

Analisis Interaksi α -Amilase *Bacillus licheniformis* (BLA) dan Mutannya (MTBLA) dengan Maltoheptaosa pada Suhu Tinggi menggunakan Metode *In Silico*

Interaction Analysis of α -Amylase *Bacillus licheniformis* (BLA) and its Mutant (MTBLA) with Maltoheptaose at High Temperature using *In Silico* Method

Annisyaban Fatiha Azzahra¹, Regaputra Satria Janitra¹, Wahyu Widayat²,
Farhan Azhwin Maulana³, Safri Ishmayana⁴, Muhammad Yusuf^{4,5,*}

¹Program Studi Magister Bioteknologi, Fakultas Sekolah Pascasarjana, Universitas Padjadjaran, Bandung 40132, Indonesia

²Laboratorium Riset dan Pengembangan Farmaka Tropis, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda 75119, Indonesia

³Departemen Life Sciences, National Central University, Taoyuan, Taiwan

⁴Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Sumedang 45363, Indonesia

⁵Pusat Riset Bioteknologi Molekuler dan Bioinformatika, Universitas Padjadjaran, Bandung 40132, Indonesia

*Email Korespondensi: m.yusuf@unpad.ac.id

Abstrak

α -Amilase merupakan enzim yang menghidrolisis pati menjadi oligosakarida yang digunakan di sektor industri makanan dan kesehatan. Produk hidrolisis seperti maltopentosa dapat menjadi sumber makanan tinggi nutrisi untuk pasien gagal ginjal dan defisit kalori. Oleh sebab itu, peningkatan termostabilitas enzim perlu dilakukan untuk memenuhi kriteria industri. Pada penelitian ini kami mempelajari pengaruh mutasi α -amilase *Bacillus licheniformis* (BLA) terhadap aktivitasnya pada suhu 298 dan 373 K secara *in silico* melalui analisis interaksi enzim-substrat. Maltoheptaosa digunakan sebagai model substrat. Pada suhu 373 K, mutasi Asn190Phe berperan langsung membentuk interaksi dengan substrat sedangkan mutasi Gln264Ser tidak berperan langsung. Pada suhu 298 K mutasi Asn265Tyr berperan langsung terhadap interaksi enzim-substrat. Pada penelitian ini, kami menemukan hubungan antara interaksi enzim-substrat terhadap aktivitas, faktor yang paling menentukan adalah interaksinya dengan residu katalitik. Pada suhu 298 K, total interaksi mutan BLA (MTBLA)-maltoheptaosa sedikit lebih kuat dibandingkan BLA-maltoheptaosa. Namun, interaksi maltoheptaosa dengan residu katalitik pada BLA lebih kuat daripada MTBLA. Hal ini bersesuaian dengan eksperimen sebelumnya pada suhu 298 K. Pola yang mirip terlihat pada 373 K, sehingga aktivitas MTBLA pada suhu 373 K juga tidak lebih baik daripada BLA.

Kata Kunci: α -Amilase, aktivitas, termostabilitas, *Bacillus licheniformis*, *In silico*

Abstract

α -Amylase is an enzyme that hydrolyzes starch into oligosaccharides used in the food and health industry sector. Hydrolysis products such as maltopentose can be a high-nutrition source for patients with kidney failure and calorie deficit. Therefore, increasing the thermostability of enzymes needs to be done to meet industrial criteria. In this study, we studied the effect of the *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA) mutation on its activity at 298 and 373 K *in silico* through enzyme-substrate interaction analysis. Maltoheptaose was used as a model substrate. At 373 K, the Asn190Phe mutation plays a direct role in forming interactions with the substrate while the Gln264Ser mutation does not play a direct role. At 298 K the Asn265Tyr mutation plays a direct role in the enzyme-substrate interaction. In this study, we found a relationship between enzyme-substrate interaction and activity, the most determining factor being the interaction with the catalytic residue. At 298 K, the total interaction of the mutant BLA (MTBLA)-maltoheptaose was slightly stronger than that of BLA-maltoheptaose. However, the interaction of maltoheptaose with catalytic residues in BLA is stronger than in MTBLA. This is in agreement with the previous experiment at 298 K. A similar pattern is found at 373 K. Thereby, MTBLA activity at 373 K is also not more improved than BLA.

Keywords: α -Amylase, activity, thermostability, *Bacillus licheniformis*, *In silico*

Received: 28 Agustus 2023

Accepted: 07 Desember 2023

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5i6.2013>



Copyright (c) 2023, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains Kes.).
Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia.
This is an Open Access article under the CC-BY-NC License.

How to Cite:

Azzahra, A. F., Janitra, R. S., Widayat, W., Maulana, F. A., Ishmayana, S., Yusuf, M., 2023. Analisis Interaksi α -Amilase *Bacillus licheniformis* (BLA) dan Mutannya (MTBLA) dengan Maltoheptaosa pada Suhu Tinggi menggunakan Metode *In Silico*. *J. Sains Kes.*, 5(6). 972-984. DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v5i6.2013>

1 Pendahuluan

α -Amilase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan α -1,4-glikosidik pada pati untuk menghasilkan rantai oligosakarida dengan panjang ikatan yang bervariasi, seperti maltopentosa, maltosa, dan dekstrin [1]. α -Amilase sudah digunakan di berbagai sektor industri seperti makanan, tekstil, kertas serta kesehatan [2]. Pada industri farmasi, produk hidrolisis seperti maltopentosa dapat menjadi sumber makanan yang tinggi nutrisi untuk pasien gagal ginjal dan kondisi kekurangan

kalori [3]. Dengan meningkatnya kebutuhan α -amilase di bidang industri maka diperlukan α -amilase dengan karakteristik khusus, seperti dapat bertahan dalam rentang pH yang luas, selektivitas terhadap substrat tinggi, serta stabil dan fungsional pada suhu tinggi. Sumber α -amilase dapat berasal dari tumbuhan, hewan serta mikroorganisme seperti bakteri dan fungi, namun sumber bakteri masih menjadi sumber utama karena diversitasnya serta mudah dimodifikasi secara genetik [4]. Contoh α -amilase yang berasal dari bakteri adalah α -

amilase *Bacillus licheniformis* (BLA), α -amilase *Bacillus amyloliquefaciens* (BAA), dan α -amilase *Bacillus stearothermophilus* (BSTA). Di antara ketiganya, BLA memiliki termostabilitas terbaik [5]. α -Amilase termostabil dibutuhkan pada hidrolisis pati yang pada prosesnya melibatkan pemanasan pada suhu 80-110°C selama 90 menit [6]. Pemanasan pada suhu tinggi dibutuhkan untuk meningkatkan kelarutan substrat dan mengurangi kontaminasi mikroba [7].

Selama lebih dari tiga dekade, telah dilakukan usaha untuk meningkatkan termostabilitas BLA melalui mutasi asam amino [8–15]. Mutasi BLA pada His133Val, Asn190Phe, Ala209Val, Gln264Ser, dan Asn265Tyr (kode PDB: 1OB0, MTBLA) dapat meningkatkan termostabilitas dengan waktu paruh 7 jam 27 menit pada suhu 358 K (85°C) sedangkan BLA (natif) hanya dapat bertahan selama 14 menit [15]. Namun, aktivitas MTBLA pada suhu 298 K sedikit lebih rendah dibandingkan BLA [16]. Aktivitas BLA pada suhu 373 K telah dilakukan oleh Fitter *et al.* (2001) yang menunjukkan bahwa pada suhu tersebut, BLA masih memiliki aktivitas yang cukup tinggi [17]. Sedangkan studi aktivitas MTBLA pada suhu tinggi sudah dilakukan oleh Machius *et al.* (2003) menggunakan spektroskopi *Circular Dichroism* namun, pada metode tersebut tidak menggunakan substrat tetapi hanya melihat perubahan struktur sekunder enzim [15,18]. Oleh karena itu, pada penelitian ini kami mengkaji aktivitas enzim secara kimia komputasi melalui analisis interaksi substrat dengan BLA dan MTBLA pada suhu tinggi. Sebagai tambahan kami juga menganalisis stabilitas struktural BLA dan MTBLA pada suhu tersebut. Simulasi MD dilakukan untuk mengamati pengaruh suhu terhadap struktur BLA dan MTBLA [19]. Struktur hasil simulasi MD digunakan sebagai reseptor pada studi penambatan molekul. Selanjutnya, hasil penambatan diminimisasi kemudian dihitung energinya menggunakan MMGBSA [20–22]. Penelitian ini berperan sebagai langkah awal dalam mendesain α -amilase termostabil dan meningkatkan aktivitasnya.

2 Metode Penelitian

2.1 Pemodelan Homologi dan Validasi

Struktur MTBLA diperoleh dari RCSB PDB dengan kode PDB 1OB0 (<https://www.rcsb.org/structure/1OB0>), kemudian dimodelkan ulang [15]. Struktur kristal MTBLA dimodelkan ulang untuk menghilangkan adanya tabrakan antar atom. Struktur BLA diperoleh dengan memutasi balik MTBLA pada Val133His, Phe190Asn, Val209Ala, Ser264Gln, Tyr265Asn yang selanjutnya dimodelkan ulang. Pemodelan ulang struktur 3D dilakukan menggunakan Modeller 10.4 [23]. Pemilihan model terbaik berdasarkan nilai DOPE (*Discreted Optimized Potential Energy*) terendah dan GA341. Validasi model terbaik dilakukan menggunakan PROCHECK, Verify3D, dan ERRAT yang terdapat dalam web server SAVES (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) serta web server PROSA (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>) untuk memprediksi nilai-z [24–28].

2.2 Preparasi Ligan

Struktur 3D maltoheptaosa dan acarbose digambar menggunakan GaussView 5.0.9 [29]. Maltoheptaosa umum digunakan sebagai substrat untuk studi interaksi α -amilase dan memiliki kemiripan dengan struktur amilosa pada pati [20,21]. Acarbose dipilih sebagai kontrol positif pada studi penambatan molekul karena merupakan inhibitor kompetitif α -amilase [30,31]. Ligan dioptimasi pada level teori MMFF94s menggunakan Avogadro [32–38], kemudian dioptimasi kembali pada level teori HF-3c menggunakan Gamess US VERSION 30 SEP 2020 (R2) [20,21,39,40].

2.3 Simulasi Dinamika Molekul (MD)

Struktur BLA dan MTBLA hasil pemodelan, *Bacillus paralicheniformis* ATCC 9945a (BliAmy) dengan kode PDB 6TOZ sebagai kontrol, ditambahkan atom hidrogen menggunakan program LEaP. Kemudian, disesuaikan keadaan protonasinya pada pH 7,0 menggunakan web server PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/pdb2pqr>). Residu katalitik Glu261 dimodelkan pada keadaan netral [41–43]. Enzim disolvasi dalam kotak air eksplisit dengan jarak terdekat antara permukaan dengan tepi kotak sejauh 10 Å. Ion

Na⁺ digunakan sebagai penetral sistem. Medan gaya yang digunakan untuk enzim adalah ff14SB, sedangkan ion Ca²⁺, Na⁺ dan air adalah TIP3P [44,45]. Ion Ca²⁺, dan Na⁺ merupakan kofaktor pada BLA dan MTBLA.

Sistem diminimisasi dalam 4 tahap. Pertama, minimisasi 250 tahap *steepest descent* dan 750 tahap *conjugate gradient* tanpa menggunakan tahanan gaya. Kedua, rantai utama di tahan menggunakan tahanan gaya 5000 tahap *steepest descent*. Ketiga, seluruh sistem kecuali Na⁺ dan air ditahan menggunakan 5000 tahap *steepest descent*. Terakhir, seluruh sistem ditahan hingga konvergensi energi minimum tercapai. Konvergensi energi minimum dilakukan untuk mengetahui apakah minimisasi sebelumnya sudah mencapai lokal minima. Jika belum tercapai, dilakukan penambahan pada step minimisasi sebelumnya [46]. Tahanan gaya yang digunakan sebesar 10 kkal.mol⁻¹.Å⁻². BliAmy dipanaskan hingga suhu 298 K sedangkan BLA dan MTBLA hingga 298 K dan 373 K. Sistem dipanaskan secara bertahap pada kondisi volume konstan dengan enzim diberikan tahanan gaya sebesar 5 kkal.mol⁻¹.Å⁻² selama 60 ps. Kemudian, sistem disetimbangkan dalam 6-tahap dengan menurunkan tahanan gaya secara bertahap hingga tidak ada tahanan gaya yang digunakan selama 0,91 ns. Produksi simulasi MD dilakukan selama 100 ns pada *ensemble* NVT. Jarak terjauh interaksi nonikatan yang diperhitungkan adalah 8 Å. Perhitungan elektrostatis jarak jauh menggunakan metode particle mesh Ewald [47]. Implementasi termostat Langevin digunakan sebagai kontrol untuk pemanasan sistem [48]. Simulasi MD dilakukan menggunakan Amber20 [49].

Analisis hasil simulasi menggunakan program CPPTRAJ, yang meliputi RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), dan analisis klustering [50]. Konformasi enzim mayoritas hasil dari klustering 30 ns terakhir pada suhu 298 K dan 373 K digunakan sebagai struktur reseptor pada studi penambatan molekul.

2.4 Studi Penambatan Molekul

Studi penambatan molekul menggunakan AutoDock Vina [51,52]. Autodock Tools digunakan untuk menghasilkan berkas pdbqt

[53]. Validasi parameter penambatan molekul dilakukan dengan penambatan kembali reseptor BliAmy dengan acarbose. Tujuan penambatan kembali dilakukan untuk menentukan parameter yang sesuai pada penambatan BLA dan MTBLA. Lokasi *grid box* (42,723 52,383, 44,556) koordinat kartesian, ukuran *grid box* 20 × 20 × 20 dengan *spacing* 1 Å dengan 22 torsi aktif. Parameter *global exhaustiveness* diatur 8, rentang perbedaan energi 3 kkal/mol dan jumlah pose hasil penambatan sembilan. Kemudian *output* berkas pdbqt dikonversi menjadi berkas pdb menggunakan Open Babel dan divisualisasikan interaksinya menggunakan Biovia Discovery Studio, dan VMD [54–56].

2.5 Energi Ikatan

Ligan hasil optimasi HF-3c dihitung muatan parsial ESP pada level teori HF/6-31G(d) menggunakan Gaussian 09 Revision D.01. Selanjutnya, hasil perhitungan tersebut dijadikan input pada modul antechamber untuk perhitungan muatan parsial RESP, yang muatan tersebut digunakan pada GAFF2 [57–59]. Kompleks disolvasi menggunakan air dengan sistem seperti yang telah dijelaskan sebelumnya dan dilakukan minimisasi untuk relaksasi rantai samping enzim. Hasil minimisasi kompleks, dihitung energi bebas interaksi antara reseptor dan ligan menggunakan metode MMGBSA [60]. Nilai tegangan permukaan air diatur sesuai dengan kondisi suhu simulasi yang digunakan [61].

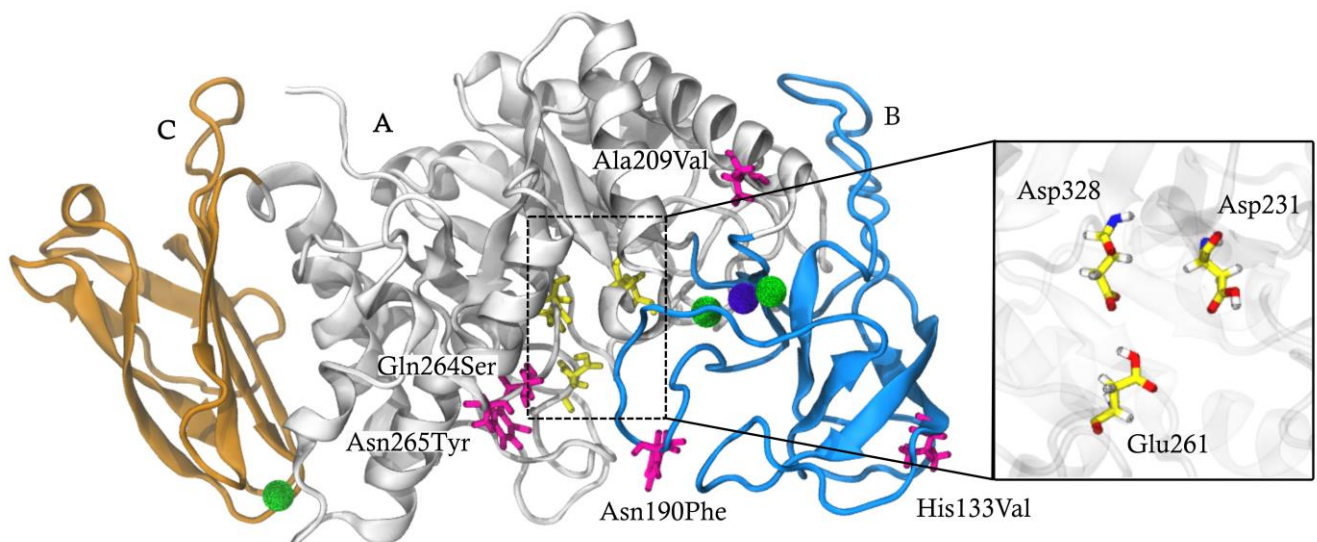
3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Analisis RMSD dan RMSF

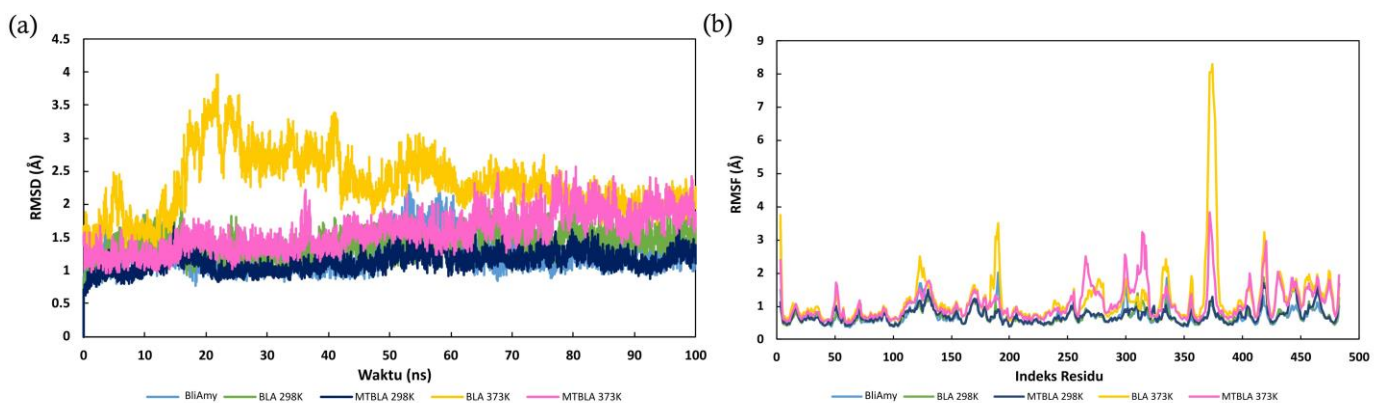
BLA dan MTBLA memiliki tiga domain yaitu A, B, dan C. Domain A meliputi membentuk (β/α)₈ barel dimulai residu 1 hingga 103 dan 205 hingga 396, merupakan domain yang terlestarikan pada α -amilase. Domain B dimulai dari residu 104 hingga 204, sedangkan domain C dimulai dari residu 397 hingga 483 memiliki motif *Greek key*. Tiga residu katalitik terdiri dari, Asp231, Glu261, dan Asp328 terletak di *cleft* sisi aktif domain A [13]. Struktur MTBLA hasil pemodelan ulang ditampilkan pada (Gambar 1). Daftar asam amino yang dimutasi adalah His133Val, dan Asn190Phe berada di domain B. Tiga Mutasi Ala209Val, Gln264Ser, dan

Asn265Tyr berada di domain A. Mutasi Asn190Phe, Gln264Ser, dan Asn265Tyr berada di daerah katalitik. Lima mutasi pada MTBLA

tidak berinteraksi dengan kofaktor (ion logam) serta tidak menyebabkan perubahan konformasi yang signifikan.



Gambar 1 Struktur MTBLA hasil pemodelan ulang. Domain A, B, dan C masing-masing ditampilkan dengan warna abu-abu muda, biru, dan coklat dengan representasi pita. Asam amino yang dimutasi ditampilkan dengan warna merah muda dengan representasi batang. Tiga residu katalitik ditampilkan dengan warna kuning dengan representasi batang. Kofaktor Ca^{2+} dan Na^+ masing-masing ditampilkan dengan warna hijau dan ungu dengan representasi bola.



Gambar 2 (a) Profil RMSD dari rantai utama polipeptida (b) Profil RMSF selama simulasi 100 ns.

Data RMSD BliAmy, BLA dan MTBLA hasil simulasi MD selama 100 ns ditampilkan pada (Gambar 2a). Pada suhu 298 K, BLA dan MTBLA memperlihatkan konformasi yang masih stabil sepanjang simulasi dengan $\text{RMSD} < 2 \text{ \AA}$. Saat suhu ditingkatkan menjadi 373 K, BLA mengalami lonjakan nilai dengan $\text{RMSD} > 2 \text{ \AA}$ pada saat 14-80 ns dengan nilai tertinggi mencapai $3,9 \text{ \AA}$ sedangkan MTBLA di suhu tinggi

maupun rendah tidak terlalu berbeda walaupun terjadi kenaikan nilai RMSD.

Desain rasional untuk meningkatkan termostabilitas enzim memerlukan identifikasi daerah-daerah yang memiliki fleksibilitas tinggi karena dapat menginisiasi *unfolding* enzim. *Loop* merupakan daerah dengan fleksibilitas tinggi pada enzim, sehingga salah satu metode yang efektif untuk meningkatkan

termostabilitas enzim adalah membuat *loop* menjadi kaku [62]. Analisis RMSF (Gambar 2b) pada suhu 298 K dan 373 K menunjukkan fluktuasi tertinggi pada BLA dan MTBLA terjadi di daerah *loop* N-terminal, karena lemahnya densitas elektron pada daerah tersebut [63]. Pada suhu 373 K, nilai RMSF BLA daerah *loop* residu 122-126 dan 188-191 serta residu 368-379 lebih tinggi daripada MTBLA. Hal tersebut disebabkan karena pada MTBLA terdapat mutasi His133Val yang terletak pada lembar- β membentuk interaksi CH/ π dengan Tyr175 (panjang ikatan (d) = 4,63 Å) serta daerah residu tersebut dikelilingi oleh asam amino nonpolar seperti Ile135 dan Ala117 sehingga meningkatkan hidrofobisitas pada daerah tersebut serta membuat *loop* 122-126 menjadi lebih kaku (Gambar S2a). *Triple aromatic interaction* terbentuk dari cincin Tyr193 dengan Phe190 dan His235 (d = 4,68 Å; 4,81 Å) melalui interaksi π - π bentuk *T-shaped* dan *sandwich* sehingga memperkuat kestabilan domain B dan *loop* 188-191 yang menjadi sangkar untuk melindungi kofaktor *metal triad* Ca-Na-Ca dari difusi (Gambar S2b) [15]. Pada BLA maupun MTBLA peningkatan fluktuasi pada suhu 373 K terlihat pada *loop* residu 368-379, namun peningkatan terbesar terjadi pada BLA yang nilainya mencapai 8 Å sedangkan MTBLA hanya 3,8 Å.

Pada suhu 373 K, RMSF MTBLA pada daerah *loop* residu 264-267 dan α -heliks residu 312-317 lebih tinggi daripada BLA. Hal tersebut diduga karena adanya mutasi Gln264Ser yang memutuskan ikatan hidrogen antara Gln264 dengan Glu189 di BLA sehingga mengakibatkan peningkatan fluktuasi di sekitar residu tersebut. Mutasi Asn265Tyr membentuk situs interaksi aromatik dengan Trp263, Tyr290, His289 dan Phe323 pada domain A namun tidak berpengaruh terhadap kekakuan struktur (Gambar S2d).

3.2 Interaksi BLA dan MTBLA dengan Maltoheptaosa

Pada suhu 373 K, total energi interaksi MTBLA-maltoheptaosa sedikit lebih lemah dibandingkan dengan total energi interaksi BLA-maltoheptaosa (Tabel 1). Komponen interaksi hidrofobik (ΔE_{vdW} dan ΔE_{SURF}) pada MTBLA-maltoheptaosa lebih kuat dibandingkan BLA-maltoheptaosa karena adanya mutasi Asn190Phe dan Asn265Tyr yang terletak di situs pengikatan substrat. Baik BLA dan MTBLA memiliki komponen interaksi elektrostatis yang dominan (ΔE_{EL}), namun interaksi elektrostatis pada MTBLA-maltoheptaosa lebih lemah daripada BLA-maltoheptaosa.

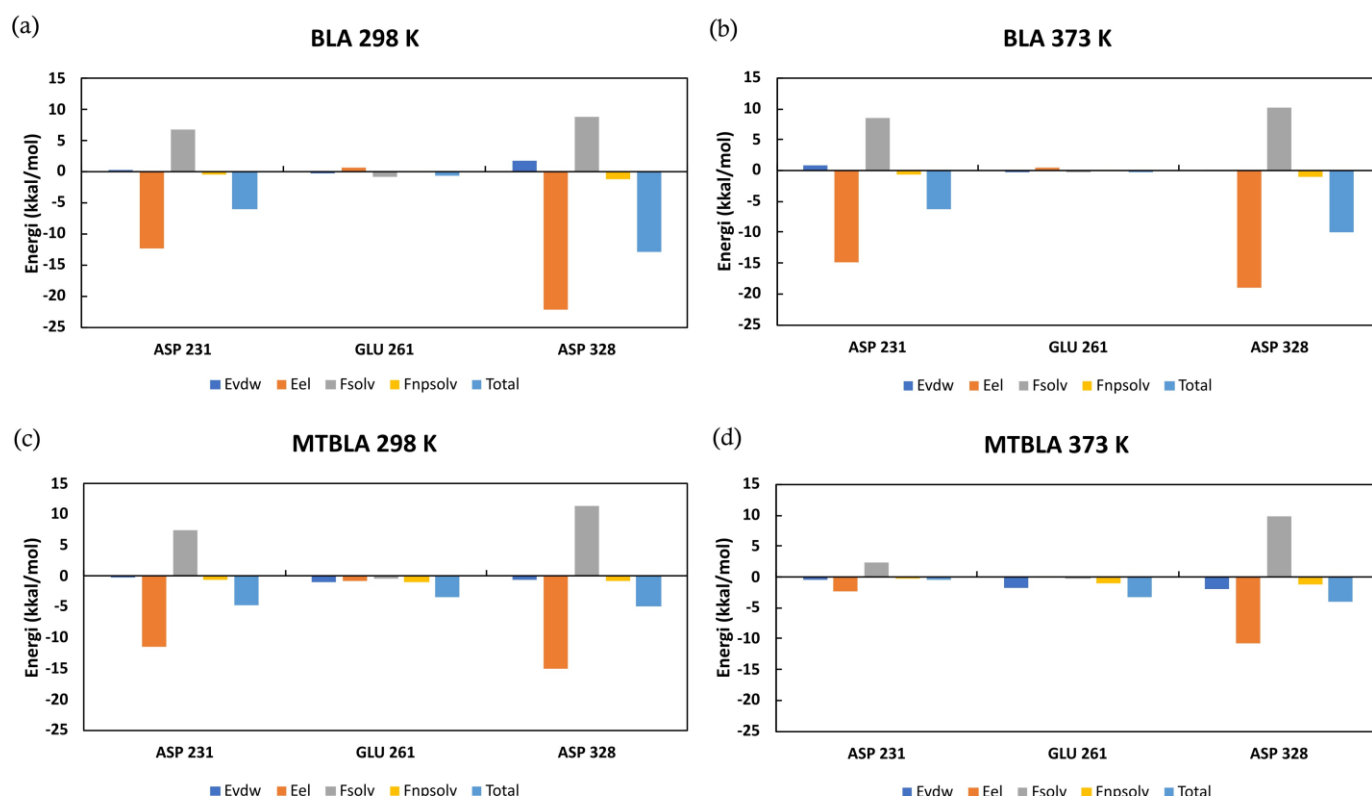
Tabel 1 Komponen nilai energi dari hasil minimisasi kompleks BLA-maltoheptaosa dan MTBLA-maltoheptaosa pada suhu 298 K dan 373 K.

Reseptor	Ligan	Komponen energi / (kkal/mol)						
		ΔE_{vdW}	ΔE_{EL}	ΔE_{GB}	ΔE_{SURF}	ΔF_{gas}	ΔF_{solv}	ΔF_{Total}
BLA	Maltoheptaosa	-47,41	-160,74	183,15	-7,95	-208,16	175,20	-32,96
		(-45,53)	(-122,06)	(157,72)	(-9,60)	(-167,59)	(148,12)	(-19,47)
MTBLA	Maltoheptaosa	-50,98	-104,08	135,15	-7,68	-155,06	127,48	-27,58
		(-56,35)	(-84,57)	(127,84)	(-9,22)	(-140,92)	(118,62)	(-22,30)

*angka dalam kurung adalah nilai pada suhu 298K.

Total energi interaksi MTBLA-maltoheptaosa sedikit lebih kuat dibandingkan BLA-maltoheptaosa pada suhu 298 K (Tabel 1). Namun, untuk melihat aktivitas α -amilase perlu dilihat interaksinya dengan tiga residu katalitik Asp231, Glu261, dan Asp328 [21]. Interaksi residu katalitik pada MTBLA lebih lemah daripada BLA pada suhu 298 K (Gambar 3). Eksperimen yang dilakukan oleh Declerck *et al.*,

melaporkan aktivitas MTBLA sedikit lebih rendah pada suhu 298 K [16]. Oleh sebab itu, interaksi antara residu katalitik dengan substrat diduga memainkan peran penting dalam aktivitas enzimatis. Pola yang mirip juga terlihat pada suhu 373 K. Interaksi residu katalitik substrat dengan MTBLA lebih lemah daripada BLA, oleh karena itu aktivitas MTBLA pada suhu 373 K diduga akan lebih rendah.

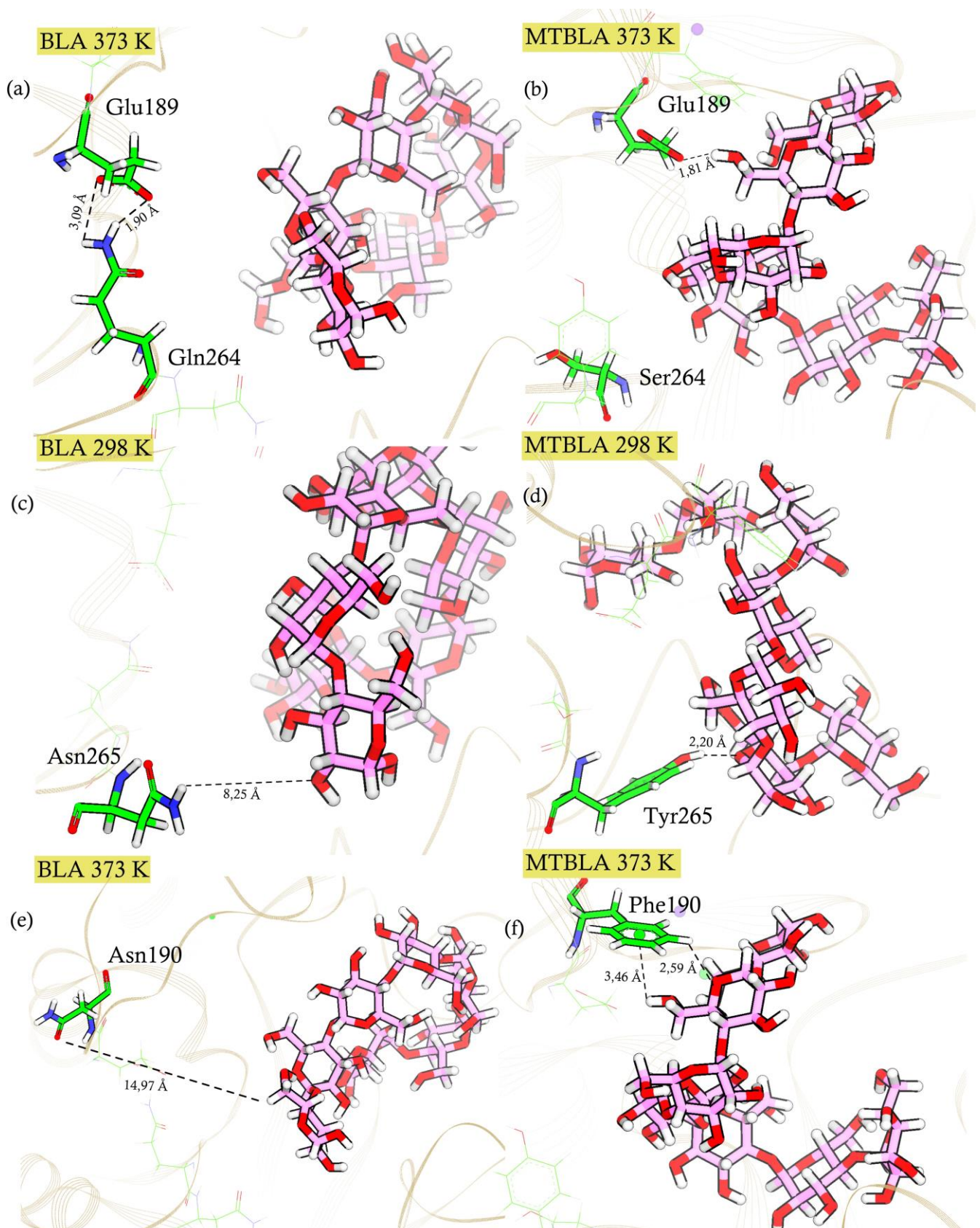


Gambar 3 Grafik dekomposisi residu katalitik (a) BLA 298 K, (b) BLA 373 K, (c) MTBLA 298 K, dan (d) MTBLA 373 K.

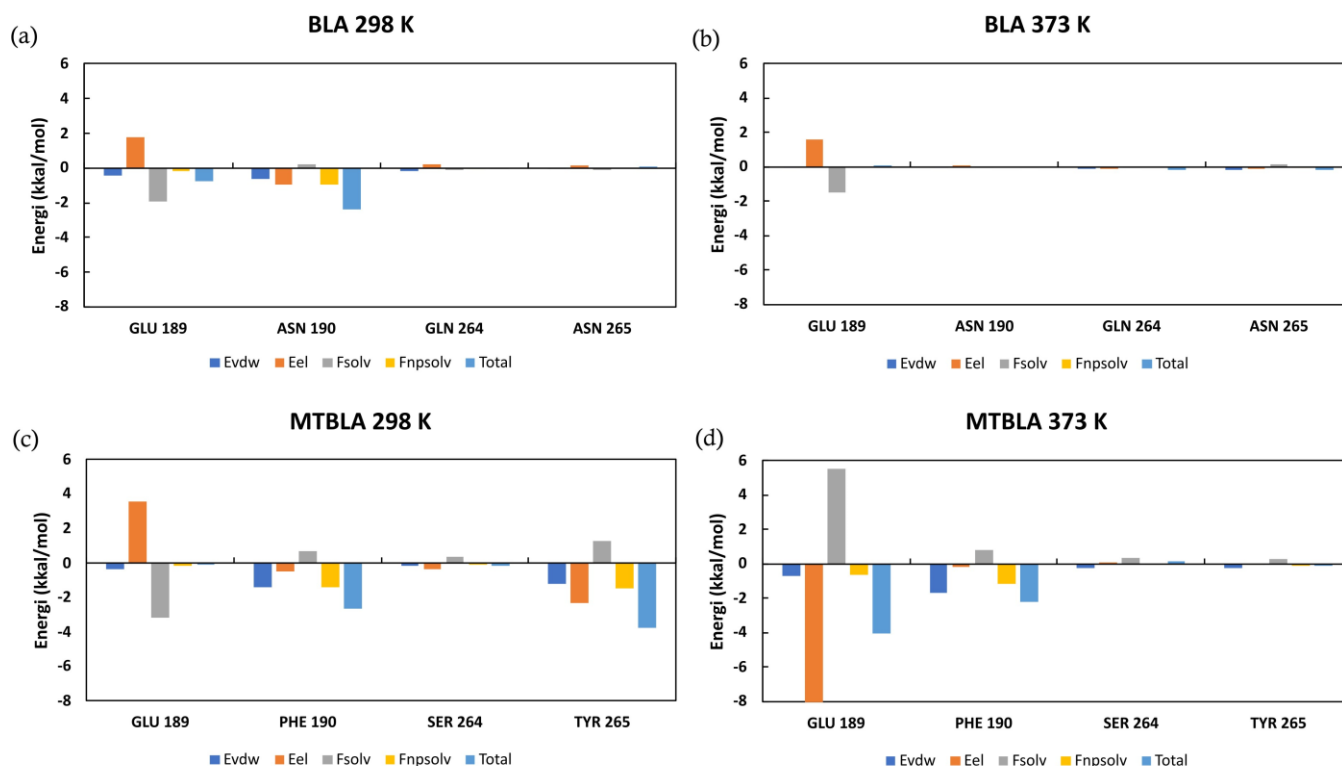
3.3 Pengaruh Mutasi terhadap Interaksi dengan Maltoheptaosa

Untuk mengetahui lebih detail mengenai pengaruh mutasi terhadap interaksi α -amilase-substrat, kami menginvestigasi tiga titik mutasi Asn190Phe, Gln264Ser, dan Asn265Tyr. Pada suhu 373 K, mutasi Gln264Ser berperan penting dalam membentuk ikatan hidrogen baru ($d = 1,81 \text{ \AA}$) antara atom O dari gugus $-\text{COO}^-$ pada Glu189 dengan gugus $-\text{OH}$ bagian planar cincin maltoheptaosa akibat dari putusnya ikatan hidrogen antara Gln264 dengan Glu189. Mutasi Asn190Phe berperan dalam membentuk interaksi CH/O antara gugus $-\text{CH}$ cincin benzena pada Phe190 dengan atom O bagian planar dari

cincin maltoheptaosa ($d = 2,59 \text{ \AA}$), serta interaksi OH/ π antara elektron π cincin benzena pada Phe190 dengan gugus $-\text{OH}$ cincin maltoheptaosa ($d = 3,46 \text{ \AA}$). Pada suhu 298 K, ikatan hidrogen terbentuk antara atom O dari gugus $-\text{CONH}_2$ pada Asn190 dengan atom H dari cincin maltoheptaosa, namun ikatan hidrogen tersebut tidak terbentuk ketika suhu ditingkatkan menjadi 373 K. Mutasi Asn265Tyr berperan dalam membentuk ikatan hidrogen antara atom H dari gugus $-\text{OH}$ pada Tyr265 dengan atom O dari cincin maltoheptaosa ($d = 2,20 \text{ \AA}$). Interaksi tersebut tidak terbentuk pada BLA (Gambar 4). Interaksi yang telah dijelaskan, bersesuaian dengan nilai energi dekomposisinya (Gambar 5).



Gambar 4 Interaksi antara maltoheptaosa dengan (a) Glu189, Gln264, (b) Glu189, Ser264, (c) Asn265, (d) Tyr265, (e) Asn190, dan (f) Phe190. Maltoheptaosa dan asam amino masing-masing ditampilkan dengan warna merah muda dan hijau dengan representasi batang.



Gambar 5 Grafik energi dekomposisi residu 189, 190, 264, 265 pada (a) BLA 298 K, (b) BLA 373 K, (c) MTBLA 298 K, dan (d) MTBLA 373 K.

Penelitian Declerck *et al.* [16] menunjukkan bahwa mutasi pada Gln264Ser dan Asn265Tyr memberikan peningkatan aktivitas enzimatis 30-40% lebih tinggi daripada BLA. Namun ketika diperkenalkan mutasi lain pada posisi His133Val, Asn190Phe, dan Ala209Val terjadi penurunan aktivitas menjadi sedikit lebih rendah dibandingkan BLA pada suhu 298 K, sehingga efek mutasi Gln264Ser dan Asn265Tyr menjadi hilang. Meningkatnya aktivitas enzimatis akibat efek mutasi Gln264Ser dan Asn265Tyr terjadi karena putusnya ikatan hidrogen antara Gln264 dengan Glu189 sehingga terbentuk ikatan hidrogen baru antara gugus -OH pada Ser264 ataupun gugus -COO⁻ pada Glu189 serta interaksi aromatik Tyr265 dengan substrat [16]. Hal ini bersesuaian dengan hasil simulasi kami pada suhu 298 K dan 373 K.

Asam amino aromatik berperan penting dalam mengenali karbohidrat. Kemunculan asam amino aromatik pada sisi aktif berkontribusi dalam selektivitasnya terhadap substrat. Asam amino aromatik membentuk interaksi nonkovalen seperti interaksi π - π atau

CH/ π dengan cincin karbohidrat [64–66]. Interaksi selain CH/ π seperti OH/ π , NH/ π , dan CH/O sering kali diabaikan meskipun interaksi tersebut juga berperan dalam pengikatan enzim dengan substrat [67].

Mutasi lima titik cenderung membuat enzim menjadi lebih kaku [16]. Nilai aktivitas tidak selalu berbanding lurus dengan termostabilitas. Hasil simulasi kami mendukung pernyataan ini yang dibuktikan dengan hasil RMSD dan RMSF (Gambar 2) yang mengindikasikan bahwa MTBLA memiliki struktur lebih kaku daripada BLA. Walau demikian, pada penelitian ini, kami hanya mengkaji aspek interaksinya dengan substrat. Perlu kajian lanjutan mengenai aspek kinetika *unfolding*.

4 Kesimpulan

Pada suhu 373 K, mutasi Asn190Phe berperan dalam membentuk interaksi CH/O antara gugus -CH cincin benzena pada Phe190 dengan atom O bagian planar dari cincin maltoheptaosa, serta interaksi OH/ π antara

elektron π cincin benzena pada Phe190 dengan gugus -OH bagian planar dari cincin maltoheptaosa. Mutasi Gln264Ser berperan dalam membentuk ikatan hidrogen tambahan antara atom O dari gugus -COO⁻ pada Glu189 dengan gugus -OH dari cincin maltoheptaosa. Pada suhu 298 K, mutasi Asn265Tyr berperan dalam membentuk ikatan hidrogen antara atom H dari gugus -OH pada Tyr265 dengan atom O bagian planar dari cincin maltoheptaosa. Seluruh interaksi tersebut tidak terbentuk pada BLA.

Bila meninjau interaksi substrat dengan residu katalitik, pada suhu 298 K, total interaksi MTBLA-maltoheptaosa sedikit lebih kuat dibandingkan BLA-maltoheptaosa. Namun, interaksi residu katalitik Asp231, Glu261 dan Asp328 dengan maltoheptaosa pada BLA lebih kuat daripada MTBLA. Hasil eksperimen Declerck *et al.* (2003) menunjukkan bahwa aktivitas MTBLA pada suhu 298 K sedikit lebih rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa interaksi substrat dengan residu katalitik memainkan peran penting dalam aktivitas. Pola yang mirip terlihat pada suhu 373 K. Interaksi residu katalitik dengan substrat pada MTBLA lebih lemah daripada BLA. Sehingga aktivitas MTBLA pada suhu 373 K juga akan lebih rendah. Walau begitu studi lebih lanjut mengenai kinetika *unfolding* perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas serta mengetahui hubungan daya tahan enzim dengan aktivitas.

5 Pernyataan

5.1 Ucapan Terima Kasih

Kami berterima kasih kepada Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia atas pendanaan dari program Penelitian Pascasarjana (PPS).

5.2 Penyandang Dana

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia dari program Penelitian Pascasarjana (PPS).

5.3 Kontribusi Penulis

Annisyaban Fatiha Azzahra dan Regaputra Satria Janitra: Merencanakan dan mendesain eksperimen; melakukan eksperimen; mengolah dan menganalisis data; serta menulis

manuskrip. Wahyu Widayat dan Farhan Azhwin Maulana: Mengolah dan menganalisis data; serta menulis manuskrip. Safri Ishmayana dan Muhammad Yusuf: Merencanakan dan mendesain eksperimen; serta menulis manuskrip. Seluruh penulis telah membaca dan menyetujui manuskrip ini.

5.4 Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

6 Data Pendukung

Data pendukung artikel ini dapat diakses secara online.

7 Daftar Pustaka

- [1] Paul J S, Gupta N, Beliya E, Tiwari S and Jadhav S K 2021 Aspects and Recent Trends in Microbial α -Amylase: a Review *Appl Biochem Biotechnol* **193** 2649–98
- [2] Elyasi Far B, Ahmadi Y, Yari Khosroshahi A and Dilmaghani A 2020 Microbial Alpha-Amylase Production: Progress, Challenges and Perspectives *Adv Pharm Bull* **10** 350–8
- [3] Kandra L 2003 α -Amylases of medical and industrial importance *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **666–667** 487–98
- [4] Pouyan S, Lagzian M and Sangtarash M H 2022 Enhancing thermostabilization of a newly discovered α -amylase from *Bacillus cereus* GL96 by combining computer-aided directed evolution and site-directed mutagenesis *International Journal of Biological Macromolecules* **197** 12–22
- [5] Hmidet N, Bayoudh A, Berrin J G, Kanoun S, Juge N and Nasri M 2008 Purification and biochemical characterization of a novel α -amylase from *Bacillus licheniformis* NH1 *Process Biochemistry* **43** 499–510
- [6] Parashar D and Satyanarayana T 2018 An Insight Into Ameliorating Production, Catalytic Efficiency, Thermostability and Starch Saccharification of Acid-Stable α -Amylases From Acidophiles *Front. Bioeng. Biotechnol.* **6** 125
- [7] Gopinath S C B, Anbu P, Arshad M K M, Lakshmipriya T, Voon C H, Hashim U and Chinni S V 2017 Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production *BioMed Research International* **2017** 1–9
- [8] Declerck N, Joyet P, Gaillardin C and Masson J M 1990 Use of amber suppressors to investigate the thermostability of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase. Amino acid replacements at 6

- histidine residues reveal a critical position at His-133. *Journal of Biological Chemistry* **265** 15481–8
- [9] Joyet P, Declerck N and Gaillardin C 1992 Hyperthermostable Variants of a Highly Thermostable Alpha-Amylase *Nat Biotechnol* **10** 1579–83
- [10] Declerck N, Joyet P, Trosset J-Y, Garnier J and Gaillardin C 1995 Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* α -amylase: multiple amino acid replacements and molecular modelling *Protein Eng Des Sel* **8** 1029–37
- [11] Machius M, Wiegand G and Huber R 1995 Crystal Structure of Calcium-depleted *Bacillus licheniformis* α -amylase at 2.2 Å Resolution *Journal of Molecular Biology* **246** 545–59
- [12] Declerck N, Machius M, Chambert R, Wiegand G, Huber R and Gaillardin C 1997 Hyperthermostable mutants of *Bacillus licheniformis* alpha-amylase: thermodynamic studies and structural interpretation *Protein Engineering Design and Selection* **10** 541–9
- [13] Machius M, Declerck N, Huber R and Wiegand G 1998 Activation of *Bacillus licheniformis* α -amylase through a disorder $\rightarrow$ order transition of the substrate-binding site mediated by a calcium–sodium–calcium metal triad *Structure* **6** 281–92
- [14] Declerck N, Machius M, Wiegand G, Huber R and Gaillardin C 2000 Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis* α -amylase 1 Edited by A. R. Fersht *Journal of Molecular Biology* **301** 1041–57
- [15] Machius M, Declerck N, Huber R and Wiegand G 2003 Kinetic Stabilization of *Bacillus licheniformis* α -Amylase through Introduction of Hydrophobic Residues at the Surface *Journal of Biological Chemistry* **278** 11546–53
- [16] Declerck N, Machius M, Joyet P, Wiegand G, Huber R and Gaillardin C 2003 Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50°C temperature range *Protein Engineering, Design and Selection* **16** 287–93
- [17] Fitter J, Herrmann R, Dencher N A, Blume A and Hauss T 2001 Activity and Stability of a Thermostable α -Amylase Compared to Its Mesophilic Homologue: Mechanisms of Thermal Adaptation *Biochemistry* **40** 10723–31
- [18] Kikani B A and Singh S P 2015 Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy *International Journal of Biological Macromolecules* **81** 450–60
- [19] Karplus M and Kuriyan J 2005 Molecular dynamics and protein function *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102** 6679–85
- [20] Housaindokht M R, Bozorgmehr M R, Hosseini H E, Jalal R, Asoodeh A, Saberi M, Haratipour Z and Monhemi H 2013 Structural properties of the truncated and wild types of Taka-amylase: A molecular dynamics simulation and docking study *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **95** 36–40
- [21] Vahidi S H, Bozorgmehr M R, Morsali A and Beyramabadi S A 2018 Does high pressure have any effect on the structure of alpha amylase and its ability to binding to the oligosaccharides having 3–7 residues? Molecular dynamics study *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **80** 85–94
- [22] Manas N H A, Bakar F D A and Illias R Md 2016 Computational docking, molecular dynamics simulation and subsite structure analysis of a maltogenic amylase from *Bacillus lehensis* G1 provide insights into substrate and product specificity *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **67** 1–13
- [23] Webb B and Sali A 2016 Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER *CP in Bioinformatics* **54**
- [24] Wiederstein M and Sippl M J 2007 ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins *Nucleic Acids Research* **35** W407–10
- [25] Sippl M J 1993 Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins *Proteins* **17** 355–62
- [26] Laskowski R A, MacArthur M W, Moss D S and Thornton J M 1993 PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures *J Appl Crystallogr* **26** 283–91
- [27] Lüthy R, Bowie J U and Eisenberg D 1992 Assessment of protein models with three-dimensional profiles *Nature* **356** 83–5
- [28] Colovos C and Yeates T O 1993 Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions *Protein Sci.* **2** 1511–9
- [29] Dennington R, Keith T A and Millam J M 2009 GaussView (5.0.9)
- [30] Thongnum K and Chanthai S 2018 Inhibitory Reactivity of Capsaicin with α -Amylase and α -Glucosidase Related to Antidiabetes using Molecular Docking and Quantum Calculation Methods *Orient. J. Chem* **34** 2211–28
- [31] Yunitasari N, Raharjo T J, Swasono R T and Pranowo H D 2022 Identification α -Amylase Inhibitors of *Vernonia amygdalina* Leaves Extract Using Metabolite Profiling Combined with Molecular Docking *Indones. J. Chem.* **22** 526

- [32] Hanwell M D, Curtis D E, Lonie D C, Vandermeersch T, Zurek E and Hutchison G R 2012 Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform *J. Cheminform* **4** 17
- [33] Halgren T A 1996 Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94 *J. Comput. Chem.* **17** 490–519
- [34] Halgren T A 1996 Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions *J. Comput. Chem.* **17** 520–52
- [35] Halgren T A 1996 Merck molecular force field. III. Molecular geometries and vibrational frequencies for MMFF94 *J. Comput. Chem.* **17** 553–86
- [36] Halgren T A and Nachbar R B 1996 Merck molecular force field. IV. conformational energies and geometries for MMFF94 *J. Comput. Chem.* **17** 587–615
- [37] Halgren T A 1996 Merck molecular force field. V. Extension of MMFF94 using experimental data, additional computational data, and empirical rules *J. Comput. Chem.* **17** 616–41
- [38] Halgren T A 1999 MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies *J. Comput. Chem.* **20** 720–9
- [39] Sure R and Grimme S 2013 Corrected small basis set Hartree-Fock method for large systems *J. Comput. Chem.* **34** 1672–85
- [40] Barca G M J, Bertoni C, Carrington L, Datta D, De Silva N, Deustua J E, Fedorov D G, Gour J R, Gunina A O, Guidez E, Harville T, Irle S, Ivanic J, Kowalski K, Leang S S, Li H, Li W, Lutz J J, Magoulas I, Mato J, Mironov V, Nakata H, Pham B Q, Piecuch P, Poole D, Pruitt S R, Rendell A P, Roskop L B, Ruedenberg K, Sattasathuchana T, Schmidt M W, Shen J, Slipchenko L, Sosonkina M, Sundriyal V, Tiwari A, Galvez Vallejo J L, Westheimer B, Włoch M, Xu P, Zahariev F and Gordon M S 2020 Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system *The Journal of Chemical Physics* **152** 154102
- [41] Jurrus E, Engel D, Star K, Monson K, Brandi J, Felberg L E, Brookes D H, Wilson L, Chen J, Liles K, Chun M, Li P, Gohara D W, Dolinsky T, Konecny R, Koes D R, Nielsen J E, Head-Gordon T, Geng W, Krasny R, Wei G, Holst M J, McCammon J A and Baker N A 2018 Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite *Protein Science* **27** 112–28
- [42] Kuriki T and Imanaka T 1999 The Concept of The α -Amylase Family: Structural Similarity and Common Catalytic Mechanism *J. Biosc. Bioeng.* **87** 557–65
- [43] Pinto G P, Brás N F, Perez M A S, Fernandes P A, Russo N, Ramos M J and Toscano M 2015 Establishing the Catalytic Mechanism of Human Pancreatic α -Amylase with QM/MM Methods *J. Chem. Theory Comput.* **11** 2508–16
- [44] Maier J A, Martinez C, Kasavajhala K, Wickstrom L, Hauser K E and Simmerling C 2015 ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB *J. Chem. Theory Comput.* **11** 3696–713
- [45] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, Impey R W and Klein M L 1983 Comparison of simple potential functions for simulating liquid water *The Journal of Chemical Physics* **79** 926–35
- [46] Janitra R S, Destiarani W, Hardianto A, Baroroh U, Rohmatulloh F G, Rustaman, Subroto T, Rukiah and Yusuf M 2023 Multilayer Model of Gold Nanoparticles (AuNPs) and Its Application in the Classical Molecular Dynamics Simulation of Citrate-Capped AuNPs *J. Phys. Chem. B* **127** 7103–10
- [47] York D M, Darden T A and Pedersen L G 1993 The effect of long-range electrostatic interactions in simulations of macromolecular crystals: A comparison of the Ewald and truncated list methods *The Journal of Chemical Physics* **99** 8345–8
- [48] Wu X and Brooks B R 2003 Self-guided Langevin dynamics simulation method *Chemical Physics Letters* **381** 512–8
- [49] Case D A, Aktulga H M, Belfon K, Ben-Shalom I Y, Brozell S R, Cerutti D S, Cheatham T E, III, Cruzeiro V W D, Darden T A, Duke R E, Giambasu G, Gilson M K, Gohlke H, Goetz A W, Harris R, Izadi S, Izmailov S A, Jin C, Kasavajhala K, Kaymak M C, King E, Kovalenko A, Kurtzman T, Lee T S, LeGrand S, Li P, Lin C, Liu J, Luchko T, Luo R, Machado M, Man V, Manathunga M, Merz K M, Miao Y, Mikhailovskii O, Monard G, Nguyen H, O'Hearn K A, Onufriev A, Pan F, Pantano S, Qi R, Rahnamoun A, Roe D R, Roitberg A, Sagui C, Schott-Verdugo S, Shen J, Simmerling C L, Skrynnikov N R, Smith J, Swails J, Walker R C, Wang J, Wei H, Wolf R M, Wu X, Xue Y, York D M, Zhao S and Kollman P A 2021 Amber 2021
- [50] Roe D R and Cheatham T E 2013 PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data *J. Chem. Theory Comput.* **9** 3084–95
- [51] Trott O and Olson A J 2009 AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading *J. Comput. Chem.* NA-NA

- [52] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack A F and Forli S 2021 AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings *J. Chem. Inf. Model.* **61** 3891–8
- [53] Morris G M, Huey R, Lindstrom W, Sanner M F, Belew R K, Goodsell D S and Olson A J 2009 AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility *J. Comput. Chem.* **30** 2785–91
- [54] O'Boyle N M, Banck M, James C A, Morley C, Vandermeersch T and Hutchison G R 2011 Open Babel: An open chemical toolbox *J Cheminform* **3** 33
- [55] SYSTÈMES D 2021 BIOVIA Discovery Studio Dassault Syst mes BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017
- [56] Humphrey W, Dalke A and Schulten K 1996 VMD: Visual molecular dynamics *Journal of Molecular Graphics* **14** 33–8
- [57] Bayly C I, Cieplak P, Cornell W and Kollman P A 1993 A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model *J. Phys. Chem.* **97** 10269–80
- [58] Frisch M J, Trucks G W, Schlegel H B, Scuseria G E, Robb M A, Cheeseman J R, Scalmani G, Barone V, Petersson G A, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich A V, Bloino J, Janesko B G, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian H P, Ortiz J V, Izmaylov A F, Sonnenberg J L, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski V G, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery J A Jr, Peralta J E, Ogliaro F, Bearpark M J, Heyd J J, Brothers E N, Kudin K N, Staroverov V N, Keith T A, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A P, Burant J C, Iyengar S S, Tomasi J, Cossi M, Millam J M, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski J W, Martin R L, Morokuma K, Farkas O, Foresman J B and Fox D J 2015 Gaussian 09 Revision D.01 (Revision D.01)
- [59] He X, Man V H, Yang W, Lee T-S and Wang J 2020 A fast and high-quality charge model for the next generation general AMBER force field *The Journal of Chemical Physics* **153** 114502
- [60] Miller B R, McGee T D, Swails J M, Homeyer N, Gohlke H and Roitberg A E 2012 MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations *J. Chem. Theory Comput.* **8** 3314–21
- [61] Vargaftik N B, Volkov B N and Voljak L D 1983 International Tables of the Surface Tension of Water *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **12** 817–20
- [62] Rahban M, Zolghadri S, Salehi N, Ahmad F, Haertlé T, Rezaei-Ghaleh N, Sawyer L and Saboury A A 2022 Thermal stability enhancement: Fundamental concepts of protein engineering strategies to manipulate the flexible structure *International Journal of Biological Macromolecules* **214** 642–54
- [63] Maulana F A 2019 *Simulasi Termostabilitas Struktur Glukosa* (Bogor: Institut Pertanian Bogor)
- [64] Asensio J L, Ardá A, Cañada F J and Jiménez-Barbero J 2013 Carbohydrate–Aromatic Interactions *Acc. Chem. Res.* **46** 946–54
- [65] Matsui I and Hondat K 1994 Roles of the Aromatic Residues Conserved in the Active Center of *Saccharomycopsis* α -Amylase for Transglycosylation and Hydrolysis Activity *Biochemistry* **33** 451–8
- [66] Baroroh U, Yusuf M, Rachman S D, Ishmayana S, Syamsunarno M R A A, Levita J and Subroto T 2017 The Importance of Surface-Binding Site towards Starch-Adsorptivity Level in α - Amylase: A Review on Structural Point of View *Enzyme Research* **2017** 1–11
- [67] Stanković I M, Blagojević Filipović J P and Zarić S D 2020 Carbohydrate – Protein aromatic ring interactions beyond CH/ π interactions: A Protein Data Bank survey and quantum chemical calculations *International Journal of Biological Macromolecules* **157** 1–9