mittlebach, 1990; Xu et al., 2003; Chodorge et al., 2005; Ong et al., 2006; Suen, 2004). Sedangkan suhu reaksi sendiri merupakan salah satu variabel yang penting dalam suatu reaksi, baik pada reaksi dengan katalis kimia maupun reaksi enzimatis (Marchetti et al., 2007). Beberapa aplikasi lipase dalam bidang industri juga memerlukan lipase yang termostabil. Hal tersebut diperlukan karena penggunaan suhu tinggi pada proses kimia akan meningkatkan laju reaksi, meningkatkan kelarutan substrat, menurunkan viskositas, dan mengurangi kemungkinan terkontaminasi oleh mikroba lain (Haki dan Rakshit, 2003; Kim et al., 2010). Untuk pengolahan minyak nabati dengan lipase, baik reaksi hidrolisis maupun esterifikasi, kondisi reaksi dengan suhu tinggi lebih disukai. Contoh penggunaan lipase pada suhu tinggi adalah pada proses pemurnian minyak nabati yang menggunakan lipase pada suhu hingga 75°C. Lipase digunakan untuk dalam proses refinasi minyak nabati secara enzimatis untuk menghasilkan minyak yang lebih murni (Klaus, 1998). Minyak nabati lebih mudah larut pada suhu 65-75 °C, sehingga lipase yang diperlukan dalam proses hidrolisis atau transesterifikasi minyak-minyak ini harus lebih stabil pada suhu yang tinggi (Klaus, 1998).

Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan termostabilitas suatu enzim adalah dengan strategi rekayasa protein seperti mengganti beberapa residu asam amino pada enzim dengan asam amino lain sehingga dihasilkan enzim mutan yang lebih stabil. Enzim mutan kemudian dihasilkan dengan teknik rekayasa genetik, yaitu mengubah urutan basa nukleotida (gen) yang mengkode urutan asam amino enzim tersebut. Strategi rekayasa genetik yang digunakan dalam rekayasa protein dapat dilakukan dengan cara random (acak) atau secara terarah (*site-directed mutagenesis*). Mutagenesis secara acak dilakukan dengan membuat suatu pustaka (*library*) klon-klon mikroba dengan gen penyandi yang dimutasi, kemudian dilakukan seleksi sifat terhadap klon yang dapat memproduksi enzim dengan sifat yang diinginkan. Peningkatan termostabilitas CALB melalui strategi pembuatan pustaka klon secara acak dan seleksi klon sudah dilakukan dengan teknik *DNA shuffling* (Suen et al., 2004) atau *error-prone PCR* (Chodorge et al., 2005; Zhang et al., 2003).

*Site-directed mutagenesis* dilakukan dengan mengubah residu asam amino spesifik pada protein. Perancangan protein mutan dilakukan dengan mempelajari struktur protein. Karakter dan aktivitas suatu protein sangat bergantung pada strukturnya, sehingga pemahaman terhadap struktur akan membantu pemahaman karakter dan aktivitas protein. Simulasi dinamika molekul (*molecular dynamic simulation*) atau pemodelan komputer merupakan salah satu teknik yang digunakan dalam mempelajari struktur protein untuk merancang suatu mutasi pada protein (Han et al., 2009; Yamaguchi et al., 1996; Sandstrom et al., 2009; Kim et al., 2010; Santarossa et al., 2005). Hasil analisis pemodelan komputer digunakan untuk menentukan residu asam amino yang akan dimutasi untuk kemudian diaplikasikan lewat rekayasa genetik.

Salah satu pendekatan yang dapat digunakan untuk menentukan residu yang akan dimutasi adalah dengan mempelajari fleksibilitas enzim yang berkaitan dengan proses terjadinya denaturasi termal protein (Pikkemaat et al., 2002; Han et al., 2009; Jeong et al., 2007; Liu et al., 2003; Kim et al., 2010). Daerah dengan fleksibilitas tinggi pada protein seringkali berperan dalam proses awal denaturasi termal. Mengurangi fleksibilitas enzim dengan mengganti beberapa residu sehingga enzim menjadi lebih rigid, akan mengarah pada

termostabilitas yang lebih baik (Liu et al., 2003; Kim et al., 2003; Yamaguchi et al., 1996). Salah satu mutasi yang dapat dilakukan pada enzim untuk meningkatkan termostabilitas adalah dengan menambahkan ikatan disulfida baru pada enzim. Penambahan ikatan disulfida baru dilakukan dengan memutasi dua residu asam amino (satu pasang) menjadi sistein. Adanya ikatan disulfida menyebabkan terjadi *cross-link* intramolekul pada protein, yang dapat menyebabkan bertambahnya rigiditas protein. Bertambahnya rigiditas protein diakibatkan oleh berkurangnya fleksibilitas residu-residu di sekitar daerah terbentuknya ikatan disulfida. Ikatan disulfida dapat dianggap berfungsi sebagai 'pengunci' pergerakan residu-residu yang fleksibel (Liu dan Wang, 2003).

Simulasi dinamika molekul dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari termostabilitas protein lewat analisis fleksibilitas (Pikkemaat et al., 2002; Purmonen et al., 2007; Nurbaiti, 2009). Dengan mempelajari proses perubahan struktur dan fleksibilitas yang terjadi pada denaturasi termal, dapat dirancang suatu mutan yang memiliki termostabilitas yang lebih baik. Strategi simulasi yang dapat dilakukan untuk mempelajari perubahan struktur protein selama proses denaturasi adalah dengan melakukan simulasi pada suhu yang sangat tinggi (Li dan Dagget, 1994; Day et al., 2002; Becker et al., 2001; Liu dan Wang, 2003; Purmonen et al., 2007). Penggunaan suhu tinggi menyebabkan simulasi proses perubahan struktur dapat terjadi dengan lebih cepat sehingga penggunaan sumber daya komputasi dapat dikurangi.

Dalam penelitian ini dilakukan perancangan mutan lipase B *Candida antarctica* (CALB) yang lebih termostabil dengan menambahkan ikatan disulfida pada enzim dengan memutasi pasangan asam amino menjadi sistein sehingga terbentuk ikatan disulfida baru pada CALB. Mutasi yang dilakukan dengan menambahkan ikatan disulfida baru pada lipase diharapkan dapat meningkatkan termostabilitas lipase yang dikorelasikan dengan kestabilan struktur dalam pengujian dengan simulasi molekular dinamik. Pemilihan residu yang dimutasi dilakukan dengan mempertimbangkan perubahan struktur enzim pada kenaikan suhu yang dipelajari dengan simulasi dinamika molekul. Strategi yang digunakan adalah dengan melakukan simulasi dinamika molekul pada suhu tinggi untuk mempercepat proses perubahan struktur ke arah denaturasi protein. Stabilitas

enzim mutan kemudian dianalisis dengan simulasi dinamika molekul dengan membandingkan parameter-parameter antara CALB mutan dan CALB *wild type*. Peningkatan termostabilitas enzim mutan terhadap enzim *wild type* dinyatakan dengan kestabilan struktur yang lebih baik pada simulasi suhu tinggi.

## 1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah melakukan perancangan mutan CALB yang lebih termostabil dibanding CALB *wild type* dengan menambahkan ikatan disulfida baru. Hasil penelitian ini dapat memberikan saran rancangan mutasi yang dapat diimplementasikan ke dalam laboratorium basah (*wet experiment*) untuk melakukan rekayasa genetik secara *site-directed mutagenesis* pada CALB.

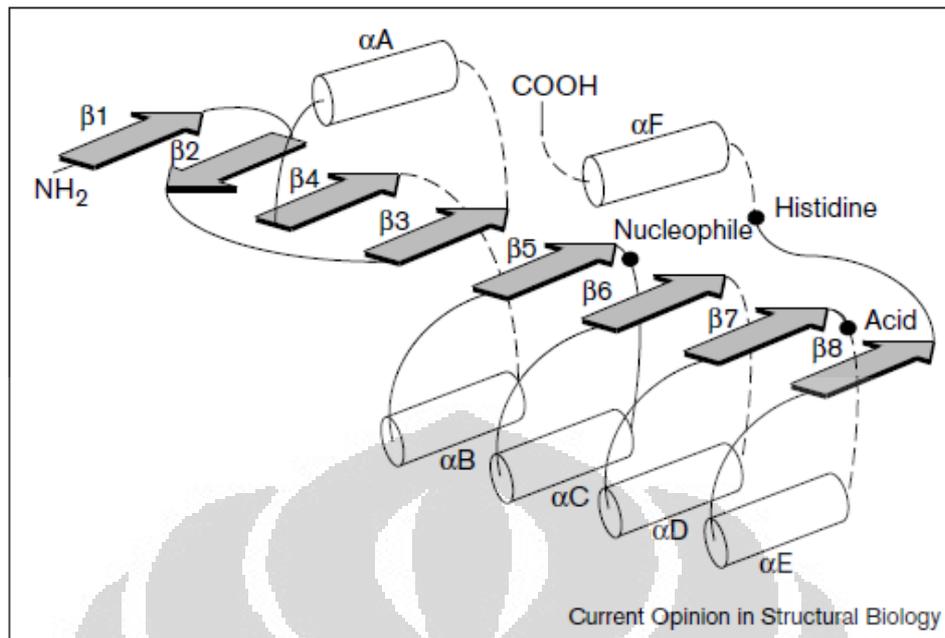


## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Lipase

Lipase (EC.3.1.1.3) adalah kelompok enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida. Lipase sendiri merupakan bagian dari kelas enzim hidrolase (3.x.x.x) yang anggotanya antara lain adalah protease, selulase, esterase, amilase, dan lipase. Lipase dan esterase dapat mengkatalisis tipe reaksi yang sama, namun berbeda dalam spesifisitas substrat dan kinetika enzim (Fernandez et al., 2000). Sebagian besar substrat bagi lipase adalah molekul dengan rantai yang lebih panjang dan tidak larut dalam air, sedangkan substrat bagi esterase adalah molekul yang larut dalam air seperti asam karboksilat atau ester dengan rantai yang lebih pendek (Pleiss et al., 1998). Karakteristik beberapa lipase yang tidak dimiliki esterase adalah aktivasi antarmuka, yaitu aktivitas enzimatik yang mulai teramati ketika lipase berada pada antarmuka minyak dan air (Nardini dan Dijkstra, 1999; Santarossa et al., 2005; Kim et al., 1997). Aktivitas antarmuka terjadi karena adanya *lid* yang menutup sisi aktif substrat, yang akan terbuka pada keadaan aktif ketika berada pada antarmuka minyak dan air. Terbukanya *lid* memungkinkan masuknya substrat pada sisi aktif lipase (Kim et al., 1997).

Reaksi yang dikatalisis oleh kedua enzim ini pada lingkungan alaminya (fisiologis) adalah hidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak dan gliserol. Pada lingkungan reaksi yang sesuai seperti dalam pelarut organik atau lingkungan dengan konsentrasi air yang rendah, lipase dapat mengkatalisis reaksi sebaliknya yaitu reaksi esterifikasi (Zhao et al., 2007; Iso et al. 2001; Ghaly et al. 2010; Mittelbach, 1990). Beberapa lipase menunjukkan aktivitas yang lebih baik pada lingkungan reaksi dengan konsentrasi air yang lebih rendah. Kemampuan lipase untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi dimanfaatkan dalam sintesis biodiesel, senyawa obat, senyawa deterjen, surfaktan, industri oleokimia, dan kosmetik (Sharma, et al. 2001). Banyaknya jenis reaksi dan jenis substrat yang dapat dikatalisis oleh lipase menyebabkan enzim ini dipelajari dan digunakan secara ekstensif dalam sintesis senyawa kimia.



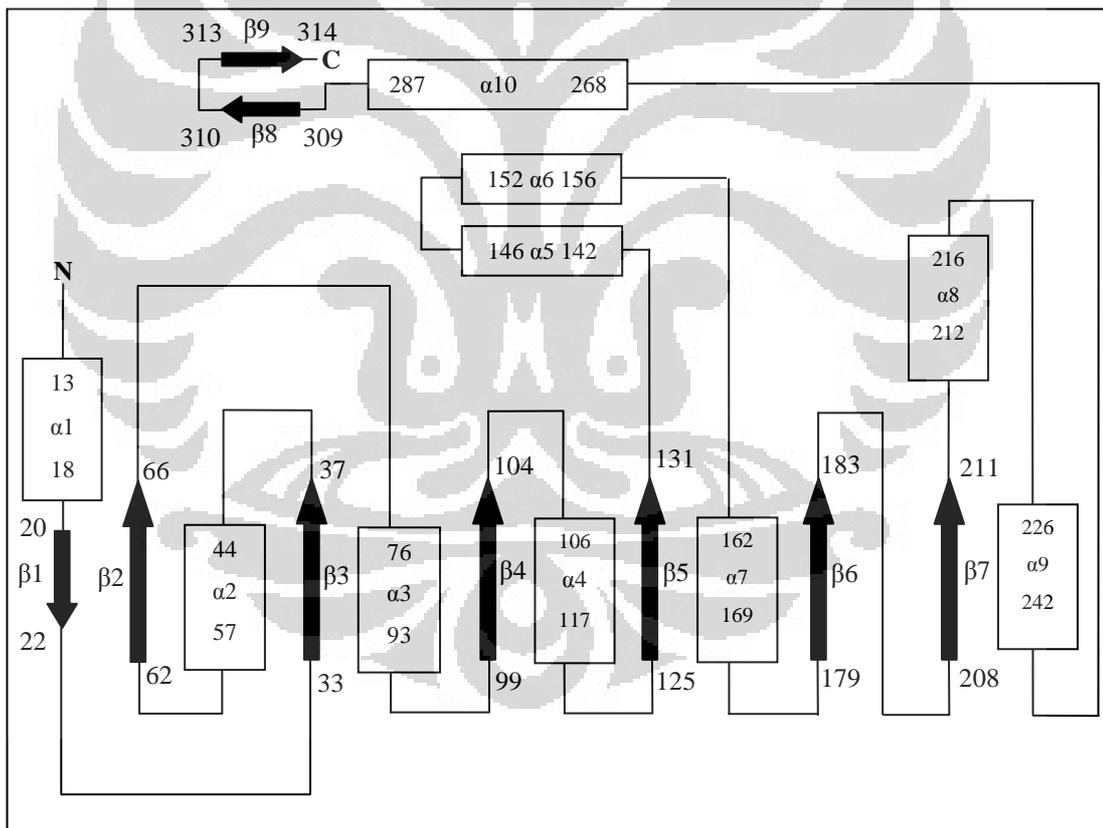
[sumber: nardini dan Dijkstra, 1999]

**Gambar 2.1.** Diagram struktur sekunder  $\alpha/\beta$  *hydrolase fold*

Struktur protein yang dimiliki oleh beberapa lipase termasuk dalam keluarga  $\alpha/\beta$ -*hydrolase fold*. Struktur ini juga diadaptasi oleh hidrolase lainnya seperti protease, esterase, dehalogenase, dan epoksidase (Nardini dan Dijkstra, 1999). Semua enzim yang termasuk dalam keluarga  $\alpha/\beta$ -*hydrolase fold* mengadopsi struktur dimana terdapat delapan  $\beta$ -*strand* pada interior protein dengan diselingi adanya  $\alpha$ -heliks di antara *strand* (**Gambar 2.1**). Tipe *fold* ini dipertahankan (*conserved*) dengan sangat baik pada semua anggota keluarga, bahkan antara protein dengan sekuens yang berbeda jauh. Sisi aktif protein pada keluarga *fold* ini juga dipertahankan, yaitu katalitik triad yang bersifat nukleofil (serin, sistein, atau asam aspartat) serta residu histidin. Residu histidin dapat ditemui pada sisi aktif seluruh protein keluarga  $\alpha/\beta$ -*hydrolase fold* (Nardini dan Dijkstra, 1999; Ollis et al., 1992).

## 2.2. Lipase B *Candida antarctica*

*Candida antarctica* memproduksi dua jenis lipase, yaitu lipase A (CALA) dan lipase B (CALB). Lipase A (CALA) tidak bekerja secara spesifik, sedangkan Lipase B (CALB) bersifat sangat stereospesifik. Perbedaan lainnya adalah CALA menunjukkan sifat aktifasi antarmuka, sedangkan CALB tidak memiliki sifat ini (Martinelle, 1995). Struktur kristal CALB telah ditentukan dan terdapat pada bank data PDB dengan lima PDB ID (1TCA, 1TCB, 1TCC, 1LBT, dan 1LBS). Struktur kristal 1TCA adalah struktur dengan resolusi kristalografis terbaik sebesar 1,5 Å. Pada kristal 1TCA terdapat molekul air dan inhibitor *N*-asetil glukosamin yang terikat pada enzim (Uppenberg et al., 1994).



[sumber: Uppenberg et al., 1994)

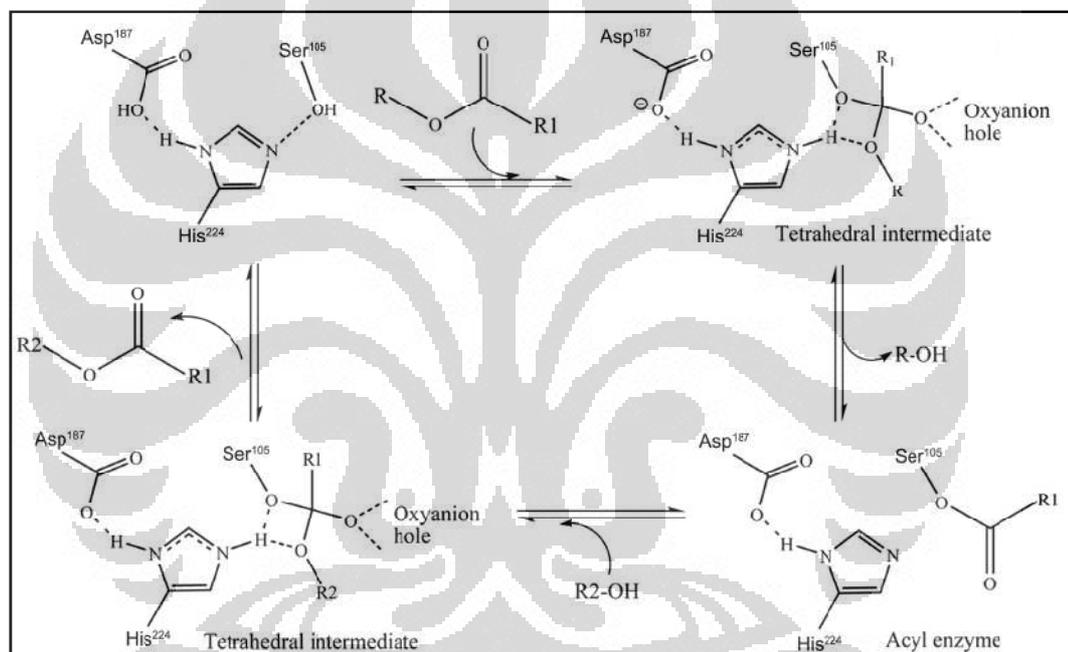
**Gambar 2.2.** Diagram struktur sekunder CALB

CALB termasuk dalam keluarga  $\alpha/\beta$ -*hydrolase fold* yang memiliki delapan  $\beta$ -*strand* sebagai inti protein yang diselingi beberapa heliks (**Gambar 2.2**). Dua  $\beta$ -*strand* tambahan yang antiparalel terdapat pada daerah C-terminal. Sisi aktif CALB terdiri dari triad katalitik yaitu serin, histidin, dan asam aspartat (Ser105-His224-Asp187). Sisi aktif His 224 terletak di awal heliks-9. Sisi aktif Asp187 terletak pada *turn* setelah *sheet*-6 yang merupakan ciri khusus dari keluarga  $\alpha/\beta$ -*hydrolase fold*. Sisi aktif Ser105 terletak tepat setelah *sheet*-4. CALB memiliki tiga ikatan disulfida pada keadaan *native*, yaitu antara Cys22-Cys64, Cys216-Cys258, dan Cys293-Cys311.

Kantong pengikatan substrat pada CALB dapat dibagi menjadi dua bagian, yaitu sisi asil dan sisi alkohol (Uppenberg et al., 1995). Residu-residu yang terlibat dalam pembentukan kantung adalah Gly39, Thr42, Ser47, Trp104, Asp134, Thr138, Ala141, Leu144, Val154, Gln157, Ile189, Val190, Ala225, Ile285, Pro289, dan Lys290 (Uppenberg et al., 1994; Trodler dan Pleiss, 2008). Kantong pengikat substrat berbentuk terowongan elips yang memiliki dimensi sekitar 9,5 x 4,5 Å dengan sisi aktif Ser105 yang terletak di bagian dasar. Panjang kantung ini cocok untuk substrat dengan rantai yang cukup panjang hingga C13 (Martinelle et al., 1995). Sebagian besar terowongan ini dibentuk oleh heliks-5, heliks-10, dan bagian *loop* dekat residu Ile189. Kantong pengikat substrat bersifat sangat hidrofobik dan sebagian besar terbentuk oleh residu dengan rantai samping alifatik, sedangkan daerah sekitar Ser105 bersifat sangat polar (Uppenberg et al., 1994). Pada kantung juga terapat *oxyanion hole* yang dibentuk oleh residu Thr40 dan Gln106. *Oxyanion hole* ini berfungsi untuk menstabilkan keadaan transisi enzim dengan bertindak sebagai donor proton bagi oksianion keadaan transisi (Uppenberg et al., 1994; Haeffner dan Norin, 1999). Hidrogen peptida dari Gln106 berperan sebagai donor proton, sedangkan donor proton dari Thr40 berasal dari hidrogen peptida dan hidrogen hidroksil (Kwon, et al., 2007).

Katalisis reaksi oleh lipase berlangsung lewat mekanisme “*bi-bi ping-pong*” (Haefner dan Norin, 1999). Pada CALB, residu yang berinteraksi secara langsung dengan substrat adalah Ser105 dan His224, sedangkan residu Asp187 berperan dalam meningkatkan nukleofilisitas His224 dengan melakukan *relay* muatan pada cincin histidin. Dalam mekanisme ini, akan terbentuk keadaan transisi yang

berupa residu Ser105 pada enzim yang berikatan kovalen dengan asil (**Gambar 2.3**). Keadaan intermediet terjadi ketika karbon karbonil dari substrat berada dalam keadaan tetrahedral dan membentuk oksianion. Pada intermediet ini, oksianion distabilkan lewat ikatan hidrogen pada residu-residu *oxyanion hole*. Setelah pembentukan intermediet, terjadi pelepasan alkohol dan enzim berada dalam keadaan transisi dengan mengikat gugus asil secara kovalen. Ketika substrat kedua masuk pada sisi aktif, kembali terbentuk intermediet tetrahedral. Setelah produk akhir dilepas, enzim kembali ke keadaan awalnya.



[sumber: Li et al., 2010]

**Gambar 2.3.** Mekanisme katalisis oleh CALB

### 2.3. Rekayasa Protein

Rekayasa protein adalah proses mengubah urutan asam amino suatu protein untuk menghasilkan protein mutan dengan sifat yang lebih baik dibandingkan protein alaminya. Urutan asam amino diubah menggunakan teknik-teknik rekayasa genetik dengan mengubah urutan basa nukleotida (gen) yang mengkode urutan asam amino protein. Contoh peningkatan sifat-sifat protein yang

dapat dilakukan antara lain adalah spesifisitas substrat, kinetika reaksi enzimatik, aktivitas pada pelarut non-air, kebutuhan kofaktor, spesifisitas reaksi, resistensi terhadap protease, dan termostabilitas (Glick dan Pasternak, 2003).

Strategi rekayasa genetik yang digunakan dalam rekayasa protein dapat dilakukan dengan cara random (*directed mutagenesis*) atau secara terarah (*site-directed mutagenesis*). Mutagenesis secara acak dilakukan dengan membuat suatu pustaka (*library*) klon-klon mikroba dengan gen penyandi yang dimutasi, kemudian dilakukan seleksi sifat terhadap klon yang dapat memproduksi enzim dengan sifat yang diinginkan (Glick dan Pasternak, 2003). Keunggulan mutagenesis secara acak adalah dihasilkan tidak diperlukan pengetahuan tentang struktur kristal serta banyaknya pustaka mutan yang dihasilkan (Vieille dan Zeikus, 2001). Kelemahannya adalah banyaknya tahapan *trial-and-error* pada strategi mutagenesis ini, serta perlunya seleksi sifat protein yang diinginkan dari masing-masing mutan yang terdapat pada pustaka klon (Glick dan Pasternak, 2003). Beberapa teknik menghasilkan pustaka klon mutan dengan mutagenesis acak antara lain adalah *DNA shuffling*, *error-prone PCR*, (Vieille dan Zeikus, 2001; Suen et al., 2004; Chodorge et al., 2005; Zhang et al., 2003).

*Site-directed* dilakukan dengan mengubah residu asam amino spesifik pada protein. Pada teknik mutagenesis ini, urutan DNA yang mengkode protein dan asam amino mana yang akan diganti harus diketahui secara pasti (Glick dan Pasternak, 2003). Perancangan protein mutan dilakukan dengan mempelajari struktur protein hasil analisis X-Ray, NMR, atau komputasi. Karakter dan aktivitas suatu protein sangat bergantung pada strukturnya, sehingga pemahaman terhadap struktur akan membantu pemahaman karakter dan aktivitas protein. Proses pemilihan asam amino yang akan diganti juga semakin dibantu dengan teknik-teknik komputasi.

Beberapa algoritma diciptakan untuk memprediksi mutasi asam amino yang dapat meningkatkan kestabilan protein (Vieille dan Zeikus, 2001; Dombkowski, 2003). Selain itu, simulasi dinamika molekul (*molecular dynamic simulation*) atau pemodelan komputer merupakan teknik yang banyak digunakan dalam mempelajari struktur protein untuk membantu pemilihan mutasi pada

protein (Han et al., 2009; Yamaguchi et al., 1996; Sandstrom et al., 2009; Kim et al., 2010; Santarossa et al., 2005).

## 2.4. Stabilitas Termal Protein

Stabilitas termal suatu enzim didefinisikan sebagai ketahanan enzim untuk tetap dalam struktur alaminya (*folded state*) sedemikian rupa sebagai respon terhadap energi tinggi, sehingga dapat menjalankan fungsinya dengan baik (Zhang, et.al., 2004). Penelitian melalui berbagai pendekatan baik eksperimen maupun komputasional telah berusaha untuk mengelusidasi faktor penentu stabilitas termal enzim. Hasil penelitian menyarankan bahwa mekanisme umum untuk menjelaskan sifat stabilitas enzim ataupun protein hingga saat ini belum dapat dijelaskan secara pasti karena banyak faktor yang mempengaruhi stabilitas termal tersebut. Stabilitas termal dapat dipengaruhi parameter internal enzim seperti komposisi asam amino, interaksi elektrostatik, ikatan sulfida, interaksi hidrofobik, interaksi aromatik dan ikatan hidrogen.

### 2.4.1. Definisi Stabilitas Termal Protein

Stabilitas protein secara termodinamika diukur dari perubahan energi bebas Gibbs antara keadaan protein *native* (N) dengan keadaan protein terdenaturasi/*unfolded* (U) pada kesetimbangan dinamik ( $N \rightleftharpoons U$ ) yang juga disebut sebagai perubahan energi bebas *unfolding* protein (Kumar dan Nussinov, 2001):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Dimana  $\Delta H$  adalah perubahan entalpi dan  $\Delta S$  adalah entropi antara protein dalam keadaan *native* dengan keadaan *unfolded*. Penggunaan model sederhana untuk kesetimbangan ini dilakukan dengan model dua keadaan (*two state unfolding*), dimana protein hanya berada pada dua keadaan diskret, yaitu N dan U (Buchner dan Kiefhaber, 2005). Keadaan N adalah keadaan dimana kekompakan struktur

tercapai dan protein melipat secara sendiri. Struktur kristal yang ditentukan secara eksperimental dapat dianggap mewakili keadaan N, walaupun sebenarnya keadaan N tidak terdiri dari konformasi tunggal melainkan berupa sekumpulan struktur dengan konformasi pada tingkatan yang sama (Buechner dan Kiefhaber, 2005; Robic, 2010).

Entalpi dari reaksi *unfolding* protein bernilai positif, sehingga secara entalpi, keadaan *native* lebih disukai dan lebih stabil dibanding keadaan *unfolded*. Interaksi-interaksi internal seperti ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals intramolekular memberi efek menstabilkan secara entalpi, sedangkan ekspos interior protein terhadap protein pada keadaan *unfolding* bersifat destabilisasi secara entalpi.

Proses *unfolding* protein disertai oleh peningkatan entropi sistem, sehingga secara keadaan *unfolding* lebih disukai secara entropik (Buchner dan Kiefhaber, 2005). Faktor pertama yang menyebabkan peningkatan entropi adalah interaksi gugus-gugus yang terekspos kepada pelarut pada keadaan *unfolded*. Faktor lainnya adalah bertambahnya jumlah konformasi protein yang dapat diakses oleh protein keadaan *unfolded* dibanding konformasi yang mungkin diakses keadaan *native*. Secara keseluruhan, kestabilan struktur dicapai secara entalpi yang diimbangi oleh destabilisasi entropik. Keseimbangan ke arah keadaan *native* tercapai ketika nilai entalpi cenderung lebih besar dibanding entropi destabilisasi (Buchner dan Kiefhaber, 2005).

## 2.5. Ikatan Disulfida

Ikatan disulfida pada protein dibentuk oleh sepasang residu sistein dalam keadaan teroksidasi pada atom S yang terjadi dengan bantuan oksidan. Di dalam sel, tahapan pembentukan ikatan disulfida seringkali merupakan tahapan penentu dalam proses *fold*ing suatu protein (Woycechowsky et al., 1999). Secara *in vivo* pembentukan ikatan disulfida antara dua residu sistein dikatalisis oleh sistem enzim oksidan seperti *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1 protein* (Ero1p) dan *protein disulfide isomerase* (PDI) yang terdapat pada sel eukariot. Oksidasi

pasangan sistein terjadi akibat transfer elektron dari atom S sistein ke sisi aktif enzim. Selain enzim, secara *in vitro* ada beberapa oksidan lain berupa molekul kimia yang dapat berfungsi sebagai oksidator bagi pembentukan ikatan disulfida (Woycechowsky, 1999). Defisiensi atau berkurangnya aktivitas enzim oksidan ini menyebabkan kegagalan pembentukan ikatan disulfida pada protein tertentu dan menyebabkan hilangnya aktivitas protein tersebut (Woycechowsky dan Raines, 2000).

Ikatan disulfida pada protein memiliki peran yang beragam, di antaranya adalah mengikat peptida pendek ke keadaan bioaktif, menghubungkan rantai-rantai pada imunoglobulin, menjaga konformasi protein selama proses ekskresi, serta berperan untuk meningkatkan resistensi enzim ekstraseluler terhadap protease (Liebeton et al., 2000; Brumlik et al., 1997). Peran ikatan disulfida dalam kestabilan protein adalah dengan mengurangi entropi protein keadaan *unfolded* (Betz, 1993). Teori terkini tentang efek ikatan disulfida pada kestabilan protein juga menunjukkan pengaruh ikatan disulfida terhadap entalpi sistem.

Termostabilitas protein dapat ditingkatkan dengan memodifikasi protein sehingga proses *unfolding* protein pada kenaikan suhu terhambat. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan ikatan disulfida dapat meningkatkan kestabilan protein. Penambahan ikatan disulfida baru dilakukan dengan memutasi dua (satu pasang) asam amino menjadi sistein. Ikatan disulfida diketahui dapat meningkatkan kestabilan enzim terhadap denaturasi secara termal dengan menurunkan entropi enzim pada keadaan *unfolded* atau terdenaturasi (Betz, 1993; Yamaguchi et al., 1996). Adanya ikatan disulfida menyebabkan terjadi *cross-link* intramolekul pada protein, yang dapat menyebabkan bertambahnya rigiditas protein. Bertambahnya rigiditas protein diakibatkan oleh berkurangnya fleksibilitas residu-residu di sekitar daerah terbentuknya ikatan disulfida. Ikatan disulfida dapat dianggap berfungsi sebagai 'pengunci' pergerakan residu-residu yang fleksibel (Liu dan Wang, 2003). Ikatan disulfida yang ditambahkan pada protein dapat mengurangi fleksibilitas enzim sehingga enzim menjadi lebih rigid. Rigiditas ini akan mengarah pada stabilitas terhadap denaturasi termal yang lebih baik.

## 2.6. Simulasi Dinamika Molekul

Metode simulasi dinamika molekul pertama kali diperkenalkan oleh Alder dan Wainwright pada akhir tahun 1950. Pada awalnya digunakan untuk mempelajari permukaan yang keras (*hard spheres*). Sedangkan simulasi dinamika molekul terhadap sistem nyata baru dilakukan pada tahun 1974. Tahun 1977 teknik ini pertama kali digunakan untuk kajian biomolekul dengan menggunakan bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) (McCammon, et.al., 1977).

Secara umum, simulasi dinamika molekul didasarkan pada integrasi numerik terhadap persamaan Newton tentang gerak ( $F=m.a$ ). Gaya interaksi antar atom dalam simulasi dinamika molekul hanya tergantung pada posisi atom dan tidak tergantung pada kecepatannya, yang dinyatakan sebagai gradien dari energi potensial. Simulasi dinamika molekul merupakan salah satu bagian dari pendekatan komputasional dimana atom dan molekul dibiarkan saling berinteraksi selama periode waktu tertentu sehingga tingkah laku sistem dapat teramati. Teknik ini banyak digunakan dalam biologi struktur, karena mampu memberikan informasi detail mengenai fluktuasi dan perubahan konformasi biomolekul sampai pada tingkat atom. Teknik ini dikembangkan untuk mempelajari stabilitas enzim atau protein, perubahan konformasi, pelipatan protein, pengangkutan ion pada sistem biologi, evaluasi struktur hasil kristalografi sinar-X maupun NMR, hingga prancangan obat. Teknik simulasi dinamika molekul berperan sebagai jembatan antara eksperimen dan teori (Roux, et.al., 2004).

Simulasi dinamika molekul merupakan salah satu metode yang berguna untuk menambah informasi dari eksperimen lain tentang kestabilan protein seperti pengamatan keadaan *native* dan *unfold* serta proses pembentukannya. Perubahan struktur protein seperti proses *unfolding* pada suhu tinggi terjadi pada skala waktu dengan satuan mikrosekon hingga jam (Becker et al., 2001; Purmonen et al., 2007). Simulasi dinamika molekul yang dilakukan pada skala waktu tersebut akan sangat memakan waktu dan sumber daya komputasi. Penggunaan suhu tinggi dalam simulasi akan memberikan energi kinetik tambahan pada sistem sehingga dalam waktu yang lebih singkat dan dengan tenaga komputasi yang lebih terjangkau, adanya batas energi antara keadaan *native* protein dengan keadaan

*unfolding* dapat dilewati (Becker et al., 2001; Day et al., 2002). Perubahan struktur protein akan dipercepat dengan penggunaan suhu tinggi pada simulasi (Li dan Dagget, 1994). Simulasi yang dipercepat dengan menggunakan suhu tinggi bahkan menunjukkan pola perubahan struktur protein (*unfolding pathway*) yang sama jika dibandingkan dengan simulasi pada suhu lebih rendah dan waktu yang lebih panjang (Day et al., 2002). Selain itu, simulasi dinamika molekul menggunakan prinsip fisika mekanik yang tidak melibatkan pergerakan elektron dalam perhitungan (fisika kuantum), sehingga penggunaan suhu tinggi pada simulasi tidak menyebabkan terputusnya ikatan kimia (Becker et al., 2001).

### 2.6.1. Gaya Intramolekul

Secara umum, interaksi intramolekul diekspresikan sebagai gradien energi potensial yang bekerja pada atom-atom terhadap kordinat masing-masing dalam struktur ruang 3D. Dalam simulasi dinamika molekul, fungsi energi potensial diberikan oleh *force field*, yaitu fungsi yang mendefinisikan gaya-gaya yang bekerja pada suatu atom individual pada keadaan energi rendah (kesetimbangan termal) (Ponder dan Case, 2003). Ada dua kelompok interaksi yang dapat memberikan pengaruh terhadap energi potensial, yaitu interaksi internal dan eksternal. Interaksi internal didefinisikan sebagai interaksi kovalen antar atom yang disebut sebagai interaksi ikatan (*bonded interaction*), meliputi uluran ikatan (*bonded stretching*) yaitu interaksi kovalen antara dua atom pada jarak kesetimbangan tertentu, sudut ikatan dan sudut dihedral. Pada simulasi dinamika molekul, ikatan kovalen didefinisikan sebagai pegas dengan pergerakan harmonis (Becker, 2001) Sedangkan interaksi eksternal mengekspresikan interaksi non-kovalen dan non-ikatan. Interaksi non-ikatan mempresentasikan interaksi fleksibel diantara pasangan atom atau partikel. Dua jenis interaksi non-ikatan paling umum yang dapat mengakibatkan perubahan energi potensial adalah interaksi elektrostatik (*potential Coulomb*) dan interaksi van der Waals (*potential Lennard-Jones*) (Becker, et.al.,2001).

## 2.6.2. Parameter Simulasi

### 2.6.2.1. Sistem Pelarut Protein (Solvasi)

Proses solvasi atau pelarutan biomolekul dilakukan pada enzim yang akan disimulasikan bertujuan agar proses simulasi mendekati sistem nyata. Dua jenis sistem solvasi yang biasa digunakan yaitu sistem implisit dan eksplisit. Pada sistem solvasi implisit, molekul pelarut hanya berperan sebagai medium dan tidak terlalu terlibat dalam suatu proses simulasi. Pada sistem ini pelarut dimodelkan dengan menggunakan pelarut kontinyu (*continuum solvent model*).

Pada sistem solvasi eksplisit, molekul enzim secara nyata dikelilingi oleh molekul air. Untuk mensimulasikan keadaan tersebut, maka proses simulasi akan melibatkan jumlah atom yang tidak sedikit, sekitar  $10^3 - 10^5$  bahkan lebih. Sistem tunggal dengan dengan partikel atom sebanyak ini akan merasakan pengaruh lingkungan. Karena itu, hampir keseluruhan simulasi dilakukan dengan menerapkan kondisi batasan berkala (*periodic boundary condition/PBC*). Hal ini dapat dijelaskan sebagai berikut, proses simulasi dilakukan dalam suatu kotak komputasi, kotak tersebut secara virtual akan dikelilingi oleh kotak-kotak replika dengan ukuran yang sama. Hanya satu kotak saja yang akan disimulasikan, dinamakan kotak pusat, kotak-kotak yang lain akan memiliki tingkah laku yang sama. Dengan diterapkannya kondisi batasan berkala, partikel-partikel dapat secara bebas berpindah dari satu kotak ke kotak lainnya (Leeuw et.al., 1980).

### 2.6.2.2. Parameter Temperatur dan Tekanan

Selain mengatur parameter solvasi, ditentukan pula parameter temperatur dan tekanan ke dalam sistem yang akan disimulasikan sehingga mendekati keadaan nyata. Sebagian besar pengukuran eksperimen dilakukan pada tekanan dan temperatur tetap, maka kondisi simulasi juga akan dilakukan pada kondisi tekanan dan temperatur tetap, sehingga pengaturan tekanan dan temperatur simulasi pada kondisi isotherm-isobar akan lebih relevan dengan data eksperimen. Kondisi ini diisyaratkan dengan mempertahankan secara tetap hubungan antara jumlah atom atau partikel  $N$ , tekanan  $P$ , dan temperatur  $T$ , disebut sebagai NPT ansambel. Sedangkan kondisi lainnya dibuat volume sistem menjadi tetap

(volume V tetap) disebut sebagai NVT atau kanonikel ansambel (Becker et al., 2001).

### 2.6.2.3. Minimisasi

Setelah parameter sistem simulasi disesuaikan mendekati keadaan nyata, dilakukan pula proses minimisasi sehingga posisi geometri atom yang sesuai dapat dikembalikan sedemikian rupa untuk menghasilkan energi potensial terendah bagi sistem. Hal ini dilakukan karena biasanya koordinat awal suatu molekul umumnya diperoleh dari hasil kristalografi sinar-X ataupun permodelan struktur 3D, yang terkadang jarak antar satu atom dengan atom lainnya sangat dekat atau bahkan sangat jauh dari posisi keseimbangan. Ketidaksesuaian geometri ini menyebabkan terjadinya interaksi yang tidak sesuai (*bad van der Waals contact*) maupun efek-efek sterik berenergi tinggi yang mengakibatkan pada saat disimulasikan sistem menjadi tidak stabil.

Berdasarkan tinjauan entropi, energi potensial permukaan enzim atau protein memiliki banyak sekali daerah minimum lokal (*local minima*), sehingga proses minimisasi energi untuk mencari minimum global (*global minima*) merupakan suatu proses yang tidak sederhana. Beberapa algoritma minimisasi telah dikembangkan untuk mencari posisi geometri atom yang paling sesuai dengan tingkat energi terendah. Proses melokalisasi minimum global merupakan proses yang rumit, sehingga pengembangan algoritma minimisasi hingga saat ini hanya diarahkan pada pencarian minimum lokal terdekat. Secara umum terdapat 2 jenis algoritma minimisasi, yaitu (i) algoritma yang tidak melibatkan proses derivatif disebut algoritma orde ke 0, dan (ii) algoritma yang melibatkan proses derivatif, terdiri atas algoritma orde pertama dan orde kedua, algoritma orde pertama seperti metode *steepest descent* (SD) dan *conjugate gradient* (CG), algoritma orde kedua seperti metode Newton Raphson. Metode algoritma minimisasi yang paling banyak dipergunakan dalam simulasi biomolekul adalah metode SD dan CG. Keduanya merupakan algoritma minimisasi untuk mencari minimum lokal (Becker, et.al.,2001).

#### 2.6.2.4. *Position Restraints*

*Position restraint* digunakan untuk mengekang (*restraint*) partikel pada posisi referensinya (van der Spoel et al., 2010). Kekangan yang diberikan pada suatu sistem, berupa suatu potensial yang diberikan oleh persamaan tertentu untuk membatasi pergerakan sistem. Tujuan pemberian kekangan adalah untuk menghindari pergerakan yang berpotensi merusak sistem, atau untuk mempelajari fenomena tertentu dari suatu eksperimen. Simulasi singkat dengan *position restraint* seringkali diterapkan pada molekul protein yang terlarut secara eksplisit setelah proses minimisasi struktur protein dilakukan. Tahapan ini berfungsi untuk membatasi pergerakan protein selama molekul pelarut bergerak untuk mencapai kesetimbangan, sehingga seringkali disebut sebagai tahapan minimisasi molekul pelarut.

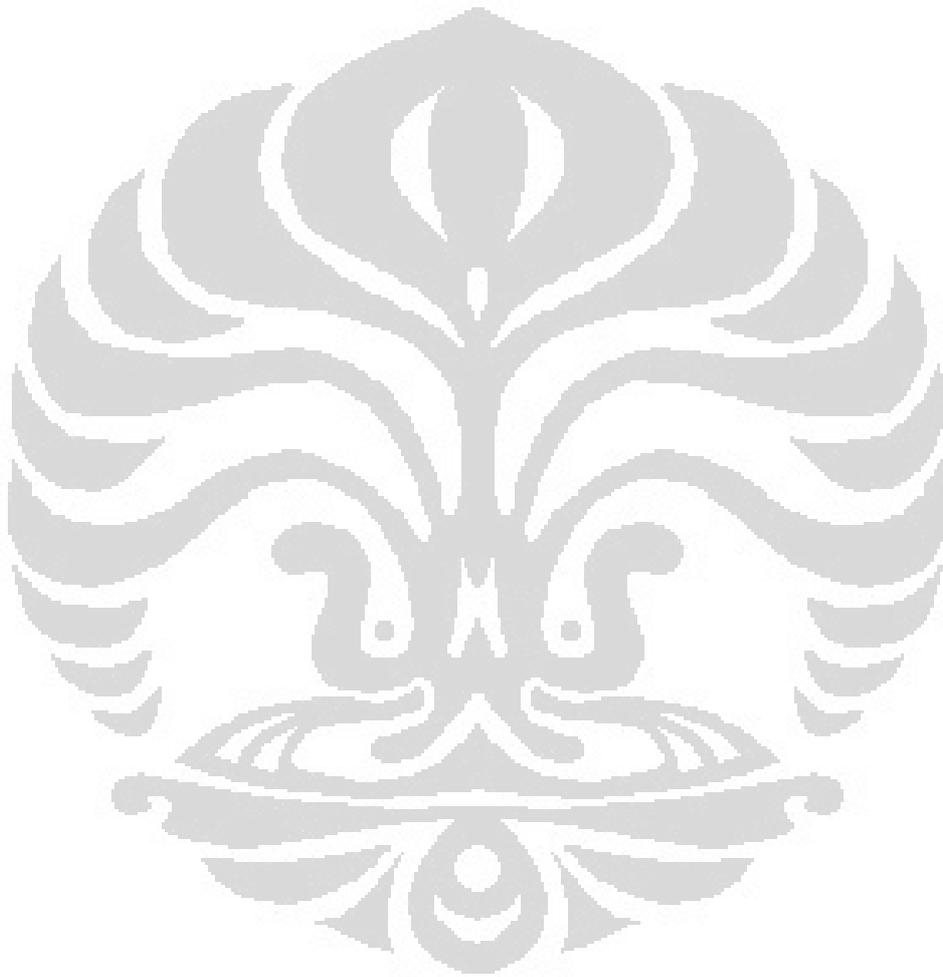
#### 2.6.2.5. **Simulasi Produksi**

Simulasi produksi adalah simulasi yang dilakukan dengan tujuan pengambilan sampel konformasi untuk tujuan pengamatan fenomena-fenomena pada eksperimen yang dilakukan. Simulasi produksi biasanya dilakukan dalam tiga tahapan, yaitu pemanasan (*heating*), ekuilibrase, dan produksi (Becker et al., 2001). Pemanasan dilakukan pada sistem dengan menaikkan suhu sistem secara perlahan mulai dari suhu yang rendah hingga suhu yang diinginkan. Suhu pada simulasi dinamika molekul diberikan oleh energi kinetik atomik berdasarkan persamaan distribusi Maxwell (Becker, 2001). Penetapan sistem pada suhu tertentu secara langsung akan berpotensi menghasilkan sistem yang tidak stabil, sehingga proses pemberian suhu tertentu pada sistem simulasi perlu dilakukan secara perlahan lewat proses pemanasan.

Ekuilibrase adalah simulasi yang dilakukan dengan waktu lebih lama setelah tahapan pemanasan. Tujuan dari ekuilibrase adalah untuk memastikan kestabilan simulasi dan memastikan sistem sudah tidak berfluktuasi secara drastis (Becker, 2001). Lama simulasi yang dilakukan berkisar antara puluhan hingga ratusan pikosekon.

Tahapan simulasi produksi adalah tahapan dimana data-data simulasi, terutama trajektori, mulai dapat disimpan dengan anggapan bahwa sistem simulasi

telah mencapai kesetimbangan setelah tahapan ekuilibrasi (Becker, 2001). Lama simulasi yang dilakukan sangat tergantung dari fenomena yang ingin diamati serta ketersediaan sumber daya komputasi.



## BAB 3 METODOLOGI

### 3.1. Metodologi

Pada penelitian ini dilakukan perancangan mutan *Candida antarctica* lipase B (CALB) dengan menambahkan ikatan disulfida pada enzim untuk mendapatkan enzim yang lebih termostabil melalui mutasi sepasang asam residu asam amino menjadi sistein. Prediksi pasangan residu yang dapat dimutasi menjadi sistein dilakukan dengan perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>”. Pemilihan residu yang dimutasi didasarkan pada hasil analisis perubahan fleksibilitas CALB pada kenaikan suhu yang dilakukan dengan metode simulasi dinamika molekul.

Enzim mutan yang didapat kemudian diuji kestabilannya terhadap suhu dengan melakukan simulasi dinamika molekul. Termostabilitas enzim mutan terhadap enzim *wild type* dibandingkan dengan mengamati kestabilan struktur antara keduanya. Parameter-parameter yang menunjukkan perubahan struktur seperti RMSD, SASA, jari-jari girasi (Rg), dan struktur sekunder hasil simulasi enzim mutan kemudian dibandingkan dengan enzim sebelum mutasi (*wild type*).

### 3.2. Alat dan Perangkat Lunak

Simulasi dinamika molekul pada penelitian ini dilakukan pada satu set komputer personal dengan prosesor Intel Core<sup>TM</sup> 2 Duo 2,93 GHz, 2 Gb RAM. Perangkat lunak yang digunakan untuk proses simulasi adalah paket GROMACS 4.5.4 (Groningen Machine for Chemical Simulations) (van der Spoel et al., 2005; Hess et al., 2008) yang dijalankan pada sistem operasi Ubuntu 10.04 LTS. Visualisasi dan analisis hasil simulasi dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak VMD 1.9 (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey et al., 1996). Pencarian pasangan residu pada CALB yang dapat dimutasi menjadi sistein untuk membentuk ikatan disulfida akan dilakukan dengan perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” (Dombkowski, 2003).

### 3.3. Cara Kerja

#### 3.3.1. Preparasi Sistem Simulasi

Struktur kristal lipase B *Candida antarctica* (kode PDB: 1TCA; Uppenberg et al., 1994) yang digunakan pada simulasi didapat dari bank data Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) (Berman et al., 2000). Penentuan struktur kristal 1TCA dilakukan dengan metode difraksi sinar-X dan memiliki resolusi 1,55 Å. Molekul-molekul air dan N-asetil-D-glukosamin yang terdapat dalam struktur kristal dihilangkan terlebih dahulu. Untuk simulasi pada paket GROMACS, struktur enzim dalam bentuk file *pdb* (\*.pdb) dikonversi menjadi bentuk topologi GROMACS (\*.gro) dengan program *pdb2gmx* yang terdapat pada paket GROMACS. Program *pdb2gmx* juga menambahkan atom hidrogen pada struktur kristal yang sebelumnya tidak ada terdapat pada file yang diunduh dari bank data. *Force field* yang digunakan untuk mendefinisikan energi potensial struktur kristal adalah AMBER99 (Wang et al., 2000). Molekul air yang dipilih sebagai pelarut eksplisit (solvasi) pada sistem simulasi adalah model molekul air TIP3P (Jorgensen et al., 1983).

Struktur kristal enzim disiapkan dalam suatu kotak dodekahedron yang cocok untuk digunakan pada simulasi molekul sferik dalam lingkungan pelarut. Pengaturan jenis dan besar kotak dilakukan dengan program *editconf* yang terdapat pada paket GROMACS. Jarak dari sisi kotak ke struktur enzim diatur sebesar 1,0 nm, sehingga dihasilkan total volume kotak sebesar 350,77 nm<sup>3</sup>. Penambahan molekul air secara eksplisit dilakukan sebagai pendekatan terhadap keadaan molekul dalam pelarut, dimana interaksi dengan molekul pelarut ikut mempengaruhi konformasi molekul. Program *genbox* yang terdapat pada paket GROMACS digunakan untuk menambahkan molekul air pada kotak yang sudah disiapkan sebelumnya. Secara total, jumlah molekul air yang ditambahkan pada kotak adalah 10285 molekul air. Total muatan sistem enzim-pelarut di dalam kotak dodekahedron adalah -1. Untuk menetralkan total muatan sistem, satu ion Na<sup>+</sup> ditambahkan untuk mengganti satu molekul air. Program *genion* pada paket

GROMACS digunakan untuk mengganti secara acak (random) 1 molekul air dengan 1 ion  $\text{Na}^+$ . Setelah penambahan ion  $\text{Na}^+$ , keseluruhan sistem dalam kotak dodekahedron adalah 1 molekul protein (enzim), 10284 molekul air TIP3P, dan 1 ion  $\text{Na}^+$ .

Setelah preparasi sistem simulasi, kemudian dilakukan minimisasi pada sistem. dalam dua tahap. Pada tahap pertama, dilakukan minimisasi dengan menggunakan algoritma *steepest descent* (SD) sebanyak 1000 tahap dengan parameter sebagai berikut dalam suatu file *mdp* (\*.mdp):

```
nstlog           = 5000
integrator       = steep
nsteps          = 1000
emstep          = 0.01
ns_type         = grid
rlist           = 1
coulombtype     = PME
fourierspacing  = 0.15
pme_order       = 4
rcoulomb_switch = 0
rcoulomb        = 1.0
vdwtype         = Cut-off
rvdw_switch     = 0
rvdw           = 1.0
tcoupl          = no
pcoupl          = no
gen_vel         = no
```

Minimisasi tahap kedua dilakukan dengan menggunakan algoritma *conjugate gradient* (CG) sebanyak 1000 tahap dengan parameter sebagai berikut:

```
nstlog           = 5000
integrator       = cg
nsteps          = 1000
emstep          = 0.01
ns_type         = grid
rlist           = 1
coulombtype     = PME
fourierspacing  = 0.15
pme_order       = 4
rcoulomb_switch = 0
rcoulomb        = 1.0
vdwtype         = Cut-off
rvdw_switch     = 0
rvdw           = 1.0
tcoupl          = no
pcoupl          = no
gen_vel         = no
```

Setelah minimisasi, dilakukan tahap ekuilibrasi molekul air lewat simulasi singkat selama selama 10 ps ( $10 \times 10^{-12}$  sekon) dengan *time step* 0,002 ps.. Selama

simulasi, molekul air dibiarkan bebas bergerak, sedangkan molekul protein dikekang (*position restraint*) untuk menjaga struktur protein agar tidak berubah dari struktur awal. Simulasi dilakukan dengan NVT *ensemble* (*constant number, volume and temperature*) pada 300 K dimana sistem dikopling terhadap termostat *velocity rescaling* pada konstanta kopling 0,1 (Bussi et al., 2007). Metode *periodic boundary condition* digunakan pada ekuilibrasi molekul air dan semua simulasi selanjutnya. Interaksi elektrostatik sistem dihitung dengan metode *particle mesh Ewald* (PME) (Darden et al., 1993; Essmann et al., 1995) dengan jari-jari *cut-off* sebesar 1,0 nm. Untuk penghitungan interaksi van der Waals, digunakan model energi potensial Lennard-Jones dengan jari-jari *cut-off* sebesar 1,0 nm. Struktur akhir setelah ekuilibrasi molekul air ini digunakan pada tahap simulasi selanjutnya. Parameter tahap ekuilibrasi air adalah sebagai berikut:

```
define = -DPOSRES
constraints = all-bonds
integrator = md
dt = 0.002
nsteps = 5000
nstcomm = 100
nstxout = 100
nstvout = 1000
nstfout = 0
nstlog = 10
nstenergy = 100
nstlist = 10
ns_type = grid
rlist = 1.0
rcoulomb = 1.0
rvdw = 1.0
coulombtype = PME
fourierspacing = 0.15
pme_order = 4
vdwtype = Cut-off
Tcoupl = v-rescale
tc-grps = Protein SOL NA
tau_t = 0.1 0.1 0.1
ref_t = 300 300 300
energygrps = Protein SOL
Pcoupl = no
tau_p = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p = 1.0
gen_vel = yes
gen_temp = 300.0
gen_seed = 173529
```

### 3.3.2. Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dilakukan dengan NVT *ensemble* (*constant number, volume and temperature*) pada suhu simulasi yang diinginkan dimana sistem dikopling terhadap termostat *velocity rescaling* (Bussi et al., 2007). Algoritma LINCS (Hess et al., 1997) digunakan pada sistem untuk mengekang (*constraint*) semua ikatan yang mengandung atom hidrogen. *Time step* yang digunakan untuk tiap simulasi adalah 0,002 ps. Metode *periodic boundary condition* digunakan untuk mengurangi efek sudut sehingga mendekati kondisi sebenarnya dimana interaksi antara molekul protein satu dengan molekul protein tetangganya ikut diperhitungkan. Interaksi elektrostatik sistem dihitung dengan metode *particle mesh Ewald* (PME) (Darden et al., 1993; Essmann et al., 1995) dengan jari-jari *cut-off* sebesar 1,0 nm. Untuk penghitungan interaksi van der Waals, digunakan model energi potensial Lennard-Jones dengan jari-jari *cut-off* sebesar 1,0 nm. Dalam satu simulasi pada suhu tertentu, tahapan yang dilakukan adalah pemanasan (*heating*) sistem selama 10 ps, dilanjutkan dengan ekuilibrasi selama 100 ps, dan produksi simulasi selama 6000 ps. Tahapan minimisasi, pemanasan, ekuilibrasi, dan simulasi produksi dilakukan dengan menggunakan program *mdrun* pada paket GROMACS. Kecepatan komputasi untuk tahapan simulasi berkisar antara 2,3-2,4 ns/hari, sehingga simulasi 6000-8000 ps akan memakan waktu *real-time* selama kurang lebih 3-4 hari.

Parameter tahapan pemanasan adalah sebagai berikut:

```

constraints          = hbonds
constraint_algorithm = LINCS
integrator           = md
dt                   = 0.002
nsteps               = 5000
nstcomm              = 10
nstxout              = 500
nstvout              = 500
nstfout              = 0
nstlog               = 1000
nstenergy            = 100
nstlist              = 10
ns_type              = grid
rlist                 = 1.0
rcoulomb              = 1.0
rvdw                  = 1.0
coulombtype          = PME
fourierspacing       = 0.15
pme_order             = 4

```

```

vdwtype           = cutoff
Tcoupl            = v-rescale
tc-grps           = Protein SOL NA
tau_t             = 0.1      0.1  0.1
ref_t             = 450      450  450
energygrps        = Protein SOL
Pcoupl            = no
gen_vel           = no
continuation      = yes

```

Parameter tahapan ekuilibrasi adalah sebagai berikut:

```

constraints        = hbonds
constraint_algorithm = LINCS
integrator         = md
dt                 = 0.002
nsteps             = 50000
nstcomm           = 10
nstxout           = 1000
nstvout           = 1000
nstfout           = 0
nstlog            = 5000
nstenergy         = 1000
nstlist           = 10
ns_type           = grid
rlist             = 1.0
rcoulomb          = 1.0
rvdw              = 1.0
coulombtype       = PME
fourierspacing    = 0.15
pme_order         = 4
vdwtype           = cutoff
Tcoupl            = v-rescale
tc-grps           = Protein SOL NA
tau_t             = 0.1      0.1  0.1
ref_t             = 450      450  450
energygrps        = Protein SOL
Pcoupl            = no
gen_vel           = no
continuation      = yes

```

Parameter tahapan simulasi produksi adalah sebagai berikut:

```

constraints        = hbonds
constraint_algorithm = LINCS
integrator         = md
dt                 = 0.002
nsteps             = 3000000
nstcomm           = 10
nstxout           = 1000
nstvout           = 1000
nstfout           = 0
nstlog            = 200
nstenergy         = 200
nstlist           = 10
ns_type           = grid
rlist             = 1.0

```

```

rcoulomb           = 1.0
rvdw               = 1.0
coulombtype        = PME
fourierspacing     = 0.15
pme_order          = 4
vdwtype            = cutoff
Tcoupl             = v-rescale
tc-grps            = Protein SOL NA
tau_t              = 0.1      0.1  0.1
ref_t              = 450      450  450
energygrps         = Protein SOL
Pcoupl             = no
gen_vel            = no
continuation       = yes

```

### 3.3.3. Analisis Simulasi Dinamika Molekul

Enzim CALB dianalisis kestabilan dan fleksibilitasnya dengan simulasi dinamika molekul pada beberapa suhu simulasi. Tahapan ini dilakukan untuk mengetahui fleksibilitas enzim dan perubahan struktur yang terjadi. Parameter-parameter yang dianalisis antara lain adalah RMSD, RMSF, *solvent accessible surface area* (SASA), struktur sekunder, dan trajektori.

#### 3.3.3.1. RMSD

*Root mean-square deviation* (RMSD) adalah rerata simpangan (*deviation*) posisi atom-atom selama waktu simulasi yang dibandingkan terhadap satu struktur pembanding (van der Spoel et al., 2010). Penghitungan RMSD dilakukan terhadap keseluruhan protein dengan terlebih dahulu melakukan penyesuaian *least-square* (*least-square fitting*) terhadap atom-atom tulang punggung (*backbone*), yaitu atom-atom yang terlibat dalam ikatan peptida ditambah atom C- $\alpha$  pada protein. Nilai RMSD dihitung dengan program *g\_rms* yang terdapat pada paket GROMACS yang menggunakan persamaan berikut (van der Spoel, 2010):

$$RMSD_{(t_1,t_2)} = \left[ \frac{1}{M} \sum m_i \|\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2)\|^2 \right]^{1/2}$$

Dimana  $M = \sum_{i=1}^N m_i$  dan  $\mathbf{r}_i(t)$  adalah posisi atom  $i$  pada waktu  $t$ . Struktur pembanding adalah struktur awal simulasi, yaitu pada  $t_2 = 0$ .

### 3.3.3.2. RMSF

Nilai RMSF (*root mean-square fluctuation*) adalah rerata fluktuasi posisi atom dalam suatu trajektori simulasi yang dibandingkan terhadap satu struktur pembanding. Penghitungan RMSF dilakukan terhadap perubahan posisi atom-atom C- $\alpha$  pada protein selama simulasi. Penentuan nilai RMSF dilakukan dengan program *g\_rmsf* yang terdapat pada paket GROMACS.

### 3.3.3.3. Ikatan Hidrogen

Analisis ikatan hidrogen intramolekul antara atom-atom protein dilakukan dengan program *g\_hbond* yang terdapat pada paket GROMACS. Program ini melakukan analisis terhadap semua kemungkinan donor dan akseptor hidrogen dengan menggunakan kriteria panjang ikatan hidrogen,  $r_{HB} \leq 0,35$  nm; dan sudut ikatan hidrogen,  $\alpha_{HB} \leq 30^\circ$  (van der Spoel et al., 2010).

### 3.3.3.4. Solvent Accessible Surface Area

Analisis *solvent accessible surface area* (SASA) digunakan untuk menentukan luas permukaan molekul protein yang dapat diakses oleh pelarut, dan dapat menggambarkan kekompakan (*compactness*) serta kepadatan/densitas molekul. Penentuan SASA dilakukan dengan program *g\_sas* yang terdapat pada paket GROMACS dengan menggunakan algoritma *double cubic lattice method* (Eisenhaber et al., 1995). Luas permukaan ditentukan dengan menggunakan suatu bola pelacak (*spherical probe*) sebagai model pelarut yang akan melacak permukaan van der Waals protein. Besar bola pelacak menentukan SASA yang didapat, karena penentuan luas area menggunakan jarak yang dibentuk oleh pusat bola pelacak selama penelusuran permukaan protein. Jari-jari bola pelacak yang digunakan adalah 0,14 nm, sebagai model molekul air.

### 3.3.3.5. Jari-jari Girasi (R<sub>g</sub>)

Analisis jari-jari girasi (*radius of gyration*, R<sub>g</sub>) juga dapat digunakan untuk menggambarkan kekompakan (*compactness*) serta kepadatan/densitas molekul protein. Penentuan jari-jari girasi dilakukan dengan program *g\_gyrate* yang terdapat pada paket GROMACS dengan menggunakan persamaan berikut (van der Spoel et al., 2010):

$$R_g = \left( \frac{\sum_i |r_i|^2 m_i}{\sum_i m_i} \right)^2$$

Dimana  $m_i$  adalah massa atom  $i$ , dan  $r_i$  adalah posisi atom  $i$  terhadap pusat massa molekul.

### 3.3.3.6. Analisis Struktur Sekunder

Analisis struktur sekunder dilakukan untuk melihat perubahan struktur sekunder pada saat simulasi dengan menggunakan *plug-in* tambahan yang terdapat pada perangkat lunak VMD. Penentuan struktur sekunder didasarkan pada algoritma STRIDE (*Structural Identification*) (Frishman dan Argos, 1995).

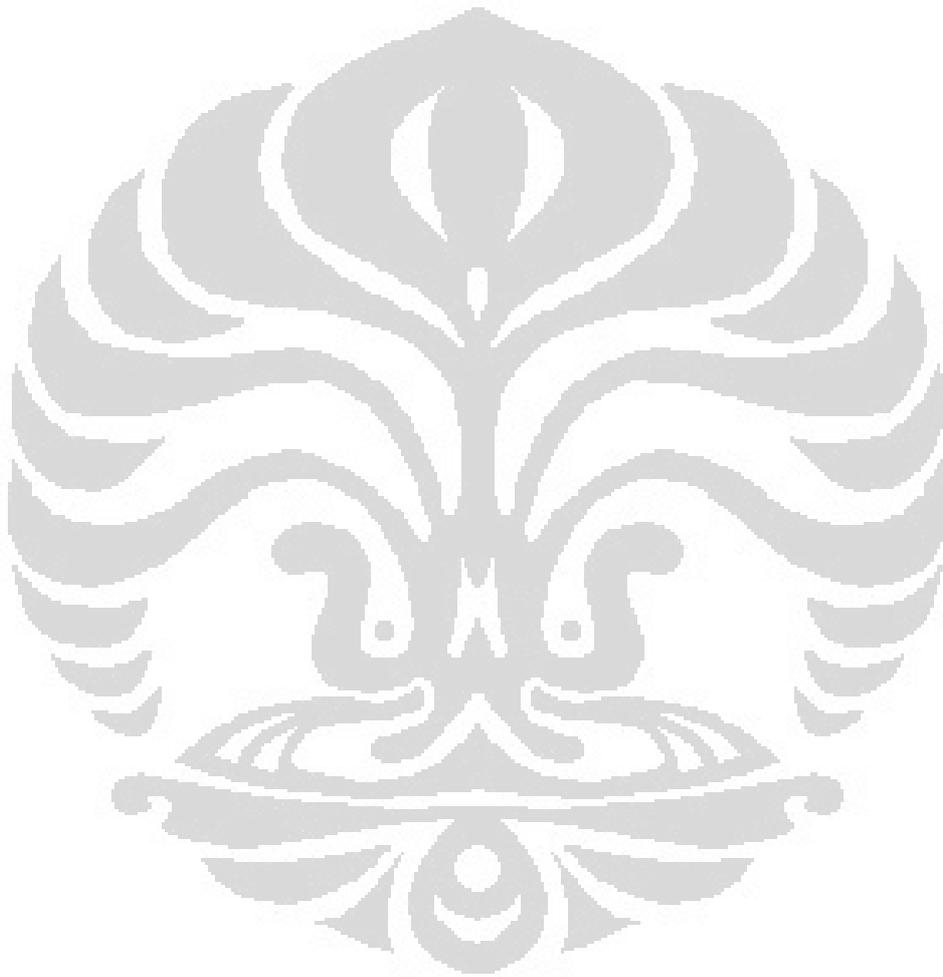
### 3.3.4. Prediksi Pasangan Residu yang akan Dimutasi Menjadi Sistein

Pasangan residu yang akan dapat dimutasi menjadi sistein pada CALB dicari dengan menggunakan perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” (Dombkowski, 2003). Masukan data yang diperlukan adalah struktur kristal CALB (PDB ID 1TCA). Kriteria yang digunakan adalah *Optimum Chi3-angle* =  $+100^\circ/-80^\circ$ , *tolerance*  $\pm 10^\circ$ ; dan *Ca-Cb-S-angle* =  $114,60$ , *tolerance*  $\pm 10^\circ$ . Keluaran dari perangkat lunak ini adalah beberapa pasangan residu yang dapat dimutasi menjadi sistein dan dapat membentuk ikatan disulfida berdasarkan kriteria geometrik (jarak dan sudut). Pembuatan struktur enzim mutan juga dilakukan dengan perangkat lunak ini dengan memilih mutasi yang diinginkan. Keluaran struktur mutan didapat dalam bentuk file pdb (\*.pdb)

### 3.3.5. Simulasi Dinamika Molekul Mutan CALB

CALB yang telah dimutasi (mutan) kemudian dianalisis kestabilannya pada suhu tertentu dengan metode simulasi dinamika molekul. Tahapan simulasi dinamika molekular CALB mutan sama seperti tahapan simulasi CALB *wild type*, yaitu pemanasan, ekuilibrasi, dan simulasi produksi. Parameter-parameter kondisi dan sistem simulasi yang digunakan juga sama seperti simulasi CALB *wild type*.

Kemudian dilakukan analisis terhadap trajektori simulasi dinamika molekul yang dihasilkan. Termostabilitas mutan dan *wild type* dibandingkan dengan melakukan analisis terhadap parameter-parameter perubahan struktur protein seperti RMSD, jari-jari girasi, SASA, dan struktur sekunder.



## BAB 4

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Simulasi CALB *Wild Type*

Dalam menentukan pasangan residu yang akan dimutasi menjadi sistein, dipelajari terlebih dahulu perubahan struktur protein yang terjadi pada kenaikan suhu, terutama untuk mengetahui daerah-daerah pada protein yang memiliki fleksibilitas tinggi. Pada penelitian ini, perubahan struktur CALB yang terjadi pada kenaikan suhu dipelajari dengan metode simulasi dinamika molekul. Strategi yang digunakan adalah melakukan simulasi dinamika molekul terhadap CALB pada suhu tinggi dan menganalisis perubahan-perubahan yang terjadi.

Perubahan struktur protein seperti proses *unfolding* pada suhu tinggi terjadi pada skala waktu dengan satuan mikrosekon hingga jam (Becker et al., 2001; Purmonen et al., 2007). Simulasi dinamika molekul yang dilakukan pada skala waktu tersebut akan sangat memakan waktu dan sumber daya komputasi. Penggunaan suhu tinggi dalam simulasi akan memberikan energi kinetik tambahan pada sistem, yaitu laju pergerakan molekul yang semakin besar, sehingga dalam waktu yang lebih singkat dan dengan tenaga komputasi yang lebih terjangkau, adanya batas energi antara keadaan *native* protein dengan keadaan *unfolding* dapat dilewati (Becker et al., 2001; Day et al., 2002, Buchner dan Kiefhaber, 2005). Perubahan struktur protein akan dipercepat dengan penggunaan suhu tinggi pada simulasi (Li dan Dagget, 1994). Simulasi yang dipercepat dengan suhu tinggi bahkan menunjukkan pola perubahan struktur protein (*unfolding pathway*) yang sama jika dibandingkan dengan simulasi pada suhu lebih rendah dan waktu yang lebih panjang (Day et al., 2002). Selain itu, simulasi dinamika molekul menggunakan prinsip fisika mekanik dimana ikatan kovalen diibaratkan sebagai pegas yang bergerak harmonis dan tidak melibatkan pergerakan elektron dalam perhitungan (fisika kuantum) (Becker et al., 2001). Dengan pendekatan ini, penggunaan suhu tinggi pada simulasi tidak menyebabkan terputusnya ikatan kimia.

Perubahan struktur dipelajari melalui analisis RMSD (*root means-square deviation*), RMSF (*root mean-square fluctuation*), ikatan hidrogen, jari-jari girasi, SASA (*solvent accessible surface area*), dan struktur sekunder. Pasangan residu yang akan dimutasi terutama dipilih berdasarkan fleksibilitas pergerakan residu selama simulasi, yang dipelajari dengan analisis RMSF. Sedangkan analisis ikatan hidrogen, jari-jari girasi, dan SASA digunakan untuk membandingkan karakteristik CALB *wild type* dengan CALB mutan secara kuantitatif.

#### 4.1.1. Validasi Metode Simulasi Dinamika Molekul

Seperti pada teknik percobaan lainnya, percobaan yang dilakukan dengan metode komputasi, simulasi, atau pemodelan dengan komputer perlu divalidasi. Validasi dilakukan agar dari percobaan yang dilakukan dapat diambil suatu kesimpulan yang baik dan sedekat mungkin mewakili fenomena yang ingin dipelajari. Validasi suatu model molekular, seperti simulasi dinamika molekul, dapat dilakukan dengan membandingkan data hasil simulasi dengan data eksperimental (van Gunsteren, 1998). Beberapa data simulasi yang dapat dibandingkan dengan data eksperimental antara lain adalah densitas, energi bebas pelarutan, viskositas, tegangan permukaan, dan *B-factors* dari penentuan kristalografi (van Gunsteren, 1998).

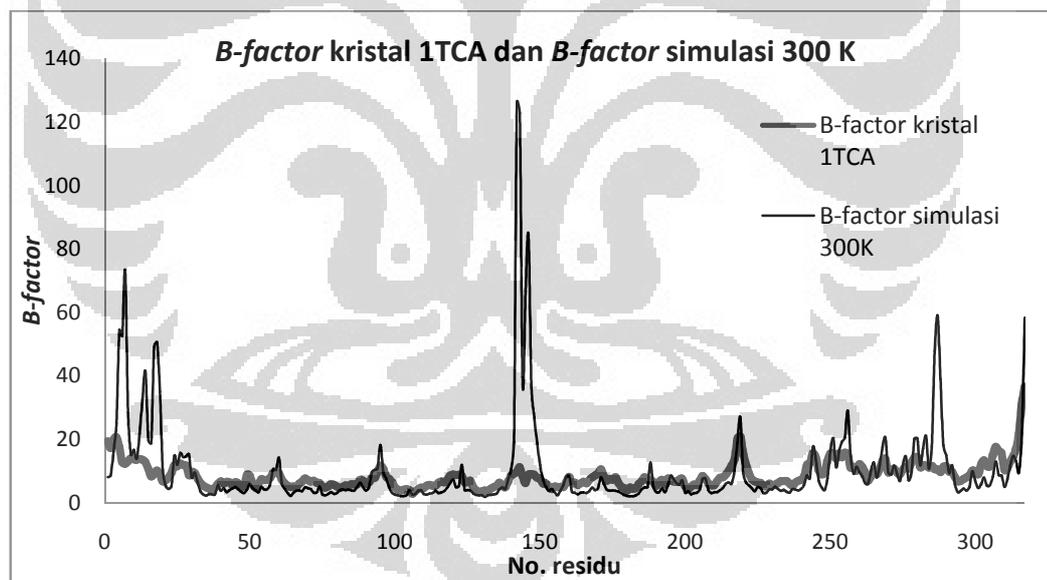
*B-factors* atau *atomic displacement values* (nilai pergeseran atomik) digunakan pada kristalografi untuk menggambarkan pergeseran kerapatan elektron suatu atom pada kristal (Parthasarathy et al., 2000). Koordinat tiap atom dalam suatu kristal protein pada file bank data (PDB) lebih menggambarkan koordinat kesetimbangan atau rata-rata, yang bukanlah koordinat pasti (rigid) dari molekul protein dikarenakan adanya perbedaan struktur antar molekul dalam kisi kristal. Pergeseran atom dari posisi kesetimbangan dapat diamati dari pergeseran kerapatan elektron yang terdapat pada bank data suatu kristal protein.

Validasi metode simulasi pada penelitian ini dilakukan dengan membandingkan *B-factors* simulasi dengan *B-factors* eksperimen yang didapat dari bank data. Untuk mendapatkan nilai *B-factors* simulasi, dapat digunakan data

RMSF (*root mean-square fluctuation*) hasil simulasi. RMSF adalah standar deviasi yang menggambarkan fluktuasi posisi atom dalam suatu trajektori simulasi dengan membandingkan terhadap struktur pembanding. RMSF dapat diubah menjadi *B-factors* dengan persamaan berikut (Kuzmanic dan Zagrovic, 2010):

$$RMSF_i^2 = \frac{3Bi}{8\pi^2}$$

RMSF yang digunakan adalah RMSF atom-atom C- $\alpha$  dari simulasi dinamika molekul pada suhu 300 K yang dihitung pada waktu simulasi 4000-6000 ps dengan struktur pembanding kristal 1TCA dari PDB. Hasil perbandingan menunjukkan bahwa *B-factors* simulasi dinamika molekul dan *B-factors* kristalografi tidak berbeda secara signifikan (**Gambar 4.1**). Keduanya memiliki nilai yang hampir sama, dan secara keseluruhan memiliki pola yang serupa.



**Gambar 4.1.** Perbandingan nilai *B-factors* kristal 1TCA dengan *B-factors* simulasi suhu 300 K.

Perbedaan nilai *B-factors* yang cukup besar dapat diamati pada residu-residu di daerah 4-9, 12-20, 141-150, dan 285-289. Pada daerah-daerah tersebut *B-factors* simulasi lebih besar dibanding *B-factors* kristalografi. Perbedaan ini masih dapat diterima karena adanya perbedaan kondisi protein pada simulasi dan

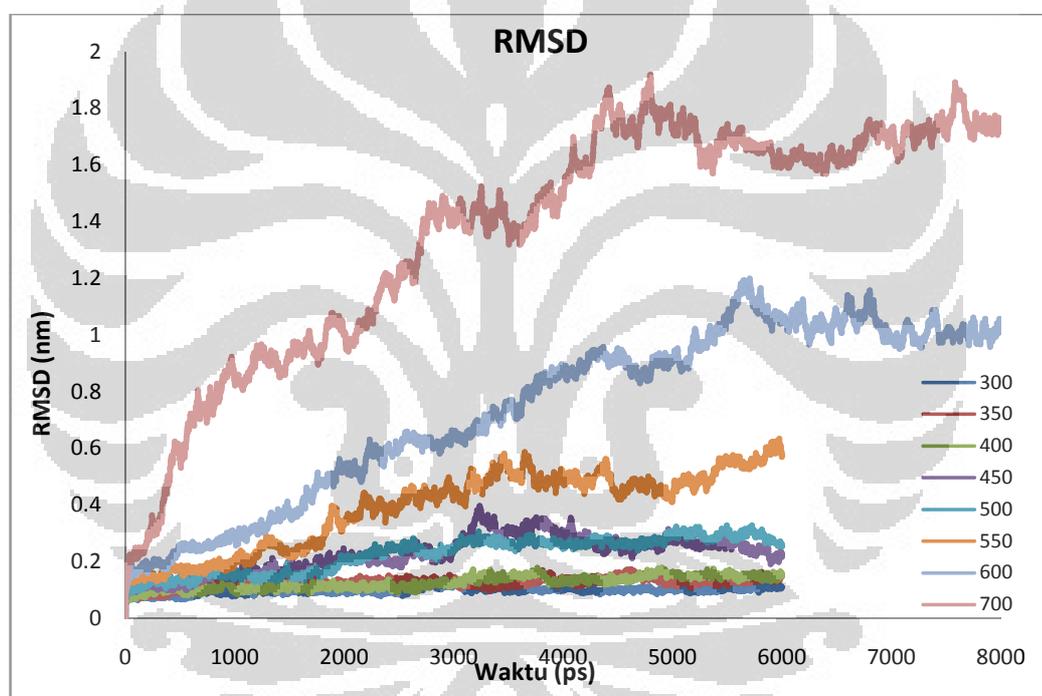
kristalografi. Pada sistem simulasi, protein berada dalam kondisi terlarut dalam air sehingga lebih fleksibel jika dibandingkan kondisi kristal yang rigid. CALB sendiri diketahui memiliki fleksibilitas yang tinggi dalam lingkungan pelarut air (Trodler dan Pleiss, 2008). Selain itu, perbedaan *B-factors* pada daerah 141-150 dan 285-289 dapat dihubungkan dengan terlibatnya beberapa residu di daerah tersebut dalam kantung pengikatan substrat yang nampaknya memang membutuhkan residu-residu yang fleksibel (Trodler dan Pleiss, 2008, Uppenberget al., 1994). Secara keseluruhan, model simulasi yang digunakan memiliki validitas yang baik untuk dapat digunakan sebagai model mewakili kondisi eksperimen yang diinginkan.

#### 4.1.2. Analisis RMSD

*Root mean-square deviation* (RMSD) adalah rerata simpangan (*deviation*) posisi atom-atom selama waktu simulasi yang dibandingkan terhadap satu struktur pembanding (van der Spoel et al., 2010). RMSD dapat digunakan untuk menggambarkan kesamaan antara dua struktur (Becker et al., 2001) dan mengamati terjadinya perubahan struktur protein secara global selama simulasi. Nilai RMSD yang makin besar merupakan indikasi makin banyaknya perbedaan antara dua struktur, sedangkan nilai nol menunjukkan dua struktur yang serupa. Selain itu, RMSD juga menggambarkan tercapainya kesetimbangan suatu sistem simulasi, yaitu ketika RMSD menunjukkan kecenderungan linear (Lyman dan Zuckerman, 2006).

Pada penelitian ini, penghitungan RMSD dilakukan terhadap keseluruhan protein dengan terlebih dahulu mensejajarkan dua struktur dengan melakukan *least-square* (*least-square fitting*) terhadap atom-atom tulang punggung (*backbone*) struktur pembanding. Pensejajaran ini dilakukan untuk memperkecil nilai deviasi. Nilai RMSD tiap-tiap *time step* simulasi dihitung sehingga didapatkan pergerakan RMSD selama waktu simulasi. Struktur pembanding yang digunakan adalah struktur awal simulasi pada  $t = 0$  ps (pikosekon).

**Gambar 4.2** menunjukkan RMSD simulasi pada semua variasi suhu yang dilakukan (300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, dan 700 K). Simulasi pada 300-400 K tidak menunjukkan perbedaan nilai RMSD yang signifikan. Nilai RMSD maksimal adalah 0,13; 0,17; dan 0,18 nm untuk suhu 300, 350, dan 400 K secara berurutan. RMSD pada ketiga suhu simulasi tersebut mengalami peningkatan pada awal simulasi dan mencapai linearitas pada 3000-6000 ps (akhir simulasi), dengan nilai RMSD yang berfluktuasi pada kisaran 0,1 nm. Ini menunjukkan bahwa pada ketiga suhu simulasi ini, kesetimbangan simulasi mulai tercapai di kisaran 4000-6000 ps dan struktur CALB mulai stabil pada rentang waktu tersebut.



**Gambar 4.2.** Nilai RMSD selama simulasi suhu 300-700 K.

Peningkatan RMSD secara signifikan mulai teramati pada suhu simulasi 450 K dan seterusnya. Nilai RMSD maksimal untuk simulasi 450, 500, dan 550 K adalah 0,39; 0,32; dan 0,64 nm. Simulasi suhu 450 dan 500 K mulai menunjukkan linearitas RMSD pada 4000-6000 ps, dengan nilai RMSD pada kisaran 0,2 nm. Pada suhu simulasi 550 K, nilai RMSD juga mencapai kesetimbangan di rentang 4000-6000 ps dengan nilai RMSD maksimal 0,64.

Simulasi pada suhu 600 dan 700 K menghasilkan nilai RMSD yang terus meningkat hingga 6000 ps. Untuk mendapatkan kesetimbangan simulasi dengan nilai RMSD yang linear, simulasi pada kedua suhu ini diperpanjang hingga 8000 ps. Perpanjangan waktu simulasi ini memberikan nilai RMSD yang linear di rentang 6000-8000 ps.

Analisis RMSD pada simulasi yang dilakukan menggambarkan perubahan global yang terjadi pada struktur protein CALB selama simulasi dibandingkan dengan struktur awal simulasi. Peningkatan suhu simulasi menghasilkan nilai RMSD yang makin besar, dan menunjukkan semakin banyaknya perubahan yang terjadi pada struktur protein. Analisis kesetimbangan simulasi menggunakan nilai RMSD juga dapat digunakan untuk tujuan pengambilan sampel trajektori selanjutnya. Penentuan populasi sampel untuk kuantisasi dilakukan pada simulasi yang telah mencapai konvergensi, dimana sifat dinamika molekul dan sampel konformasi bisa digunakan untuk mewakili populasi (Smith et al., 2002). Pengambilan sampel trajektori untuk analisis parameter-parameter simulasi seperti energi dan konformasi, lebih baik dilakukan pada saat sistem sudah mengalami kesetimbangan. Kesetimbangan sistem, dalam hal ini kesetimbangan konformasi protein dapat diamati dari nilai RMSD yang sudah linear (Smith et al., 2002).

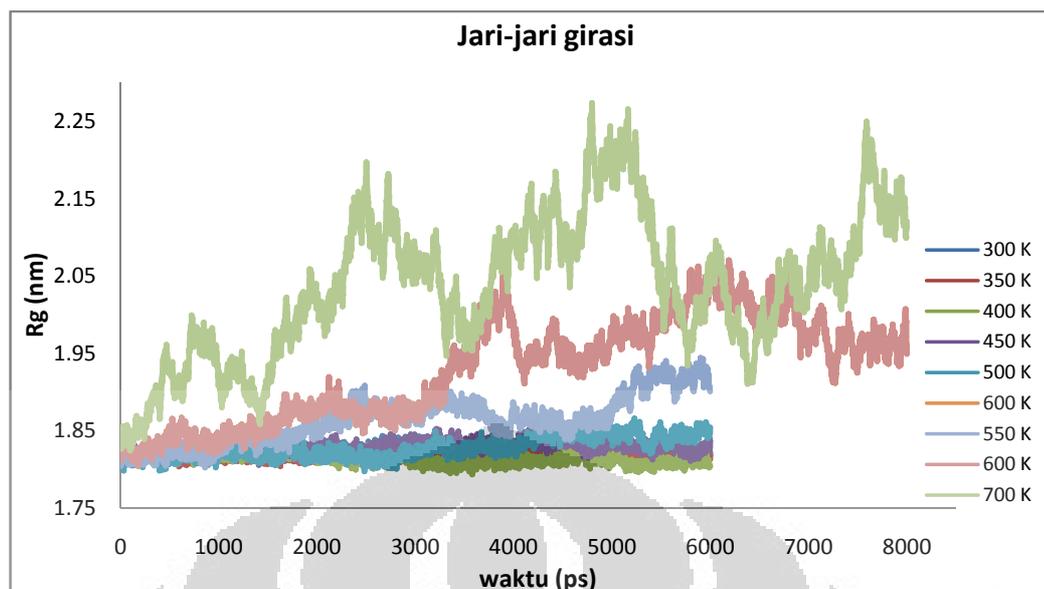
Simulasi pada suhu 300-550 K sudah mengalami kesetimbangan pada 2000 ps akhir simulasi (4000-6000 ps). Rentang waktu simulasi inilah yang untuk selanjutnya digunakan dalam pengambilan sampel trajektori simulasi. Sedangkan untuk simulasi 600-700 K, diperlukan penambahan waktu simulasi hingga 8000 ps untuk mencapai kesetimbangan konformasi protein dalam simulasi. Simulasi suhu 600 dan 700 K mencapai linearitas nilai RMSD pada rentang 6000-8000 ps. Untuk itu, pada suhu simulasi ini pengambilan sampel trajektori dilakukan pada rentang 6000-8000 ps.

#### **4.1.3. Analisis Jari-jari Girasi ( $R_g$ )**

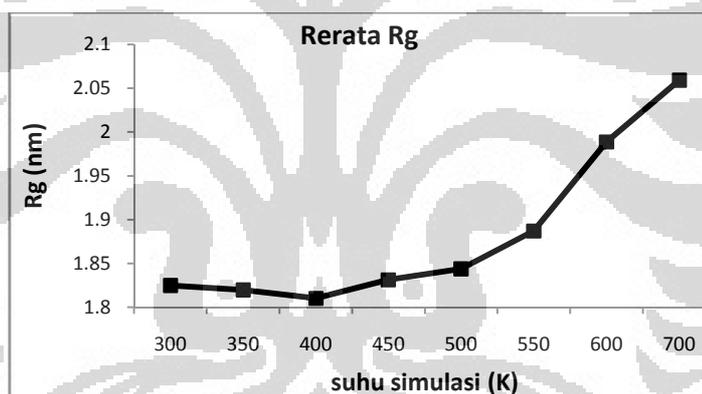
Analisis jari-jari girasi ( $R_g$ ) dilakukan untuk mengukur kekompakan (*compactness*) suatu molekul protein. Peningkatan nilai  $R_g$  pada suatu simulasi

menunjukkan struktur protein yang semakin membesar volumenya secara geometri (menempati bidang geometri yang lebih besar). Karena panjang rantai protein tetap sama, peningkatan volume ini menunjukkan semakin berkurangnya kerapatan molekul protein, atau makin berkurangnya kekompakan struktur. Dalam proses rusaknya (*unfolding*) struktur protein secara termal, molekul protein akan berekspansi dan mengalami peningkatan volume. Naiknya nilai Rg ketika terjadi proses *unfolding* dapat dikaitkan pula dengan berkurangnya ikatan hidrogen intramolekular yang menjaga kekompakan struktur protein (Zhao et al., 2009). Proses *unfolding* dapat dipelajari dengan melakukan analisis terhadap Rg selama simulasi (Zhao et al., 2009; Day et al., 2002; Li dan Dagget, 1994; Paschek et al., 2011).

Hasil analisis Rg menunjukkan bahwa tidak ada peningkatan nilai Rg yang signifikan sepanjang waktu simulasi pada simulasi suhu 300-450 K (**Gambar 4.3**). Pada simulasi tersebut, kenaikan suhu belum berpengaruh terhadap kekompakan struktur. Simulasi pada suhu 500 K mulai menunjukkan kenaikan nilai Rg, walaupun hanya ada perbedaan sebesar 4% antara nilai Rg minimal dengan nilai maksimal. Simulasi pada suhu 550-700 K menunjukkan kenaikan nilai Rg yang signifikan pada saat simulasi. Perbedaan nilai Rg minimal dengan nilai maksimal pada simulasi 550, 600, dan 700 K adalah 7, 10, dan 16% secara berurutan. Untuk semua suhu simulasi, pada 2000 ps terakhir waktu simulasi dapat diamati bahwa nilai Rg cenderung stabil. Nilai Rg pada rentang 2000 ps akhir simulasi kemudian digunakan sebagai sampel untuk menentukan rerata nilai Rg struktur akhir simulasi (**Gambar 4.4**). Rerata nilai Rg pada 2000 ps akhir simulasi menunjukkan bahwa terjadi lonjakan nilai Rg pada simulasi dimulai pada suhu 450 K. Lonjakan nilai Rg adalah indikasi bahwa struktur protein sudah mengarah pada konformasi *unfolded* (Seshasayee, 2005).



**Gambar 4.3.** Jari-jari girasi ( $R_g$ ) selama simulasi suhu 300-700 K.



Rerata nilai  $R_g$  ditentukan dengan mengambil sampel dari 2000 ps akhir simulasi.

**Gambar 4.4.** Rerata nilai jari-jari hirasi ( $R_g$ ) pada tiap suhu simulasi.

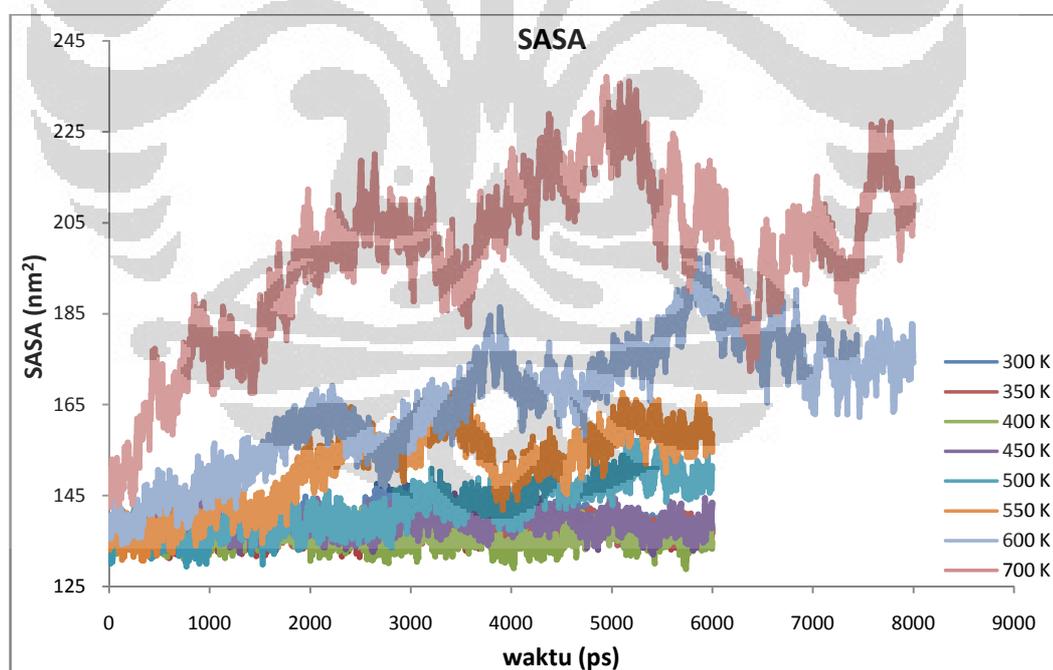
#### 4.1.4. Analisis SASA (*Solvent Accessible Surface Area*)

Selain jari-jari girasi, kekompakan suatu struktur protein juga dapat dipelajari dengan analisis *solvent accessible surface area* (SASA). SASA menghitung luas area permukaan protein yang dapat diakses oleh molekul pelarut, dan merupakan ukuran luas daerah protein yang terpapar terhadap molekul pelarut. Dalam suatu proses *unfolding* molekul protein, peningkatan nilai SASA secara perlahan terjadi karena molekul protein mulai berekspansi. Pada keadaan tersebut,

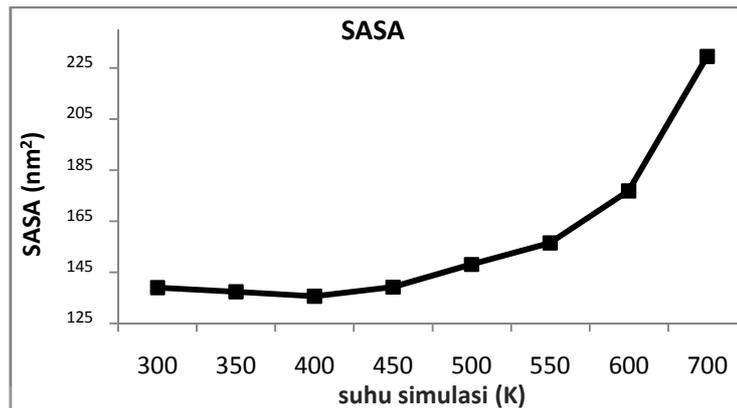
akan semakin banyak daerah pada protein yang terekspos pada molekul pelarut sehingga memperbesar luas permukaan.

Sepanjang simulasi pada suhu 300-450 K tidak teramati kenaikan nilai SASA total secara signifikan (**Gambar 4.5**). Pada suhu simulasi tersebut nilai SASA total berfluktuatif pada kisaran 140 nm<sup>2</sup>. Pada suhu simulasi 500-700 K, mulai terjadi kenaikan nilai SASA. Untuk semua suhu simulasi, 2000 ps terakhir waktu simulasi menunjukkan nilai SASA yang cenderung stabil. Nilai SASA pada rentang 2000 ps akhir simulasi kemudian digunakan sebagai sampel untuk menentukan rerata nilai SASA struktur akhir simulasi (**Gambar 4.6**).

Pengamatan terhadap rerata nilai SASA pada 2000 ps akhir simulasi menunjukkan bahwa terjadi lonjakan nilai yang dimulai pada suhu simulasi 500 K. Meningkatnya nilai SASA secara cepat akan terjadi ketika pusat hidrofobik dari molekul protein mulai rusak (*collapse*) akibat hilangnya interaksi penstabil, dan molekul pelarut mulai dapat memasuki bagian dalam (*interior*) protein (Day et al., 2002; Yan et al., 2010).



**Gambar 4.5.** Solvent accessible surface area (SASA) selama simulasi suhu 300-700 K.



Rerata nilai SASA ditentukan dengan mengambil sampel dari 2000 ps akhir simulasi.

**Gambar 4.6.** Rerata nilai SASA pada tiap suhu simulasi.

#### 4.1.5. Analisis Ikatan Hidrogen

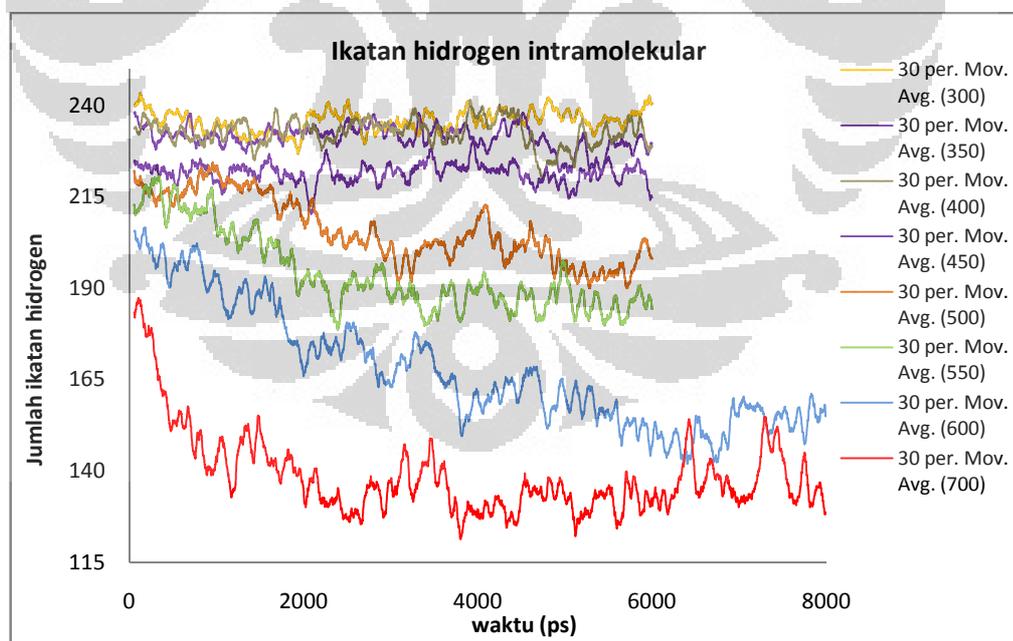
Ikatan hidrogen pada protein berperan penting dalam membentuk struktur protein, terutama struktur sekunder. Selain adanya pengaruh urutan asam amino, struktur sekunder protein seperti  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -sheet, dan  $\beta$ -turn juga ditentukan oleh pola ikatan hidrogen yang terjadi. Ikatan hidrogen intramolekular berperan dalam menjaga kestabilan protein dalam keadaan *native*. Walaupun energi ikatan hidrogen tergolong rendah, namun sama seperti interaksi van der Waals yang ada pada protein, akumulasi interaksi berperan dalam mempertahankan struktur *native* suatu protein.

Perubahan jumlah ikatan hidrogen dapat menjelaskan perubahan struktur yang terjadi selama simulasi pada suhu tinggi. Protein dalam keadaan *unfolding* tidak memiliki ikatan hidrogen intramolekular, dan ikatan hidrogen akan lebih banyak terjadi antara molekul protein dengan molekul pelarut (air) (Buchner dan Kiefhaber, 2005; Myers dan Pace, 1996). Analisis ikatan hidrogen yang dilakukan adalah ikatan hidrogen intramolekular (protein-protein) dan ikatan hidrogen antara protein dengan pelarut (air). Sedangkan kriteria yang digunakan dalam penentuan ikatan hidrogen adalah jarak dan sudut ikatan hidrogen. Oleh karena itu, berkurangnya ikatan hidrogen selama simulasi menunjukkan perubahan struktur,

terutama terjadinya perubahan jarak dan sudut atom-atom yang terlibat dalam ikatan hidrogen.

#### 4.1.5.1. Ikatan Hidrogen Intramolekular

Jumlah ikatan hidrogen intramolekular protein sepanjang waktu simulasi ditunjukkan pada **Gambar 4.7**. Grafik yang ditampilkan adalah grafik yang diperhalus dengan menghitung rerata jumlah ikatan hidrogen tiap 30 *time-step* simulasi. Dapat dilihat bahwa jumlah ikatan hidrogen berfluktuasi bahkan pada suhu simulasi yang rendah (300 K). Fluktuasi tersebut menunjukkan dinamika molekul protein yang terus bergerak. Ikatan hidrogen ditentukan dengan kriteria jarak dan sudut. Dengan kriteria ini, atom-atom non-hidrogen pada jarak  $\leq 0,35$  nm, sudut  $\leq 30^\circ$ , dan memiliki muatan parsial berlawanan dianggap terlibat dalam ikatan hidrogen (vab der Spoel et al., 2010; Kumar et al., 1999). Dengan kriteria jarak dan sudut ikatan yang digunakan dalam penentuan ikatan hidrogen, pergerakan konstan atom-atom molekul protein selama simulasi akan menghasilkan total ikatan hidrogen yang fluktuatif.



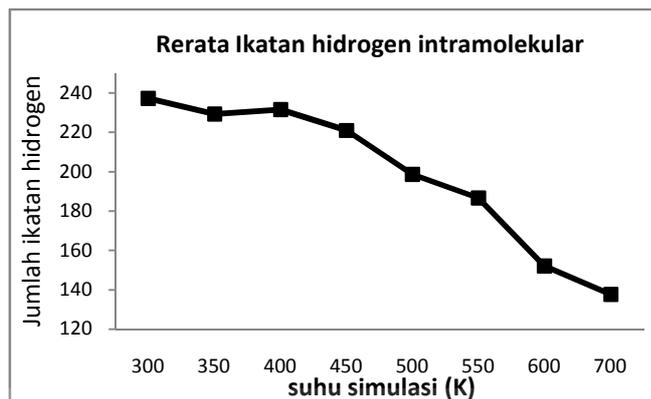
**Gambar 4.7.** Jumlah Ikatan hidrogen intramolekular selama simulasi suhu 300-700 K.

Jumlah ikatan hidrogen pada simulasi suhu 300, 350, dan 400 K tidak berbeda secara signifikan. Selain itu, tidak ada penurunan jumlah ikatan hidrogen intramolekular yang drastis sepanjang waktu simulasi (0-6000 ps). Simulasi pada suhu 450 K juga tidak menunjukkan penurunan jumlah ikatan hidrogen yang drastis selama simulasi, walaupun pada simulasi ini jumlah ikatan hidrogen mulai menurun dibandingkan simulasi pada suhu yang lebih rendah. Berkurangnya jumlah ikatan hidrogen secara signifikan mulai teramati pada suhu simulasi 500, 550, 600, dan 700 K. Jumlah ikatan hidrogen intramolekular menurun drastis pada awal simulasi (0-2000 ps), dan kemudian cenderung stabil hingga akhir simulasi.

Penurunan jumlah ikatan hidrogen mencapai 50 % sepanjang simulasi pada suhu 700 K (**Tabel 4.1**). Kenaikan temperatur simulasi juga menyebabkan naiknya persentasi perbedaan nilai maksimum dan minimum sepanjang simulasi. Jika dibandingkan antara jumlah ikatan hidrogen terbesar pada simulasi 300 K dengan jumlah ikatan hidrogen terendah pada simulasi 700 K, ada pengurangan jumlah ikatan hidrogen sebesar 60 %. Jumlah ikatan hidrogen intramolekular pada rentang 2000 ps akhir simulasi kemudian digunakan sebagai sampel untuk menentukan rerata jumlah ikatan hidrogen intramolekular struktur di akhir simulasi. Rerata jumlah ikatan hidrogen intramolekular pada 2000 ps terakhir dari masing-masing simulasi ditampilkan pada **Gambar 4.8**. Dapat diamati bahwa jumlah ikatan hidrogen intramolekular mengalami penurunan dengan meningkatnya suhu simulasi.

**Tabel 4.1.** Persentase penurunan jumlah ikatan hidrogen intramolekular tiap simulasi.

Suhu simulasi (K)	perbedaan nilai maksimum dan minimum pada simulasi (%)
300	18
350	19
400	20
450	25
500	25
550	32
600	47
700	51



Rerata jumlah ikatan hidrogen intramolekular ditentukan dengan mengambil sampel dari 2000 ps akhir simulasi.

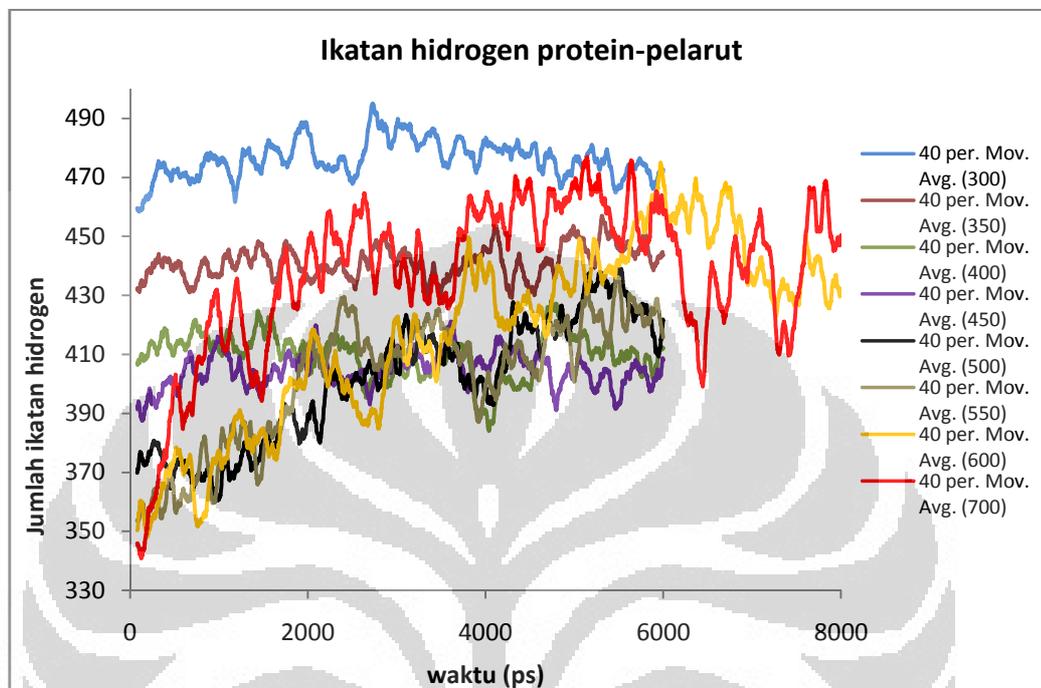
**Gambar 4.8.** Rerata jumlah ikatan hidrogen intramolekular pada tiap suhu simulasi.

#### 4.1.5.2. Ikatan Hidrogen Protein-Pelarut

Selain analisis ikatan hidrogen intramolekular, dilakukan juga analisis ikatan hidrogen yang terjadi antara pelarut (molekul air) dan molekul protein. Seperti dijelaskan sebelumnya, pada keadaan terdenaturasi (*unfolding*), protein kehilangan sebagian atau keseluruhan struktur sekundernya yang disebabkan hilangnya ikatan hidrogen intramolekular. Akan tetapi, jumlah atom-atom donor dan akseptor yang sebelumnya terlibat dalam ikatan hidrogen intramolekular tidak mengalami perubahan. Oleh sebab itu, interaksi atom-atom tersebut akan mengalami perubahan dengan semakin banyak membentuk ikatan hidrogen dengan molekul pelarut (air) (England dan Haran, 2011).

**Gambar 4.9** menunjukkan jumlah ikatan hidrogen antara atom-atom pada molekul protein dengan molekul pelarut (air) sepanjang simulasi. Pada simulasi suhu 300-400 K, tidak terjadi perubahan jumlah ikatan hidrogen protein-pelarut yang drastis. Bertambahnya ikatan hidrogen protein-pelarut secara signifikan terlihat pada simulasi suhu 600-700 K, yaitu terdapat perbedaan sebesar 67 % antara nilai maksimum dan nilai minimum pada simulasi 700 K (**Tabel 4.2**). Untuk simulasi suhu 500-700 K, ada kecenderungan peningkatan jumlah ikatan hidrogen protein-pelarut sepanjang waktu simulasi. Peningkatan ini menunjukkan bahwa sepanjang simulasi, struktur sekunder mulai mengalami kerusakan akibat

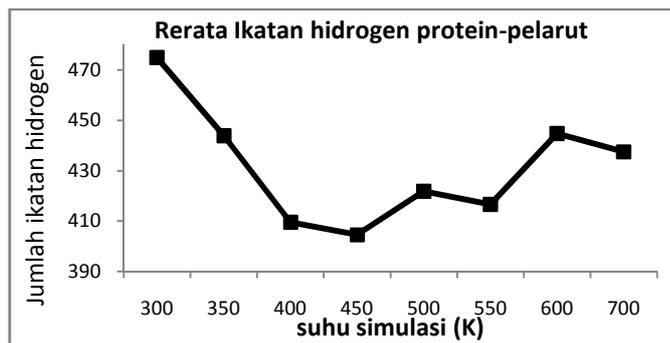
interaksi hidrogen intramolekular yang mulai berkurang sehingga dikompensasikan dengan bertambahnya ikatan hidrogen protein-pelarut.



**Gambar 4.9.** Jumlah Ikatan hidrogen antara protein-pelarut selama simulasi suhu 300-700 K.

**Tabel 4.2.** Persentase penurunan jumlah ikatan hidrogen antara protein-pelarut tiap simulasi.

Suhu simulasi (K)	perbedaan nilai maksimum dan minimum pada simulasi (%)
300	18
350	20
400	28
450	30
500	47
550	47
600	67
700	63



Rerata jumlah ikatan hidrogen antara protein-pelarut ditentukan dengan mengambil sampel dari 2000 ps akhir simulasi.

**Gambar 4.10.** Rerata jumlah ikatan hidrogen antara protein-pelarut pada tiap suhu simulasi.

Rerata jumlah ikatan hidrogen antara protein dengan pelarut pada rentang 2000 ps akhir simulasi ditampilkan pada **Gambar 4.10**. Ikatan hidrogen antara protein dengan pelarut tidak menunjukkan tren penurunan atau kenaikan yang konstan. Jumlah ikatan hidrogen protein dengan pelarut pada simulasi 350-450 K terus mengalami penurunan jika dibandingkan dengan jumlah pada simulasi 300 K. Jumlah ikatan hidrogen protein-pelarut kemudian mulai meningkat kembali pada simulasi suhu 500-600 K. Pada suhu simulasi 700 K terjadi sedikit penurunan rerata ikatan hidrogen pada 2000 ps akhir simulasi dibanding suhu simulasi 600 K, walaupun konformasi akhir simulasi 700 K memiliki jumlah ikatan hidrogen protein-pelarut yang lebih tinggi dibanding simulasi 600K.

Analisis ikatan hidrogen yang dilakukan memberi gambaran terjadinya perubahan struktur pada protein, terutama struktur sekundernya. Untuk simulasi pada suhu tinggi, jumlah ikatan hidrogen intramolekular protein mengalami penurunan dibanding jumlah pada awal simulasi. Hilangnya sebagian ikatan hidrogen intramolekular pada simulasi yang dilakukan menunjukkan hilang/rusaknya sebagian struktur sekunder protein. Karena ikatan hidrogen akan tergantung pada jarak antara atom donor dan akseptor, hilangnya ikatan hidrogen intramolekular menunjukkan terjadinya ekspansi molekul protein sebagai salah satu tahap dalam proses *unfolding* protein (Day et al., 2002; Li dan Dagget, 1994). Kompensasi dari hilangnya ikatan hidrogen intramolekular adalah terbentuknya ikatan hidrogen antara protein dengan pelarut. Ini juga ditunjukkan dari hasil

analisis simulasi, di mana terjadi peningkatan jumlah ikatan hidrogen protein-pelarut pada simulasi suhu tinggi. Terbentuknya ikatan hidrogen protein-pelarut adalah proses untuk menjaga kesetimbangan jumlah ikatan hidrogen dan juga berperan dalam menstabilkan protein dalam keadaan *unfolded* (Paschek et al., 2011).

#### 4.1.6. Analisis Struktur Sekunder

Dalam suatu protein, struktur sekunder adalah struktur lokal yang dibentuk oleh tulang punggung protein. Struktur sekunder seperti  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -sheet, dan *turn* menyatakan pola teratur sudut dihedral dan ikatan hidrogen yang terbentuk antara atom-atom pada tulang punggung protein, terutama antara atom-atom pada ikatan peptida. Struktur sekunder lain seperti *random coil* atau disebut juga *loop* tidak mensyaratkan adanya keteraturan ikatan hidrogen dan sudut dihedral antar atom-atom yang berikatan peptida (Fetrow et al., 1995). Analisis terhadap perubahan struktur sekunder dapat dilakukan untuk mengamati proses *unfolding* protein, terutama hilang/rusaknya struktur heliks dan *sheet* (Day et al., 2002; Li et al., 1994; Yan et al., 2010). Analisis struktur sekunder juga dapat melengkapi pemahaman akan perubahan struktur selama simulasi yang sebelumnya dilakukan lewat analisis Rg, SASA, dan ikatan hidrogen.

Analisis struktur sekunder dilakukan dengan menggunakan algoritma STRIDE yang mengelompokkan penentuan struktur sekunder menjadi  $\alpha$ -heliks,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -bridge, 3-heliks, 5-heliks (heliks pendek), *hydrogen bond turn (turn)*, dan *coil (random coil)*. Analisis dilakukan terhadap struktur akhir dari proses simulasi pada masing-masing suhu (300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, dan 700). Hasil analisis struktur sekunder dan konformasi akhir simulasi ditunjukkan pada **Lampiran 1-3. Lampiran 2**, menunjukkan perubahan yang terjadi pada suhu simulasi yang lebih tinggi, yaitu hilangnya struktur sekunder seperti  $\alpha$ -heliks dan  $\beta$ -sheet. Penentuan struktur sekunder ITCA yang didapat dari PDB dengan menggunakan algoritma STRIDE menghasilkan struktur sekunder yang cocok dengan struktur sekunder dari kristalografi, yaitu heliks-1 sampai -10 serta *sheet*-1 sampai -9 (**Gambar 2.2**) (Uppenberg et al., 1994). Untuk penentuan struktur

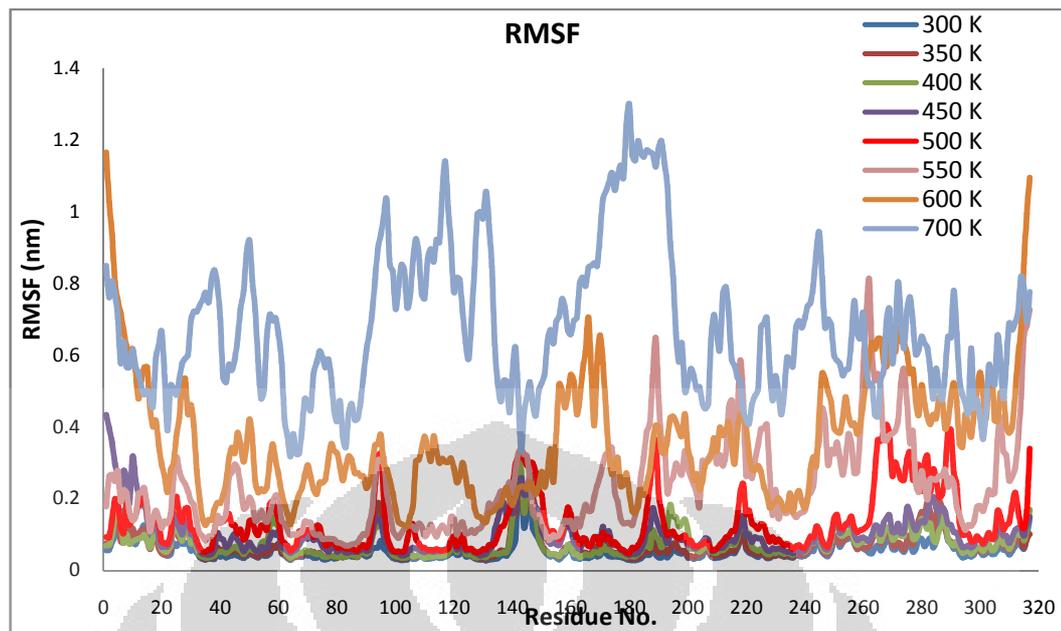
sekunder dari konformasi akhir simulasi suhu 300 K terdapat dua daerah heliks yang tidak teramati, yaitu heliks-6 (residu 152-156) dan heliks-8 (212-216). Struktur heliks-6 teramati kembali pada konformasi akhir simulasi suhu 350 K, sedangkan heliks-8 tidak teramati pada semua suhu simulasi.

Simulasi menunjukkan dinamika yang terjadi pada protein, yaitu selama simulasi terjadi perubahan pada struktur sekunder seperti beberapa residu yang berpindah-pindah dari satu bentuk struktur sekunder ke bentuk lainnya. Sebagian struktur sekunder dari protein *native* dipertahankan pada simulasi di suhu yang lebih rendah (300-400 K). Hal ini sesuai dengan analisis ikatan hidrogen intramolekular yang tidak menunjukkan penurunan signifikan pada simulasi suhu 300-400 K. Terdapat beberapa pergeseran struktur sekunder yang terutama teramati pada C- atau N- terminal suatu *sheet* atau heliks. Pada bagian terminal ini, beberapa residu mengalami pergerakan dinamis di mana dalam beberapa *frame* simulasi, residu terlibat dalam struktur *sheet* atau heliks, sedangkan di beberapa *frame* lainnya menjadi tidak terlibat dalam struktur sekunder. Pergerakan residu yang dinamis seperti ini juga menyebabkan terpecahnya heliks menjadi heliks yang lebih pendek (**Lampiran 2**). Struktur sekunder yang lebih dahulu mengalami kerusakan adalah heliks-2 (44-57) pada konformasi akhir simulasi 450 K, di mana residu 44-51 sudah tidak terlibat dalam struktur heliks lagi. Kemudian pada konformasi akhir simulasi 500 K, terjadi kerusakan total pada heliks-5 (142-146). Pada suhu ini terjadi kerusakan sebagian pada heliks-8 (212-216) dan heliks-9 (226-242). Pada konformasi akhir simulasi 550 K, terjadi kerusakan total dari heliks-1 (13-18). Sedangkan kerusakan sebagian terjadi pada heliks-6 (152-156) heliks-10 (268-287), serta *sheet*-8 (309-310) dan -9 (313-315). Pada konformasi akhir simulasi 600 K, sebagian besar struktur sekunder sudah mengalami kerusakan, kecuali pada *sheet*-2 (33-37), heliks-3 (76-93), *sheet*-4 (99-104), dan *sheet*-5 (125-131). Kerusakan mulai teramati pada pertengahan waktu simulasi (**Lampiran 2**). Seluruh struktur sekunder sudah hilang pada simulasi 700K, kecuali sebagian dari struktur heliks-3, yaitu residu 78-83 yang masih memiliki karakter  $\alpha$ -heliks.

#### 4.1.7. Analisis RMSF

Perancangan mutasi dengan menambahkan ikatan disulfida pada CALB dilakukan dengan mempertimbangkan daerah-daerah protein yang fleksibel. Daerah fleksibel pada protein seringkali berperan dalam proses awal *unfolding*, ikatan disulfida yang ditambahkan untuk “mengikat” daerah fleksibel tersebut akan mengurangi pergerakannya dan memberi tambahan rigiditas pada daerah yang diinginkan serta memperlambat tahap transisi ke keadaan *unfolded* (Pikkemaat et al., 2002; Han et al., 2009; Jeong et al., 2007; Liu et al., 2003). Simulasi dinamika molekular dapat digunakan untuk mempelajari daerah fleksibel pada suatu portein. Analisis RMSD terhadap trajektori simulasi dapat menunjukkan perubahan yang terjadi pada molekul secara global, sedangkan analisis RMSF secara khusus menggambarkan pergerakan lokal yang terjadi selama simulasi. Analisis RMSF yang dilakukan adalah analisis pergerakan atom-atom C- $\alpha$  pada suatu residu. Secara khusus, analisis terhadap pergerakan atom C- $\alpha$  mewakili pergerakan rata-rata dari suatu residu protein selama simulasi. Nilai RMSF juga berhubungan dengan fleksibilitas, yaitu nilai RMSF yang tinggi menunjukkan daerah dengan fleksibilitas yang tinggi (Benson dan Dagget, 2008).

Analisis RMSF terhadap simulasi pada berbagai suhu menunjukkan peningkatan nilai RMSF di suhu simulasi yang lebih tinggi (**Gambar 4.11**). Nilai RMSF masing-masing simulasi ditentukan dengan mengambil sampel 2000 ps terakhir dari simulasi. Selain itu, terdapat pola nilai RMSF dan fleksibilitas yang sama antara simulasi pada suhu yang berbeda, terutama pada suhu 300-500K. Sedangkan simulasi suhu 550-700 K memiliki nilai RMSF yang jauh lebih tinggi dibanding simulasi lainnya dan juga memiliki pola yang sudah berbeda. Analisis struktur sekunder (**Lampiran 2**) juga menunjukkan bahwa sebagian besar struktur sekunder sudah mulai rusak pada simulasi suhu 550-700 K. Hilangnya struktur sekunder menjadi *random coil* yang lebih fleksibel menyebabkan fluktuasi yang lebih besar pada pergerakan molekul, dan menghasilkan nilai RMSF yang lebih besar.



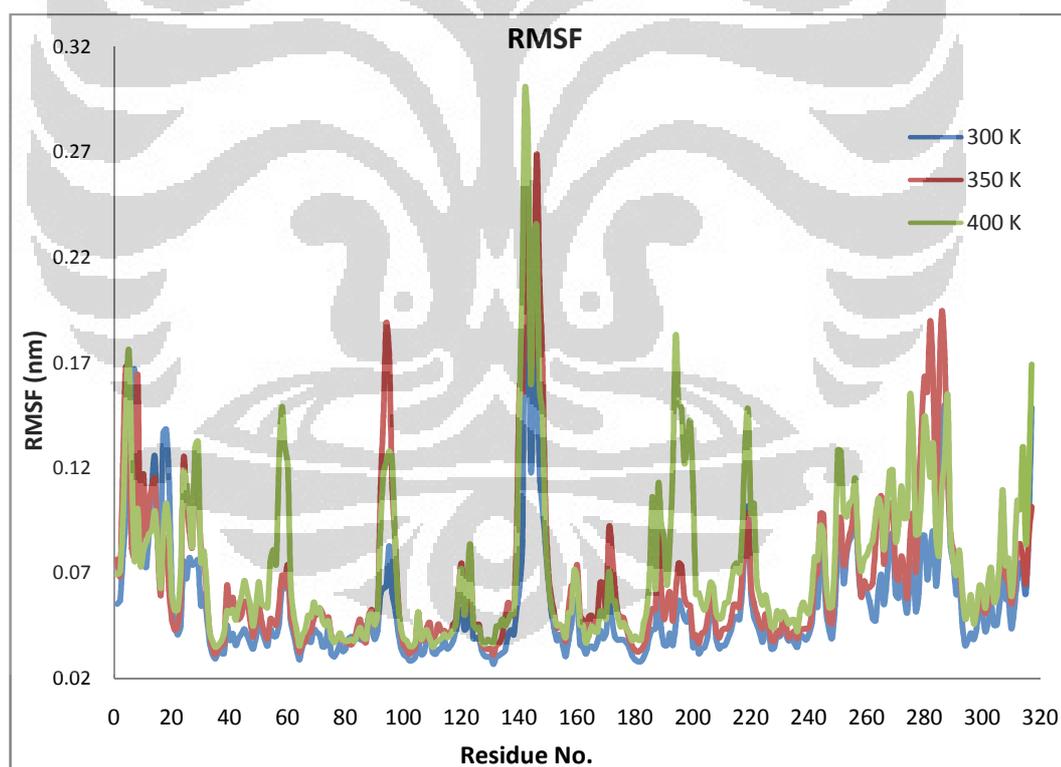
Nilai RMSF masing-masing simulasi ditentukan dengan mengambil sampel 2000 ps terakhir simulasi.

**Gambar 4.11.** Analisis RMSF simulasi suhu 300-700 K.

Penentuan daerah fleksibel untuk seleksi daerah mutasi dilakukan dengan mengamati nilai RMSF simulasi 300-400 K (**Gambar 4.12**). Pemilihan ini dilakukan karena simulasi pada suhu tersebut masih memiliki daerah dengan nilai RMSF rendah yaitu  $< 0.05$  nm (Benson dan Dagget, 2008), untuk meminimalisasi pengamatan fleksibilitas yang terjadi akibat kerusakan struktur yang terlalu besar. Penyisihan simulasi dengan nilai RMSF yang tinggi dilakukan agar struktur yang diamati masih cukup banyak memiliki karakter struktur *native*.

Pengamatan terhadap nilai RMSF menunjukkan ada sembilan daerah yang memiliki fleksibilitas tinggi, yaitu sebagai berikut: residu 1-30, 43-62, 91-97, 140-153, 168-173, 184-203, 210-225, 238-297, dan 304-317. Residu-residu yang terlibat dalam  $\beta$ -sheet pada interior protein (*sheet 2-7*) tidak terdapat pada daerah-daerah fleksibel tersebut, yang menunjukkan kestabilan daerah-daerah ini. Residu 1-30 adalah daerah N-terminal dari protein yang terdiri dari heliks-1 dan *sheet-1*. Pada daerah 1-30 ini, *sheet-1* (residu 20-22) memiliki nilai RMSF yang cenderung lebih kecil akibat interaksinya dengan *sheet-2*. Sebagian besar residu 55-62, 91-97, 168-173, serta 184-203 memiliki struktur coil dengan fleksibilitas tinggi yang

menghubungkan dua struktur sekunder seperti heliks dan *sheet*. Daerah 140-153 terdiri dari heliks-5 (142-146) dan heliks-6 (152-156) yang menyusun kantung pengikatan substrat (*binding pocket*) dari CALB yang berada di sekitar sisi aktif enzim. Tingginya nilai RMSF pada daerah ini dapat dihubungkan dengan keragaman substrat CALB, sehingga daerah pengikatan substrat enzim ini cukup fleksibel untuk mengakomodasi substrat yang masuk (Trodler dan Pleiss, 2008; Uppenberget al., 1994; Uppenberget al., 1995). Begitu pula nilai RMSF yang tinggi pada daerah 210-225 dan 238-297, akibat sebagian besar daerah ini berada dalam bentuk *coil*. Selain itu, heliks-10 (268-287) juga berperan dalam membentuk kantung pengikat substrat CALB. Sedangkan daerah 304-317 merupakan daerah C-terminal CALB yang memiliki fleksibilitas tinggi bahkan pada suhu simulasi yang rendah.



Nilai RMSF masing-masing simulasi ditentukan dengan mengambil sampel 2000 ps terakhir simulasi.

**Gambar 4.12.** Analisis RMSF simulasi suhu 300-400 K.

## 4.2. Prediksi Mutasi

Perangkat lunak yang digunakan untuk prediksi mutasi sepasang residu menjadi sistein adalah “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” (Dombkowski, 2003). Algoritma yang digunakan perangkat lunak ini melakukan perhitungan terhadap tiap pasangan residu yang ada pada *input* struktur PDB dengan asumsi tiap pasang residu dimutasi menjadi sistein. Residu yang mungkin dimutasi menjadi sistein ditentukan dengan ada tidaknya karakteristik ikatan disulfida pada pasangan residu yang dimutasi. Karakteristik ikatan disulfida yang digunakan sebagai acuan adalah jarak ikatan  $C_{\beta}-S_{\gamma}$  dan  $S_{\gamma}-S_{\gamma}$ , masing-masing 1,81 dan 2,04 Å serta sudut ikatan  $C_{\beta}-S_{\gamma}-S_{\gamma}$  104.15°. Keluaran dari perangkat lunak ini adalah dua belas pasangan residu yang dapat dimutasi menjadi sistein (**Tabel 4.3**). Perangkat lunak ini juga menampilkan 3 pasang residu sistein yang sudah terlibat dalam ikatan disulfida pada CALB sebagai keluaran (**Lampiran 4**), yang menunjukkan validitas perangkat lunak ini dalam memprediksi ikatan disulfida.

**Tabel 4.3.** Prediksi pasangan residu keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>”

Residu 1		Residu 2	
42	Thr	46	Gln
43	Thr	67	Ser
50	Ser	274	Ala
73	Leu	151	Ala
155	Trp	294	Glu
156	Gln	163	Leu
167	Leu	172	Gly
183	Tyr	202	Ser
208	Lys	247	Gln
234	Tyr	263	Ala
239	Ser	252	Asp
266	Leu	270	Gln

Hasil keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” adalah sepasang residu yang apabila dimutasi menjadi sistein dapat membentuk ikatan disulfida. Perangkat lunak juga memprediksi ikatan disulfida yang sudah ada pada enzim *wild type* (tidak ditampilkan di Tabel).

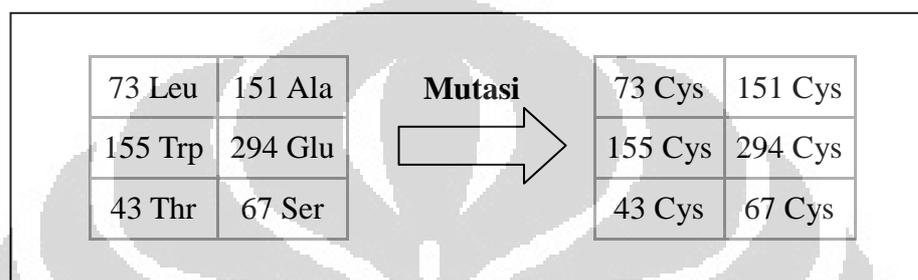
### 4.3. Pemilihan Mutan

Pemilihan mutan dilakukan dengan pertimbangan hasil analisis fleksibilitas (RMSF). Sembilan daerah fleksibel dari hasil analisis RMSF merupakan target potensial untuk ditambahkan ikatan disulfida dengan melakukan mutasi sepasang residu menjadi sistein. Dari hasil keluaran program “Disulfide by Design<sup>TM</sup>”, ada sebelas target mutasi yang terdapat pada daerah fleksibel (**Tabel 4.4**). Beberapa residu yang terlibat dalam pembentukan struktur heliks atau *sheet* tidak dipilih sebagai target mutasi karena alasan sterik (**Tabel 4.4**). Penambahan ikatan disulfida dengan melakukan mutasi residu yang berada pada struktur heliks atau *sheet* akan memberi dampak negatif karena adanya tegangan sterik yang tinggi pada struktur tersebut (Pikkemaat et al., 2002). Pengecualian dilakukan terhadap residu 43 dan 155 yang berada pada bagian terminal heliks-2 dan heliks-6, yang selama simulasi menunjukkan perubahan dengan seringkali tidak terlibat dalam struktur heliks, bahkan pada simulasi 300 K (**Lampiran 2**). Selain itu, dari hasil keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” tidak ada target mutasi yang terletak pada daerah katalitik, *oxyanion hole*, maupun kantung pengikatan substrat.

**Tabel 4.4.** Pasangan mutasi keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” yang terletak pada daerah fleksibel berdasarkan analisis RMSF

Residu 1	Residu 2	Keterangan
42 Thr	46 Gln	residu 42 dan 46 berada pada heliks-2
43 Thr	67 Ser	<b>Mutan-3</b>
50 Ser	274 Ala	residu 50 berada pada heliks-2 dan 274 pada heliks-10
73 Leu	151 Ala	<b>Mutan-1</b>
155 Trp	294 Glu	<b>Mutan-2</b>
167 Leu	172 Gly	residu 167 berada pada heliks-7
183 Tyr	202 Ser	residu 183 berada pada <i>sheet</i> -6
208 Lys	247 Gln	residu 208 berada pada <i>sheet</i> -7
234 Tyr	263 Ala	residu 234 berada pada heliks-9
239 Ser	252 Asp	residu 239 berada pada heliks-9
266 Leu	270 Gln	residu 270 berada pada heliks-10

Setelah dilakukan seleksi dengan kriteria yang disebutkan di atas, didapatkan tiga pasang residu sebagai target mutasi menjadi sistein. Ketiga pasang residu ini kemudian akan dimutasi menjadi sistein untuk membentuk ikatan disulfida (**Gambar 4.13**). Perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>” digunakan untuk membuat struktur enzim mutan dengan ikatan disulfida baru hasil mutasi. Tiga target mutan yang dihasilkan adalah Mutan-1 (Leu73Cys/Ala151Cys), Mutan 2 (Trp155Cys/Glu294Cys), dan Mutan 3 (Thr43Cys/Ser67Cys).



**Gambar 4.13.** Target mutasi pada enzim *wild type* dan mutan-mutan yang dihasilkan

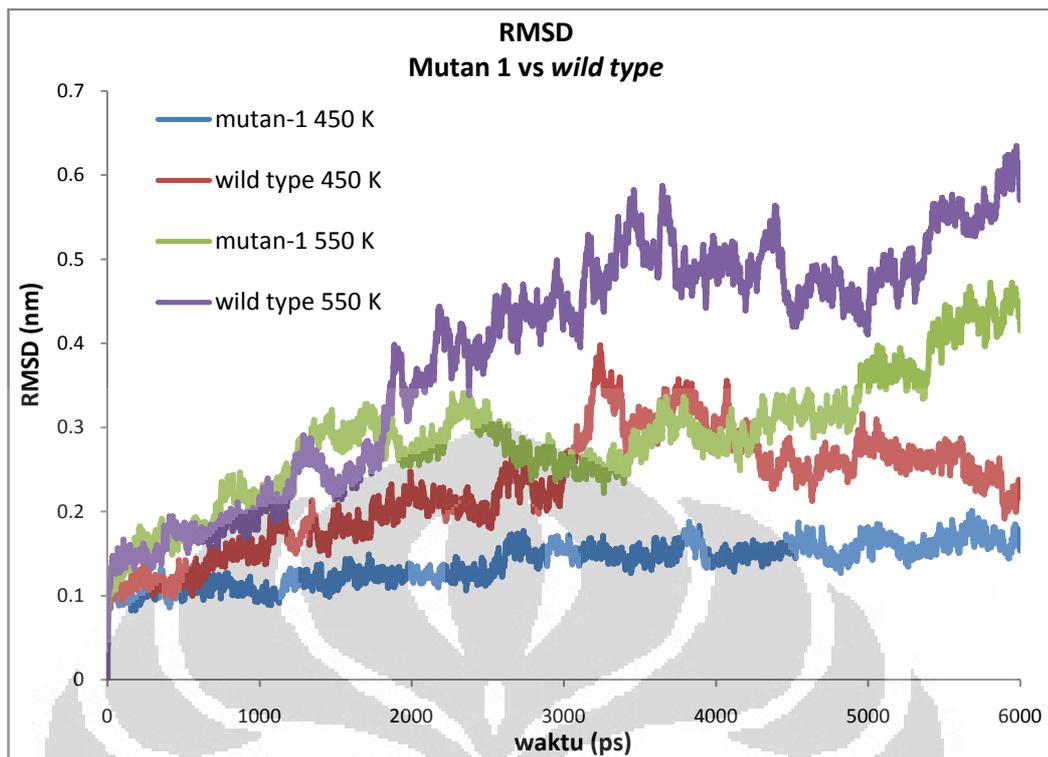
#### 4.4. Simulasi Dinamika Molekul Enzim Mutan

Untuk menguji perubahan kestabilan enzim mutan, dilakukan simulasi dinamika molekul enzim mutan. Parameter-parameter seperti RMSD, SASA, dan jari-jari girasi (Rg) enzim mutan kemudian dibandingkan dengan parameter-parameter enzim sebelum mutasi (*wild type*). Simulasi enzim mutan dilakukan pada suhu simulasi 450 dan 550 K. Dua suhu simulasi ini dipilih karena suhu 450 K merupakan suhu di mana perubahan struktur enzim *wild type* mulai teramati, sedangkan suhu 550 K merupakan suhu ketika sebagian besar struktur sekunder enzim *wild type* mulai teramati. Peningkatan termostabilitas enzim mutan terhadap enzim *wild type* dinyatakan dengan kestabilan struktur yang lebih baik pada simulasi kedua suhu tersebut.

#### 4.4.1. Mutan-1

Mutasi yang dilakukan pada Mutan-1 (Leu73Cys/Ala151Cys) adalah mengubah leusin pada residu 73 (Leu73) dan alanin pada residu 151 (Ala151) menjadi sistein (**Lampiran 5**). Pada **Lampiran 5** dapat dilihat bahwa ikatan disulfida baru yang ditambahkan pada Mutan-1 tidak mengganggu residu-residu penting yang berperan dalam aktivitas CALB (residu-residu pada sisi aktif, *binding pocket*, dan *oxyanion hole*). Residu 73 berada pada daerah dengan struktur *coil* yang terletak sebelum heliks-3 (76-93), sedangkan residu 151 berada pada daerah dengan struktur *coil* yang terletak sebelum heliks-6 (152-156). Setelah mutasi dilakukan, jembatan disulfida yang terbentuk membentuk ikat silang antara kedua heliks tersebut pada daerah terminalnya tanpa mengganggu struktur heliks. Kantung pengikat substrat juga masih teramati dan tidak mengalami perubahan baik pada Mutan-1, Mutan 2, maupun Mutan 3 (**Lampiran 6**). Pengamatan pada kantung pengikat substrat penting untuk dilakukan karena mutasi yang dilakukan jangan sampai merusak struktur sisi aktif (Korkegian et al., 2005).

Analisis RMSD Mutan-1 dan CALB *wild type* pada suhu 450 dan 550 K menunjukkan bahwa Mutan-1 lebih stabil pada kedua suhu simulasi tersebut (**Gambar 4.14**). Pada simulasi 450 K, Mutan-1 lebih cepat mencapai kestabilan. Sejak waktu simulasi 1000 ps hingga akhir simulasi, nilai RMSD Mutan-1 cenderung stabil dan linear, sedangkan nilai RMSD CALB *wild type* baru menunjukkan linearitas pada waktu simulasi 3000 ps. Selain itu, nilai RMSD konformasi akhir Mutan-1 juga lebih kecil dibandingkan *wild type* yaitu sekitar 0,1 dan 0,2 untuk Mutan-1 dan *wild type*. Pada suhu 550 K struktur akhir Mutan-1 juga memiliki nilai RMSD yang lebih kecil dibanding *wild type*, dan juga cenderung lebih stabil.

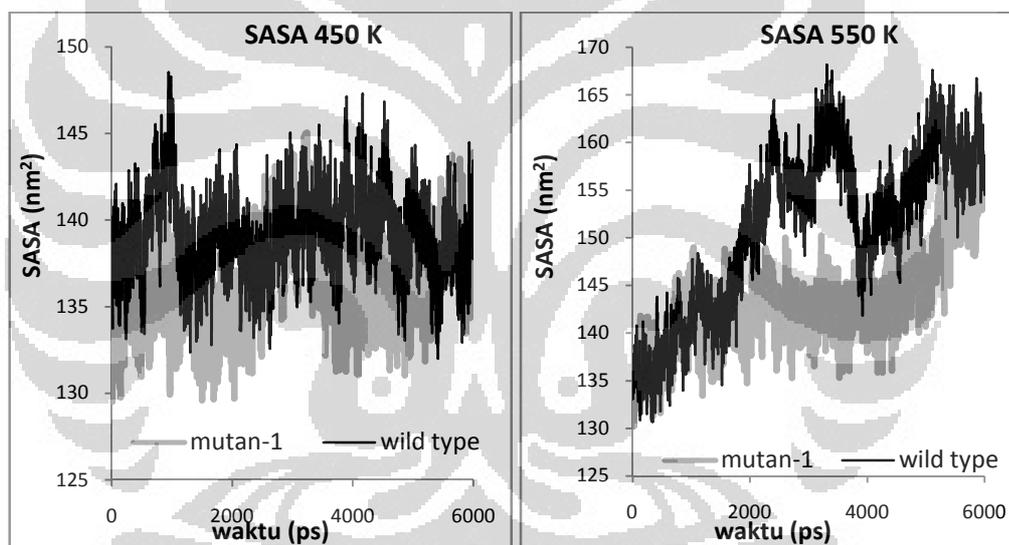


**Gambar 4.14.** Nilai RMSD Mutan-1 dan *wild type* pada simulasi 450 dan 550 K

Nilai RMSD tiap-tiap mutan tidak ditentukan dengan membandingkan struktur selama simulasi dengan struktur CALB *wild type*, melainkan struktur masing-masing mutan pada awal simulasi ( $t = 0$  ps). Walaupun tidak dibandingkan secara langsung, namun analisis RMSD mutan masih bisa digunakan untuk menggambarkan kestabilan mutan selama waktu simulasi dibandingkan struktur awalnya. Tercapainya linearitas nilai RMSD Mutan-1 pada waktu simulasi yang lebih awal dibandingkan CALB *wild type* menunjukkan bahwa Mutan-1 lebih stabil dapat mempertahankan strukturnya awalnya lebih lama dalam simulasi.

Nilai SASA dapat digunakan untuk menganalisis kestabilan struktur protein selama simulasi. Meningkatnya nilai SASA secara cepat akan terjadi ketika pusat hidrofobik dari molekul protein mulai rusak (*collapse*) akibat hilangnya interaksi penstabil, dan molekul pelarut mulai dapat memasuki bagian dalam (*interior*) protein (Day et al., 2002; Yan et al., 2010). Dengan demikian, nilai SASA yang lebih linear atau lebih lambat mengalami kenaikan selama simulasi menunjukkan kestabilan struktur protein.

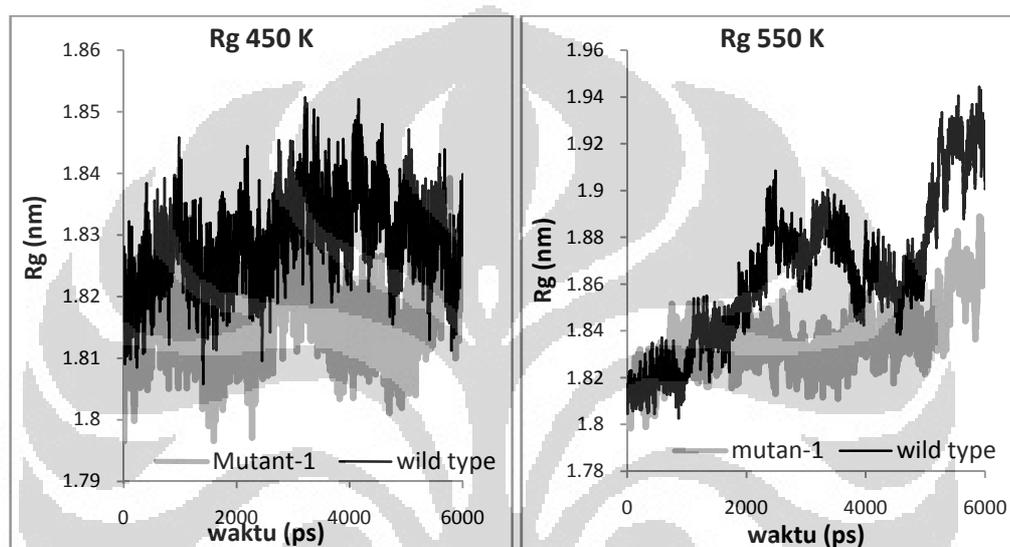
Beberapa penelitian juga menggunakan nilai Rg sebagai ukuran kestabilan protein yang dikaitkan dengan proses *unfolding* protein (Zhao et al., 2009; Day et al., 2002; Li dan Dagget, 1994; Paschek et al., 2011). Naiknya nilai Rg ketika terjadi proses *unfolding* dapat dikaitkan pula dengan berkurangnya ikatan hidrogen intramolekular yang menjaga kekompakan struktur protein (Zhao et al., 2009). Lompatan nilai Rg menunjukkan mulai terjadi kerusakan pada struktur protein karena hilangnya interaksi-interaksi penstabil. Oleh karenanya, sama seperti analisis SASA, nilai Rg yang lebih linear atau lebih lambat mengalami kenaikan selama simulasi menunjukkan kestabilan struktur protein. Simulasi suhu tinggi dilakukan untuk mempercepat pengamatan perubahan nilai SASA dan Rg tersebut.



**Gambar 4.15.** SASA Mutan-1 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).

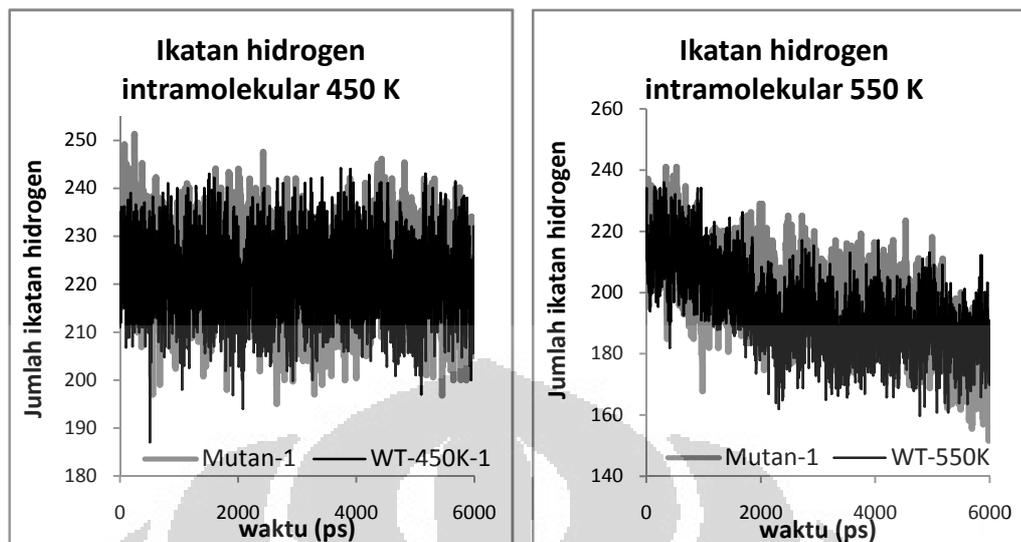
Analisis SASA pada suhu simulasi 450 dan 500 K menunjukkan bahwa pada kedua simulasi, nilai SASA konformasi akhir tidak berbeda jauh (**Gambar 4.15**). Akan tetapi pada simulasi 550 K, nilai SASA *wild type* lebih cepat mengalami loncatan peningkatan yaitu pada sekitar 2000 ps. Kenaikan nilai SASA Mutan-1 baru terjadi secara signifikan pada waktu 5000 ps. Hal ini juga menunjukkan kekompakan (*compactness*) struktur Mutan-1 yang dapat lebih dipertahankan. Hal yang sama teramati pada analisis jari-jari girasi (Rg) (**Gambar**

**4.16).** Nilai Rg CALB *wild type* pada simulasi 550 K juga lebih cepat mengalami peningkatan, yaitu dimulai pada 2000 ps. Sedangkan nilai Rg Mutan-1 pada simulasi 550 K baru mengalami peningkatan pada 5000 ps. Pada simulasi 550 K, nilai Rg konformasi akhir Mutan-1 juga lebih kecil dibandingkan nilai Rg *wild type*. Analisis Rg juga mengkonfirmasi kesimpulan yang didapat lewat analisis SASA, yaitu Mutan-1 lebih dapat mempertahankan kekompakan strukturnya.



**Gambar 4.16.** Jari-jari girasi (Rg) Mutan-1 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).

Analisis struktur sekunder dilakukan untuk mendapatkan pengamatan yang lebih baik terhadap pengaruh mutasi yang dilakukan. Perubahan struktur sekunder tiap mutan diamati pada simulasi suhu 550 K dan dibandingkan dengan perubahan struktur sekunder *wild type* pada simulasi suhu 550 K (**Lampiran 7**). Ikatan disulfida yang ditambahkan pada Mutan-1 mengikat daerah dekat heliks-3 dengan daerah dekat heliks-6. Pengamatan yang dilakukan pada daerah heliks-3 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan struktur yang signifikan antara Mutan-1 dengan *wild type*. Sedangkan daerah heliks-6 pada Mutan-1 teramati lebih fleksibel dimana pada beberapa *frame* simulasi struktur heliks-6 terpecah menjadi heliks yang lebih pendek, tetapi pada *frame* lainnya struktur heliks-6 teramati kembali.



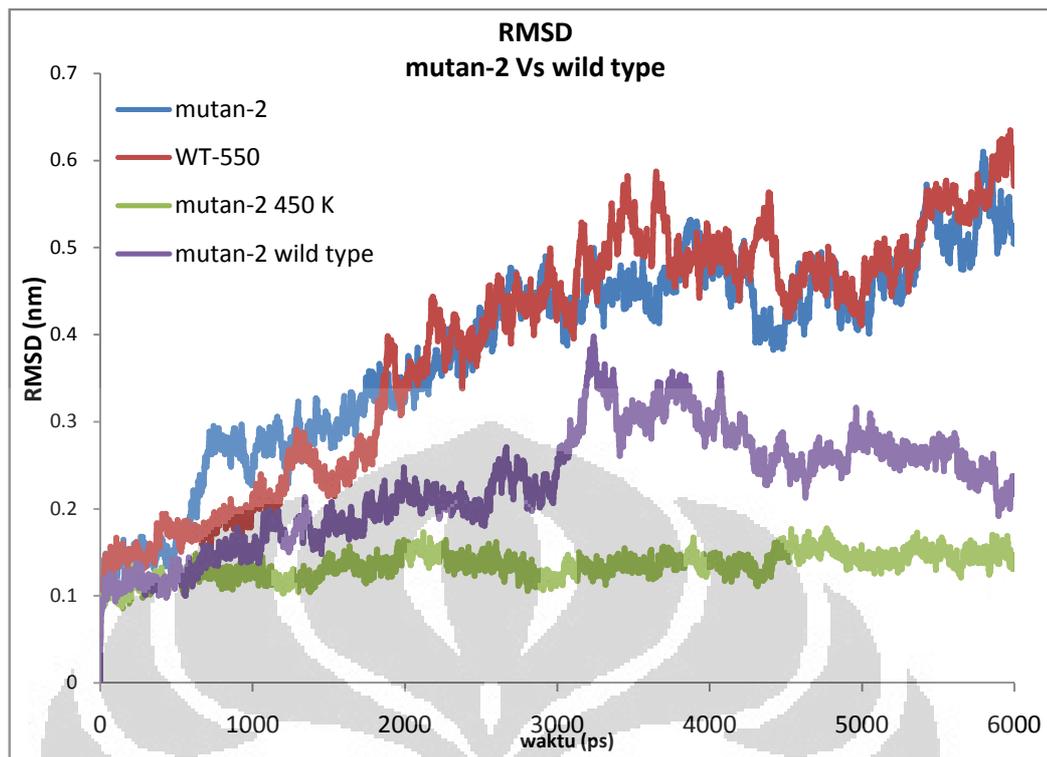
**Gambar 4.17.** Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-1 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan)

Secara keseluruhan, tidak ada kerusakan permanen struktur heliks-6 pada Mutan-1. Kondisi heliks-6 pada Mutan-1 yang lebih fleksibel dibanding *wild type* mungkin membantu protein menjaga kestabilannya terhadap perubahan suhu. Selain itu kedua daerah yang dihubungkan oleh ikatan disulfida baru pada Mutan-1 adalah daerah *coil* yang fleksibel. Pengikatan silang daerah fleksibel seperti ini dapat meningkatkan kestabilan dengan mengurangi entropi struktur (Li et al., 1998). Analisis ikatan hidrogen intramolekular antara Mutan-1 dan *wild type* tidak menunjukkan perbedaan jumlah yang signifikan, baik pada simulasi suhu 450 K dan 550 K (**Gambar 4.17**). Ini menunjukkan bahwa stabilisasi ikatan disulfida pada Mutan-1 bukan merupakan stabilisasi struktur sekunder baik heliks maupun *sheet*. Kemungkinan kestabilan tambahan pada Mutan-1 berasal dari berkurangnya pergerakan daerah fleksibel yang tidak termasuk dalam struktur sekunder tertentu. Hal ini ditunjukkan dari nilai RMSD, SASA, dan Rg Mutan-1 yang cenderung lebih rendah dibandingkan *wild type*. Hasil-hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa ikatan disulfida yang ditambahkan pada Mutan-1 berhasil mengikat daerah fleksibel pada CALB, sehingga berdampak pada meningkatnya rigiditas struktur dan memperlambat proses denaturasi terhadap suhu.

#### 4.4.2. Mutan-2

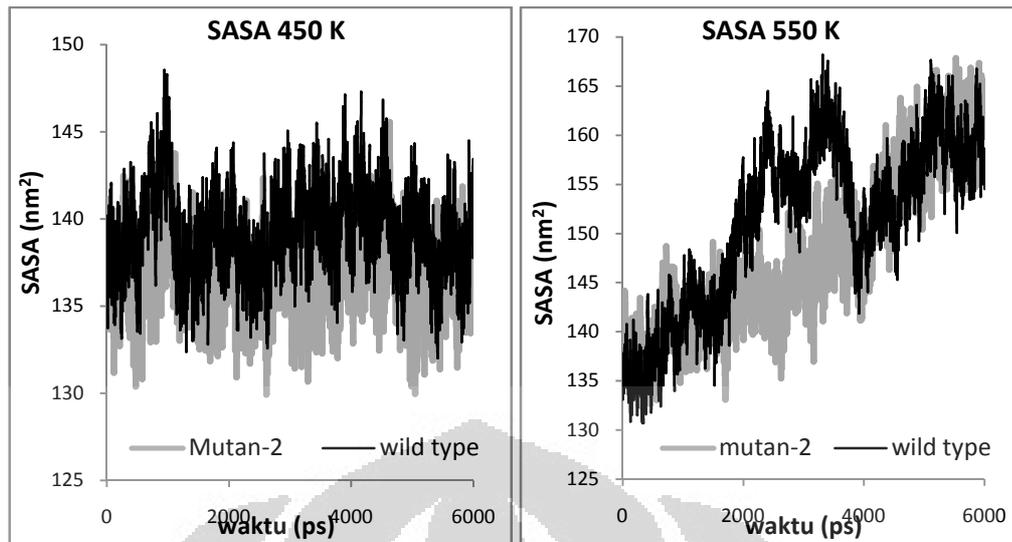
Mutasi yang dilakukan pada Mutan-2 (Trp155Cys/Glu294Cys) adalah mengubah triptofan pada residu 155 (Trp155) dan glutamat pada residu 294 (Glu294) menjadi sistein (**Lampiran 5**). Ikatan disulfida baru pada Mutan-2 berdekatan dengan salah satu residu pada kantung pengikat substrat, yaitu residu 154 sehingga mungkin akan mempengaruhi fleksibilitas kantung pengikat substrat (**Lampiran 5**). Hal ini mungkin akan mempengaruhi spesifisitas substrat nantinya dan perlu diuji lebih lanjut secara *wet lab*. Selain itu, ikatan disulfida ini tidak berdekatan dengan sisi aktif dan *oxyanion hole*, sehingga besar kemungkinan aktivitas katalitik enzim tidak terganggu. Residu 155 berada pada daerah terminal heliks-6 (152-156), akan tetapi simulasi suhu 300 K menunjukkan bahwa residu ini cukup fleksibel dan mengalami perubahan fluktuatif menjadi tidak terlibat pada struktur heliks. Residu 294 berada pada daerah dengan struktur *coil* yang terletak sebelum *sheet-8* (309-310). Yang menarik adalah ikatan disulfida yang terbentuk terletak berdekatan dengan ikatan disulfida yang sudah ada pada CALB *wild type* yaitu antara residu 293-311. Ikatan disulfida pada 293-311 dapat dianggap mengikat struktur *sheet-8* dengan *sheet-9*.

Analisis RMSD Mutan-2 dan CALB *wild type* pada simulasi suhu 450 K menunjukkan bahwa Mutan-2 lebih stabil pada suhu simulasi tersebut (**Gambar 4.18**). Nilai RMSD Mutan-2 pada simulasi 450 K tetap stabil selama waktu simulasi, sedangkan *wild type* mengalami peningkatan nilai RMSD dimulai pada 3000 ps. Akan tetapi pada simulasi suhu 550 K nilai RMSD Mutan-2 dan *wild type* tidak jauh berbeda dan nilai RMSD konformasi akhir keduanya tidak berbeda secara signifikan. Pengamatan ini menunjukkan bahwa Mutan-2 tidak se-stabil Mutan-1 dalam mempertahankan strukturnya.

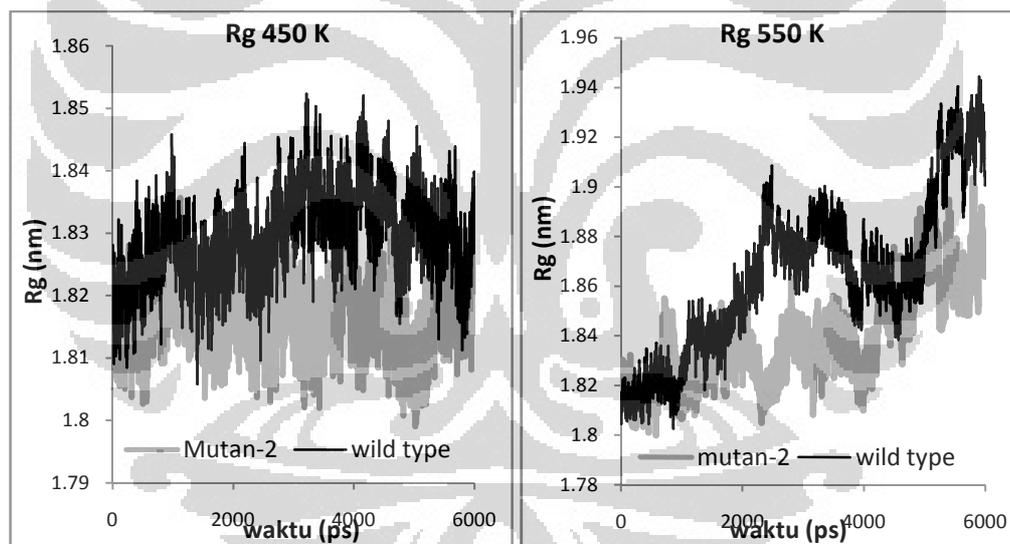


**Gambar 4.18.** Nilai RMSD Mutan-2 dan *wild type* pada simulasi 450 dan 550 K

Analisis lebih lanjut terhadap nilai SASA pada suhu simulasi 450 dan 500 K menunjukkan bahwa pada kedua simulasi, nilai SASA konformasi akhir tidak berbeda jauh (**Gambar 4.19**). Pada simulasi 550 K, baik Mutan-2 maupun *wild type* mengalami kenaikan nilai SASA yang serupa. Tidak seperti Mutan-1 yang sempat mengalami kestabilan nilai SASA, nilai SASA Mutan-2 terus mengalami kenaikan sejak awal simulasi walaupun dengan peningkatan yang tidak setajam *wild type*. Fenomena yang serupa juga teramati pada analisis jari-jari girasi ( $R_g$ ) (**Gambar 4.20**). Nilai  $R_g$  Mutan-2 tidak berbeda jauh dengan nilai  $R_g$  *wild type* pada simulasi suhu 450 dan 550 K. Mutan-2 memiliki nilai  $R_g$  yang linear hingga 4000 ps, kemudian terjadi lonjakan nilai  $R_g$  sehingga konformasi akhir memiliki nilai  $R_g$  yang tidak jauh berbeda dengan *wild type*. Analisis RMSD, SASA, dan  $R_g$  pada Mutan-2 menunjukkan bahwa kestabilan Mutan-2 tidak sebaik Mutan-1 terutama pada simulasi suhu 550 K.



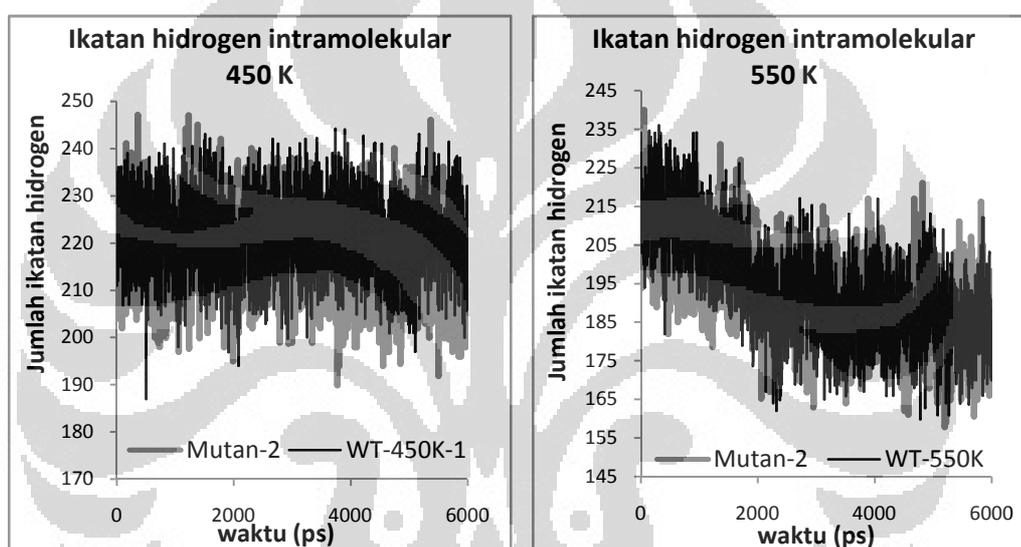
**Gambar 4.19.** SASA Mutan-2 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).



**Gambar 4.20.** Jari-jari girasi (Rg) Mutan-2 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).

Ikatan disulfida yang ditambahkan pada Mutan-2 mengikat daerah terminal heliks-6 dengan daerah *coil* antara heliks-10 dengan *sheet*-8.. Pengamatan yang dilakukan pada daerah heliks-6 menunjukkan bahwa pada Mutan-2, mulai mengalami kerusakan pada waktu simulasi yang lebih cepat dibanding *wild type*. Faktor inilah yang kemungkinan menyebabkan Mutan-2 tidak terlalu stabil dibandingkan Mutan-1. *Sheet*-8 dan *sheet*-9 pada *wild type*

dihubungkan oleh ikatan disulfida pada residu 293 dan 311. Pada Mutan-2, ikatan silang dua *sheet* ini ditambah lagi dengan ikatan disulfida pada residu 155-294. Ikatan disulfida tambahan ini nampaknya bersifat destablisasi pada struktur. Ini terlihat dari pengamatan struktur sekunder dimana pada Mutan-2 kerusakan pada *sheet-8* dan *sheet-9* teramati pada waktu yang lebih cepat dibanding *wild type*. Sama seperti pada Mutan-1, analisis ikatan hidrogen intramolekular Mutan-2 juga tidak menunjukkan perbedaan dengan *wild type* pada kedua suhu simulasi (Gambar 4.21).

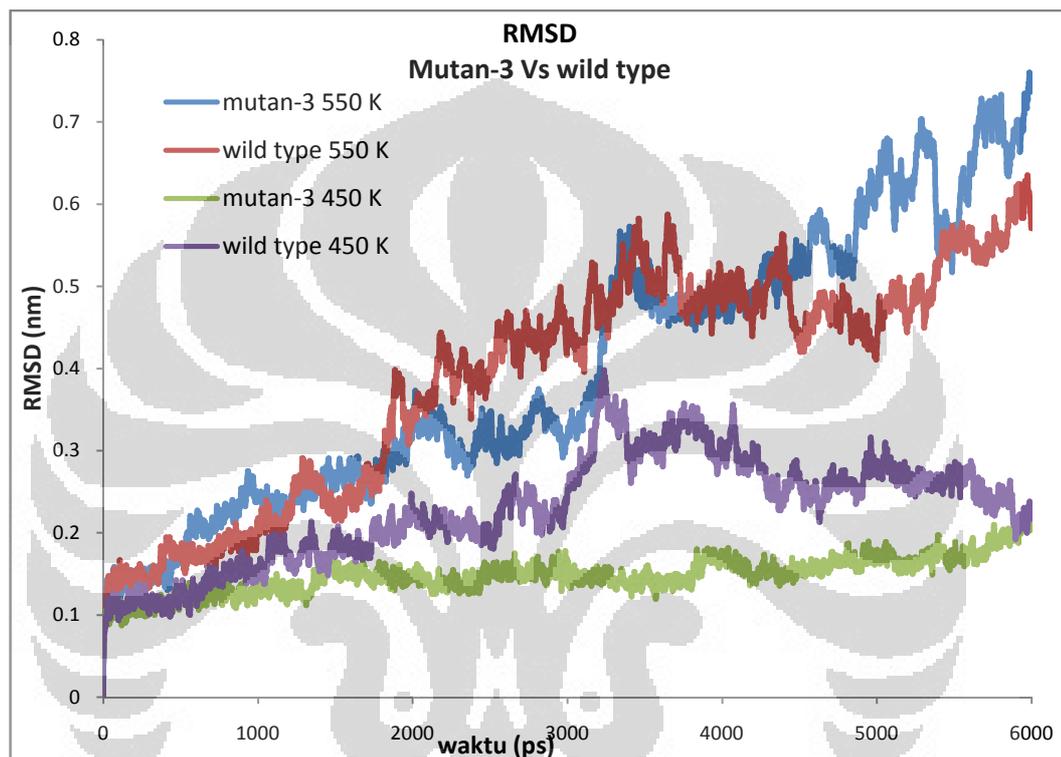


**Gambar 4.21** Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-2 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan)

#### 4.4.3. Mutan-3

Mutasi yang dilakukan pada Mutan-3 (Thr43Cys/Ser67Cys) adalah mengubah treonin pada residu 43 (Thr43) dan serin pada residu 67 (Ser294) menjadi sistein (**Lampiran 5**). Residu 43 berada pada daerah terminal heliks-2 (44-57), akan tetapi simulasi suhu 300 K menunjukkan bahwa residu ini cukup fleksibel dan dapat mengalami perubahan fluktuatif menjadi tidak terlibat pada struktur heliks. Residu 67 berada pada daerah dengan struktur *coil* yang terletak setelah *sheet-2* (62-66). Sama seperti pada Mutan-2, ikatan disulfida baru pada Mutan-3 juga berdekatan dengan salah satu residu pada kantung pengikat substrat,

yaitu residu 42 sehingga mungkin akan mempengaruhi fleksibilitas kantung pengikat substrat (**Lampiran 5**). Akan tetapi, ikatan disulfida baru ini tidak berdekatan dengan sisi aktif dan *oxyanion hole*, sehingga besar kemungkinan aktivitas katalitik enzim tidak terganggu.

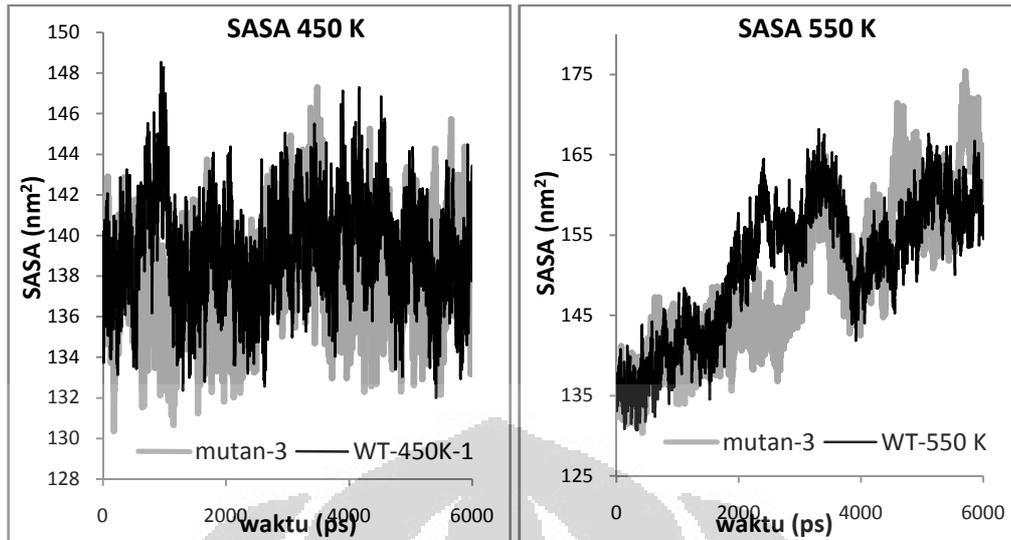


**Gambar 4.22.** Nilai RMSD Mutan-3 dan *wild type* pada simulasi 450 dan 550 K

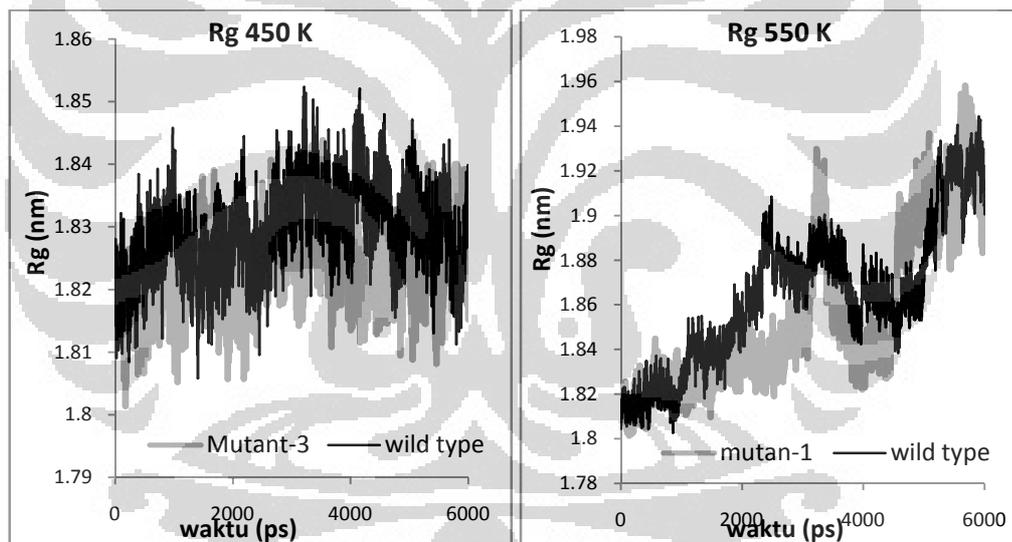
Analisis RMSD Mutan-3 dan CALB *wild type* pada simulasi suhu 450 menunjukkan bahwa Mutan-3 lebih stabil pada suhu simulasi tersebut (**Gambar 4.22**). Nilai RMSD Mutan-3 pada simulasi 450 K tetap stabil hingga 5000 ps dan kemudian naik hingga akhir simulasi. Walaupun cenderung lebih stabil dan kenaikan nilai RMSD Mutan-3 tidak secepat kenaikan *wild type*, nilai RMSD konformasi akhir kedua protein tersebut tidak berbeda jauh. Pada simulasi suhu 550 K terlihat bahwa nilai RMSD Mutan-3 dan *wild type* mengalami peningkatan dengan pola yang serupa. Mutan-3 bahkan memiliki nilai RMSD yang lebih tinggi dibanding *wild type* dimulai dari 4500 ps hingga akhir simulasi. Pengamatan ini menunjukkan bahwa di antara ketiga mutan, Mutan-3 memiliki kestabilan yang

terendah. Dengan nilai RMSD yang lebih tinggi dibanding *wild type* pada 1000 ps terakhir simulasi 550 K, dapat disimpulkan bahwa mutasi yang dilakukan pada Mutan-3 memberi dampak destabilisasi (*destabilized*) sehingga menyebabkan perubahan struktur yang makin besar menurut nilai RMSD.

Analisis lebih lanjut terhadap nilai SASA pada suhu simulasi 450 dan 550 K menunjukkan bahwa pada kedua simulasi, nilai SASA konformasi akhir tidak berbeda jauh (**Gambar 4.23**). Pada simulasi 550 K, baik Mutan-3 maupun *wild type* mengalami kenaikan nilai SASA yang serupa. Sama seperti Mutan-2, nilai SASA Mutan-3 juga terus mengalami kenaikan sejak awal simulasi. Fenomena yang serupa juga teramati pada analisis jari-jari girasi ( $R_g$ ) (**Gambar 4.24**). Nilai  $R_g$  Mutan-3 tidak berbeda jauh dengan nilai  $R_g$  *wild type* pada simulasi suhu 450 dan 550 K. Kenaikan nilai  $R_g$  Mutan-3 selama simulasi suhu 550 K terjadi pada tingkatan yang sama seperti kenaikan nilai  $R_g$  *wild type*. Mutan-3 terus mengalami peningkatan nilai  $R_g$  dari dimulainya simulasi hingga akhir simulasi, dan sempat terjadi lonjakan nilai  $R_g$  di sekitar 3000 ps sehingga nilainya lebih tinggi dari *wild type*. Pada konformasi akhir, baik Mutan-3 maupun *wild type* memiliki nilai  $R_g$  yang tidak jauh berbeda. Analisis SASA, dan  $R_g$  pada Mutan-3 mendukung hasil pengamatan terhadap nilai RMSD yang menunjukkan bahwa di antara ketiga mutan, Mutan-3 memiliki kestabilan termal yang terendah. Pengamatan yang dilakukan pada Mutan-3, terutama pada simulasi suhu 550 K menunjukkan bahwa mutasi yang dilakukan pada Mutan-3 tidak memperbaiki kemampuan enzim untuk mempertahankan kestabilan struktur selama simulasi.



**Gambar 4.23.** SASA Mutan-3 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).

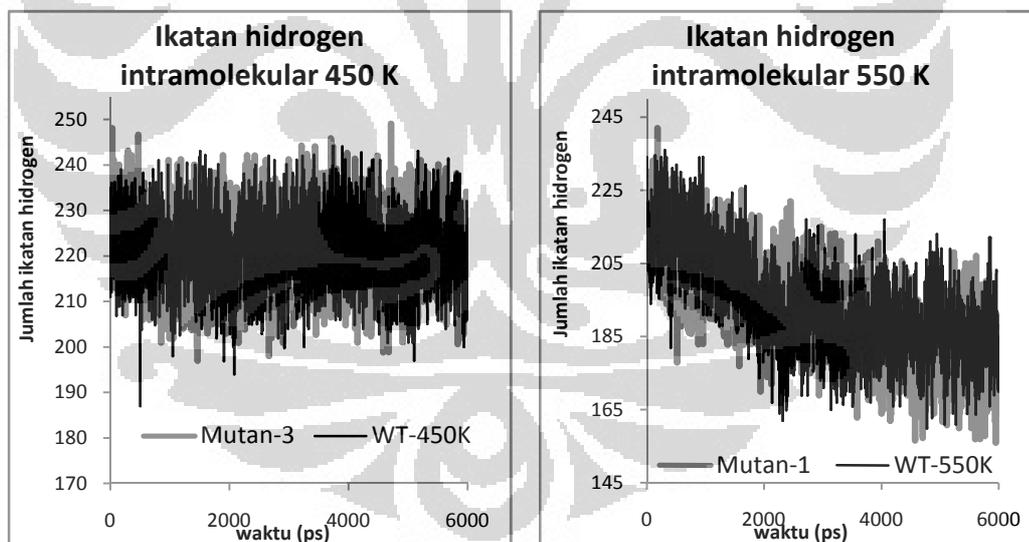


**Gambar 4.24.** Jari-jari girasi (Rg) Mutan-3 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan).

Ikatan disulfida yang ditambahkan pada Mutan-3 mengikat daerah sebelum heliks-2 dengan daerah sebelum heliks-3. Pengamatan yang dilakukan pada daerah heliks-3 menunjukkan bahwa pada Mutan-3, terjadi kerusakan struktur heliks yang lebih banyak terutama pada C-terminal heliks-3 dibandingkan *wild type* (**Lampiran 7**). Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-3 dan *wild type* juga tidak berbeda secara signifikan pada kedua suhu simulasi. Sama

seperti pada Mutan-1 dan Mutan-2, analisis ikatan hidrogen intramolekular Mutan-3 juga tidak menunjukkan perbedaan dengan *wild type* pada kedua suhu simulasi.

Mutan-3 juga tidak menunjukkan perbedaan jumlah ikatan hidrogen dengan *wild type* pada simulasi 450 dan 550 K (**Gambar 4.25**). Tidak adanya perbedaan dalam jumlah ikatan hidrogen tiap mutan dibanding *wild type* pada suhu simulasi yang sama menunjukkan bahwa stabilisasi atau destabilisasi yang dilakukan pada mutan tidak memberi dampak pada perubahan struktur sekunder. Perbedaan yang teramati hanya pada nilai RMSD, Rg, dan SASA, yang kesemuanya merupakan parameter yang menunjukkan kestabilan dan kepadatan (*compactness*) struktur. Ini mengindikasikan bahwa stabilisasi atau destabilisasi mutan lebih memberi dampak pada kekompakan struktur sebagai akibat perubahan fleksibilitas. Peningkatan stabilitas Mutan-1 merupakan akibat dari berkurangnya fleksibilitas daerah yang diikat-silang oleh ikatan disulfida.



**Gambar 4.25.** Jumlah ikatan hidrogen intramolekular Mutan-3 dan *wild type* pada simulasi suhu 450 K (kiri) dan 550 K (kanan)

## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Pemodelan dengan metode simulasi dinamika molekul untuk menentukan daerah mutasi CALB telah berhasil dilakukan. Parameter RMSF menyatakan bahwa terdapat beberapa daerah residu yang memiliki fleksibilitas tinggi dan berpotensi untuk dimutasi menjadi sistein untuk membentuk ikatan disulfida. Tiga mutan berhasil dirancang dari analisis fleksibilitas CALB *wild type* dan berdasarkan prediksi mutasi melalui perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>”, yaitu Mutan-1 (Leu73Cys/Ala151Cys), Mutan-2 (Trp155Cys/Glu294Cys) dan Mutan-3 (Thr43Cys/Ser67Cys).

Analisis termostabilitas mutan-mutan yang dirancang telah dilakukan lewat simulasi dinamika molekul pada suhu simulasi 450 dan 550 K. Mutan-1 memiliki beberapa parameter struktural yang menunjukkan bahwa mutan bersifat lebih termostabil dibanding CALB *wild type*. Parameter RMSD terutama menunjukkan bahwa dalam simulasi, struktur Mutan-1 lebih cepat mencapai kesetimbangan pada simulasi suhu 450 dan 550 K jika dibandingkan CALB *wild type*. Parameter struktural lain seperti jari-jari girasi, SASA, dan struktur sekunder juga mengarah pada kesimpulan yang sama. Mutan-2 juga memiliki parameter struktural yang menunjukkan termostabilitas yang lebih baik dibanding CALB *wild type*. Akan tetapi, jika dibandingkan dengan Mutan-1, Mutan-2 kurang termostabil. Kesimpulan ini terutama yang ditunjukkan oleh parameter RMSD, jari-jari girasi, dan SASA Mutan-2 pada suhu simulasi 550 K yang tidak berbeda jauh dibanding *wild type*. Sedangkan pengamatan parameter-parameter struktural Mutan-3 selama simulasi menunjukkan bahwa Mutan-3 memiliki termostabilitas yang lebih rendah dibanding *wild type* pada simulasi suhu 550 K.

Dari hasil-hasil analisis tersebut, penelitian ini mengajukan mutasi penambahan ikatan disulfida dengan mengubah pasangan residu Leu73 dan Ala151 menjadi sistein untuk menghasilkan CALB mutan yang memiliki termostabilitas lebih baik dibandingkan CALB *wild type*. Ikatan disulfida yang

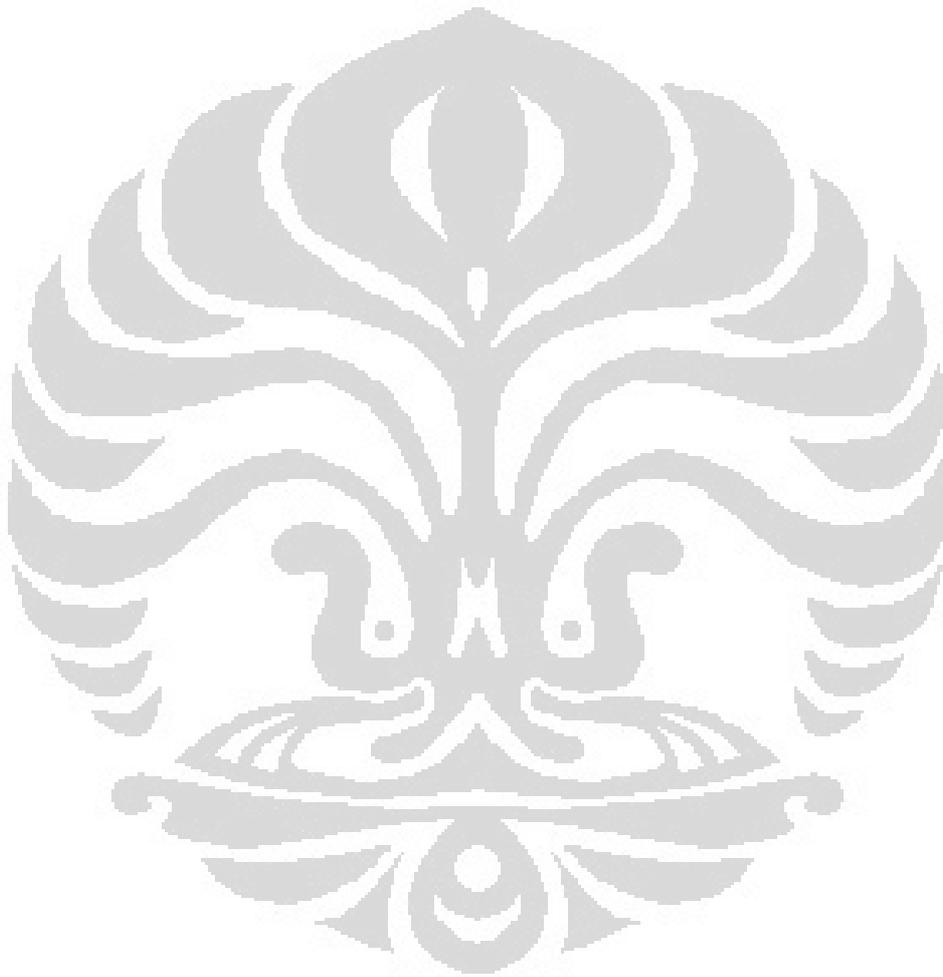
ditambahkan pada Mutan-1 berhasil mengikat daerah fleksibel pada CALB sehingga parameter-parameter hasil simulasi menunjukkan peningkatan rigiditas struktur serta mengurangi dampak denaturasi pada suhu yang lebih tinggi.

## 5.2. Saran

Penelitian ini hanya membandingkan termostabilitas CALB mutan dan *wild type* dengan mempertimbangkan parameter-parameter struktural selama simulasi seperti (RMSD, jari-jari girasi, SASA, dan struktur sekunder). Peningkatan termostabilitas enzim mutan terhadap enzim *wild type* dikorelasikan dengan kestabilan struktur yang lebih baik pada simulasi suhu tinggi. Mutan yang dapat mempertahankan struktur secara lebih baik atau yang lebih cepat mencapai kesetimbangan selama simulasi dianggap memiliki termostabilitas yang lebih baik. Untuk dapat membandingkan kestabilan antara mutan dan *wild type* secara lebih baik, analisis lain yang dapat dilakukan adalah dengan mempertimbangkan perubahan energi bebas ( $\Delta\Delta G$ ) antara mutan dengan *wild type*.

Selain itu, perlu juga dilakukan analisis pengaruh ikatan disulfida yang ditambahkan terhadap bentuk dan fleksibilitas kantung pengikat substrat atau sisi aktif enzim, sehingga mutasi yang dilakukan tidak mengurangi fungsi dan aktivitas enzim. Simulasi *molecular docking* pada struktur akhir enzim mutan hasil simulasi pada suhu tinggi juga dapat dilakukan untuk membandingkan termostabilitas mutan dan *wild type*. Lewat *molecular docking*, dapat dilakukan analisis interaksi antara substrat dan sisi aktif enzim mutan setelah simulasi suhu tinggi sebagai model untuk mempelajari sejauh mana aktivitas enzim mutan dipertahankan pada suhu yang lebih tinggi.

Penggunaan suhu tinggi hingga 700 K pada simulasi yang dilakukan dalam penelitian ini tidak menggambarkan seberapa besar peningkatan termostabilitas mutan yang dihasilkan jika dibandingkan dengan *wild type*. Untuk penelitian lebih lanjut, dapat dilakukan ekstrapolasi parameter-parameter simulasi mutan terhadap suhu, sehingga kualitas prediksi peningkatan termostabilitas mutan menjadi lebih baik.



## DAFTAR PUSTAKA

- Becker, O.M., Mackerell, A.D.Jr., Roux, B., Watanabe, M. (2001). *Computational Biochemistry and Biophysics*. New York: Marcel Dekker.
- Benson, N.C. dan Dagget, V. (2008). Dynamematics: Large-scale assesment of native protein flexibility. *Protein Science*, **17**: 2038-2050.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **28**: 235-242.
- Betz, S.F. (1993). Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science*, **2**: 1551-1558.
- Brumlik, M.J., van der Goot, F.G., Wong, K.R., Buckley, J.T. (1997) The disulfide bond in the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. *J. Bacteriol.*, **179**: 3116-3121.
- Buchner, J. dan Kiefhaber, T. (2005). *Protein folding handbook. Part I*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Bussi, G., Donadio, D., Parrinello, M. (2007). Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.*, **126**:014101.
- Chodorge, M., Fourage, L., Ullmann, C., Duvivier, V., Masson, J.-M., Levefre, F. (2005). Rational strategies for directed evolution of biocatalyst – Application to *Candida Antarctica* lipase B (CALB). *Adv. Synth. Catal.*, **347**: 1022-1026.
- Darden, T., York, D., Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **98**: 10089-10092.
- Day, R., Bennion, B.J., Ham, S., Daggett, V. (2002). Increasing temperature accelerates protein unfolding without changing the pathway of unfolding. *J. Mol. Biol.*, **322**: 189-203.
- Dombkowski, A.A. (2003). Disulfide by Design<sup>TM</sup>: a computational method for the rational design of disulfide bonds in proteins. *Bioinformatics*, **19**: 1852-1853.
- Eisenhaber, F., Lijnzaad, P., Argos, P., Sander, C., Scharf, M. (1995). The double cubic lattice method: Efficient approaches to numerical integration of surface area and volume, and to dot surface contouring of molecular assemblies. *Journal of Computational Chemistry*, **16**: 273-284.
- England, J.L. dan Haran, G. (2011). Role of solvation effects in protein denaturation: From thermodynamics to single molecules and back. *Annu. Rev. phys. Chem.*, **62**: 257-277.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M.L., Darden, T., lee, H., Pedersen, L.G. (1995). A smooth particle mesh Ewald potential. *J. Chem. Phys.*, **103**: 8577-8592.

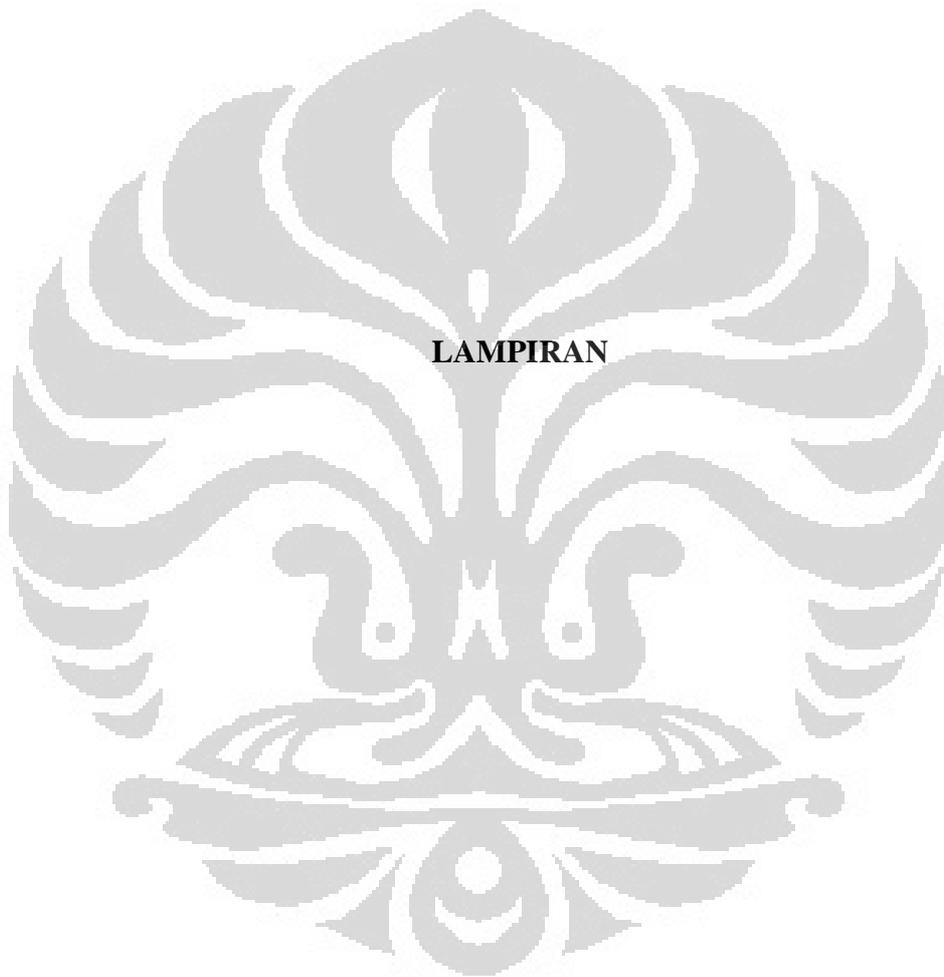
- Fernandez, L., Beerthuyzen, M.M., Brown, J., Siezen, R.J., Coolbear, T., Holland, R., Kuipers, O.P. (2000). Cloning, characterization, controlled overexpression, and inactivation of the major tributyrin esterase gene of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1360-1368.
- Frishman, D. dan Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **23**: 566-579.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Brooks, M.S., and Budge, S. (2010). Production of biodiesel by enzymatic transesterification: Review. *Am. J. Biochem. & Biotech.*, **6**(2): 54-76.
- Glick, B.R. dan Pasternak, J.J. (2003). *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. -3<sup>rd</sup> ed. Washington: ASM Press.
- Haefner, F. dan Norin, T. (1999). Molecular modelling of lipase catalyzed reactions, prediction of enantioselectivities. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**: 591-600.
- Haki, G.D. dan Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **89**: 17-34.
- Han, Z., Han, S., Zheng, S., Lin, Y. (2009). Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**: 117-126.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C., Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *J. Comp. Chem.*, **18**: 1463-1472.
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.*, **4**: 435-447.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, **14**: 33-38.
- Iso, M., Chen, B., Eguchi, m., Kudo, T., Shrestha, S. (2001). Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*, **16**: 53-58.
- Jeong, M, Kim, S., Yun, C., Choi, Y., Cho, S. (2007). Engineering a *de novo* internal disulfide bridge to improve the thermal stability of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *Journal of Biotechnology*, **127**: 300-309.
- Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W., Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, **79**: 926-935.
- Kim, H.S., Le, Q.A.T., Kim, Y. H. (2010). Development of thermostable lipase B from *Candida antarctica* (CalB) through *in silico* design employing B-factor and RosettaDesign. *Enzyme and Microbial Technology*, **47**: 1-5.
- Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y. Suh, S.W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a

- highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure*, **5**: 173-185.
- Klaus, D. (1998). An enzyme process for the physical refining of seed oils. *Chem. Eng. Technol.*, **21**: 278-281.
- Korkegian, A., Black, M.E., Baker, D., Stoddard, B.L. (2005). Computational thermostabilization of an enzyme. *Science*, **308**: 857-860.
- Kumar, S. dan Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**: 1216-1233.
- Kumar, S., Tsai, C., Nussinov, R. (1999). Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.*, **13**: 179-191.
- Kuzmanic, A. dan Zagrovic, B. (2010). Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. *Biophys. J.*, **98**: 861-871.
- Kwon, Hoon, C., Shin, D.Y., Lee, J.H., Kim, S.W., Kang, J.W. (2007). Molecular modeling and its experimental verification for the catalytic mechanism of *Candida antarctica* Lipase B. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **17**: 1098-1105.
- Leeuw, S.W.D., Perram, J.W., Smith, E.R. (1980). Simulation of electrostatic systems in periodic boundary conditions. II. Equivalence of boundary conditions. *Proc. Roy. Soc. of London, Ser. A Math. Phys. Sci.*, **373**: 57-66.
- Li, A. dan Daggett, V. (1994). Characterization of the transition state of protein unfolding by use of molecular dynamics: Chymotrypsin inhibitor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10430-10434.
- Li, Y., Coutinho, P.M., Ford, C. (1998). Effect on thermostability and catalytic activity of introducing disulfide bonds into *Aspergillus awamori* glucoamylase. *Protein Engineering*, **11**: 661-667.
- Liebeton, K., Zacharias, A., Jaeger, K.E. (2000). Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. *J. Bacteriol.*, **183**: 597-603.
- Liu, H. dan Wang, W. (2003). Protein engineering to improve the thermostability of glucoamylase from *Aspergillus awamori* based on molecular dynamics simulations. *Protein Engineering*, **16**: 19-25.
- Lyman, E. dan Zuckerman, D.M. (2006). Ensemble-based convergence analysis of biomolecular trajectories. *Biophys. J.*, **91**: 164-172.
- Marchetti, J.M., Miguel, V.U., Errazu, A.F. (2007). Possible methods for biodiesel production. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **11**(6): 1300-1311.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1258**: 272-276.
- McCammon, J.A., Gelin, B.R., Karplus, M. (1997). Dynamics of folded proteins. *Nature*, **267**: 585-590.

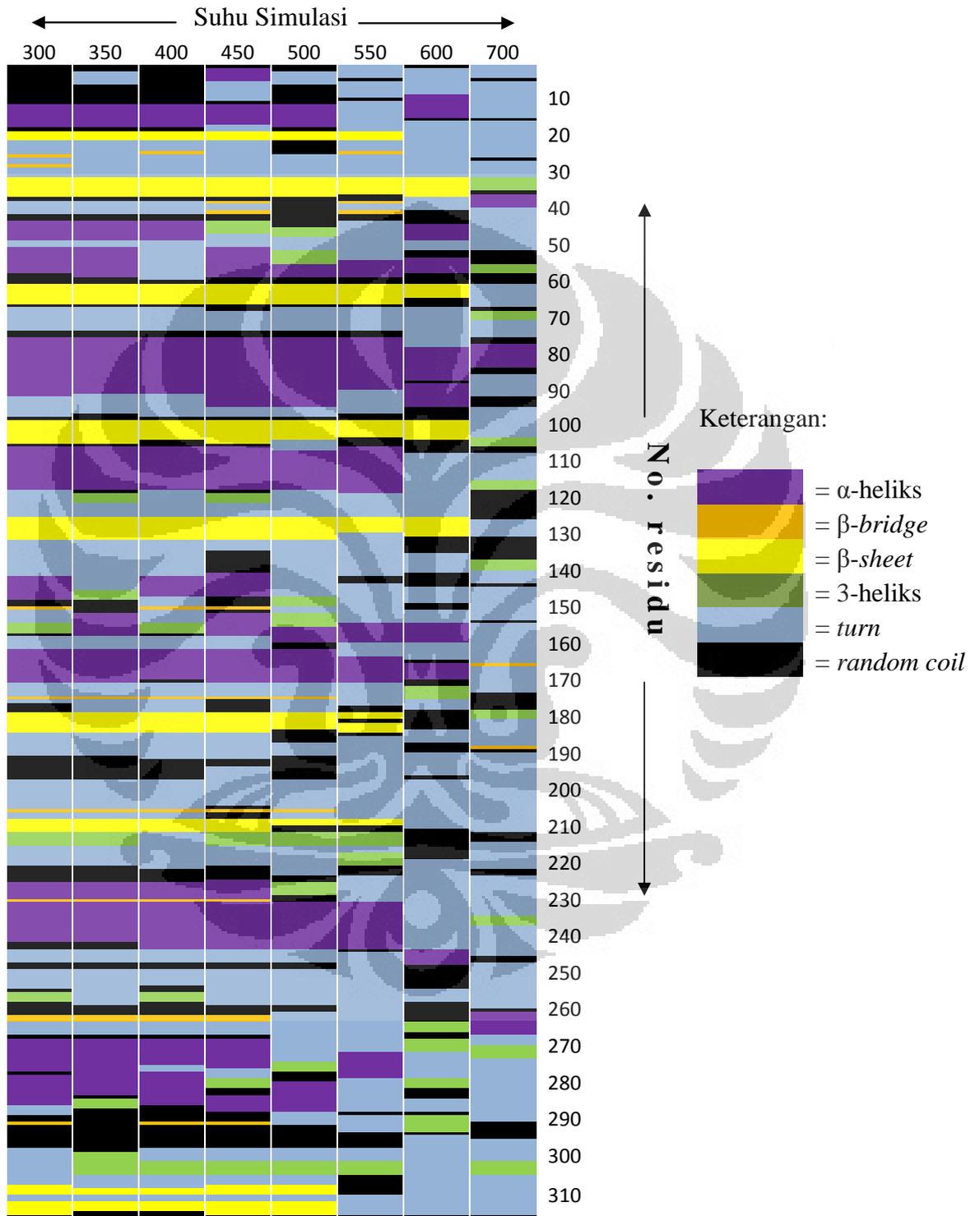
- Mittlebach, M. (1990). Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. *JAOCS*, **67**(3): 168-170.
- Myers, J.K. dan Pace, C.N. (1996). Hydrogen bonding stabilizes globular proteins. *Biophysical Journal*, **71**: 2033-2039.
- Nardini, M. dan Dijkstra, B.W. (1999).  $\alpha/\beta$  hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current opinion in Structural Biology*, **9**: 732-737.
- Nurbaiti, S. (2009) Stabilitas termal dan pergerakan dinamis klenow-like DNA polimerase I ITB-1 berdasarkan simulasi dinamika molekul. Disertasi Program Studi Kimia Institut Teknologi Bandung.
- Ollis, D.L. Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, m., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. (1992). The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering*, **5**: 197-211.
- Ong, A.L., Kamaruddin, A.H., Bhatia, S., Long, W.S., Lim, S.T., Kumari. R. (2006). Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (R)-ketoprofen. *Enzyme and Microbial Technology*, **39**: 924-929.
- Parthasarathy, S. dan Murthy, M.R.N. (2000). Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (*B values*). *Protein Engineering*, **13**: 9-13.
- Paschek, D., Day, R., Garcia, A.E. (2011). Influence of water-protein hydrogen bonding on the stability of Trp-cage miniprotein. A comparison between the TIP3P and TIP4P-Ew water models. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **13**: 19840-19847.
- Patel, R.N., Banerjee, A., Nanduri, V., Goswami, A., Comezoglu, F.T. (2000). Enzymatic resolution of racemic secondary alcohols by lipase B from *Candida antarctica*. *JAOCS*, **77**: 1015-1019.
- Peeters, J.W., Leeuwen, O. van, Palmans, A.R.A., Meijer, E.W. (2005). Lipase-catalyzed ring-opening polymerizations of 4-substituted  $\epsilon$ -caprolactones: Mechanistic consideration. *Macromolecules*, **38**: 5587-5592.
- Pikkemaat, M.G., Linssen, A.B.M., Berendsen H.J.C., Janssen, D.B. (2002). Molecular dynamics simulations as a tool for improving protein stability. *Protein Engineering*, **15**(3): 185-192.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, **93**: 67-80.
- Ponder, J.W. dan Case, D.A. (2003). Force fields for protein simulations. *Advances in protein Chemistry*, **66**: 27-85.
- Purmonen, M., Valjakka, J., Takkinen, K., Laitinen, T., Rouvinen, J. (2007). Molecular dynamics studies on the thermostability of family 11 Xylanases. *Protein Engineering, Design & Selection*, **20**: 551-559.

- Robic, S. (2010). Mathematics, thermodynamics, and modeling to address ten common misconceptions about protein structure, folding and stability. *Life Sciences Education*, **9**: 189-195.
- Roux, B., Allen, T., Berneche, S. Im, W. (2004). Theoretical and computational models of biological ion channels. *Quart. Rev. Biophys.* **37**: 15-103.
- Sandstrom, A.G., Engstrom, K., Nyhlen, J., Kasrayan, A., Backvall J.-E. (2009). Directed evolution of *Candida antartica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. *Protein Engineering, Design & Selection*, **22**(7): 413-420.
- Santarossa, G., Lafranconi, P.G., Alquati, C., DeGioia, L., Alberghina, L., Fantucci, P., Lotti, M. (2005). Mutation in the "lid" region affect chain length specificity and thermostability of a *Pseudomonas fragii* lipase. *FEBS Letters*, **579**: 2383-2386.
- Seshasayee, A.S.N. (2005). High-temperature unfolding of a Trp-cage mini-protein: a molecular dynamic study. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, **2**:7.
- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, **19**: 627-662.
- Smith, L.J., Daura, X., van Gunsteren, W.F. (2002). Assessing equilibration and convergence in biomolecular simulations. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **48**: 487-496.
- Suen, W.-C., Zhang, N., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A. (2004). Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. *Protein Engineering, Design & Selection*, **17**(2): 133-140.
- Trodler, P. dan Pleiss, J. (2008). Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology*, **8**: doi:10.1186/1472-6807-8-9.
- Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A. (1994). The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure*, **2**: 293-308.
- Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleyweg, G.J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T.A. (1995). Crystallographic and molecular modeling studies of Lipase B from *Candida antarctica* reveals a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*, **34**: 16838-16851.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., Berendsen, H.J.C. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comp. Chem.*, **26**: 1701-1719.
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., van Buuren, A.R., Apol, E., Meulenhoff, P.J., tieleman, D.P., Sijbers, A.L.T.M., Feenstra, K.A., van Drunen, R., Berendsen, H.J.C. (2010). Gromacs user manual version 4.5.4. [www.gromacs.com](http://www.gromacs.com).

- van Gunsteren, W.F. (1998). Validation of molecular dynamics simulation. *Journal of Chemical Physics*, **108**:6109-6116.
- Vieille, C. dan Zeikus, G.J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**: 1-43.
- Wang, J., Cieplak, P., Kollman, P.A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comp. Chem.*, **21**: 1049-1074.
- Woycechowsky, K., Wittrup, K.D., Raines, R.T. (1999). A small-molecule catalyst of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Chemistry & Biology*, **6**: 871-879.
- Woycechowsky, K.J. dan Raines, R.T. (2000). Native disulfide formation in proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**: 533-539.
- Xu, Y., Du, W., Liu, D., Zeng, J. (2003). A novel enzymatic route for biodiesel production from renewable oils in a solvent-free medium. *Biotechnology letters*, **25**: 1239-1241.
- Yamaguchi, S., Takeuchi, K., mase, T., Oikawa, K., McMullen, T., Derewenda, U., McElhaney, R.N., Kay, C.M., Derewenda, Z.S. (1996). The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono and diglyceride specific lipase. *Protein Engineering*, **9**(9): 789-795.
- Yan, C. Pattani, V., Tunnel, J.W., Ren. P. (2010). Temperature-induced unfolding of epidermal growth factor (EGF): Insight from molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **29**: 2-12.
- Zhang, J., Zhang, K. Zhou, L. (2004). Thermostability of protein studied by molecular dynamics simulation. *J. Biomo. Struct. Dyn.*, **21**: 657-662.
- Zhang, N., Suen, W., Windsor, W., Xiao, L., Madison, V., Zaks, A. (2003). Improving tolerance of *candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein Engineering*, **16**: 599-605.
- Zhao, L., Wang, J., Dou, X., Cao, Z. (2009). Studying the unfolding process of protein G and protein L under physical property space. *BMC Bioinformatics*, **10**(Suppl 1): S44.

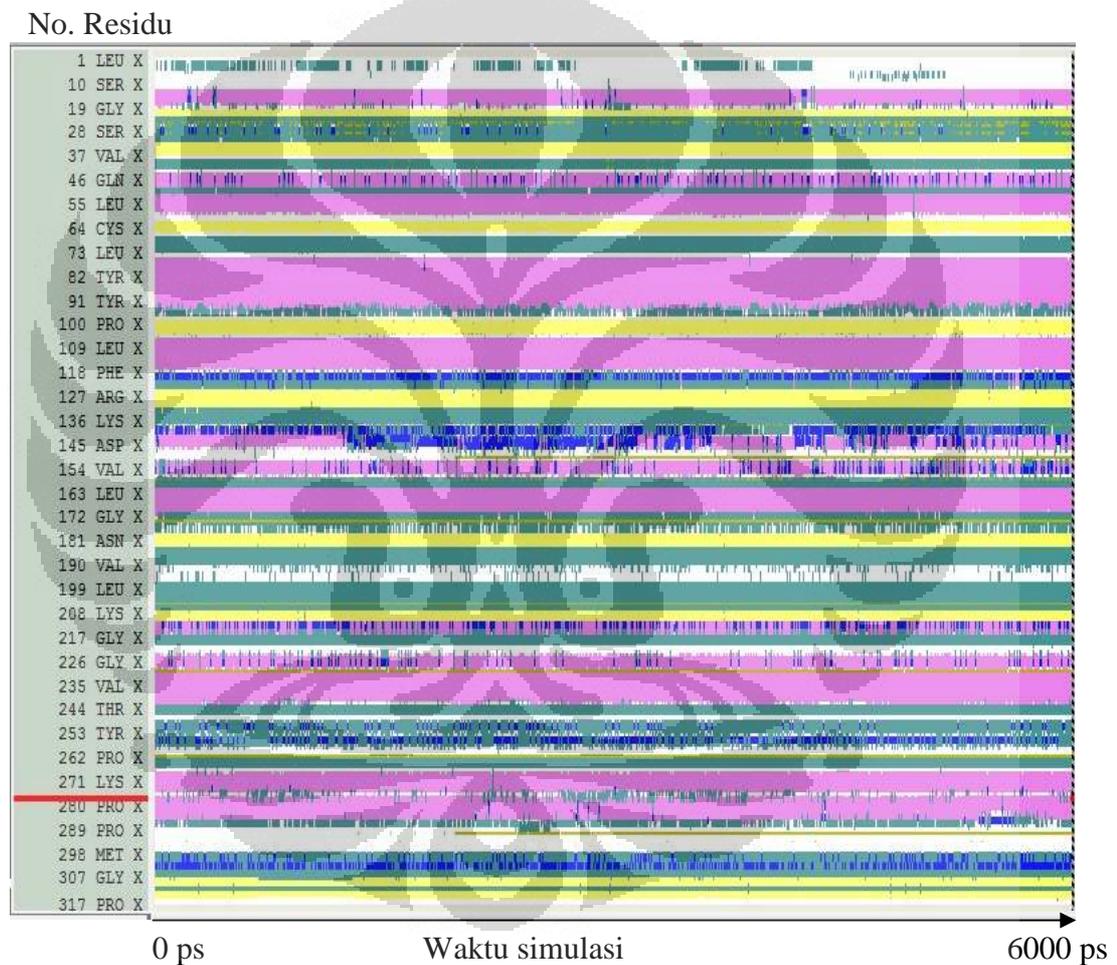
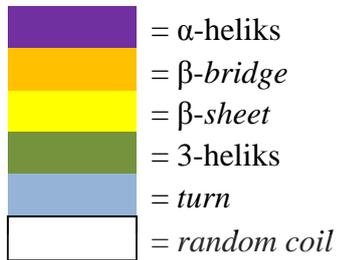


### Lampiran 1: Analisis struktur sekunder konformasi akhir simulasi



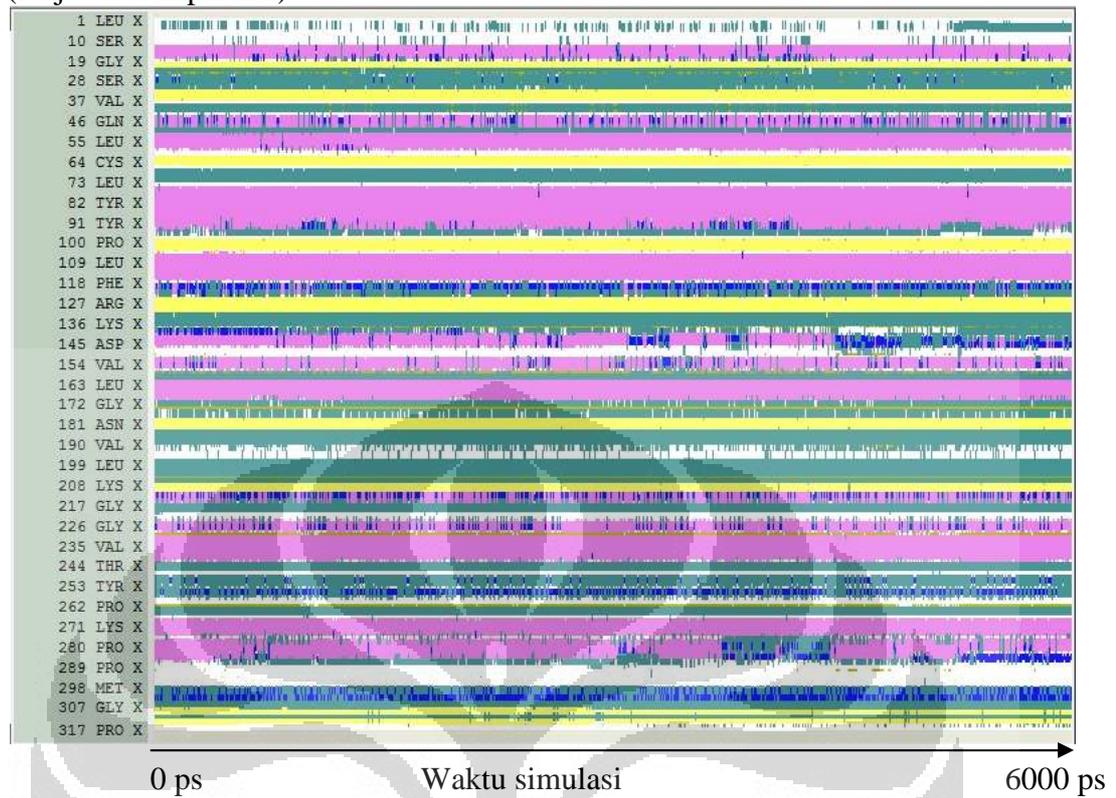
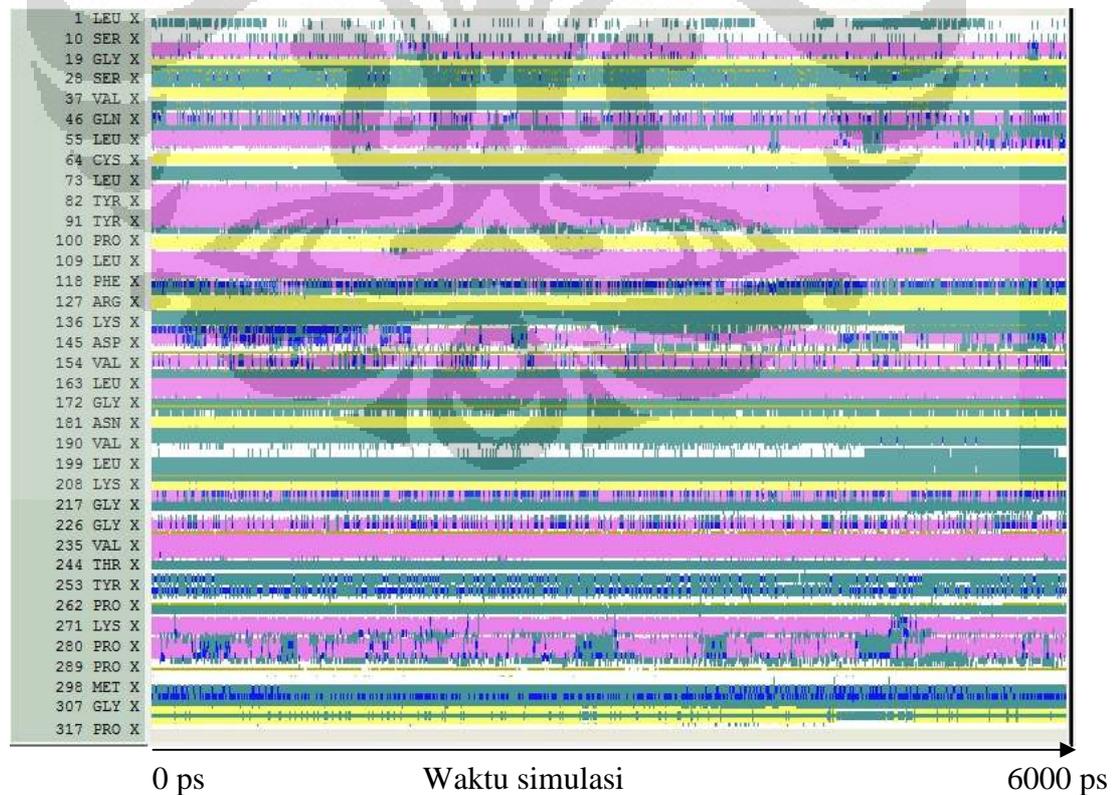
## Lampiran 2: Analisis struktur sekunder selama waktu simulasi

Keterangan:

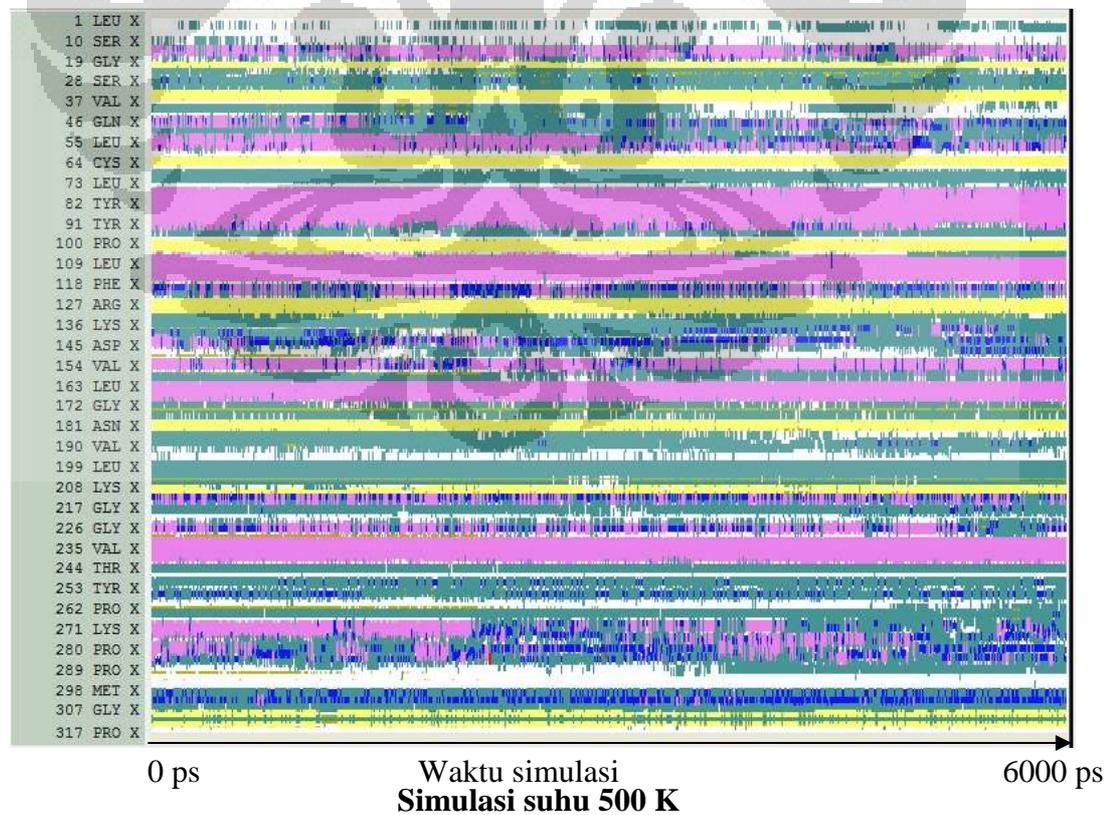
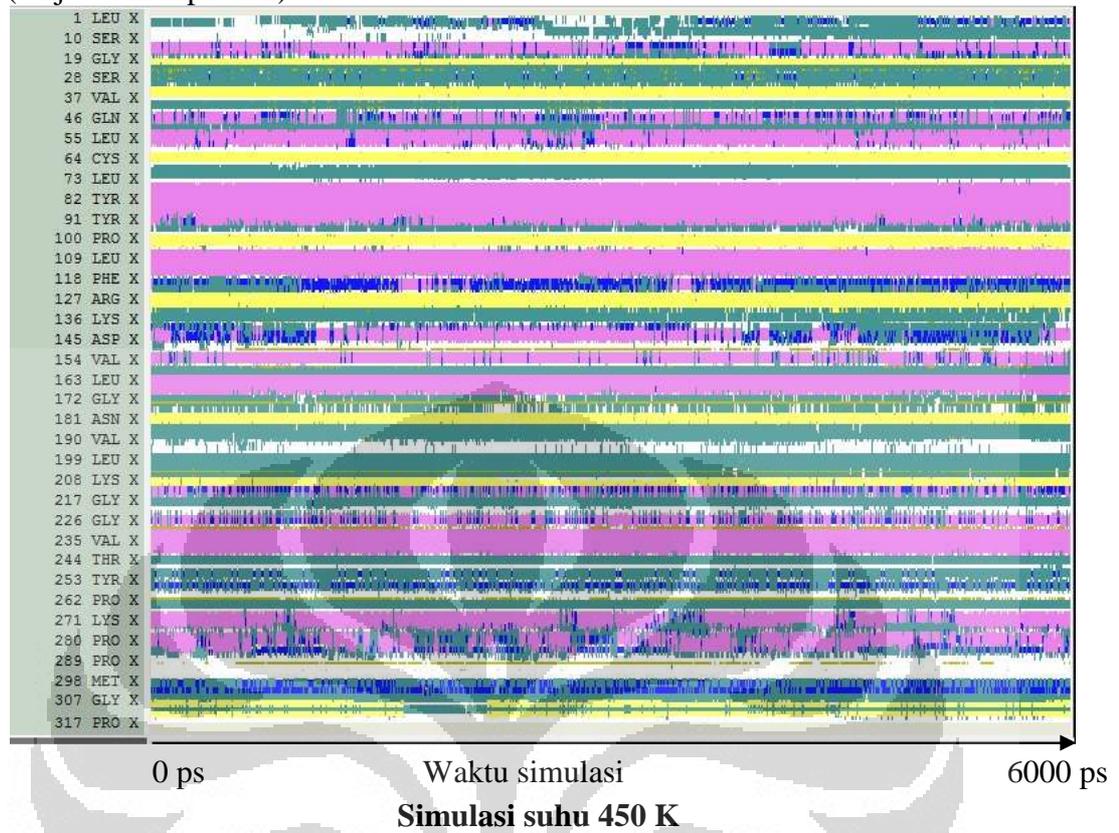


**Simulasi 300 K**

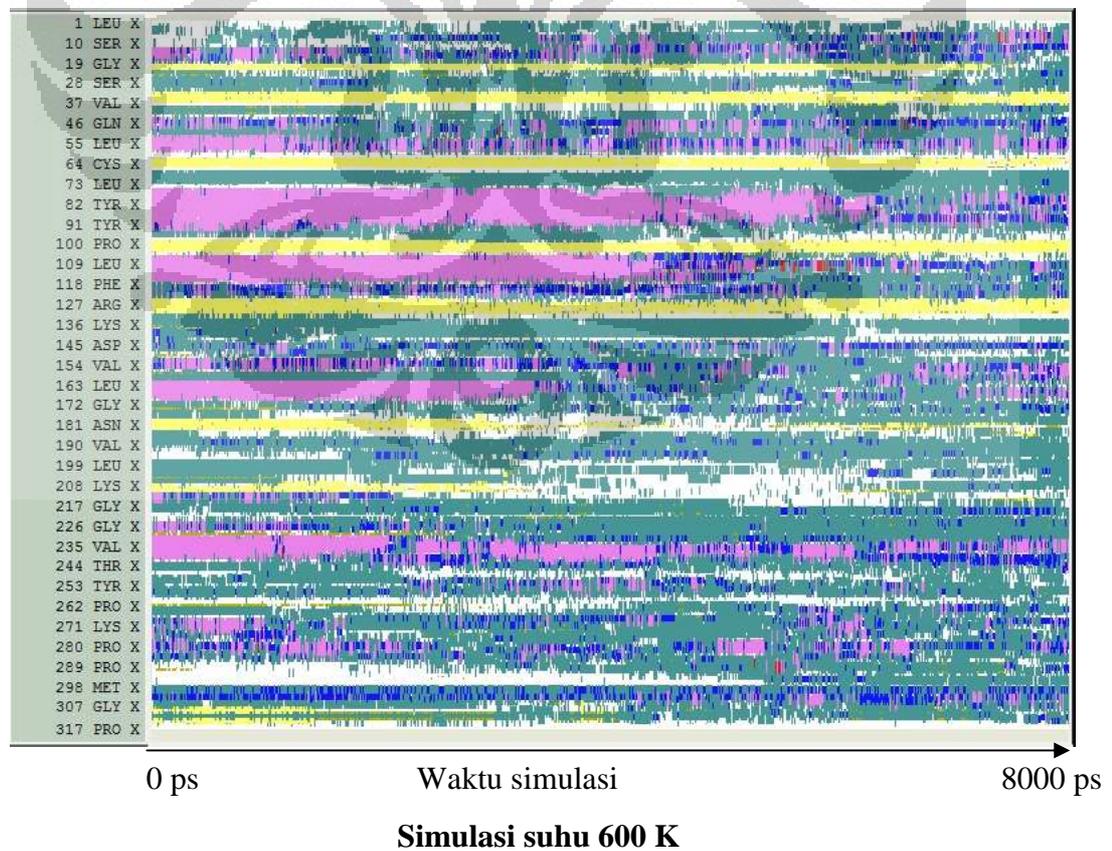
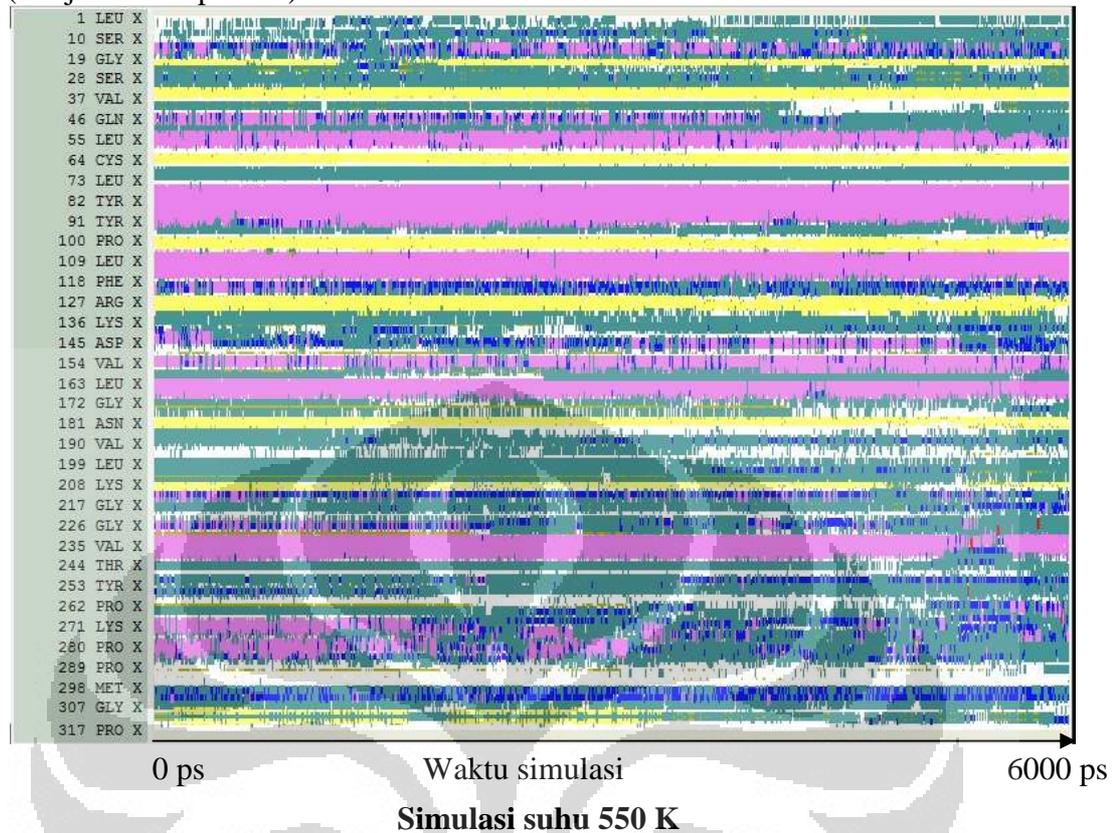
(lanjutan Lampiran 2)

**Simulasi suhu 350K****Simulasi suhu 400K**

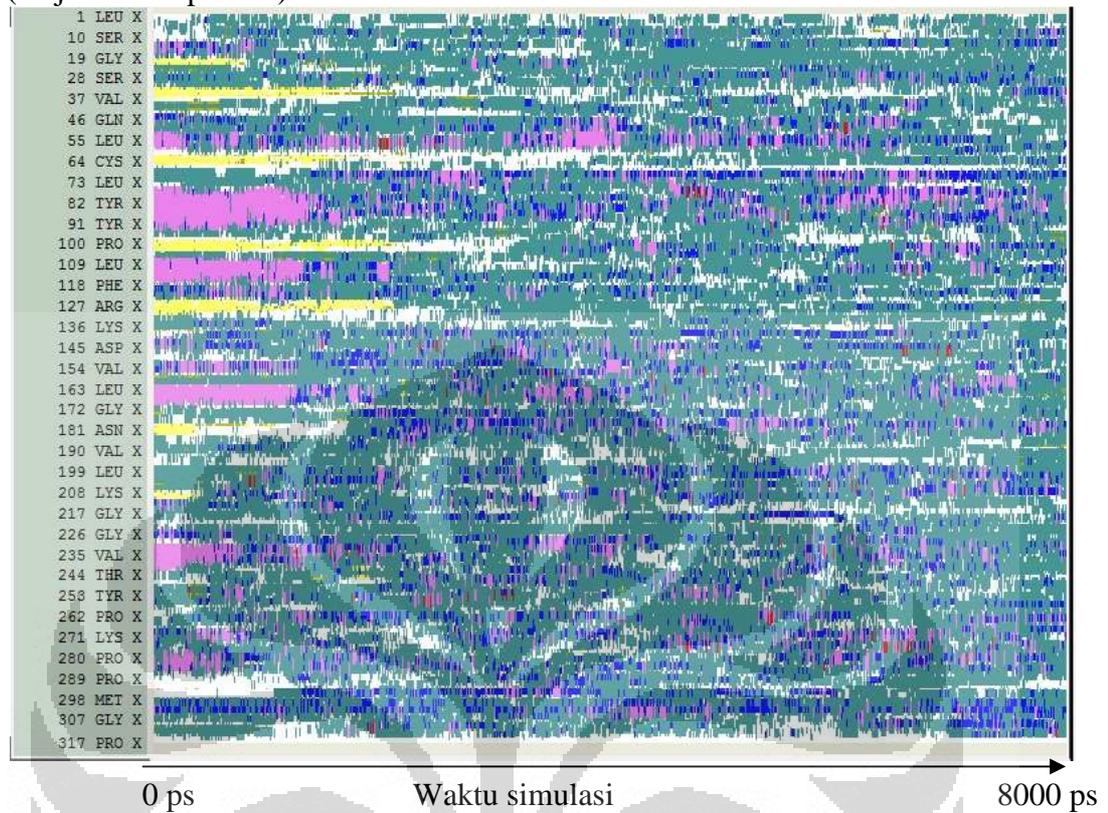
(lanjutan Lampiran 2)



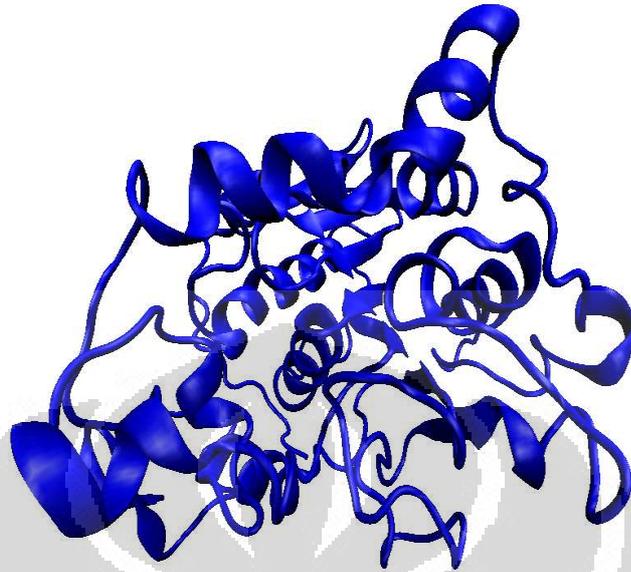
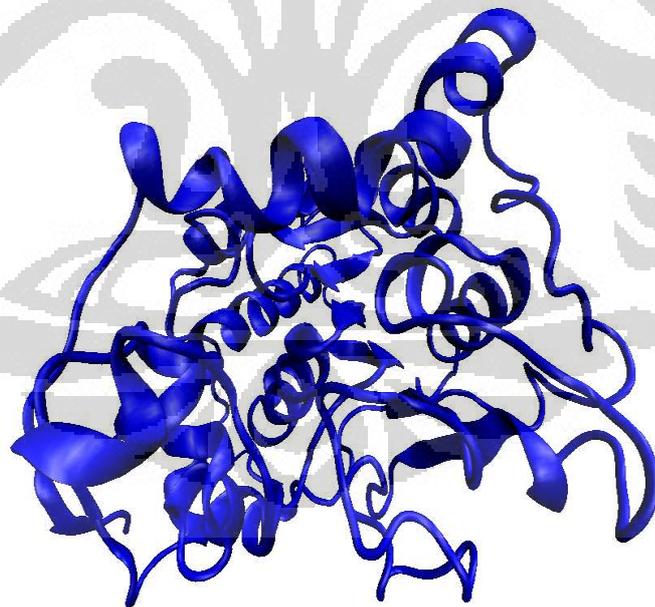
(Lanjutan Lampiran 2)



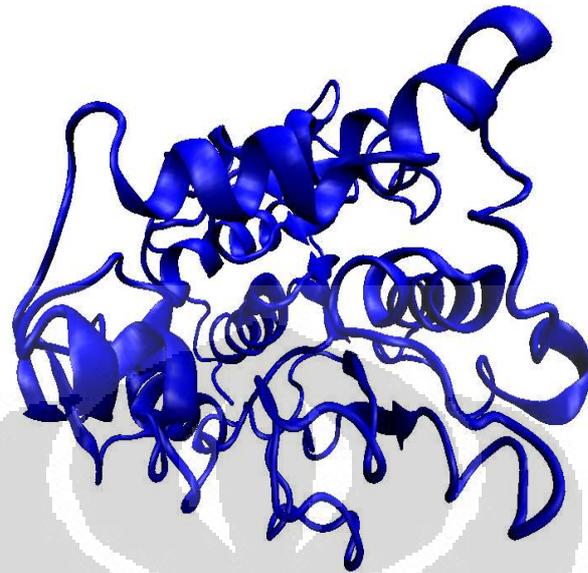
(lanjutan Lampiran 2)



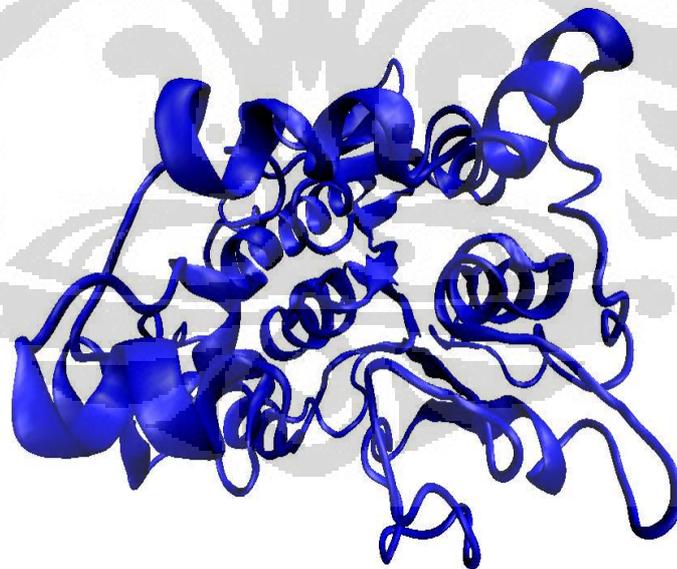
**Simulasi suhu 700 K**

**Lampiran 3: Konformasi akhir simulasi****Konformasi akhir simulasi suhu 300 K****Konformasi akhir simulasi suhu 350 K**

(lanjutan Lampiran 3)

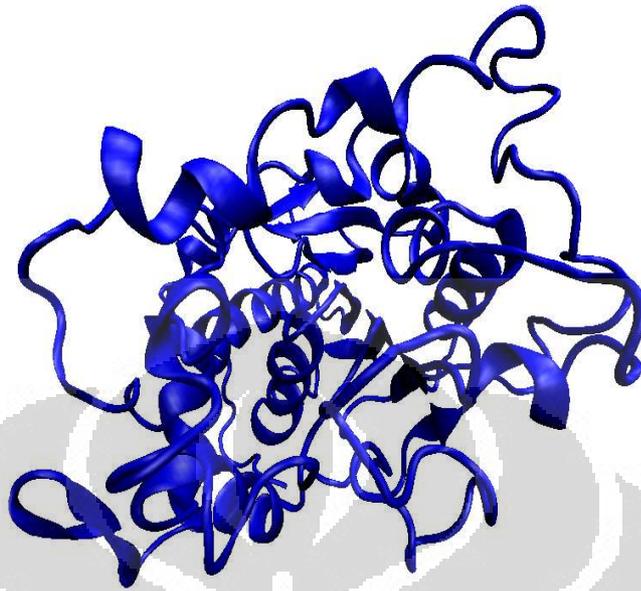


**Konformasi akhir simulasi suhu 400 K**

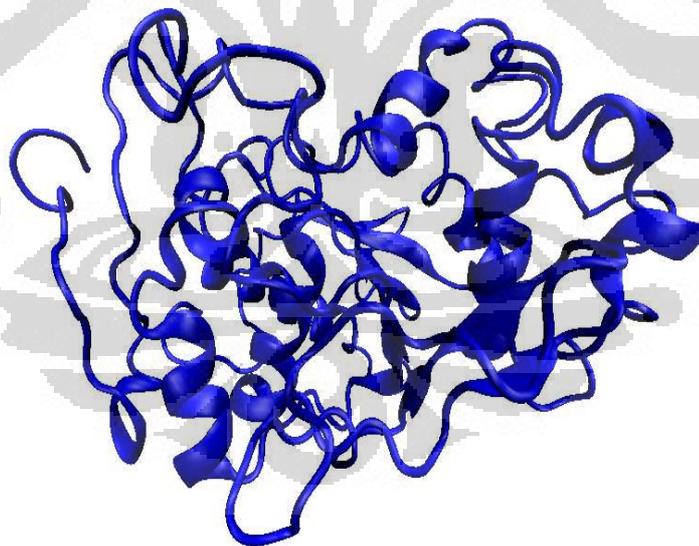


**Konformasi akhir simulasi suhu 450 K**

(lanjutan Lampiran 3)

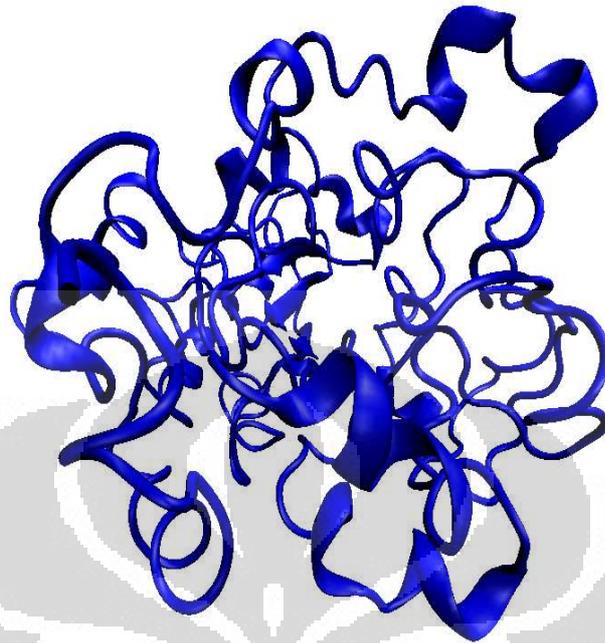


**Konformasi akhir simulasi suhu 500 K**

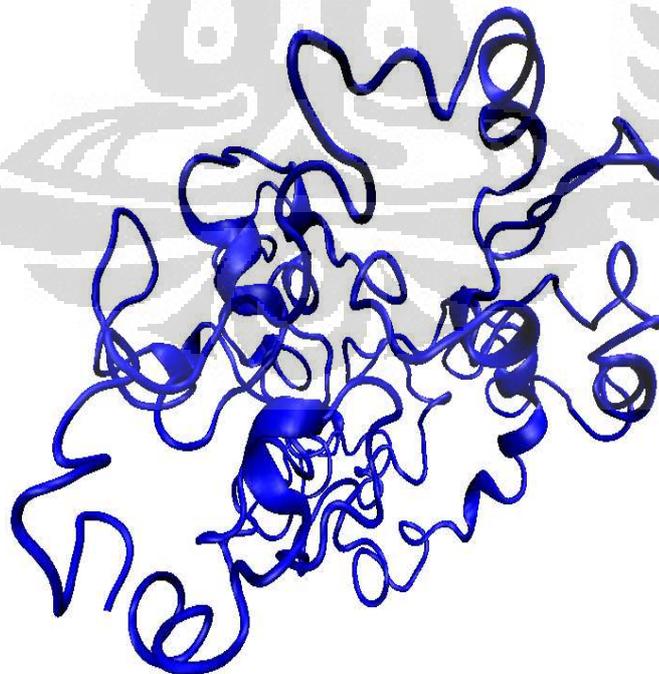


**Konformasi akhir simulasi suhu 550 K**

(lanjutan Lampiran 3)

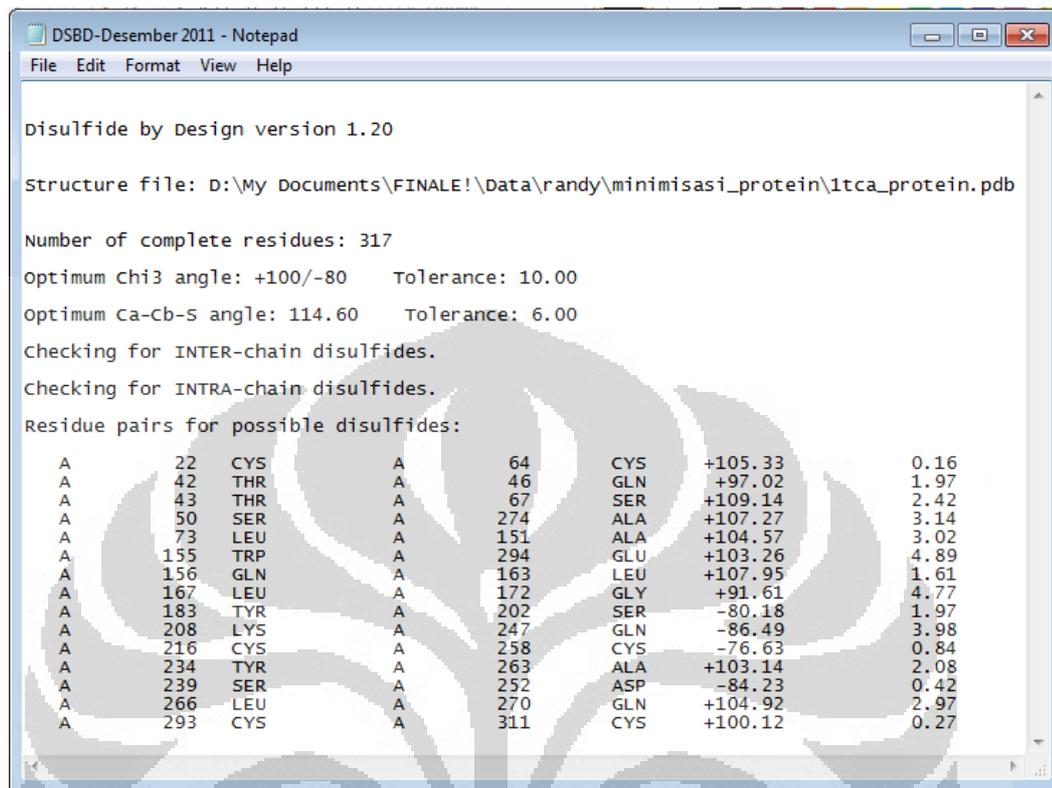


**Konformasi akhir simulasi suhu 600 K**



**Konformasi akhir simulasi suhu 700 K**

#### Lampiran 4: Prediksi mutasi hasil keluaran perangkat lunak “Disulfide by Design<sup>TM</sup>,”



```

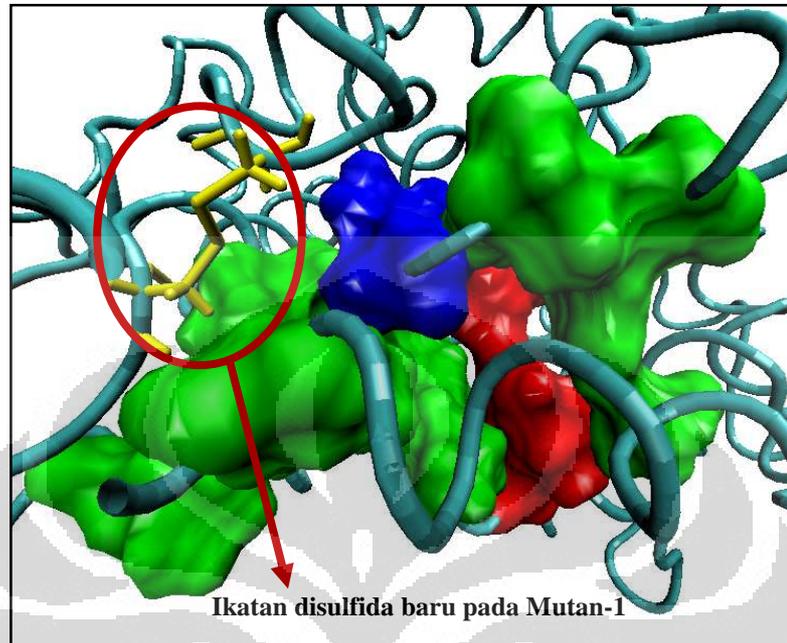
DSBD-Desember 2011 - Notepad
File Edit Format View Help

Disulfide by Design version 1.20

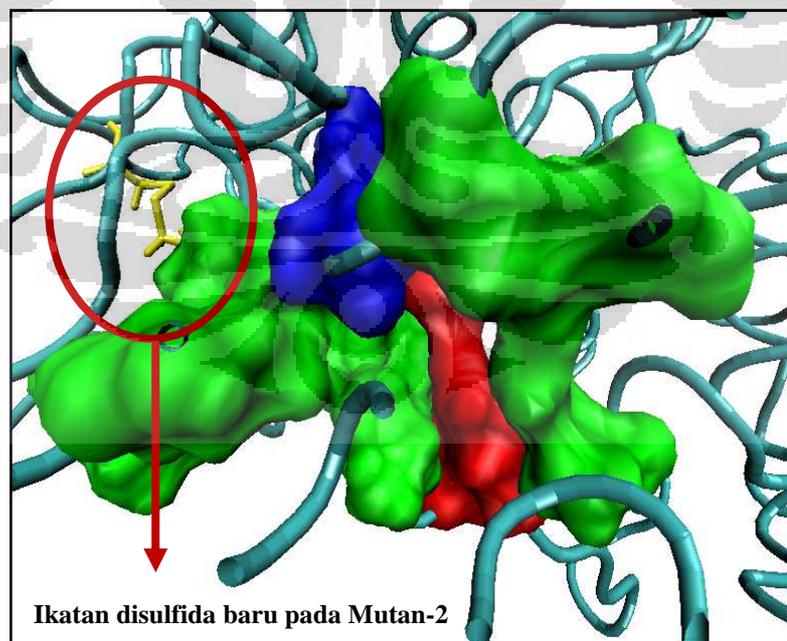
Structure file: D:\My Documents\FINALE!\Data\randy\minimisasi_protein\1tca_protein.pdb

Number of complete residues: 317
Optimum Chi3 angle: +100/-80   Tolerance: 10.00
Optimum Ca-Cb-S angle: 114.60   Tolerance: 6.00
Checking for INTER-chain disulfides.
Checking for INTRA-chain disulfides.
Residue pairs for possible disulfides:
A      22  CYS      A      64  CYS    +105.33    0.16
A      42  THR      A      46  GLN    +97.02     1.97
A      43  THR      A      67  SER    +109.14    2.42
A      50  SER      A     274  ALA    +107.27    3.14
A      73  LEU      A     151  ALA    +104.57    3.02
A     155  TRP      A     294  GLU    +103.26    4.89
A     156  GLN      A     163  LEU    +107.95    1.61
A     167  LEU      A     172  GLY    +91.61     4.77
A     183  TYR      A     202  SER    -80.18     1.97
A     208  LYS      A     247  GLN    -86.49     3.98
A     216  CYS      A     258  CYS    -76.63     0.84
A     234  TYR      A     263  ALA    +103.14    2.08
A     239  SER      A     252  ASP    -84.23     0.42
A     266  LEU      A     270  GLN    +104.92    2.97
A     293  CYS      A     311  CYS    +100.12    0.27
  
```

**Lampiran 5: Konformasi dan letak penambahan ikatan disulfida pada Mutan-1, Mutan-2, dan Mutan-3**

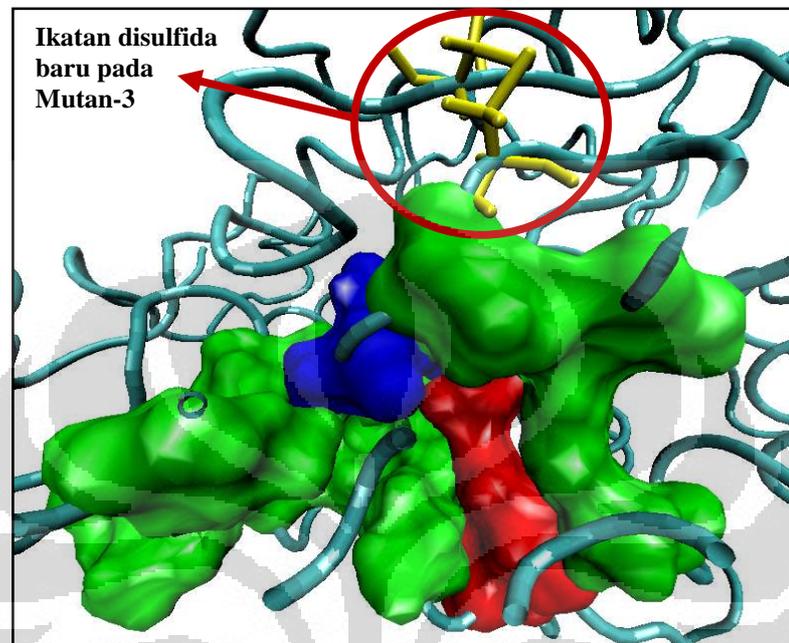


**Ikatan disulfida antara residu 73 dan 151 yang ditambahkan pada Mutan-1**  
(Ket. Hijau = *binding pocket*, merah = sisi katalitik, biru = *oxyanion hole*)



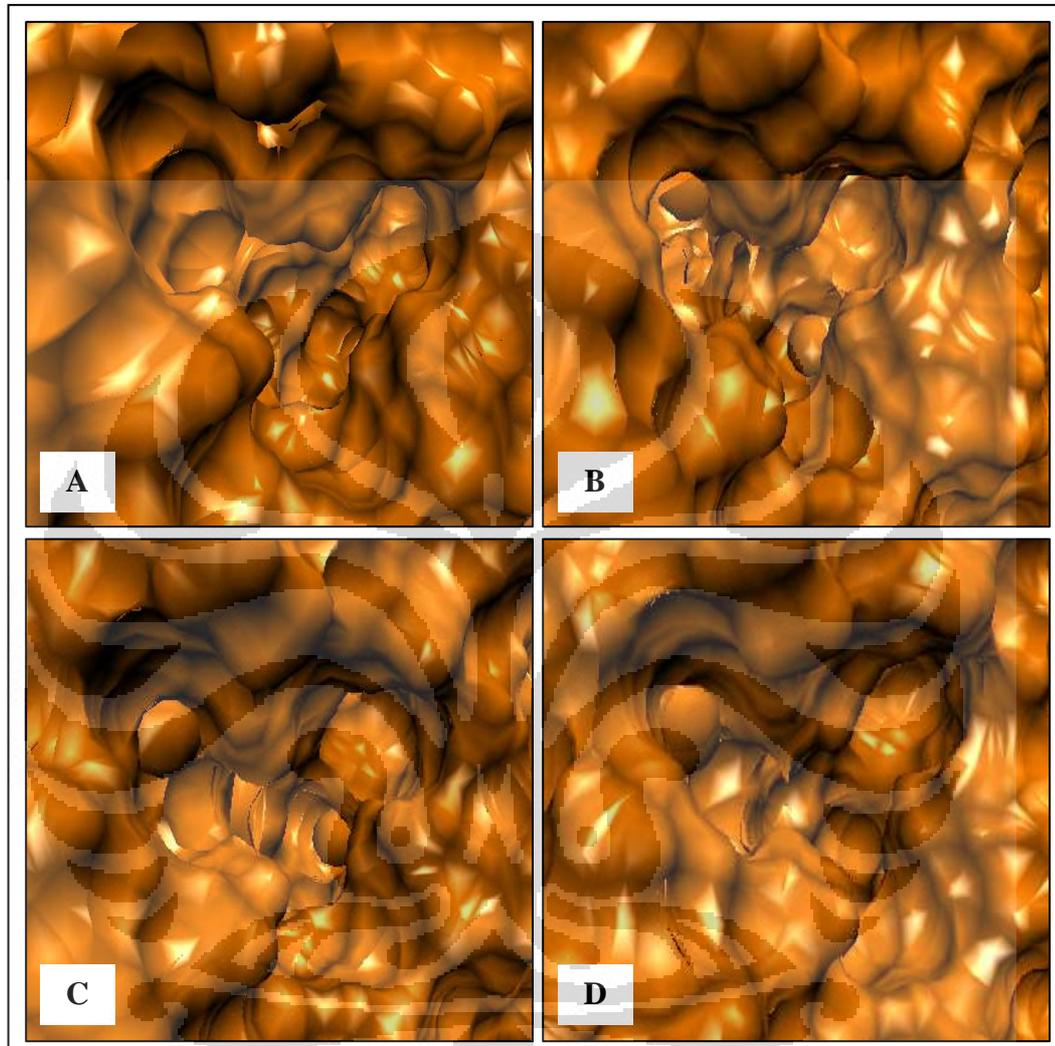
**Ikatan disulfida antara residu 155 dan 294 yang ditambahkan pada Mutan-2**  
(Ket. Hijau = *binding pocket*, merah = sisi katalitik, biru = *oxyanion hole*)

(lanjutan Lampiran 5)



**Ikatan disulfida antara residu 43 dan 67 yang ditambahkan pada Mutan-3**  
(Ket. Hijau = *binding pocket*, merah = sisi katalitik, biru = *oxyanion hole*)

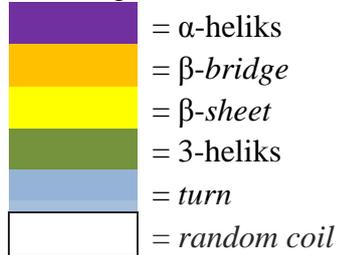
**Lampiran 6: Kantung pengikatan substrat pada Mutan-1, Mutan-2, Mutan-3  
dan *wild type***



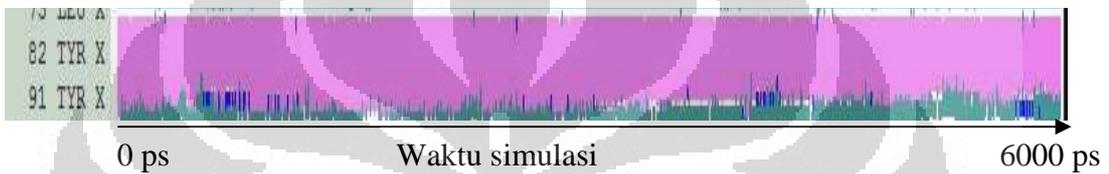
**Kantung pengikat substrat pada (A) Mutan-1, (B) Mutan-2, (C) Mutan-3,  
dan (D) *wild type***

**Lampiran 7: Analisis perubahan struktur sekunder Mutan-1, Mutan-2, dan Mutan-3 selama simulasi suhu 550 K**

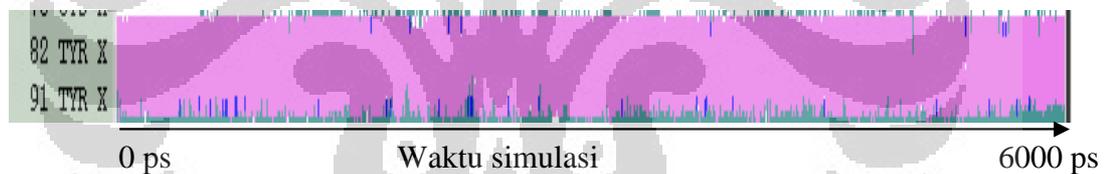
Keterangan:



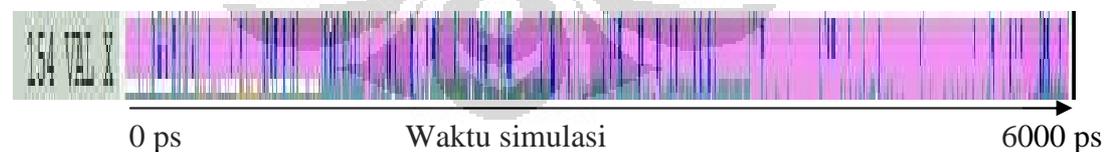
**1. Mutan-1**



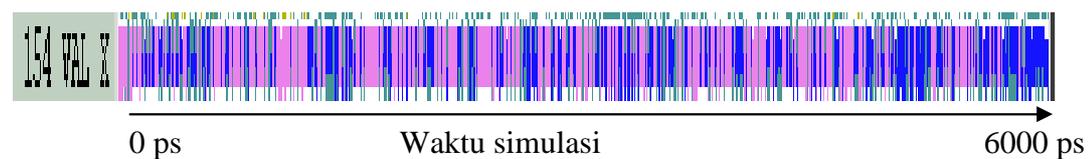
**Heliks 3 (76-93) *wild type***



**Heliks 3 (76-93) Mutan-1**



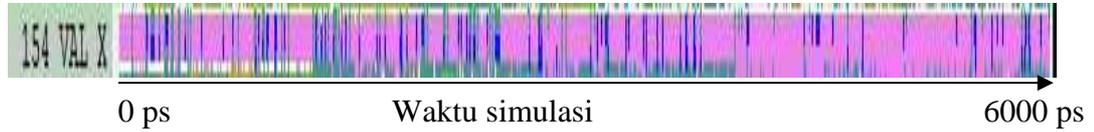
**Heliks 6 (152-156) *wild type***



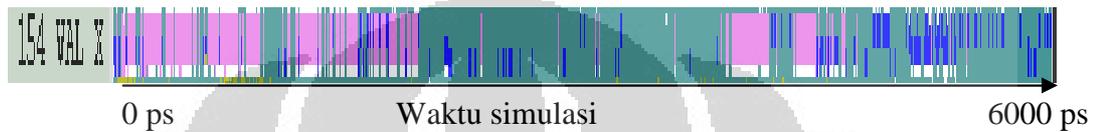
**Heliks 6 (152-156) Mutan-1**

(lanjutan Lampiran 7)

### 1. Mutan-2



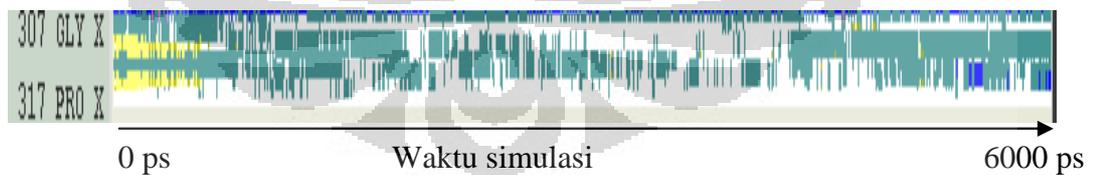
**Heliks 6 (152-156) *wild type***



**Heliks 6 (152-156) Mutan-2**



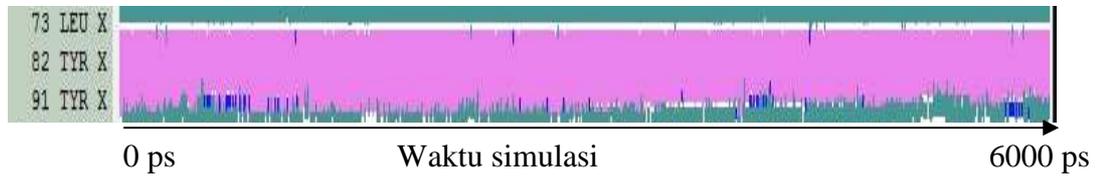
**Sheet 8 (309-310) & sheet 9 (313-314) *wild type***



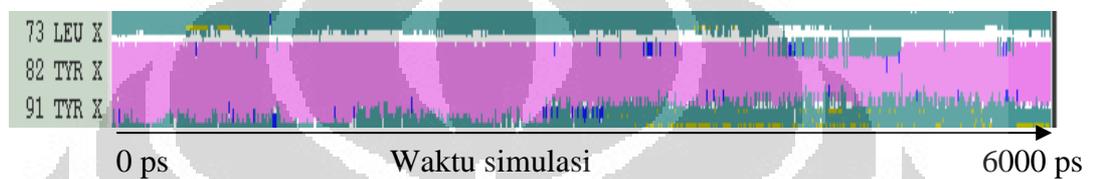
**Sheet 8 (309-310) & sheet 9 (313-314) Mutan-2**

(lanjutan Lampiran 7)

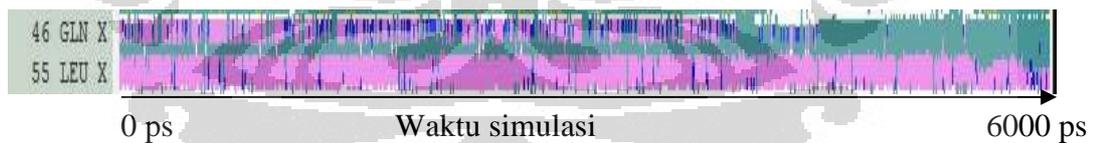
### 3. Mutan-3



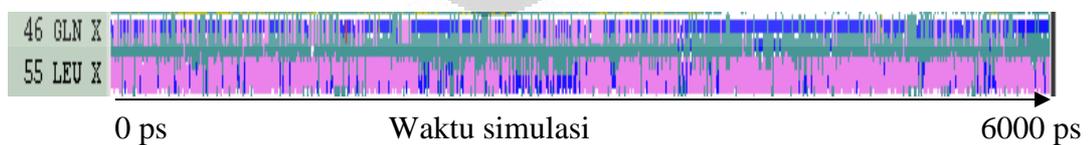
**Heliks 3 (76-93) wild type**



**Heliks 3 (76-93) Mutan-3**



**Heliks 2 (44-57) wild type**



**Heliks 2 (44-57) wild type**

### Lampiran 8. Diagram alir metode penelitian

