

Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan Kestabilan Termal Enzim *Xilanase Aspergillus niger*

Nya Daniaty malau^{*1}, Manogari Sianturi²

^{1,2}Program Studi Pendidikan Fisika, Universitas Kristen Indonesia
Jln. Mayjend Sutoyo, No.2, Cawang, Jakarta Timur, 13630

*e-mail: malaunyadaniaty@gmail.com

Abstract

Enzymes are the same biomolecules such as proteins, has only a functional difference. Enzymes are biocatalyst that recently applied to many industrial fields. To be applied in the field of industrial enzymes should be enhanced stability against temperature. Analysis of the salt bridge is able to demonstrate the potential of residues mutated to improve thermal stability. Molecular dynamics simulations performed by observing the unfolding process. Variations in temperature used is 400 K, 450 K and 500 K, respectively performed for 2.5 ns. Then analyzed the pair a salt bridge is formed. There are 25 pairs of salt bridges at a temperature of 400 K, 24 pairs of salt bridges at a temperature of 450 K, and there are 30 pairs of the salt bridge is formed at a temperature of 500 K. To determine the salt bridge partner is a key enzyme kestabilan we then plotted salt bridge between distances (Å) with time (ns) only at a temperature of 500 K, for allegedly at these temperatures has been a process of unfolding. Of the 30 pairs of the salt bridge that had plotted the distance with time, the pair obtained a salt bridge that pattern similar to the pattern chart graph analysis Root-mean-square deviation (RMSD). There are three curves salt bridge that pattern is similar to the pattern of RMSD curve and SASA, namely the salt bridge Glu84-Arg134, Asp104-Arg134 and Asp113-Arg115. The sharp rise in the value of RMSD and the resulting rupture SASA three pairs of the salt bridges. So when carried mutations in-silico candidate mutants that will be transferred is the amino acid residues are thought to play a role in electrostatic interactions and replace it with another amino acid residue on the basis of structural similarities.

Keywords: Salt bridge, Electrostatic bond, Mutation, Unfolding

PENDAHULUAN

Protein merupakan penyusun kunci dari sel-sel hidup dan terlibat dalam semua proses dalam kehidupan. Protein disusun dari monomer nya yang disebut asam amino. Terdapat 20 jenis asam amino di alam yang merupakan penyusun semua jenis protein. Asam amino – asam amino tersebut dirangkai dalam ikatan peptida. Komposisi asam amino dalam ikatan peptida akan menentukan sifat dari struktur protein.

Struktur protein dibagi atas 4 bagian yaitu struktur primer, struktur sekunder, struktur tertier dan kuartener (Triwibowo Yuwono, 2005).

Beragamnya fungsi protein terletak tidak saja dari keragaman susunan asam aminonya tetapi karena keragaman struktur tiga dimensi (struktur sesungguhnya) yang membentuk protein itu sendiri. Fungsi protein hanya dapat ditafsirkan dari

strukturnya (Szilágyi et al, 2007). Untuk memperoleh bentuk aktifnya secara biologi, protein dengan struktur sekunder akan mengalami pelipatan (*folding*) untuk dapat mencapai struktur aslinya. Pelipatan protein di dalam sel merupakan proses kompleks yang membutuhkan bantuan molekul lain dan energi. Kegagalan suatu protein dalam proses *folding* protein (*misfolding*) ini dapat menyebabkan malfungsi berbagai sistem biologis yang dapat menimbulkan berbagai penyakit, seperti *Alzheimer*, *parkinson*, katarak dan kanker.

Untuk menentukan struktur tiga dimensi protein dapat dilakukan dengan teknik X-ray cristallography untuk melihat struktur protein dalam bentuk padat/kristal dan teknik *Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy* untuk melihat struktur protein dalam cairan serta dapat memberikan informasi struktural pada keadaan *unfoalded* yang penting dalam karakterisasi proses pelipatan protein. Tetapi teknik ini membutuhkan biaya yang besar dan waktu yang cukup lama jika digunakan untuk mengamati proses pelipatan protein. Karena tidak efisien maka ditemukan teknik baru yaitu dengan Simulasi dinamika molekuler.

Dinamika molekul (MD) simulasi adalah salah satu alat utama dalam studi teoritis molekul biologis. Berdasarkan

persamaan gerak Newton, metode simulasi ini merepresentasikan interaksi molekul - molekul atom dalam jangka waktu tertentu. Simulasi MD telah memberikan informasi rinci tentang fluktuasi dan perubahan konformasi protein. Metode ini sekarang secara rutin digunakan untuk menyelidiki struktur, dinamika dan termodinamika protein dan interaksi mereka dengan substrat, ligan, dan inhibitor (Katrin Bidmon).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menyelidiki proses *folding* dari sebuah molekul protein kecil seperti yang dilakukan Ryan Day (2002) mensimulasikan proses *unfolding* protein kecil Trp-cage miniprotein menggunakan Amberff99SB dengan 40 jenis variasi temperatur mulai dari 280 K hingga 539,7 K dengan waktu total 100 mikro detik dan didapat hasil protein *unfolding* pada suhu dengan nilai tinggi yaitu 450 K. Jinhyuk Lee et al (2003) menyelidiki *unfolding* pada protein kecil 1GB1, 3AIT dan 1A2P menggunakan CHARMM dengan variasi temperatur mulai dari 300K, 400K, 500K, 600K dan 700K dengan waktu 2ns.

Penelitian ini akan mengamati proses *unfolding* pada enzim *Xilanase Aspergillus niger*. Enzim merupakan biomolekul sama seperti protein, hanya memiliki perbedaan fungsi saja. Enzim merupakan

biokatalisator yang belakangan ini banyak diaplikasikan pada bidang industri. Enzim merupakan katalisator pilihan yang diharapkan dapat mengurangi dampak pencemaran dan pemborosan energi karena reaksinya tidak membutuhkan energi tinggi, bersifat spesifik, dan tidak toksik (Aunstrup, 1979). Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam bidang industri adalah enzim xilanase (Marisa, 2013).

Karakteristik xilanase komersial yang ada saat ini memiliki suhu optimum kurang dari 50°C (Dhillon dkk., 2000a) sehingga kurang sesuai dengan kondisi proses pra-pemutihan *pulp*, sehingga dilakukan berbagai teknik untuk meningkatkan stabilitas termal enzim tersebut. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan termostabilitas suatu enzim adalah dengan teknik rekayasa protein.

Sifat protein yang mendapat perhatian dari sekian banyak sifat protein, dalam teknik rekayasa protein adalah stabilitas, khususnya stabilitas terhadap suhu. Ini disebabkan karena sejak proses produksi, penyimpanan sampai kepada penggunaan, semuanya dipengaruhi oleh panas. Struktur protein (konformasi) akan mempengaruhi fungsinya. Interaksi hidrofobik, jembatan garam dan interaksi antara asam amino

Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan

yang memiliki muatan seperti lisin, arginin, asam aspartat, asam glutamat serta asam amino dari ikatan peptida adalah beberapa *force* penting yang menjaga struktur protein. Secara umum, menguatkan *force* tersebut, misalnya dengan merubah asam amino *hydrophilic* dalam lingkungan yang *hydrophobic*, akan menaikkan stabilitas protein bersangkutan.

Dalam penelitian ini dilakukan Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan Kestabilan Termal Enzim *Xilanase Aspergillus niger Wild Type* (ANX).

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisika Teori dan Komputasi, Program Studi Pendidikan Fisika Universitas Kristen Indonesia.

Peralatan

Penelitian ini menggunakan peralatan berupa alat tulis, komputer dengan spesifikasi 3,40 GHz, 12 GB RAM menggunakan sistem operasi Linux Ubuntu 12.10. Program pendukung VMD 1.9.1 pada tahap preparasi protein, NAMD 2.9 sebagai simulator, CatDCD 4.0, Gnuplot 4.6.4, dan Ms. Excel 2013 sebagai analisa hasil simulasi.

Metode Penelitian

Preparasi Sistem Simulasi

Struktur kristal enzim xilanase *Aspergillus niger* (kode PDB: 1UKR) (Krengel dan Dijkstra, 1996) yang digunakan pada simulasi didapat dari bank data Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>).

Penentuan struktur kristal 1UKR dilakukan dengan metode difraksi sinar-X dan memiliki resolusi 2.4 Å. Residu asam amino penyusun Xilanase adalah 181 residu. File PSF (*Protein Structure File*) adalah file berisikan informasi molekul secara spesifik yang dibutuhkan untuk menerapkan medan gaya tertentu ke dalam sistem molekul. Untuk membuat file ini NAMD menyediakan program *psfgen*.

Untuk lebih menyerupai lingkungan selular, protein dilarutkan dan dimasukkan kedalam air. Protein itu dilarutkan dalam bentuk kotak dengan ukuran 100 Å x 100 Å x 100 Å yang berisi molekul air. Molekul air yang dipilih sebagai pelarut eksplisit (solvasi) pada sistem simulasi adalah model molekul air TIP3P dengan metode periodic boundary condition (PBC). Sistem ini dinetralkan dengan menambahkan ion (NaCl) pada konsentrasi fisiologis menggunakan VMD *solvate* dan *autoionize plugin*. Dalam simulasi ini

dibutuhkan file parameter medan gaya. Sebuah medan gaya adalah ekspresi matematis dari gaya potensial yang diperoleh dalam sistem. Sebuah file parameter medan gaya CHARMM berisi konstanta numerik yang diperlukan untuk mengevaluasi gaya dan energi, mengingat PSF sebuah file struktur dan atom coordinates. Parameter CHARMM dapat di-download dari website: <http://www.charmm.org/>. Untuk menjalankan simulasi dinamika molekuler dibutuhkan script. Script simulasi adalah program untuk menjalankan simulasi NAMD seperti yang diinginkan. NAMD menjalankan file konfigurasi dengan menggunakan bahasa scripting Tcl.

Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi ini dilakukan dengan empat tahapan menggunakan program NAMD dengan masukan awal file konfigurasi. File ini sebagai pengontrol sistem yang berisi parameter dalam menjalankan simulasi. File topologi yang digunakan adalah *par_all27_prot_na_lipid.inp*. Tahap pertama adalah minimisasi. Minimisasi bertujuan untuk meminimalkan energi pada molekul. Masukan awal adalah file struktur dan file psf hasil dari preparasi molekul. Kedua, pemanasan, masukan awal adalah hasil dari minimisasi. Pada awal simulasi

Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan

sistem bersuhu 0 K, suhu akhir akan divariasikan menjadi 400 K , 450 dan 500 K. Ketiga, ekuilibrasi, suhu sistem dijaga konstan dengan protokol Langevin. Kemudian tahap terakhir adalah production run. Pada tahap inilah simulasi dinamika molekul dijalankan. Molekul dibiarkan bebas bergerak dengan cara suhu sistem tidak dikontrol lagi. Tahap ini dilakukan selama 2.5 ns untuk suhu 400K, 450K dan 500 K.

Keluaran dari tahap akhir simulasi dinamika molekul adalah file dcd. File ini divisualisasikan pada program VMD. Data yang diperoleh tersebut menghasilkan grafik yang dibutuhkan untuk analisis jembatan garam dalam meningkatkan kestabilan termal enzim xilanase *Aspergillus niger*.

Prosedur Analisa Data

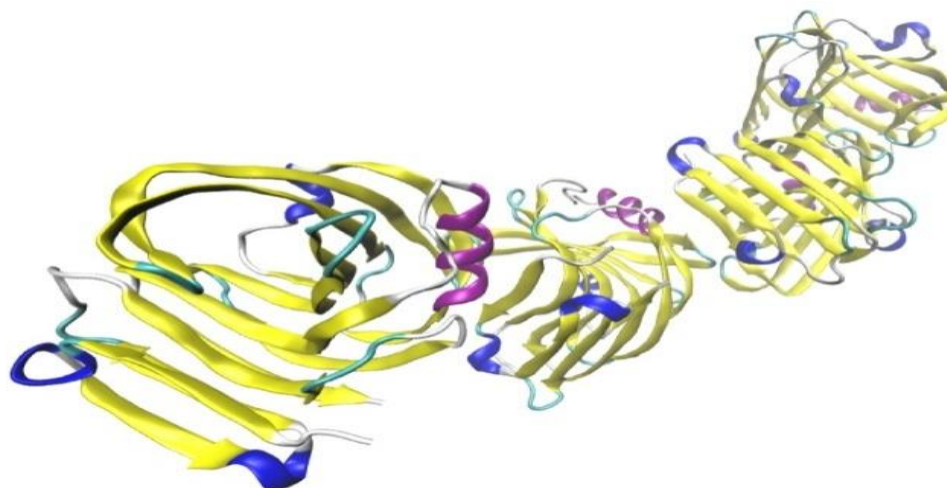
Analisa simulasi dinamika molekul pada enzim xilanase *Aspergillus niger* dilakukan untuk mengetahui fleksibilitas enzim dan perubahan struktur yang terjadi. Parameter yang dianalisis antara lain adalah Jembatan Garam/ Interaksi elektrostatik.

Interaksi elektrostatik yang sering disebut sebagai interaksi pasangan ion (*ion pairs interaction*) (Vieille dan Zeikus 2001) atau jembatan garam (*salt bridge*) merupakan interaksi antara residu-residu asam amino bermuatan. Penelitian mengenai pentingnya interaksi elektrostatik pertama kali dilaporkan oleh Perutz (1978) yang menyatakan bahwa interaksi ini memiliki kontribusi signifikan untuk menstabilkan protein.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Xilanase *Aspergillus niger* berhasil di kristalisasi oleh Kregel dan Dijkstra pertama kali pada tahun 1996 dengan resolusi struktur kristal 2,4 Angstrom. Struktur ANX ini diambil dari protein data bank (PDB) dengan kode 1UKR dengan berat molekul 13,5 - 14 kDa (Beg dkk., 2001), suhu 22°C sedangkan asam amino penyusun adalah 181 asam amino.

Representasi struktur sekunder secara *new cartoon* menggunakan program VMD (Humphrey *et al.* 1996), dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Representasi struktur sekunder enzim Xilanase *Aspergillus niger*

Interaksi elektrostatik yang sering disebut jembatan garam merupakan interaksi antara residu-residu asam amino bermuatan. Terdapat 25 pasangan jembatan garam pada temperatur 400 K, 24 pasang jembatan garam pada temperatur 450 K dan ada 30 pasang jembatan garam yang terbentuk pada temperatur 500 K, masing-masing selama 2.5 ns. Perhatikan pada tabel 1.

Tabel 1. Pasangan jembatan garam yang muncul selama simulasi 2.5 ns pada suhu 400 K

Suhu 400 K	Suhu 450 K	Suhu 500 K
Glu 84 Segname P4 – Arg134 Segname P4	Glu 84 Segname P4 – Arg134 Segname P4	GLU84 segname P4-ARG134 segname P4
Glu 118 Segname P2 – Arg115 Segname P2	Glu 79 Segname P1 – Arg115 Segname P1	GLU79 segname P1-ARG115 segname P1
Asp 113 Segname P2 – Arg115 Segname P2	Glu 118 Segname P2 – Arg115 Segname P2	GLU118 segname P3-ARG115 segname P3
Glu 118 Segname P3 – Arg115 Segname P3	Asp 104 Segname P1 - Arg138 Segname P1	ASP113 segname P2-ARG115 segname P2
Glu 79 Segname P2 – Arg115 Segname P2	ASP113 segname P2- ARG115 segnameP2	ASP104 segname P1-ARG138 segname P1
Glu 84 Segname P1 – Arg134 Segname P1	GLU118 segname P3 -ARG115 segname P3	ASP113 segname P3-ARG115 segname P3
Asp 104 Segname P3 - Arg134 Segname P3	GLU84 segname P1-ARG134 segname P1	GLU118 segname P2-ARG115 segname P2
Glu 79 Segname P1 – Arg115 Segname P1	ASP104 segname P3-ARG134 segname P3	GLU79 segname P2-ARG115 segname P2

Analisa Jembatan Garam untuk Meningkatkan

Asp 104 Segname P2 – Arg134 Segname P2	ASP104 segname P2-ARG134 segname P2	GLU84 segname P1-ARG134 segname P1
Asp 37 Segname P4 – Arg155 Segname P4	ASP104 segname P4-ARG138 segname P4	ASP104 segname P3-ARG134 segname P3
Asp 104 Segname P4 – Arg138 Segname P4	GLU118 segname P1-ARG115 segname P1	GLU84 segname P3-ARG138 segname P3
Asp 113 Segname P1 – Arg115 Segname P1	ASP113 segname P3-ARG115 segname P3	ASP104 segname P4-ARG138 segname P4
Glu 118 Segname P1 – Arg115 Segname P1	ASP104 segname P1-ARG134 segname P1	ASP104 segname P2-ARG134 segname P2
Glu 84 Segname P2 – Arg138 Segname P2	GLU84 segname P3-ARG138 segname P3	ASP113 segname P1-ARG115 segname P1
Asp 113 Segname P3 – Arg115 Segname P3	GLU79 segname P4-ARG115 segname P4	ASP104 segname P1-ARG134 segname P1
Glu 84 Segname P3 – Arg138 Segname P3	GLU84 segname P2-ARG138 segname P2	GLU118 segname P1-ARG115 segname P1
Glu 79 Segname P3 – Arg115 Segname P1	GLU84 segname P4-ARG138 segname P4	GLU84 segname P2-ARG138 segname P2
Glu 84 Segname P3 – Arg134 Segname P3	GLU84 segname P3-ARG134 segname P3	GLU79 segname P4-ARG115 segname P4
Asp 104 Segname P4 – Arg134 Segname P4	ASP104 segname P4-ARG134 segname P4	GLU84 segname P4-ARG138 segname P4
Glu 118 Segname P4 – Arg115 Segname P4	ASP104 segname P2-ARG138 segname P2	ASP104 segname P4-ARG134 segname P4
Glu 84 Segname P2 – Arg134 Segname P2	GLU118 segname P4-ARG115 segname P4	GLU84 segname P3-ARG134 segname P3
Asp 104 Segname P3 – Arg138 Segname P3	GLU84 segname P2-ARG134 segname P2	ASP104 segnameP2-ARG138 segnameP2
Glu 84 Segname P2 – Arg138 Segname P1	ASP104 segname P3-ARG138 segname P3	GLU118 segnameP4-ARG115 segnameP4
Glu 84 Segname P4 – Arg138 Segname P4	GLU84 segname P1-ARG138 segname P1	GLU84 segnameP2-ARG134 segnameP2
Asp 104 Segname P2 – Arg138 Segname P2		ASP113 segnameP4-ARG115 segname P4

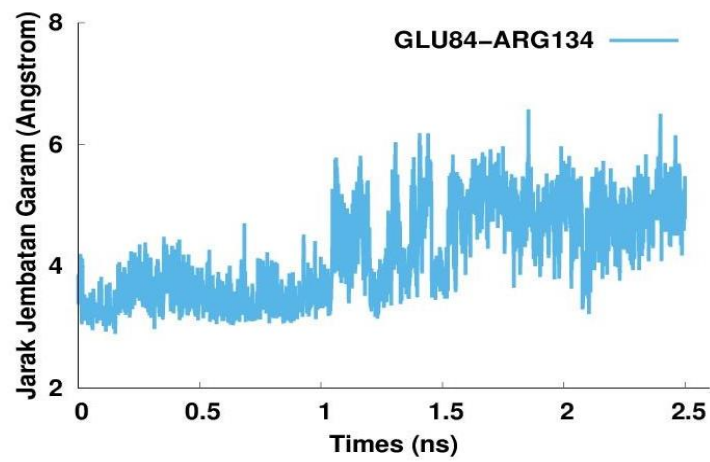
		GLU135 segname P1-ARG138 segname P1
		ASP104 segname P3-ARG138 segnameP3
		GLU84 segnameP1-ARG138 segnameP1
		ASP37 segnameP2-ARG115 segnameP2
		ASP37 segnameP1-ARG115 segnameP1

Untuk menentukan pasangan jembatan garam yang menjadi kunci kestabilan enzim maka selanjutnya jembatan garam diplot antara jarak (Å) dengan waktu (ns) hanya yang pada suhu 500 K, karena diduga pada suhu tersebut telah terjadi proses *unfolding*.

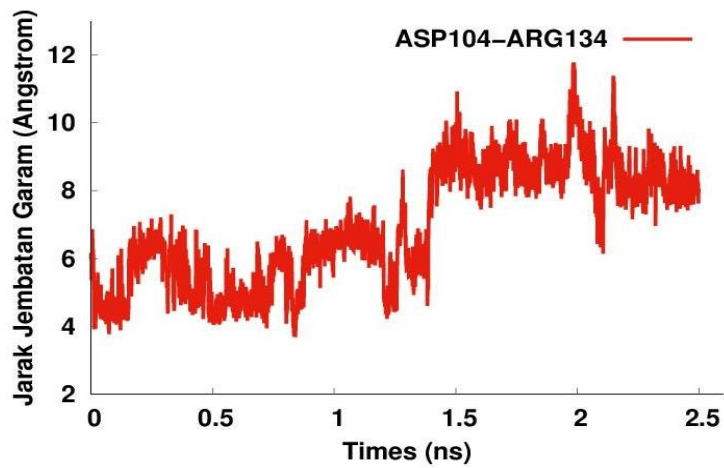
Dari 30 pasang jembatan garam yang telah diplot antara jarak dengan waktu, maka diperoleh pasangan jembatan garam yang pola grafiknya sama dengan pola grafik analisa *Root-mean-square deviation* (RMSD).

Selanjutnya jembatan garam diplot antara jarak (Å) dengan waktu (ns). Ada tiga kurva jembatan garam yang polanya sama dengan pola kurva RMSD dan SASA yang mana jarak jembatan garamnya meningkat mulai pada selang waktu 0.5 ns hingga 1.5 ns, yaitu jembatan garam Glu84-Arg134, Asp104-Arg134 dan Asp113-

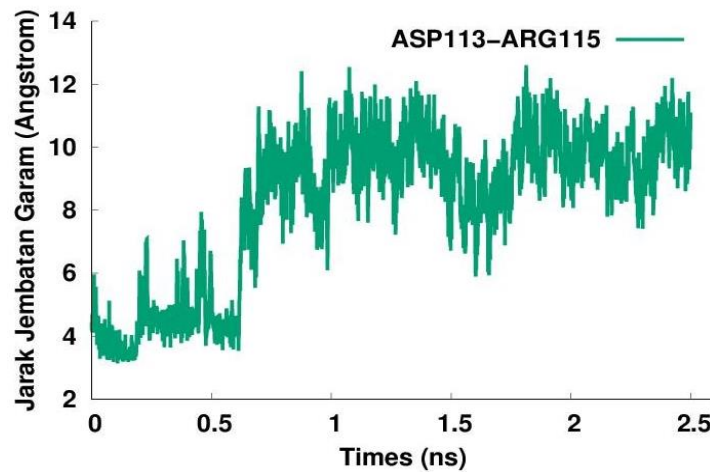
Arg115. Perhatikan gambar 2. Kenaikan tajam nilai RMSD dan SASA tersebut disebabkan putusnya ketiga pasang jembatan garam tersebut. Sehingga ketika dilakukan mutasi secara *in-silico* calon mutan yang akan dimutasi adalah residu-residu asam amino yang diduga berperan dalam interaksi elektrostatis dan menggantinya dengan residu asam amino yang lain atas dasar kemiripan struktur. Selain itu, jika diamati dari energi elektrostatisnya ketiga pasang jembatan garam ini akan kehilangan energinya mulai pada selang waktu 0.5 ns hingga 1.5 ns, waktu ini sama dengan waktu *unfolding* nya. Ini menandakan bahwa kedua pasang jembatan garam ini merupakan pengunci kestabilan termal enzim Xilanase *Aspergillus niger*.



(a)



(b)



(c)

Gambar 2. Jarak jembatan garam antara (a) Glu84-Arg134 (b) Asp104-Arg134 (c) Asp113-Arg115

KESIMPULAN

Enzim lipase Xilanase *Aspergillus niger* mengalami *unfolding* pada temperatur 500 K saat 2.5 ns. Residu-residu yang bertanggung jawab terhadap kestabilan termal enzim Xilanase *Aspergillus niger* berdasarkan analisa pasangan jembatan garam atau interaksi elektrostatik yaitu pasangan asam amino Glutamat pada residu 84 dan Arginin pada residu 134, pasangan asam amino Asam Aspartat pada residu 104 dan Arginin pada residu 134 serta pasangan asam amino Asam Aspartat pada residu 113 dan Arginin pada residu 115. Sehingga berdasarkan Interaksi Elektrostatik/jembatan garam ketiga pasang jembatan garam ini memiliki potensi untuk meningkatkan kestabilan termal jika dilakukan mutasi pada ketiga pasang jembatan garam tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Aunstrup, K.O., Andressen, Falch, and Nielsen. 1979. *Production of Microbial Enzymes. Microbial Technology*. Vol. 1. Academic Press Inc. New York
- Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 326-338
- David B. Kony, Philippe H. Hu¨nenberger, Wilfred F. Van Gunsteren. 2007. Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence. of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics. *Protein Science*. 16 : 1101-1118
- Dhillon, A., J. K. Gupta, and S. Khanna. 2000a. Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB 16. *Process Biochemistry*. 35:849- 856
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph*, 14(1) : 27 – 38.
- Jinhyuk Lee, Soonmin Jang, Youngshang Pak, and Seokmin Shin. 2003. Folding Dynamics of β -Hairpins: Molecular Dynamics Simulations. *Korean Chem*. 24 (6) : 787-791
- Katrin Bidmon dan Guido Reina. Time-Based Haptic Analysis of Protein Dynamics. *Visualization and Interactive Systems Group (VIS)*. University of Stuttgart, Germany
- Krengel, U. and B.W. Dijkstra. 1996. Three-dimensional structure of

- Endo-1,4-beta-xylanase I from *Aspergillus niger*: molecular basis for its low pH optimum. *J.Mol.Biol.* 263: 70-78
- Marisa A. Lima. 2013. *Aspergillus niger* β -Glucosidase Has a Cellulase-like Tadpole Molecular Shape. *The Journal of Biological Chemistry.* 288 : 32991-33005
- Perutz M. 1978. Electrostatic effects in proteins. *Science.* 201(4362) : 1187-1191.
- Rico, Manuel . Protein structure, dynamics and function by NMR. Instituto de Química Física "Rocasolano". Spain
- Ryan Day, Dietmar Paschek, and Angel E. Garcia. 2002. Microsecond simulations of the folding/unfolding thermodynamics of the Trp-cage mini protein. *Proteins.* 78 : 1889-1899
- Stumpe, Martin. 2007. De natura denurantium-On the molecular basis of urea-induced protein denaturation [disertasi]. Der Georg-August-Universitat zu Gottingen : der Matematish-Naturwissenschaftlichen Fakultaten
- Szila'gyi. A, Kardos J. Osva'th. S. Barna L. Za'vodszky. P. *Protein Folding.*
- Vieille C, Zeikus GJ. 2001. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, dan molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65(1) : 1-43.
- Yuwono, Triwibowo. 2005. *Biologi Molekuler.* Jakarta : Erlangga. Hlm 23-25