

Pemodelan protein dan analisis *molecular docking* enzim β -glukanase solat *Bacillus subtilis* W3.15

Protein modeling and molecular docking analysis of β -glukanase enzyme isolate of Bacillus subtilis W3.15

Ainia HANIFITRI¹⁾, Laksmi AMBARSARI^{2*)} & Nisa Rachmania MUBARIK³⁾

¹⁾Prodi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

²⁾Departemen Biokimia, FMIPA, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

³⁾Departemen Biologi, FMIPA, IPB University, Bogor, 16680, Indonesia

Diterima tgl 9 Jan 2023 / Perbaikan tgl 30 Jan 2023 / Disetujui tgl 23 Apr 2023

Abstract

The β -glukanase enzyme is an enzyme protein that can hydrolyze β -glucan, one of the main components of the fungal cell wall. This enzyme protein is produced by several bacteria, one of which is *B. subtilis*. The three-dimensional (3D) structure of proteins is necessary to understand their properties and functions of proteins. Enzyme proteins can be analyzed for their structure and function using *in silico* method. This study aims to detect the β -glukanase gene from *B. subtilis* W3.15 and analyze it using the *in silico* method. The methods in this research are homology modeling and molecular docking analyses. Modeling was carried out using the SWISS-MODEL server and docking analysis using the PLANTS 1.1 program. Modeling the β -glukanase enzyme is based on the template of the β -glukanase enzyme protein model with PDB code 3o5s. The results of sequence alignment and model visualization were quite good as indicated by the model having a Ramachandran Plot value in the favored area of 91.10 %, a MolProbity score of 0.95, and a QMEAN value of 0.90 ± 0.06 . The β -glukanase enzyme model was then docked using the PLANTS1.1 program with native ligand B3P, 1,4- β -D-Glucan, D-glucose, β -D-Glucan from oats, and N-Acetyl glucosamine. The results of docking analysis showed that the β -glucan ligand (β -D-glucan from oats) used as a substrate in the cultivation of isolate *B. subtilis* W3.15 had a better binding energy prediction value compared to the B3P ligand, which is a natural ligand in the template proteins.

[Keywords: β -Glucan, β -D-Glucan from oat, ligand, PLANTS 1.1, 3D structure, SWISS-MODEL]

*)Korespondensi penulis: laksmi@apps.ipb.ac.id

0125-9318/ 1858-3768 ©2023 Authors

This is an open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Menara Perkebunan is DOAJ indexed Journal and accredited as Sinta 2 Journal (<https://sinta.kemdikbud.go.id/journals/profile/3125>)

How to Cite: Hanifitri, A., Ambarsari, L., & Mubarik, N. R. (2023). Pemodelan protein dan analisis molecular docking enzim β -glukanase isolat *Bacillus subtilis* W3.15. *Menara Perkebunan*, 91(1), 59 – 71. <http://dx.doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v91i1.523>

Abstrak

Enzim β -glukanase merupakan protein enzim yang dapat menghidrolisis β -glukan, salah satu komponen utama penyusun dinding sel jamur. Protein enzim ini dihasilkan oleh beberapa bakteri salah satunya adalah *B. subtilis*. Struktur tiga dimensi (3D) protein diperlukan untuk memahami sifat dan fungsi protein. Protein enzim dapat dianalisis struktur dan fungsinya menggunakan metode *in silico*. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi gen β -glukanase dari *B. subtilis* W3.15 dan menganalisisnya menggunakan metode *in silico* menggunakan *homology modelling* dan analisis *molecular docking*. Pemodelan dilakukan dengan server SWISS-MODEL dan analisis *docking* menggunakan program PLANTS 1.1. Pemodelan enzim β -glukanase berdasarkan templat dari model protein enzim β -glukanase dengan kode PDB 3o5s. Hasil pensejajaran sekuens dan visualisasi model cukup baik yang ditunjukkan dengan model memiliki nilai *Ramachandran Plot* pada daerah *favoured* sebesar 91,10 %, skor *MolProbity* sebesar 0,95 dan nilai QMEAN $0,90 \pm 0,06$. Model enzim β -glukanase kemudian di-*docking* menggunakan program PLANTS1.1 dengan ligan *native ligand* B3P, 1,4- β -D-Glucan, D-glucose, β -D-Glucan dari oat, dan N-Acetyl glucosamine. Hasil analisis *docking* menunjukkan bahwa ligan β -glukan (β -D-glucan dari oat) yang digunakan sebagai substrat dalam kultivasi isolat *B. subtilis* W3.15 memiliki nilai prediksi energi ikat yang lebih baik dibandingkan dengan ligan B3P, yang merupakan ligan alami dalam protein templat.

[Kata kunci: β -Glucan, β -D-Glucan dari oat, ligan, PLANTS 1.1, struktur 3D, SWISS-MODEL]

Pendahuluan

Bakteri memiliki berbagai manfaat yang sangat menguntungkan bagi kehidupan manusia di berbagai sektor, termasuk sektor pertanian. Metabolit yang dihasilkan oleh bakteri, baik metabolit primer maupun sekunder dapat dimanfaatkan sesuai kebutuhan pada sektor pertanian, baik sebagai pembasmi hama ataupun penambah nutrisi bagi komoditas tanaman tertentu. Salah satu contoh bakteri yang dapat dimanfaatkan adalah bakteri penghasil enzim β -glukanase. Enzim β -glukanase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis β -glukan yang merupakan salah satu komponen utama penyusun dinding sel cendawan. Enzim β -glukanase bekerja pada ikatan β -glikosidik dalam struktur β -glukan. Penggolongan enzim ini pun cukup beragam tergantung pada ikatan glikosidik yang dihidrolisisnya. β -glukanase yang menghidrolisis ikatan β -1,3 dikenal sebagai laminarinase (EC 3.2.1.39) (Qin et al., 2017), sedangkan yang menghidrolisis ikatan β -1,4 lebih dikenal sebagai selulase (EC 3.2.1.4) (Ejaz et al., 2021).

Enzim β -glukanase dalam bidang industri berperan dalam proses degradasi glukan untuk meningkatkan kualitas dan mutu pakan ternak, pendegradasi limbah industri pulp dan kertas hingga biopolimer dan tekstil (Munyaka et al., 2016; Wang et al., 2017; Sharma et al., 2022). Selain itu, enzim ini juga berpotensi melisiskan dinding sel cendawan yang merupakan salah satu patogen bagi tanaman, sehingga fungsi dari enzim β -glukanase dapat dimanfaatkan sebagai pembasmi cendawan fitopatogenik seperti *Fusarium oxysporum* (Khan et al., 2018). Beberapa laporan tentang pengendalian hayati terhadap layu fusarium pada tanaman tomat mengungkapkan beberapa jenis bakteri, terutama bakteri tanah cukup efektif dalam pengendalian hama *F. oxysporum* dan aktivitasnya telah diuji dalam percobaan di rumah kaca dan percobaan lapangan skala kecil (Elanchezhian et al., 2018). Hasil penelitian Yu et al. (2019) menunjukkan bahwa enzim β -glukanase *Paenibacillus terrae* dapat melindungi tanaman padi terhadap serangan cendawan *Magnaporthe oryzae*. Dewi et al. (2016) melaporkan bahwa β -glukanase yang diproduksi oleh *B. subtilis* memiliki daya hambat kuat terhadap cendawan *Curvularia affinis* dan *Colletotrichum gleosporioides*. Hasil penelitian Suryadi et al. (2013) menunjukkan produksi β -glukanase oleh *B. cereus*, *B. firmus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Serratia marcescens* dapat menghambat pertumbuhan cendawan *Rhizoctonia solani* penyebab penyakit pelepah daun pada tanaman padi.

Selain komoditas pangan dan hortikultura, terdapat pula komoditas perkebunan yaitu kakao yang dapat diserang oleh cendawan patogen. Patogen yang domi-

nan menyerang tanaman kakao yaitu *Phytophthora palmivora* penyebab busuk buah kakao. Penyakit ini merupakan salah satu penyakit penting kakao dan dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 90 % pada musim hujan terutama pada lahan dengan populasi semut yang tinggi (Hakkar et al., 2014). Komoditas perkebunan lain yang dapat diserang oleh cendawan patogen yaitu tanaman karet dan teh. Cendawan patogen yang umum menyerang kedua tanaman itu adalah cendawan *Ganoderma philippii* yang menyebabkan penyakit akar merah. Berdasarkan penelitian dilakukan oleh Budiarti et al. (2011), Kombinasi β -1,3-glukanase dan kitinase *T. harzianum* (Sigma) menunjukkan adanya lisis pada hifa *G. philippii*.

Enzim merupakan salah satu jenis protein yang dapat dianalisis sifat dan fungsinya secara biokimia molekuler. Sifat dan fungsi protein tersebut dapat dianalisis jika protein tersebut memiliki struktur tiga dimensi (3D). Penentuan struktur 3D protein dapat dilakukan dengan menggunakan peralatan laboratorium, antara lain Difraksi Sinar-X, *Nuclear Magnetic Resonance* dan mikroskop elektron (Komari et al, 2020). Tiga cara tersebut membutuhkan waktu yang cukup lama dan memerlukan biaya sangat besar untuk penentuan satu struktur protein, sehingga diperlukan penentuan struktur 3D protein yang lebih mudah dan murah yaitu dengan cara *in silico* (Wijaya et al., 2016).

Metode pemodelan struktur 3D protein secara *in silico* terdiri atas 3 metode, yaitu *homology modelling*, *fold recognition*, dan *ab initio* (Saudale, 2020). Metode pemodelan protein yang banyak digunakan adalah *homology modelling*, hal ini karena metode ini secara komputasi lebih mudah dan lebih cepat dibandingkan dua metode lainnya. Metode ini juga cukup baik dalam memprediksi struktur 3 dimensi suatu protein, karena pembuatannya berdasarkan pada penjejarian sekuens asam amino protein target dengan protein lain sebagai templat yang telah diketahui struktur 3D-nya secara instrumentasi.

Studi *in silico* selanjutnya setelah pemodelan adalah analisis penambatan molekuler (*docking analysis*). Enzim β -glukanase pada dasarnya memiliki substrat yaitu senyawa karbohidrat yang bernama β -glukan. Metode penambatan molekuler digunakan untuk menganalisis orientasi ikatan molekul ligan (substrat enzim) dan reseptor (enzim β -glukanase) secara spesifik dengan mengukur nilai afinitasnya (Tumilar et al., 2021). Penambatan molekuler bekerja dengan algoritma pencarian dimana konformasi ligan dievaluasi secara rekursif hingga tercapai nilai energi minimum. Pendekatan molekuler yang dapat dilakukan dalam percobaan penambatan ada dua, yaitu *rigid body approach* yang mana ligan dan reseptor di-

asumsikan saling mengenal, dan *flexible docking* yang mempertimbangkan kemungkinan pengenalan konformasi ligan dan reseptor (Prieto-Martinez et al., 2018).

Struktur protein, struktur ligan, dan fungsi *scoring* yang diberikan bertujuan untuk menemukan konformasi ligan yang memiliki energi rendah pada sisi ikatan protein yang berhubungan dengan fungsi *scoring* minimum secara umum. Analisis *docking* yang dilakukan pada penelitian ini adalah menggunakan program PLANTS. Program PLANTS memiliki algoritma *docking* berdasarkan kelas algoritma optimisasi stokastik yang dinamakan *Ant Colony Optimization* (ACO). ACO diinisiasi berdasarkan perilaku semut yang menemukan jalan terpendek antara sarang dan sumber makanan. Semut menggunakan komunikasi tidak langsung yaitu dalam bentuk feromon yang menandai jalan antara sarang dan sumber makanan. Pada kasus *docking* senyawa-protein, “koloni semut” diperintahkan untuk menemukan konformasi senyawa yang memberikan energi terendah pada sisi ikatan protein (PLANTS) (Korb, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi struktur tiga dimensi protein enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15 secara *in silico* menggunakan SWISS-MODEL, yang kemudian dilanjutkan dengan menganalisis afinitas interaksi ligan-reseptor dengan metode *docking*. Informasi yang didapatkan dari penelitian ini diharapkan dapat memperluas kajian molekuler mengenai struktur protein enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15 serta memberikan dasar untuk mempelajari mekanisme interaksi antar enzim β -glukanase dan substratnya dalam pengendalian penyakit layu pada tanaman akibat jamur patogen.

Bahan dan Metode

Peremajaan isolat bakteri

Isolat bakteri *B. subtilis* W3.15 dan *B. velezensis* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA, IPB University ditumbuhkan pada medium *nutrient agar* (NA) yang mengandung 1 % β -glukan selama 24 jam pada suhu 28 °C dan disimpan pada suhu 4 °C.

Deteksi gen β -glukanase dan sekuensing

Keberadaan gen penyandi β -glukanase dalam genom isolat bakteri W3.15 dideteksi berdasarkan metode Hegazy et al. (2018). Amplifikasi gen penyandi β -glukanase dilakukan pada mesin PCR (*Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler*, USA), yang di program untuk satu siklus pertama (pre-denaturasi) pada suhu 95 °C selama dua menit, kemudian siklus selanjutnya dilakukan dengan ketentuan sebagai

berikut: denaturasi pada suhu 95 °C selama satu menit, penempelan primer pada suhu 52 °C selama satu menit, pemanjangan pada suhu 72 °C selama satu menit dan pasca pemanjangan pada suhu 72 °C selama lima menit kemudian campuran reaksi disimpan sementara pada suhu 4 °C. Primer yang digunakan dalam deteksi gen β -glukanase pada isolat bakteri terpilih adalah primer *reverse* (5'-ATT GCA GCA GGC TCT TTC AC-3') dan primer *forward* (5'-AAT GAA AGG GGA ATG CCA AT-3') (Hegazy et al., 2018). Setelah proses amplifikasi gen *bgls* pada mesin PCR telah selesai, sebanyak 10 μ L amplikon gen *bgls* dimigrasikan pada gel agarosa 1 % (b/v) yang telah ditambahkan 3 μ L pewarna DNA *peqgreen* (PeqLab, Jerman) dengan cara elektroforesis pada tegangan 70 Volt selama 35 menit. Hasil migrasi fragmen DNA dari elektroforesis lalu divisualisasi di bawah sinar UV dalam mesin *gel-doc*. Keberadaan pita DNA berukuran \pm 800 bp yang berada pada daerah pita sekitar 750 – 1.000 bp dari marker DNA 1 kb menunjukkan hasil positif untuk keberadaan gen penyandi β -glukanase pada isolat bakteri W3.15. Hasil amplifikasi gen *bgls* tersebut kemudian dilakukan sekuensing melalui jasa sekuensing dengan menggunakan primer gen *bgls* berdasarkan referensi dari Hegazy et al. (2018), yaitu *reverse* (5'-ATT GCA GCA GGC TCT TTC AC-3') dan primer *forward* (5'-AAT GAA AGG GGA ATG CCA AT-3').

Pemodelan protein enzim β -glukanase

Pemodelan protein mengikuti langkah-langkah pada server SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Tahapan pemodelan adalah: penentuan sekuens target protein, identifikasi protein templat, pembuatan model, dan evaluasi model. Identifikasi protein templat dilakukan pada server swissmodel.expasy.org/interactive. Data sekuens DNA yang diperoleh dari hasil sekuensing, kemudian diterjemahkan ke dalam sekuens asam amino dengan bantuan BioEdit. Kemudian, target protein dalam format FASTA dikirimkan pada server SWISS-MODEL tersebut. Proses identifikasi templat akan menghasilkan beberapa protein templat dengan parameternya. Protein templat dipilih sesuai dengan *parameter identity*, QMEAN, dan QSQE.

Pembuatan model protein dilakukan dengan cara memilih protein templat yang dihasilkan pada server swissmodel.expasy.org/interactive/RGPEKv/template/s/. Pilihan satu protein templat umumnya menghasilkan satu atau lebih model. Model yang dihasilkan dipilih sesuai parameter GMQE, QMEAN, *Oligo State*, *Ligands*, dan *Similarity*. Evaluasi model dilakukan dengan menggunakan fitur “*Structure Assessment*”. Evaluasi dilakukan pada parameter antara lain: *Ramachandran Plot*, *Mol Probioty Results*,

Quality Estimate, dan *Residu Quality*. Pensejajaran sekuens protein model menggunakan *Pairwise Sequence Alignment* pada server <https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>. Visualisasi protein model dilakukan dengan program *BIOVIA Discovery Studio 2021* (Dassault, 2015).

Persiapan struktur reseptor dan ligan

Tahap awal untuk melakukan simulasi *docking* adalah menentukan reseptor dan ligan yang akan diuji. Reseptor yang digunakan berupa enzim β -glukanase yang telah diperoleh dari pemodelan protein sebelumnya yang kemudian dipreparasi menggunakan program YASARA (Land et al., 2018). Struktur ligan dapat diperoleh dengan mencari di database pada server PubChem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) kemudian dipreparasi dengan menggunakan *MarvinSketch* (ChemAxon, Ltd <https://chemaxon.com>).

Simulasi docking dan evaluasi hasil docking

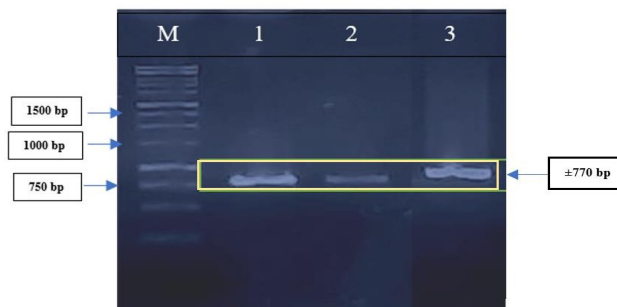
Docking dilakukan dengan menggunakan program PLANTS1.1 yaitu dengan mengetik perintah pada lembar kerja cmd, program PLANTS1.1 akan membaca protokol *plantsconfig* yang telah di set sebelumnya hingga diperoleh nilai *best score* dari ligan senyawa pembanding yang nantinya akan dibandingkan dengan nilai *best score* dari ligan senyawa uji. Langkah selanjutnya adalah membuat file hasil *docking* dari masing-masing ligan senyawa uji dengan program YASARA (tipe file .pdb) (Korb, 2009). File hasil *docking* inilah yang akan divisualisasi dan diinterpretasi untuk diketahui interaksi-interaksi yang terjadi menggunakan aplikasi *Discovery Studio*.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi gen β -glukanase dari isolat *B. subtilis* W3.15

Produksi enzim glukanase pada isolat W3.15 didasarkan pada deteksi gen *bglS* terhadap genom isolat bakteri tersebut. Pita untuk ampikon gen *bglS* berhasil dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa yang berada pada ukuran yang sesuai dengan literatur primer. Hasil ini telah sesuai dengan laporan sebelumnya bahwa ukuran pita gen *bglS* dengan primer *bglF-R* (Loni et al., 2014) sekitar 777 bp (Hegazy et al., 2018). Ukuran pita untuk gen *bglS* dari isolat W3.15 juga ternyata tidak jauh berbeda dengan yang didapatkan oleh penelitian lainnya yakni sekitar 729 bp dengan primer *BglSfosD9* (Gonçalves et al., 2020).

Amplifikasi gen *bglS* pada genom hasil isolasi dilakukan untuk mengklarifikasi keberadaan gen tersebut pada genom isolate W3.15. Hasil visualisasi gel elektroforesis terhadap hasil PCR untuk gen *bglS* diperoleh ukuran pita ampikon sekitar ± 770 bp merujuk pada marker 1 kb yang digunakan (Gambar 1). Isolat kontrol positif *B. velezensis* BT2.04 menunjukkan adanya pita pada suhu *annealing* 50 °C, yakni pita pada ukuran ± 770 bp (Gambar 1). Hasil visualisasi dari ampikon gen *bglS* tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan besar benar adanya ekspresi dan produksi enzim glukanase pada isolat W3.15. Setelah dilakukan amplifikasi, kemudian ampikon yang telah diperoleh di sekuensing dan menghasilkan sekuens yang akan digunakan untuk *modelling* protein dan menganalisis interaksi molekulernya terhadap substrat dengan metode komputasi menggunakan program PLANTS1.1.



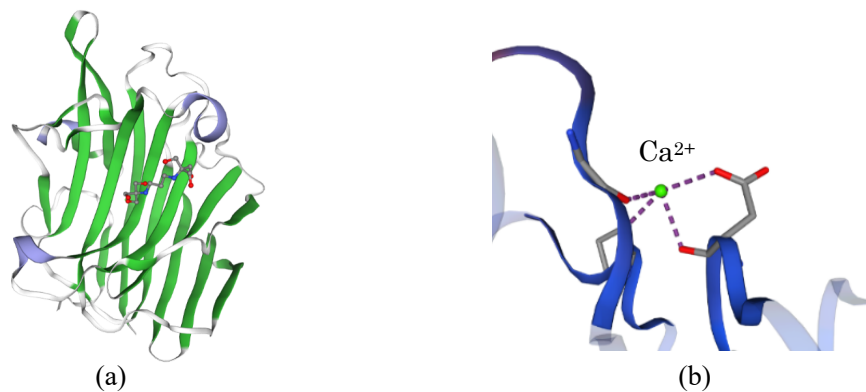
Gambar 1. Visualisasi hasil amplifikasi gen *bglS* pada gel agarose 1%. Keterangan: marker 1 kb (M), isolat *B. subtilis* W3.15 (1 dan 2) dan kontrol positif β -glukanase *B. velezensis* BT2.04 (3)

Figure 1. Visualization of *bglS* gene amplification results on 1% agarose gel. Notes: marker 1 kb (M), *B. subtilis* W3.15 (1 and 2) and positive control β -glukanase *B. velezensis* BT2.04 (3)

```
> Bacillus s W3.15 | Sekuens protein enzim beta-glukanase
RVLLLLVTGLFMSLFAVTSTASAQTGGSFDPFNGYNSGFQKADGYSNGNMFNCTWRANNVSVTSLGEMRLAL
TSPSYNKFDCGENRSVQTYGYGLYEVRMKPAKNTGIVSSFFTYTGPTDGTWPWEIDIEFLGKDTTKVQFNYYTN
GAGNHEKIVDLGFDAANAYHTYAFDWQPNSIKWYVDGQLKHTATNQIPTTPGKIMMNLWNGTGVDEWLGSYNGV
NPLYAHYDWRVRYTKK|
```

Gambar 2. Urutan asam amino enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15

Figure 2. The amino acid sequence of the β -glukanase enzyme *B. subtilis* W3.15



Gambar 3. Hasil prediksi struktur 3D enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15, (a) struktur 3D, (b) interaksi enzim dengan senyawa Ca^{2+}

Figure 3. Prediction results of the 3D structure of the β -glukanase *B. subtilis* W3.15 enzyme, (a) 3D structure, (b) enzyme interaction with Ca^{2+}

Pemodelan protein enzim β -glukanase

Pemodelan struktur protein pada penelitian ini menggunakan metode *homology modeling*. Protein target, yaitu protein enzim β -glukanase isolat bakteri *B. subtilis* W3.15 dipreparasi dengan bantuan perangkat lunak BioEdit sehingga diperoleh format file FASTA (Gambar 2). Urutan asam amino tersebut lalu digunakan dalam pencarian dan identifikasi templat dengan dibantu web server SWISS-MODEL.

Prediksi struktur 3D model enzim β -glukanase dengan menggunakan Swiss-Model menghasilkan model dengan sisi aktif enzim yang mempunyai ion kalsium (Ca^{2+}) (Gambar 3b). Pembuatan model tersebut tidak terlepas dari peran SMTL sebagai penyedia templat yang representatif sehingga memungkinkan pembangunan struktur protein model yang lengkap dan akurat menyerupai templat aslinya (Gambar 3a).

Model enzim β -glukanase yang telah dibuat kemudian dievaluasi sifat stereokimia dan sifat ruangnya. Evaluasi sifat stereokimia model dilakukan dengan menggunakan web server PROCHECK dengan menganalisis plot Ramachandran. Plot Ramachandran digunakan sebagai parameter analisis

karena plot ini menggambarkan residu asam amino pada struktur enzim secara dua dimensi, dengan sudut ϕ (phi) sebagai sumbu x dan ψ (psi) sebagai sumbu y yang dibagi dalam empat kuadran atau daerah (Laskowski et al., 1993). Keempat daerah tersebut adalah *most favoured regions*, *additional allowed regions*, *generously allowed regions*, dan *disallowed regions*. Penilaian berdasarkan plot ini dengan melihat presentase dari residu asam amino yang berada pada wilayah yang sangat disukai (*most favoured regions*) dan daerah yang tidak diizinkan (*disallowed regions*). Pada penelitian ini, menunjukkan bahwa model enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15 memiliki nilai plot Ramachandran 91,1 % pada daerah *most favoured* dan nilai 0,6 % pada daerah *disallowed*. Hal ini menunjukkan bahwa model ini baik karena memiliki jumlah nilai plot residu pada daerah *most favoured* lebih dari 90 %. Sudut ϕ (phi) sudut ψ (psi) pada plot ini merupakan deskripsi komplit secara virtual dari konformasi *backbone* plot Ramachandran dua dimensi, sehingga kombinasi dari kedua sumbu tersebut dapat dijadikan dasar dalam menilai kualitas stereokimia suatu model protein atau enzim (Laskowski et al., 1993).

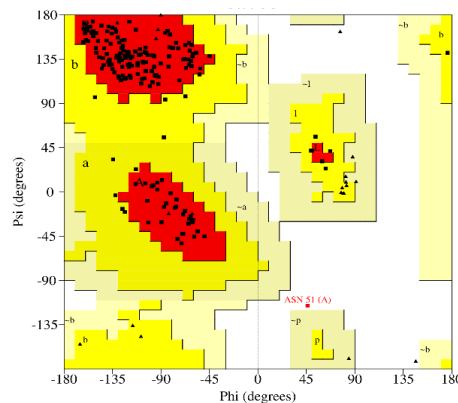
Penilaian menggunakan Verify3D didasarkan pada persen residu skor rata-rata residu 3D-1D $\geq 0,2$ yang dimiliki model. Suatu model dikatakan memiliki kualitas yang baik apabila nilai persentase residu asam amino dari penilaian Verify3D untuk rata-rata skor residu 3D-1D $\geq 0,2$ berada di atas 80 %, yaitu sebesar 99,53 % (Tabel 1). Hasil ini menggambarkan bahwa kompatibilitas sekuens dengan struktur tiga dimensinya mendekati nilai yang cukup baik. Prediksi model β -glukanase *B. subtilis* W3.15 pada penelitian ini menghasilkan model yang cukup representatif berdasarkan data evaluasi prediksi model enzim β -glukanase dari SWISS-MODEL dengan pendekatan *homology modelling*.

Skor *Molprobability* merupakan kombinasi dari *clash score*, presentase *Ramachandran outliers* dan persentase rotamer (rantai samping) yang buruk atau lebih dikenal dengan *poor rotamer* atau *rotamer outlier*. *Clash score* merupakan nilai yang diperoleh dari jumlah tumbukan per 1.000 atom. Penelitian ini memiliki nilai *clash score* 0,00 dimana nilai ini sesuai dengan kriteria nilai *clash score* yang baik yaitu

memiliki nilai $<0,45 \text{ \AA}$ (Chen et al., 2010). Kriteria selanjutnya yang dievaluasi pada penelitian ini adalah dengan melihat nilai QMEAN (Struder et al., 2020). Nilai QMEAN yang baik adalah berada di kisaran nilai 0, sedangkan nilai QMEAN yang kurang dari -4 adalah buruk (Seprianto, 2018). Nilai QMEAN pada penelitian ini berkisar 0,90 (Tabel 4) dan memenuhi syarat sebagai model yang baik. Prediksi model enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15 pada penelitian ini menghasilkan model yang cukup representatif berdasarkan data evaluasi prediksi model enzim β -glukanase dari SWISS-MODEL dengan pendekatan *homology modelling*.

Hasil docking enzim β -glukanase

Ligan uji yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas lima ligan yang merupakan senyawa atau molekul pembentuk dinding sel jamur patogen dan ligan bawaan dari struktur enzim yang telah dikristalkan. Ligan uji dan pembanding dipreparasi terlebih dahulu dengan menambahkan atom hidrogen.



Gambar 4. Plot Ramachandran
Figure 4. Ramachandran plot

Tabel 1. Hasil evaluasi model enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15

Table 1. Results of the evaluation of the β -glukanase *B. subtilis* enzyme model W3.15

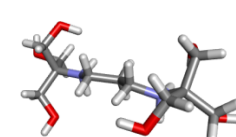
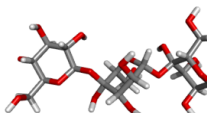
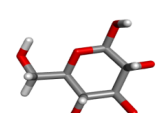
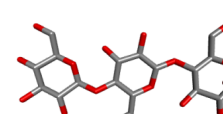
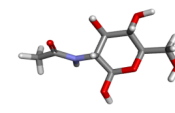
Model <i>Model</i>	Plot Ramachandran <i>Ramachandran plot</i>		3D-1D $\geq 0,2$	QMEAN	Nilai <i>Drug</i> Drug Score	Nilai <i>MolProbability</i> MolProbability score	Nilai <i>Clash</i> Clash score
	Disukai <i>Favoured</i>	Tidak diizinkan <i>Disallowed</i>					
Enzim β -glukanase	91,1%	0,6%	99,53%	0,9 \pm 0,06	0,81	0,95	0,00

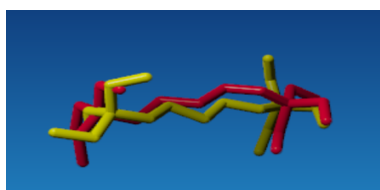
Penambatan molekul dilakukan dengan metode *targeted docking* yaitu penambatan molekul yang dilakukan pada sisi aktif dan ukuran *gridbox* yang telah ditentukan secara spesifik (Tambunan et al., 2011). Penentuan sisi aktif dan *gridbox* tersebut berdasarkan metode validitas *docking* melalui penambatan kembali (*redocking*) reseptor dan ligan alaminya sebanyak 10 kali. Validasi metode penambatan dikatakan berhasil jika nilai RMSD (*Root*

Mean Square Deviation) kurang dari 2 Å. RMSD (*Root Mean Square Deviation*) merupakan pengukuran kuantitatif yang menyatakan kesamaan koordinat dua molekul yang tumpang tindih, antara ligan alami dengan ligan alami hasil *redocking*. Semakin rendah nilai RMSD yang dihasilkan, maka ligan hasil *redocking* memiliki posisi yang semakin mendekati hasil kristalografi (Lopez-Comacho et al., 2019).

Tabel 2. Senyawa ligan pada uji penambatan molekul enzim β-glukanase

Table 2. Ligand compounds in the molecular docking of the β-glucanase enzyme

Nama Ligan <i>Ligand name</i>	Massa atom relatif (Da) <i>Relative atomic mass (Da)</i>	Donor ikatan hidrogen <i>Hydrogen bonds donors</i>	Akseptor ikatan hidrogen <i>Hydrogen bonds acceptors</i>	Struktur 3D <i>3D structure</i>
Native ligand B3P	312.000	5	6	
1,4-β-D-Glukan	536.000	13	18	
D-glukosa	180.000	5	6	
β-D-Glukan oat	472.000	0	16	
N-Asetil glukosamin	221.210	5	7	



Gambar 4. Hasil validasi metode penambatan molekul ligan, ligan awal (merah) dan ligan hasil penambatan ulang (kuning). RMSD = 1,6025 Å

Figure 4. Results of validation of the ligand molecule docking method, the initial ligand (red) and the ligand redocking result (yellow). RMSD = 1.6025 Å

Tabel 3. Hasil *docking* senyawa ligan uji dengan model enzim β -glukanase *B. subtilis* W3.15
 Table 3. The result of *docking* ligand tests with the β -glukanase enzyme from *B. subtilis* W3.15

Ligan Ligand	Skor PLANTSCEMPLP (kkal/mol) Score of PLANTSCEMPLP (kkal/mol)	Residu asam amino Amino acid residue	Jenis ikatan Bonding type	Jarak ikatan (Å) Bonding distance (Å)
<i>Native ligand B3P</i>	-89,82	GLU159	Hidrogen	2,05
		GLU133		1,98
		GLU137		1,88
		ASP135		1,97
		TYR151		2,56
		TRP212		1,92
<i>1,4-β-D-Glucan</i>	-81,83	GLY154	Hidrogen	1,51
		GLU137		2,14
		GLN147		2,11
		GLU159		1,65
		ASN149		2,03
		ASN157		1,97
		GLY156		2,09
		TYR151	Hifrofobik	1,25
<i>D-glucose</i>	-59,36	GLU137	Hidrogen	2,10
		GLU133		1,95
		ASP135	Hidrofobik	2,68
		TYR151		0,78
<i>β-D-Glucan from oats</i>	-97,85	GLU133	Hidrogen	5,21
		GLU137		5,23
		ASN149		4,32
		GLN147		5,27
		GLU159		4,91
		TRP 220		3,45
		ASN56		4,29
<i>N-Acetil glucosamine</i>	-71,04	ASN54	Hidrogen	5,28
		ASN210		4,92
		SER118		4,25
		TRP212		4,94
		GLU133		4,84

Hasil *docking* yang dilakukan menggunakan program PLANTS1.1 diurutkan berdasarkan fungsi *scoring*, yaitu suatu metode penilaian kualitas ikatan ligan dan reseptor berdasarkan fungsi perhitungan energi ikat antara ligan dan reseptor (Tabel 3). Komponen yang berperan dalam perhitungan akhir energi bebas ikatan ialah nilai ΔG *Gaussian*, nilai ΔG dari energi repulsion, nilai ΔG dari ikatan hidrogen, nilai ΔG dari interaksi hidrofobik, dan nilai ΔG dari *rotating bond number effect*. Dengan demikian, semakin banyak nilai energi ikat yang berkontribusi terhadap efek ini, maka akan semakin negatif energi ikatnya.

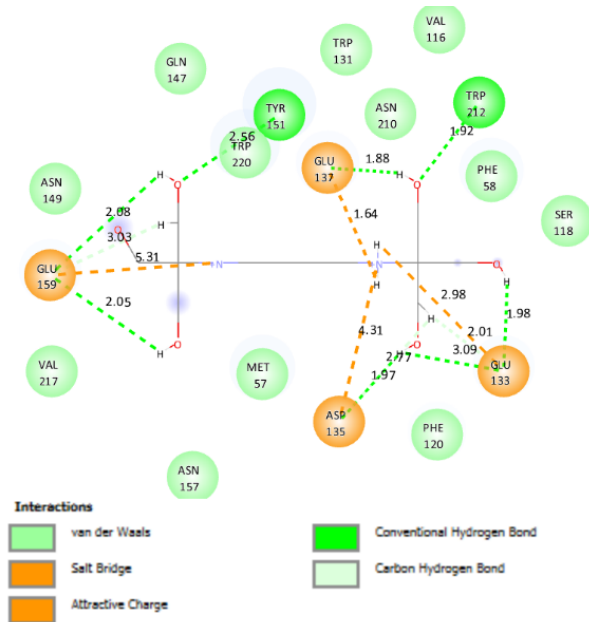
Hasil *docking* yang diperoleh pada percobaan ini terlihat pada Tabel 3. Terlihat model protein yang diperoleh setelah dilakukan proses *docking* menggunakan program PLANTS1.1 memiliki energi

ikat yang cukup baik. Hasil penambatan molekul pada 5 ligan (*native ligand* B3P, *1,4- β -D-Glucan*, *D-glucose*, *β -D-Glucan* dari oat, dan *N-Acetil glucosamine*) menunjukkan bahwa ligan *β -D-Glucan* dari oat memiliki skor PLANTS_{CEMPLP} paling rendah (Tabel 3), sehingga menunjukkan ikatan yang paling stabil dengan enzim β -glukanase.

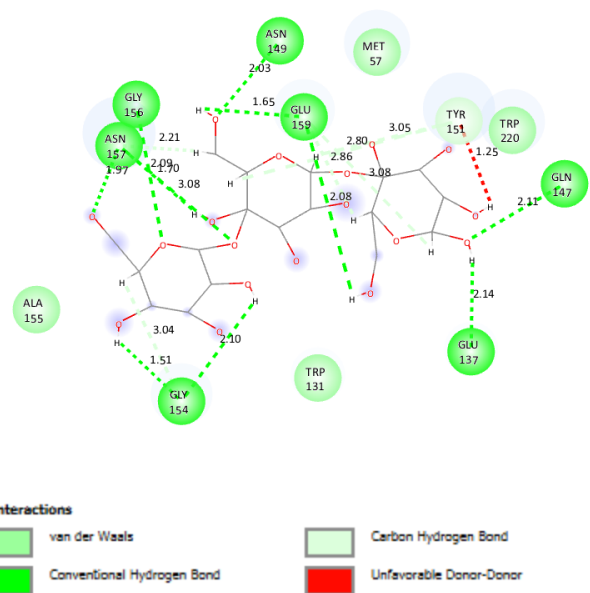
Enzim β -glukanase yang telah di-*docking*, memberikan hasil dimana enzim tersebut mengikat ligan pada beberapa residu asam amino. *Native ligand bis-tris-propan* (B3P) yang telah di-*redocking* memiliki kontak dengan enzim β -glukanase pada beberapa residu asam amino. Residu asam amino tersebut ialah GLU159, GLU133, GLU137, GLN147, ASP135, TYR151, dan TRP212 (Gambar 5a). Ligan B3P pada penelitian ini berikatan secara hidrogen dengan residu-residu asam amino GLU133, GLU137,

dan GLN147 yang merupakan celah situs aktif yang terdapat pada enzim β -glukanase (Furtado et al., 2011). Selain itu, pada sisi berlawanan dari situs aktif terdapat satu ion kalsium yang juga terikat pada gugus karbonil dari residu PRO37, GLY73, ASP235, gugus

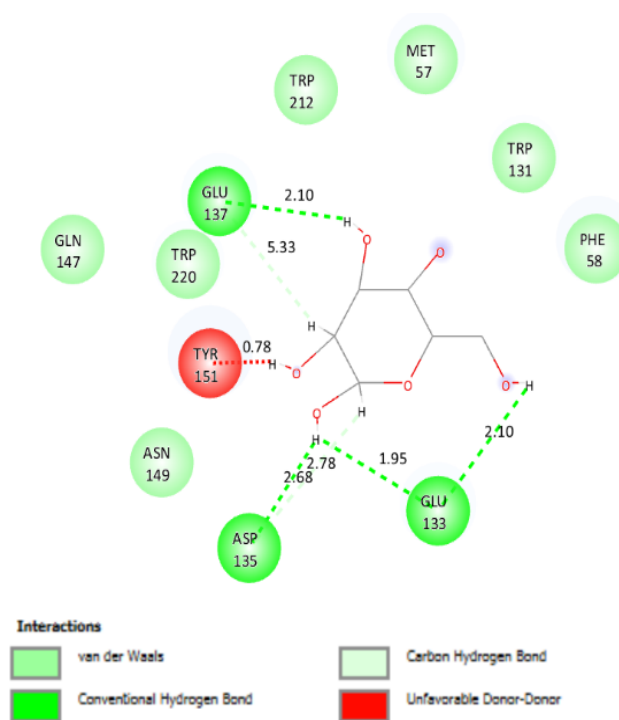
karboksilat dari ASP235, dan dua molekul air (Furtado et al., 2011). Skor PLANTS_{CHEMPLP} dari ligan bawaan ini cukup rendah, yaitu -89,8225 (Tabel 3) yang menunjukkan ikatan antara ligan dan reseptor yang cukup stabil.



(a)

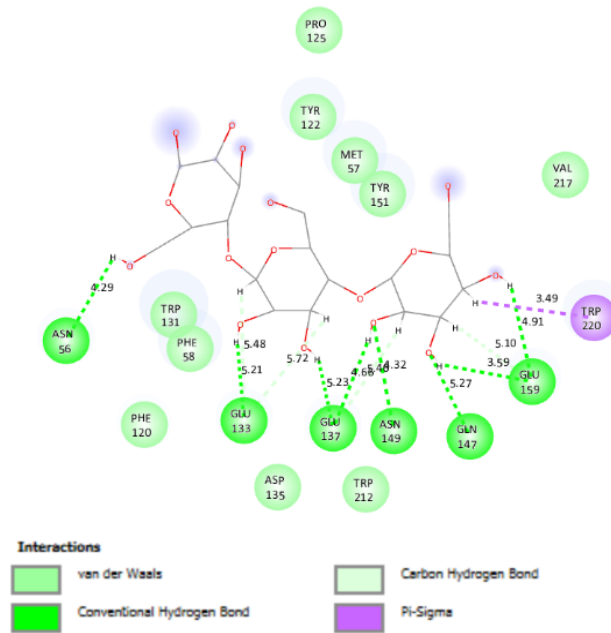


(b)

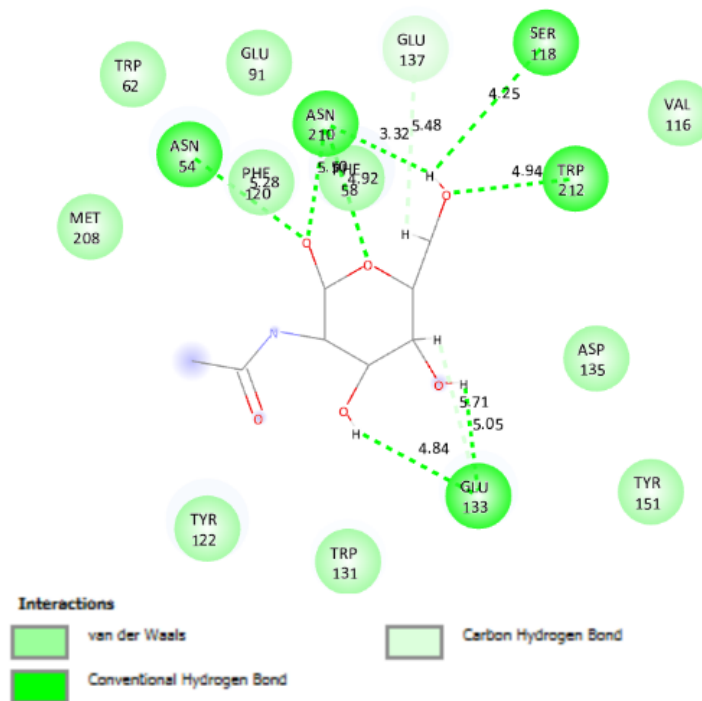


(c)

Lanjutan...



(d)



(e)

Gambar 5. Visualisasi hasil penambatan molekul ligan uji dengan protein enzim β -glukanase. (a) *native ligand* (B3P), (b) 1,4- β -D-Glukan, (c) D-glukosa, (d) β -D-glukan oat, dan (e) N-asetil glukosamin

Figure 5. Visualization of the binding of the test ligand molecule with the protein β -glukanase enzyme. (a) *native ligand* (B3P), (b) 1,4- β -D-Glucan, (c) D-glucose, (d) β -D-glucan from oat, and (e) N-acetyl glucosamine

Perbandingan antara ligan *native* (B3P) dan 4 ligan uji lain terlihat pada skor PLANTS_{CHEMPLP} dan beberapa residu asam amino yang berikatan (Lampiran 5), dimana residu asam amino yang berikatan dengan ligan-ligan tersebut memiliki kemiripan dengan B3P dan referensi (Furtado et al., 2011). Ligan β -D-Glucan oat memiliki skor PLANTS_{CHEMPLP} paling rendah yaitu -97,85 dengan adanya ikatan hidrogen dari beberapa residu asam amino (Tabel 5) dan memiliki kemiripan dengan B3P dan referensi (Furtado et al., 2011), yaitu GLU133, GLU137, ASN149, GLN147, dan GLU159.

Hasil yang diperoleh berdasarkan analisis *docking* ini memberikan pengetahuan mengenai prediksi dari ligan yang dapat digunakan untuk produksi enzim β -glukanase yang lebih optimum. Informasi mengenai residu asam amino yang berikatan dengan enzim juga dapat dijadikan referensi dalam teknologi rekayasa genetika. Penelitian ini juga dapat dilanjutkan dengan melakukan molekular dinamika untuk melihat kestabilan dari struktur dan hasil *docking* yang diperoleh. Selain itu, data sekuens asam amino yang diperoleh juga dapat digunakan sebagai data untuk melakukan rekayasa genetika untuk meningkatkan aktivitas dan produksi enzim β -glukanase dari bakteri *B. subtilis* W3.15.

Kesimpulan

Isolat *B. subtilis* W3.15 berhasil disekuensing dan dianalisis secara *in silico* dengan melakukan pemodelan kemudian dianalisis dengan studi *docking*. Model protein yang diperoleh didasarkan pada protein templat 3o5s dan memiliki hasil pensejajaran sekuens dan visualisasi model cukup baik yang ditunjukkan dengan model memiliki nilai *Ramachandran Plot* pada daerah *favoured* sebesar 91,10%, skor *MolProbability* sebesar 0,95 dan nilai QMEAN $0,90 \pm 0,06$. Hasil analisis *docking* menunjukkan bahwa ligan β -glukan (β -D-Glucan dari oat) yang digunakan sebagai substrat dalam kultivasi isolat *B. subtilis* W3.15 memiliki nilai prediksi energi ikat yang lebih baik dibandingkan dengan ligan B3P, yang merupakan ligan alami dalam protein templat. Selain itu, ligan β -D-Glucan dari oat mengikat enzim β -glukanase dengan jenis ikatan hidrogen dari beberapa residu asam amino yaitu GLU133, GLU137, ASN149, GLN147, dan GLU159.

Saran

Penelitian selanjutnya diharapkan dapat dilakukan simulasi dinamika molekuler untuk melihat kestabilan ikatan antar ligan dan substrat sehingga dapat diperoleh informasi yang lebih mendalam terkait analisis molekuler enzim β -glukanase dari *B. subtilis* W3.15.

Ucapan Terima kasih

Penelitian ini menggunakan dana mandiri dan fasilitas bahan penelitian dari Nisa Rachmania Mubarik.

Daftar Pustaka

- Budiarti, S. W., & Widyastuti, S. M. (2011). Aktivitas antifungal β -1,3-glukanase *Trichoderma reesei* pada fungi akar *Ganoderma philippii*. *Jurnal Perlindungan Tanaman*, 14 (2), 455-460.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Jeffrey, J. H., Daniel, A. K., Robert, M. I., Gary, J. K., Laura, W. M., Jane, S. R., & David, C. R. (2009). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 66, 12-21. <https://doi.org/10.1107/S0907444909042073>
- Dassault Systèmes. (2015). *BIOVIA, Discovery studio modeling environment, Version 4.5*, San Diego: Dassault Systèmes.
- Dewi, R. T., Mubarik, N. R., & Suhartono, M. T. (2016). Medium optimization of β -glukanase production by *Bacillus subtilis* SAHA 32.6 used as biological control of oil palm pathogen. *Emirates Journal of Food & Agriculture*, 28(2), 116-125. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-195>
- Elanchezhian, K., Keerthana, U., Nagendran, K., Prabhukarthikeyan, S. R., Prabakar, K., Raguchander, T., & Karthikeyan, G. (2018). Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>

- Ejaz, U., Muhammad S., & Abdelaz, G. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics (Basel)*, 6(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Furtado, G. P., Ribeiro, L. F., Santos, C. R., Tonoli, C. C., Angelica, R. S., Oliveira, R. R., Murakami, M. T., & Ward, R. J. (2011). Biochemical and structural characterization of a β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* 168. *Process Biochemistry*, 46(5), 1202-1206. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.037>
- Gonçalves, A. C., dos S., Rezende, R. P., Marques, E. de L. S., Soares, M. R., Dias, J. C. T., Romano, C. C., Costa, M. S., Dotivo, N. C., de Moura, S. R., de Oliveira, I. S., et al. (2020). Biotechnological potential of mangrove sediments: Identification and functional attributes of thermostable and salinity-tolerant β -glucanase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.078>
- Hakkar, A. A., Rosmana, A., & Rahim, M. D. (2014). Pengendalian penyakit busuk buah phytophthora pada kakao dengan cendawan endofit *Trichoderma asperellum*. *Jurnal Patologi Indonesia*, 10(5), 139-144. <https://doi.org/10.14692/jfi.10.5.139>
- Hegazy, W. K., Abdel-Salam, M. S., Hussain, A. A., Abo-Ghalia, H. H., & Hafez, S. S. (2018). Improvement of cellulose degradation by cloning of endo- β -1,3-1,4 glucanase (*bgl*s) gene from *Bacillus subtilis* BTN7A strain. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 281-285. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.06.005>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *bacillus* species against *fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Komari, N., Hadi, S., & Suhartono, E. (2020). Pemodelan protein dengan *homology modelling* menggunakan SWISS-MODEL. *Jurnal Jejaring Matematika dan Sains*, 2(2), 65-70. <https://doi.org/10.36873/jjms.2020.v2.i2.408>
- Korb, O., Stützle, T., & Exner, T. E. (2009). Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(1), 84-96. <https://doi.org/10.1021/ci800298z>
- Land, H., & Humble, M. S. (2018). YASARA: a tool to obtain structural guidance in biocatalytic investigations. *Methods in Molecular Biology*, 1685, 43-67. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7366-8_4
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl Cryst*, 26, 283-291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Lopez-Camacho, E., Garcia-Godoy, M. J., Garcia-Nieto, J., Nebro, A. J., & Aladana-Montes, J. F. (2019). Optimizing ligand conformations in flexible protein targets: a multi-objective strategy. *Soft Computing*, 24, 10705-10719. <https://doi.org/10.1007/s00500-019-04575-2>
- Loni, P. P., Patil, J. U., Phugare, S. S., & Bajekal, S. S. (2014). Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434. *Journal of Basic Microbiology*, 54(10), 1080-1089. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300533>
- Munyaka, P. M., Nandha, N. K., Kiarie, E., Nyachoti, C. M., & Khafipour, E. (2016). Impact of combined β -glucanase and xylanase enzymes on growth performance, nutrients utilization and gut microbiota in broiler chickens fed corn or wheat-based diets. *Poultry Science*, 95(3), 523 - 540. <https://doi.org/10.3382/ps/pev333>
- Prieto-Martinez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018). Molecular docking: current advances and challenges. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(1), 65-87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Saudale, F. Z. (2020). Pemodelan homologi komparatif struktur 3D protein dalam desain dan pengembangan obat. *Al-Kimia*, 8(1), 93-103. <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v8i1.9463>
- Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg520>

- Seprianto. (2018). *Bioinformatika untuk Protein Modelling*. Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Universitas Esa Unggul Press.
- Sharma, R., Gil, G., & Victoria, H. (2022). A study of different actions of glucanases to modulate microfibrillated cellulose properties. *Cellulose*, 29, 2323–2332. <https://doi.org/10.1007/s10570-022-04451-7>
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, G., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, 36, 1765-1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Suryadi, Y., Priyatno, T. P., I Made, S., Susilowati, D. N., Patricia, & Irawati, W. (2013). Karakterisasi dan identifikasi isolate bakteri endofitik penghambat jamur patogen padi. *Bul. Plasma Nutfah*, 19(1), 25-32. <https://doi.org/10.21082/blpn.v19n1.2013.p%p>
- Tambunan, U. S. F., Bramantya, N., & Parikesit, A. A. (2011). In silico modification suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) as potential inhibitor for class II histone deacetylase (HDAC). *BMC Bioinformatics*, 12(13), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S13-S23>
- Tumilaar, S. G., Siampa, J. P., & Tallei, T. E. (2021). Penambatan molekuler senyawa bioaktif dari ekstrak etanol daun pangi (*Pangium edule*) terhadap reseptor protease hiv-1. *Jurnal Ilmiah Sains*, 21(1), 6–16. <https://doi.org/10.35799/jis.21.1.2021.30282>
- Wang, M., Jian, D., Daolei, Z., Xuezhi, L., & Jian, Z. (2017). Modification of different pulps by homologous overexpression alkali-tolerant endoglucanase in *Bacillus subtilis* Y106. *Scientific Reports*, 7, 3321. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03215-9>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 296-303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wijaya H., & Hasanah, F. (2016). Prediksi struktur tiga dimensi protein alergen pangan dengan metode homologi menggunakan program SWISS-MODEL. *BioPropal Industri*, 7(2), 83-94.
- Yu, W. Q., Zheng, G. P., Yan, F. C., Liu, W. Z., & Liu, W. X. (2019). *Paenibacillus terrae* NK3-4: a potential biocontrol agent that produces β -1,3-glucanase. *Biological Control*, 129, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.09.019>