



Studi Biofisika dan Kimia Molekuler terhadap Termostabilitas Enzim PETase melalui Simulasi Dinamika Molekuler Multitemperatur

Achmad Ramadhanna'il Rasjava^{1*}, Rahmad Oktafiansyah², Tanto Budi Susilo¹, Nawwal Hikmah¹

¹ Jurusan Kimia, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Indonesia.

² Jurusan Fisika, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Indonesia.

DOI: <https://doi.org/10.29303/Goescienceed.v6i3.1214>

Article Info

Received: 01 July 2025

Revised: 30 July 2025

Accepted: 31 August 2025

Correspondence:

Phone: 0823-2804-3480

Abstract: Pencemaran plastik akibat akumulasi poli(etilena tereftalat) (PET) menjadi tantangan lingkungan global yang mendesak. Enzim PETase memiliki potensi dalam upaya bioremediasi plastik melalui proses degradasi enzimatik, namun aplikasinya masih terkendala oleh rendahnya stabilitas termal. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi stabilitas struktural dan termodinamika enzim PETase pada berbagai variasi temperatur menggunakan metode simulasi dinamika molekuler (*molecular dynamics*/MD) berbasis perangkat lunak GROMACS. Perlakuan temperatur yang digunakan meliputi 300 K, 310 K, 373 K, 440 K, dan 500 K untuk merepresentasikan kondisi temperatur ruang, fisiologis, hingga ekstrem. Analisis dilakukan terhadap parameter RMSD, RMSF, radius girasi (R_g), jumlah ikatan hidrogen, luas permukaan yang dapat diakses pelarut (*solvent accessible surface area*, SASA), energi total sistem, serta evaluasi konformasi visual melalui snapshot struktur 3D. Hasil simulasi menunjukkan bahwa PETase tetap stabil pada 300 K dan 310 K, namun mulai mengalami destabilisasi struktural pada 373 K. Perubahan struktural yang signifikan, termasuk *unfolding* protein dan peningkatan paparan permukaan hidrofobik, diamati pada 440 K dan 500 K. Studi ini memberikan informasi biofisika molekuler penting terkait batas toleransi termal PETase, yang dapat menjadi referensi dalam pengembangan varian enzim dengan termostabilitas yang lebih tinggi untuk aplikasi bioteknologi lingkungan.

Keywords: PETase; Termostabilitas; Simulasi Dinamika Molekuler; RMSD, Biodegradasi Plastik.

Citation: Rasjava, A. R., Oktafiansyah, R., Susilo, T. B., & Hikmah, N. (2025). Studi Biofisika dan Kimia Molekuler terhadap Termostabilitas Enzim PETase melalui Simulasi Dinamika Molekuler Multitemperatur. *Journal Pendidikan, Sains, Geologi dan Geofisika (GeoScienceEd Journal)*, 6(3), 11603-1612. Doi: <https://doi.org/10.29303/Goescienceed.v6i3.1214>

Pendahuluan

Pencemaran plastik merupakan salah satu tantangan lingkungan terbesar dalam beberapa dekade terakhir. Material plastik, khususnya poli(etilena tereftalat) (PET), banyak digunakan dalam berbagai sektor industri seperti kemasan makanan dan minuman karena sifatnya yang ringan, kuat, dan tahan lama (Soong et al., 2022). Akan tetapi, ketahanan ini menyebabkan PET sangat resisten terhadap proses degradasi alami, sehingga akumulasinya di lingkungan terus meningkat. Hal ini mendorong berbagai upaya pengembangan teknologi biodegradasi berbasis

enzimatis sebagai solusi yang lebih ramah lingkungan (Urbanek et al., 2021).

Enzim PETase, yang pertama kali diidentifikasi dari bakteri *Ideonella sakaiensis*, telah menjadi fokus utama dalam penelitian terkait bioremediasi plastik (Tanasupawat et al., 2016). Enzim ini memiliki kemampuan unik untuk memutus ikatan ester dalam rantai polimer PET untuk melepaskan *bis-hydroxyethyl terephthalate* (BHET) dan *mono-hydroxyethyl terephthalate* (MHET), dimana MHET selanjutnya dipecah menjadi etilen glikol dan asam tereftalat (Burgin et al., 2024). Meskipun potensial, aplikasi PETase dalam skala industri maupun lingkungan terbuka masih

Email: achmad.rasjava@ulm.ac.id

menghadapi hambatan signifikan, terutama terkait rendahnya stabilitas termal enzim ini. PETase diketahui memiliki batas temperatur kerja optimal yang relatif rendah, sehingga performa katalitiknya menurun drastis pada temperatur di atas 40 °C (Deng et al., 2023).

Stabilitas termal protein sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor biofisika seperti kekuatan interaksi intramolekul, distribusi energi potensial, fleksibilitas konformasi, serta ikatan hidrogen yang membentuk struktur sekunder dan tersier protein (Masson & Lushchekina, 2022; Rasjava et al., 2025). Untuk memahami perilaku struktural PETase terhadap variasi temperatur, diperlukan pendekatan analisis yang mampu memberikan gambaran detail hingga tingkat atomistik. Salah satu metode yang banyak digunakan dalam studi protein dengan pendekatan biofisika dan kimia molekuler adalah simulasi dinamika molekuler (*Molecular Dynamics*/MD). Metode ini memungkinkan pemodelan dan prediksi perubahan konformasi protein dalam kondisi lingkungan yang bervariasi seperti fluktuasi temperatur dan tekanan, dengan memanfaatkan prinsip dasar mekanika klasik (Hollingsworth & Dror, 2018).

Penerapan MD dalam studi protein memberikan keunggulan dalam memetakan dinamika struktural, kestabilan energi potensial, serta perilaku intramolekul dalam rentang waktu simulasi yang dapat disesuaikan. Melalui pemantauan parameter-parameter seperti *Root Mean Square Deviation* (RMSD), *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF), *radius of gyration* (Rg), jumlah ikatan hidrogen, luas permukaan yang dapat diakses pelarut (*surface solvent accessible area*, SASA), serta profil energi sistem, respons termal protein dapat dianalisis secara kuantitatif (Sabari V L et al., 2025).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis stabilitas struktural dan termodinamika enzim PETase terhadap variasi temperatur menggunakan simulasi dinamika molekuler berbasis GROMACS. Perlakuan temperatur yang digunakan meliputi 300 K, 310 K, 373 K, 440 K, dan 500 K, yang mewakili kondisi temperatur ruang, fisiologis hingga kondisi ekstrem. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi fundamental terkait mekanisme destabilisasi termal PETase, serta menjadi referensi awal dalam upaya perancangan varian enzim dengan kestabilan termal yang lebih tinggi untuk aplikasi bioteknologi lingkungan.

Metode

Persiapan Sistem Molekuler. Struktur tiga dimensi enzim PETase diperoleh dari Protein Data Bank dengan kode PDB ID: 5XH3 (Han et al., 2017). Persiapan sistem dilakukan menggunakan GROMACS versi 2023.3 (Abraham et al., 2023). Residu protein diprotonasi pada

kondisi pH 7,0 menggunakan *webserver* H++ dengan penambahan atom hidrogen berdasarkan parameter *force field* CHARMM36 (Gordon et al., 2005). Protein kemudian dimasukkan ke dalam kotak simulasi berbentuk kubik (*cubic box*) dengan jarak minimum 1,0 nm dari tepi kotak untuk mencegah interaksi antar citra periodik. Sistem selanjutnya disolvasi menggunakan model air TIP3P, kemudian ion Na⁺ dan Cl⁻ ditambahkan untuk menetralkan muatan sistem dan mencapai konsentrasi ion fisiologis sebesar 0,15 M NaCl. Minimisasi energi selanjutnya dilakukan menggunakan metode *steepest descent*, dengan kriteria konvergensi yaitu gaya maksimum di bawah 1000 kJ/mol/nm. File topologi dan parameter sistem dihasilkan melalui modul *pdb2gmx*, dengan penerapan *positional restraints* pada protein untuk menjaga kestabilan struktur selama tahap awal simulasi. Tahapan ini memastikan sistem berada dalam kondisi yang stabil sebelum dilanjutkan ke proses ekuilibrasi dan produksi simulasi dinamika molekuler.

Parameter Simulasi. Setelah proses preparasi sistem awal, dilakukan tahap ekuilibrasi temperatur (*NVT ensemble*) selama 1 nanodetik (ns) dengan pengendalian temperatur menggunakan algoritma termostat V-rescale. Selanjutnya, sistem menjalani tahap ekuilibrasi tekanan (*NPT ensemble*) selama 1 ns, di mana barostat C-rescale digunakan untuk mengontrol tekanan sistem pada 1 bar (Kim et al., 2023). Setelah kedua tahap ekuilibrasi selesai, dilakukan simulasi produksi (*production MD*) dengan durasi 50 ns untuk masing-masing perlakuan temperatur. Variasi temperatur yang dipilih untuk merepresentasikan kondisi temperatur ruang (300 K), temperatur fisiologis (310 K), serta kondisi temperatur ekstrem (373 K, 440 K, dan 500 K). Selama proses simulasi produksi, temperatur sistem dikontrol dengan termostat V-rescale dan tekanan tetap dipertahankan konstan menggunakan barostat C-rescale (Kim et al., 2023). Seluruh simulasi dilakukan dengan time step sebesar 2 femtosekon (fs) dan pengaturan kondisi batas periodik (*periodic boundary conditions*) untuk menghindari efek tepi sistem.

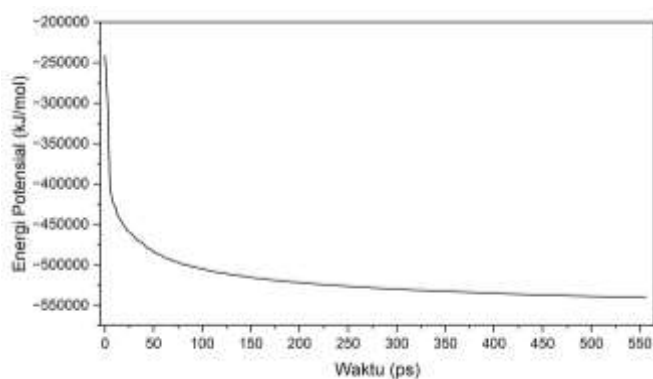
Analisis Trajektori. Analisis trajektori dilakukan berdasarkan parameter struktural dan termodinamika yang dihasilkan dari simulasi dinamika molekuler. Parameter termodinamika dianalisis melalui evaluasi energi total dan energi potensial sistem. Parameter struktural dianalisis berdasarkan RMSD, RMSF, Rg, jumlah ikatan hidrogen, dan SASA (Sabari V L et al., 2025). Selain itu, visualisasi snapshot struktur pada waktu-waktu tertentu juga dilakukan untuk mengamati perubahan konformasi protein PETase selama simulasi dinamika molekuler berlangsung.

Hasil dan Pembahasan

Validasi Stabilitas Sistem Selama Ekuilibrasi. Proses validasi sistem selama tahap ekuilibrasi dilakukan dengan menganalisis stabilitas parameter termodinamika yaitu energi potensial, temperatur, tekanan, dan densitas sistem.

Hasil minimalisasi energi menunjukkan bahwa energi potensial rata-rata sistem PETase berada pada kisaran -540113 kJ/mol untuk seluruh perlakuan temperatur (**Gambar 1**). Meskipun nilai energi potensial ini tampak seragam di antara berbagai temperatur perlakuan, rentang fluktuasi energi selama tahap minimalisasi tercatat sekitar 13.000 kJ/mol. Rentang ini masih berada dalam batas toleransi yang umum untuk sistem protein dalam lingkungan simulasi air, serta menunjukkan tidak adanya indikasi *drift* energi atau ketidakstabilan besar dalam konfigurasi sistem.

Tahap minimalisasi energi bertujuan untuk menghilangkan tegangan struktural dan kontak atomik yang tidak realistis yang mungkin muncul selama proses pembentukan sistem. Pengemasan molekul air dalam kisi periodik serta penambahan ion untuk netralisasi sistem dapat menimbulkan kontak buruk (*bad contacts*) dan interaksi elektrostatik yang tidak diinginkan. Selain itu, struktur protein hasil kristalografi sinar-X yang semula berada dalam kondisi kristal padat, ketika dimasukkan ke dalam lingkungan pelarut air simulasi berpotensi mengalami ketidakcocokan dengan konfigurasi awal, misal dalam hal orientasi ikatan hidrogen antara protein dan air (Lemkul, 2024; Mackay et al., 1989).

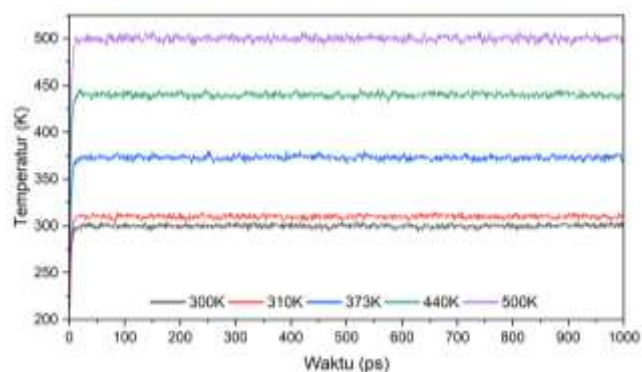


Gambar 1. Kurva minimisasi energi sistem enzim PETase

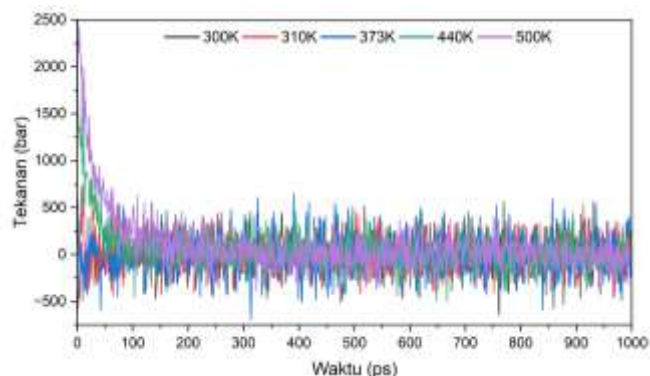
Melalui proses minimalisasi energi, atom-atom dalam sistem dipindahkan mengikuti gradien gaya potensial hingga mencapai ambang gaya maksimum yang telah ditentukan. Meskipun proses ini tidak menjamin tercapainya energi minimum global, namun minimalisasi energi mampu menghasilkan titik awal yang cukup representatif, sehingga sistem layak untuk

dilanjutkan ke tahap ekuilibrasi dan simulasi produksi dinamika molekuler (Lemkul, 2024).

Parameter temperatur rata-rata untuk masing-masing simulasi menunjukkan kesesuaian dengan temperatur target yang telah ditentukan (**Gambar 2**). Perlakuan dengan temperatur 300 K dan 310 K menunjukkan nilai rata-rata 299,74 K dan 309,75 K. Perolehan nilai temperatur ini yang sesuai dengan toleransi ± 5 K. Pada temperatur tinggi, sistem juga menunjukkan kontrol temperatur yang baik dengan nilai rata-rata sebesar 372,66 K, 439,56 K, dan 499,61 K masing-masing untuk perlakuan dengan temperatur 373 K, 440 K, dan 500 K. Fluktuasi temperatur di seluruh perlakuan tetap rendah dan berada di bawah 0,5 K. Hasil ini menunjukkan efektivitas penggunaan termostat V-rescale dalam menjaga kestabilan temperatur sistem selama proses simulasi dinamika molekuler dengan akurasi tinggi tanpa mengganggu dinamika partikel secara signifikan (Ke et al., 2022).



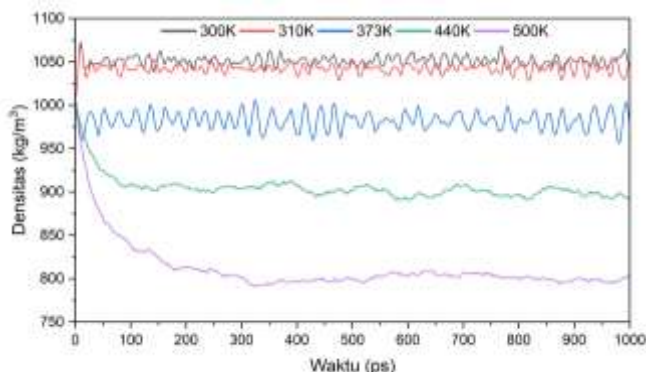
Gambar 2. Hasil ekuilibrasi temperatur sistem



Gambar 3. Hasil ekuilibrasi tekanan sistem

Pada ekuilibrasi tekanan sistem, simulasi pada temperatur 300 K dan 310 K menghasilkan nilai rata-rata tekanan sistem mendekati 1 bar, sesuai target tekanan isobarik. Meskipun terjadi peningkatan tekanan signifikan pada temperatur ekstrem, khususnya pada 440 K (53,17 bar) dan 500 K (98,99 bar), fenomena ini dapat dikaitkan dengan peningkatan energi kinetik molekuler dan dinamika sistem akibat

temperatur tinggi (**Gambar 3**). Fluktuasi tekanan ini masih dapat diterima dalam konteks simulasi sistem protein kecil di bawah pengaruh termal ekstrem. Fenomena ini dapat dikaitkan dengan peningkatan energi kinetik molekul sistem akibat pengaruh temperatur tinggi bahwa kontrol tekanan dalam *NPT ensemble* cenderung mengalami deviasi lebih besar pada temperatur ekstrem, namun tetap dalam rentang yang termodinamika wajar (Ke et al., 2022).

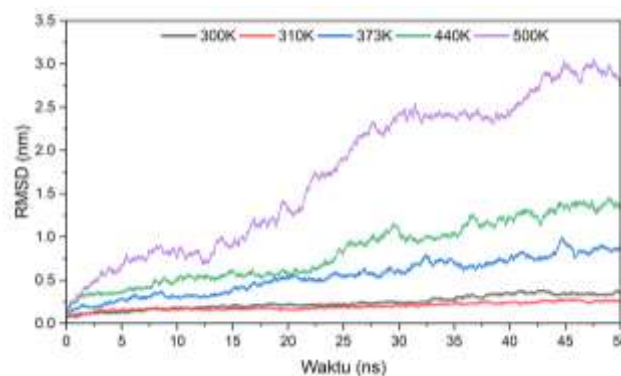


Gambar 4. Hasil ekuilibrasi densitas sistem

Analisis terhadap densitas sistem menunjukkan tren penurunan seiring peningkatan temperatur simulasi (**Gambar 4**). Pada temperatur 300 K dan 310 K, densitas rata-rata tercatat masing-masing sebesar 1042,86 kg/m³ dan 1036,15 kg/m³, nilai yang masih sesuai dengan densitas air pada temperatur ruang hingga mendekati temperatur fisiologis. Penurunan densitas mulai terlihat lebih jelas pada temperatur 373 K, dengan nilai sebesar 1008,36 kg/m³, yang mengindikasikan awal terjadinya ekspansi termal dalam sistem cair. Perubahan lebih drastis terjadi pada temperatur 440 K dan 500 K, di mana densitas sistem masing-masing turun menjadi 968,45 kg/m³ dan 929,06 kg/m³. Penurunan densitas hingga hampir 11% dari nilai awal pada 300 K ini mencerminkan peningkatan jarak antar molekul air akibat energi kinetik yang tinggi pada temperatur ekstrem. Fluktuasi densitas juga meningkat secara progresif dengan naiknya temperatur, yang menunjukkan bahwa sistem mulai mengalami pelemahan gaya kohesif antar molekul air (Skarmoutsos & Guardia, 2025). Meskipun demikian, fluktuasi densitas pada semua temperatur tetap berada dalam rentang yang dapat diterima secara termodinamika tanpa menunjukkan tren *drift* jangka panjang yang mengkhawatirkan. Perubahan densitas juga ini merupakan fenomena umum dalam simulasi *NPT* sistem cairan, di mana barostat tetap mampu menjaga volume rata-rata meskipun fluktuasi tekanan dan volume meningkat pada temperatur ekstrem (Ke et al., 2022).

Analisis Stabilitas Struktural. Analisis stabilitas struktural dilakukan dengan memantau perubahan *Root Mean Square Deviation* (RMSD) (**Gambar 5**), radius girasi (Rg) (**Gambar 6**), dan energi total sistem selama simulasi produksi (**Gambar 7**). Nilai RMSD digunakan untuk mengukur tingkat deviasi rata-rata posisi atom *backbone* protein terhadap struktur awal selama simulasi, sehingga memberikan gambaran mengenai stabilitas konformasi protein. Parameter ini digunakan untuk mengevaluasi integritas konformasi protein PETase terhadap pengaruh variasi temperatur (Aier et al., 2016; Ghahremanian et al., 2022). Nilai Rg menggambarkan distribusi spasial massa atom terhadap pusat massa protein, yang mencerminkan tingkat kekompakan struktur tersier (Apicella et al., 2017). Sementara itu, energi total sistem merepresentasikan jumlah total energi potensial dan kinetik dalam sistem simulasi, yang digunakan untuk mengevaluasi kestabilan termodinamika keseluruhan sistem (Kumar et al., 2022). Parameter ini digunakan untuk mengevaluasi integritas konformasi protein PETase terhadap pengaruh variasi temperatur.

Pada temperatur 300 K, nilai RMSD rata-rata tercatat sebesar 0,240 nm, dengan RMSD maksimum mencapai 0,393 nm. Nilai ini menunjukkan bahwa struktur protein tetap berada dalam kisaran deviasi yang rendah terhadap struktur awalnya. Nilai Rg pada temperatur ini stabil dengan nilai rata-rata 1,759 nm, menunjukkan bahwa protein mempertahankan kekompakannya selama simulasi. Energi total sistem pada temperatur ini adalah -353114,76 kJ/mol, tanpa indikasi *drift* energi yang signifikan, menandakan kestabilan sistem.

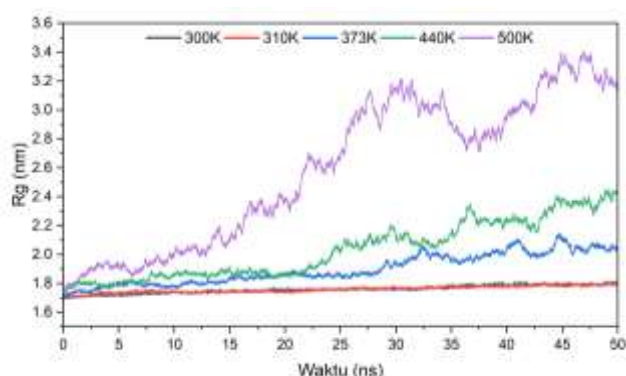


Gambar 5. RMSD struktur enzim PETase selama simulasi dinamika molekuler

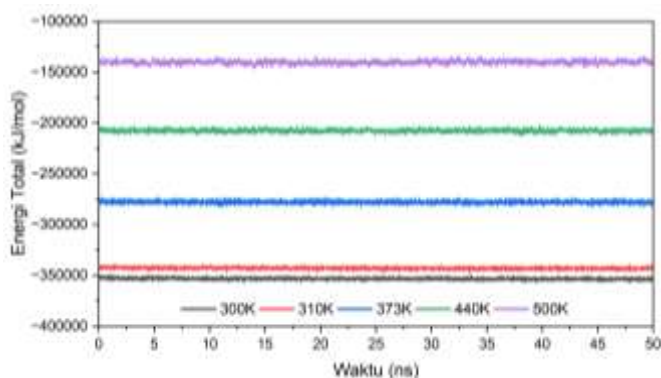
Pada temperatur 310 K, RMSD rata-rata menurun menjadi 0,197 nm, dengan RMSD maksimum sebesar 0,295 nm, menunjukkan kestabilan struktural yang lebih baik dibandingkan temperatur 300 K. Nilai Rg juga hampir tidak berubah (1,759 nm), dengan perbedaan ΔR_g hanya 0,00003 nm terhadap 300 K.

Energi total sistem sebesar -342809,86 kJ/mol, sedikit lebih tinggi dari 300 K. Hasil ini sesuai dengan adanya peningkatan energi kinetik akibat temperatur yang lebih tinggi, namun masih dalam batas stabil.

Memasuki temperatur 373 K, terjadi peningkatan signifikan pada RMSD, dengan rata-rata mencapai 0,544 nm dan maksimum 0,998 nm. Peningkatan RMSD lebih dari 0,5 nm menunjukkan awal terjadinya deviasi struktural signifikan. Rg juga mengalami kenaikan menjadi 1,899 nm, dengan ΔRg sebesar 0,140 nm dari temperatur referensi 300 K, yang mengindikasikan pelemahan kekompakan protein. Energi total sistem turut meningkat menjadi -277.729,59 kJ/mol, konsisten dengan kecenderungan sistem yang mulai mengalami destabilisasi.



Gambar 6. Radius girasi (Rg) struktur enzim PETase selama simulasi dinamika molekuler



Gambar 7. Energi total sistem enzim PETase selama proses simulasi dinamika molekuler

Pada temperatur 440 K, RMSD rata-rata naik drastis menjadi 0,831 nm, dengan maksimum mencapai 1,460 nm, menunjukkan deviasi struktural yang jauh lebih besar dibanding perlakuan berbagai temperatur sebelumnya. Nilai Rg juga meningkat menjadi 2,033 nm, dengan ΔRg sebesar 0,274 nm, mengindikasikan terjadinya proses unfolding parsial. Penurunan energi total sistem menjadi -207.505,95 kJ/mol semakin mengonfirmasi destabilisasi struktur protein pada temperatur ini.

Temperatur 500 K menunjukkan dampak termal paling ekstrem terhadap struktur PETase. RMSD rata-rata melonjak hingga 1,747 nm, dengan maksimum mencapai 3,055 nm, yang merupakan indikasi kuat terjadinya *unfolding*. Rg juga menunjukkan kenaikan substansial hingga 2,593 nm, dengan ΔRg sebesar 0,834 nm dari temperatur referensi 300 K. Penurunan drastis energi total sistem menjadi -140.125,51 kJ/mol menggambarkan akumulasi energi kinetik dan perubahan besar pada interaksi intramolekul protein.

Berdasarkan hasil analisis ini, dapat disimpulkan bahwa PETase menunjukkan kestabilan struktural yang baik pada temperatur 300 K dan 310 K, dengan indikasi awal destabilisasi mulai muncul pada 373 K, dan perubahan struktural besar terjadi pada 440 K hingga 500 K, yang mengarah pada *unfolding* protein. Hasil ini konsisten dengan karakteristik umum protein globular yang memiliki batas toleransi temperatur tertentu terhadap denaturasi termal.

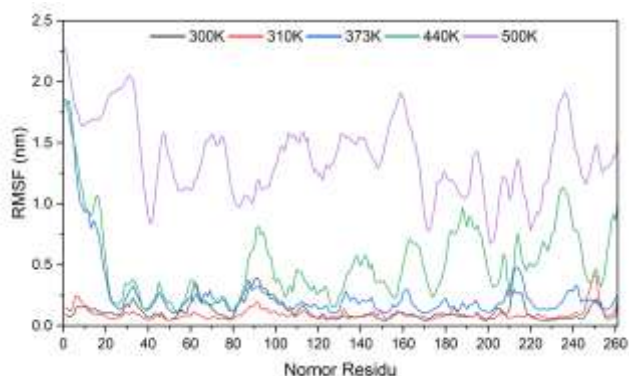
Analisis Fleksibilitas dan Interaksi Intramolekul.

Analisis fleksibilitas lokal dan interaksi intramolekul protein PETase selama simulasi dilakukan dengan mengevaluasi *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) (Gambar 8) dan jumlah ikatan hidrogen intramolekul (Gambar 9). Parameter-parameter tersebut merepresentasikan kestabilan lokal residu, kekuatan interaksi non-kovalen internal, serta tingkat eksposur permukaan protein terhadap lingkungan pelarut.

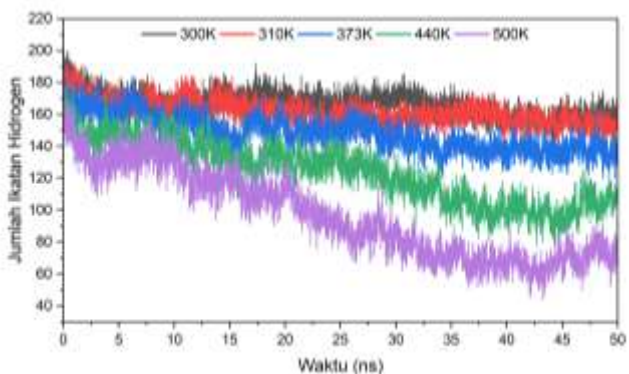
Nilai RMSF mencerminkan nilai deviasi rata-rata posisi atom dari posisi rata-ratanya dari waktu ke waktu dalam simulasi dinamika molekuler. RMSF memberikan informasi tentang fleksibilitas dan dinamika struktur protein. Protein atau residu asam amino dengan nilai RMSF tinggi biasanya lebih fleksibel, sedangkan daerah dengan nilai RMSF rendah biasanya lebih kaku (Bagewadi et al., 2023). Fluktuasi tinggi pada RMSF mencerminkan peningkatan fleksibilitas lokal residu yang sering dikaitkan dengan ketidakstabilan struktural pada temperatur tinggi (Ghahremanian et al., 2022). Nilai RMSF rata-rata pada temperatur 300 K dan 310 K masing-masing adalah 0,120 nm dan 0,097 nm, menunjukkan bahwa fluktuasi atomik pada tingkat residu berada dalam batas wajar dan protein berada dalam kondisi stabil. Rentang RMSF maksimum pada temperatur ini juga rendah (0,395 nm dan 0,422 nm), menunjukkan bahwa tidak ada fluktuasi ekstrem yang terjadi di wilayah struktural penting protein.

Pada temperatur 373 K, terjadi peningkatan signifikan dengan RMSF rata-rata sebesar 0,263 nm dan maksimum mencapai 1,847 nm, menunjukkan peningkatan fleksibilitas lokal yang cukup drastis, terutama pada daerah *loop* atau domain non-struktural. Kondisi ini semakin memburuk pada temperatur 440 K

dan 500 K, dengan RMSF rata-rata masing-masing sebesar 0,504 nm dan 1,375 nm, serta RMSF maksimum mencapai 2,276 nm pada 500 K, yang mencerminkan peningkatan mobilitas atomik ekstrem sebagai indikasi awal terjadinya *unfolding*.



Gambar 8. Nilai RMSF residu-residu asam amino pada enzim PETase



Gambar 9. Jumlah ikatan hidrogen pada enzim PETase selama simulasi dinamika molekuler

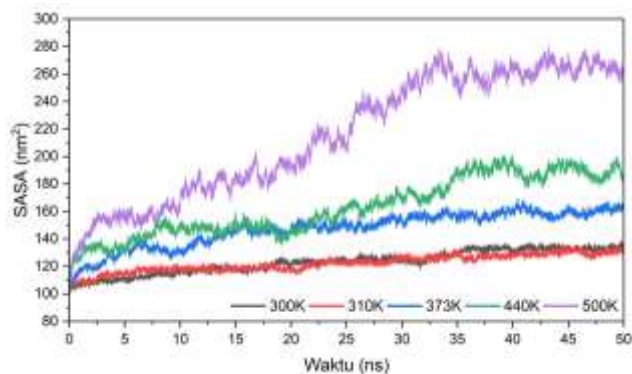
Ikatan hidrogen memiliki peranan krusial dalam menjaga kestabilan struktur sekunder dan tersier protein. Ikatan hidrogen bertanggung jawab dalam mempertahankan integritas struktural seperti α -heliks dan β -sheet melalui interaksi arah yang spesifik antara gugus donor dan akseptor dalam rantai polipeptida. Dalam konteks simulasi dinamika molekuler, ikatan hidrogen diperlakukan sebagai interaksi non-kovalen yang didominasi oleh gaya elektrostatis, sehingga representasi yang akurat terhadap ikatan hidrogen penting untuk menggambarkan *folding* dan stabilitas termal protein. Penurunan jumlah ikatan hidrogen pada suhu tinggi mengindikasikan melemahnya kekuatan ikatan intramolekul yang bertanggung jawab terhadap kestabilan konformasi protein. Fluktuasi dan

hilangnya ikatan hidrogen seiring dengan peningkatan suhu menjadi salah satu penanda utama dimulainya proses denaturasi struktural suatu protein (Gao et al., 2015).

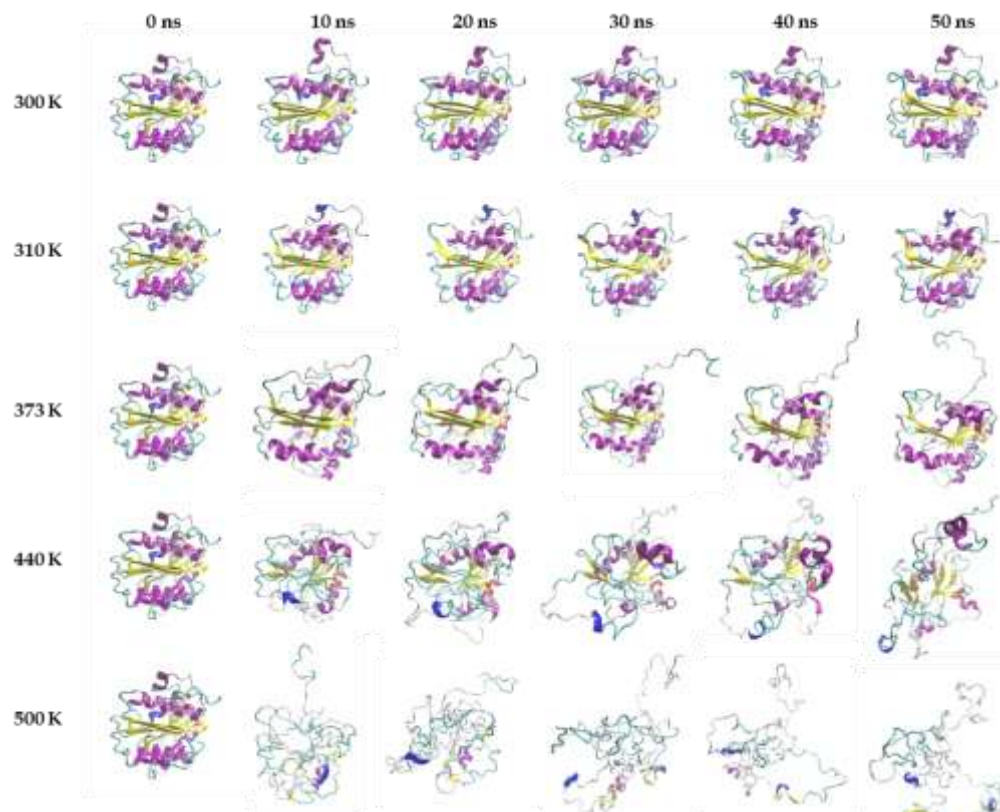
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah ikatan hidrogen intramolekul rata-rata mengalami penurunan progresif seiring peningkatan temperatur (**Gambar 9**). Dari 166,49 ikatan pada 300 K, terjadi penurunan menjadi 161,62 (310 K), 148,13 (373 K), 123,69 (440 K), dan hanya 96,96 (500 K). Persentase penurunan ikatan hidrogen mencapai lebih dari 56% pada temperatur 500 K jika dibandingkan dengan temperatur awal 300 K. Penurunan ini menjadi indikator utama terjadinya disrupti struktur sekunder dan tersier protein, terutama pada temperatur ekstrem.

Secara keseluruhan, kombinasi peningkatan RMSF dan penurunan jumlah ikatan hidrogen pada temperatur tinggi memberikan bukti kuat mengenai penurunan kestabilan struktural dan meningkatnya fleksibilitas lokal PETase. Gejala awal denaturasi struktural terlihat mulai pada temperatur 373 K, dan menjadi signifikan pada 440 K hingga 500 K, yang ditandai dengan peningkatan fluktuasi atomik dan hilangnya interaksi intramolekul stabil.

Analisis Eksposur Permukaan Protein. Analisis luas permukaan yang dapat diakses pelarut (*surface solvent accessible area*, SASA) dilakukan untuk mengevaluasi tingkat eksposur permukaan protein PETase terhadap lingkungan pelarut selama simulasi produksi pada berbagai temperatur. SASA merepresentasikan luas total permukaan protein yang dapat diakses oleh molekul air, sehingga menjadi indikator penting untuk mendeteksi perubahan konformasi yang menyebabkan paparan wilayah hidrofobik internal (Ghahremanian et al., 2022).



Gambar 10. Nilai SASA enzim PETase selama simulasi dinamika molekuler



Gambar 11. Perubahan struktur enzim PETase selama simulasi dinamika

. Analisis SASA memperlihatkan tren peningkatan luas permukaan yang terpapar pelarut seiring kenaikan temperatur (**Gambar 10**). Pada 300 K dan 310 K, nilai SASA rata-rata masing-masing adalah 123,27 nm² dan 122,34 nm², menunjukkan kestabilan struktur tertutup. Mulai temperatur 373 K, SASA meningkat menjadi 147,29 nm², dan lebih jauh menjadi 163,09 nm² (440 K) serta 215,91 nm² (500 K). Kenaikan SASA ini menandakan terbukanya bagian-bagian hidrofobik dari inti protein, yang selaras dengan indikasi awal *unfolding* dari analisis RMSF dan hilangnya ikatan hidrogen. Secara keseluruhan, tren peningkatan SASA seiring kenaikan temperatur memperkuat indikasi bahwa PETase mulai kehilangan integritas strukturalnya pada temperatur di atas 373 K, dengan eksposur progresif dari permukaan hidrofobik, yang merupakan salah satu ciri utama dari proses denaturasi protein.

Evaluasi Konformasi dan Perubahan Struktural.

Evaluasi perubahan konformasi protein PETase selama simulasi dilakukan melalui analisis visual terhadap *snapshot* struktur tiga dimensi (3D) yang diambil pada interval setiap 10 nanodetik (ns) selama 50 ns simulasi produksi, untuk masing-masing perlakuan temperatur. Tujuan dari analisis ini adalah untuk memberikan gambaran kualitatif mengenai perubahan spasial -

global yang terjadi pada struktur protein akibat pengaruh termal.

Pada temperatur 300 K dan 310 K, struktur 3D PETase menunjukkan kestabilan konformasi yang tinggi sepanjang waktu simulasi. Hasil *overlay* struktur dari setiap *snapshot* menunjukkan bahwa perubahan posisi atom *backbone* sangat minimal, tanpa indikasi pembukaan struktur atau pelepasan domain. Elemen-elemen sekunder seperti α -heliks dan β -sheet tetap terjaga dengan baik, menunjukkan bahwa protein mempertahankan integritas strukturalnya dalam rentang temperatur fisiologis.

Mulai temperatur 373 K, perubahan konformasi mulai terlihat lebih nyata. Visualisasi *snapshot* memperlihatkan peningkatan deviasi spasial pada beberapa bagian protein, terutama pada wilayah loop dan ujung terminal. Distorsi struktur sekunder mulai terjadi, dengan beberapa *loop* menunjukkan pergeseran posisi yang lebih besar dibandingkan kondisi pada temperatur rendah. Hal ini konsisten dengan hasil analisis RMSD, RMSF, dan penurunan jumlah ikatan hidrogen.

Pada temperatur 440 K, perubahan konformasi menjadi semakin signifikan, ditandai dengan terbukanya struktur tersier protein. Visualisasi *snapshot* per 10 ns menunjukkan bahwa ekspansi konformasi semakin berkembang dari waktu ke waktu, dengan terjadi *displacement* besar pada domain tertentu, serta

indikasi *unfolding* parsial pada beberapa wilayah protein.

Kondisi paling ekstrem terjadi pada 500 K, di mana struktur PETase mengalami *unfolding* global. Snapshot pada interval waktu 20 ns ke atas memperlihatkan pelepasan besar-besaran elemen struktural, disertai kehancuran elemen sekunder dan peningkatan paparan permukaan hidrofobik, sebagaimana juga terkonfirmasi oleh peningkatan SASA dan RMSD yang sangat tinggi pada temperatur ini.

Hasil observasi visual ini mendukung temuan kuantitatif sebelumnya, bahwa PETase menunjukkan kestabilan struktural yang baik hingga temperatur 310 K, mulai mengalami destabilisasi struktural pada 373 K, dan mengalami denaturasi termal yang signifikan pada temperatur di atas 440 K.

Evaluasi Biofisika pada Mekanisme Denaturasi

Termal. Peningkatan suhu memberikan energi kinetik tambahan pada atom-atom penyusun enzim PETase, yang terlihat sebagai peningkatan amplitudo vibrasi molekul. Pada suhu rendah, antara 300 hingga 310 K, getaran ini masih bersifat harmonik dan amplitudonya relatif kecil ($\delta x \approx 0.1\text{--}0.2 \text{ \AA}$), sehingga tidak cukup untuk merusak struktur protein. Namun, ketika suhu dinaikkan hingga 373 K atau lebih, energi termal ($k_B T \approx 3.1\text{--}4.3 \text{ kJ/mol}$) mulai mendekati dan bahkan melampaui ambang energi ikatan non-kovalen, seperti ikatan hidrogen ($5\text{--}30 \text{ kJ/mol}$) dan gaya van der Waals ($0.5\text{--}4 \text{ kJ/mol}$). Pada kondisi ini, vibrasi kolektif dalam mode frekuensi rendah ($<50 \text{ cm}^{-1}$), yang melibatkan gerakan terkoordinasi dari ratusan atom, mulai memicu disosiasi ikatan secara progresif, terutama pada wilayah fleksibel seperti *loop*, yang ditandai dengan fluktuasi RMSF yang tinggi.

Pada titik kritis sekitar 373 K, kerusakan lokal berkembang menjadi transisi fasa kooperatif yang diperkuat oleh arsitektur fraktal enzim PETase. Struktur hierarkinya, dengan dimensi fraktal sekitar $D_f \approx 2.4$, berperan sebagai penguat alami bagi getaran kolektif, sehingga energi termal diubah menjadi gerakan domain berskala besar. Efek ini semakin kompleks ketika air pelarut merespon paparan inti hidrofobik protein (Oktafiansyah et al., 2020). Air membentuk struktur klatrat yang teratur di sekitar bagian yang terekspos, meningkatkan entropi pelarutan ($\Delta S_{\text{solv}} > 0$) dan juga kapasitas kalor sistem ($\Delta C_p > 0$). Gabungan dari respon fraktal struktural dan reorganisasi pelarut ini menghasilkan lonjakan eksponensial pada parameter struktural seperti radius girasi (R_g meningkat 47%) dan luas permukaan terakses pelarut (SASA meningkat 75%), menandakan

perubahan menyeluruh dalam satu langkah drastis (*all-or-none*).

Ketika suhu mencapai 500 K, energi vibrasi termal ($k_B T 4.1 \text{ kJ/mol}$) sudah jauh melampaui kekuatan rata-rata ikatan non-kovalen, memicu denaturasi global yang bersifat terkoordinasi. Tidak seperti material padat yang pecah seolah rapuh (*brittle fracture*), enzim PETase mengalami "pelelehan biomolekuler" bertahap namun sistematis. Proses ini mencakup tiga tahap utama: (1) getaran kolektif yang melemahkan integritas struktural protein; (2) fungsi *loop* sebagai engsel fleksibel yang memperbesar deformasi lokal; dan (3) transisi keseluruhan struktur dari keadaan padat seperti kaca (*glassy*) menjadi cairan molekuler (*fluid*). Transisi ini tidak dapat dibalik karena konformasi terdenaturasi memiliki entropi yang jauh lebih tinggi ($S_{\text{conf}} \uparrow$), yang secara termodinamika menghasilkan $\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$, menandakan bahwa keadaan *unfolded* menjadi lebih stabil pada suhu tinggi.

Kesimpulan

Hasil simulasi dinamika molekuler pada berbagai perlakuan temperatur menunjukkan bahwa PETase memiliki stabilitas struktural yang baik pada temperatur 300 K dan 310 K yang menunjukkan nilai parameter RMSD, radius girasi, jumlah ikatan hidrogen, dan SASA yang konsisten serta menunjukkan kestabilan konformasinya pada temperatur ini. Indikasi awal destabilisasi struktural mulai terdeteksi pada temperatur 373 K yang ditandai dengan peningkatan RMSD, fluktuasi lokal residu (RMSF), penurunan jumlah ikatan hidrogen, dan kenaikan SASA. Perubahan struktural yang lebih signifikan terjadi pada temperatur 440 K dan 500 K, dengan bukti adanya *unfolding* protein, ekspansi radius girasi, peningkatan fluktuasi termal, serta paparan luas permukaan hidrofobik yang semakin besar.

Visualisasi *snapshot* struktur pada interval waktu simulasi juga memperkuat temuan ini dengan menunjukkan disrupsi progresif terhadap struktur tersier PETase. Secara keseluruhan, penelitian ini menunjukkan bahwa batas atas kestabilan termal PETase berada di bawah 373 K, sedangkan temperatur di atas 440 K menyebabkan denaturasi struktural yang signifikan. Temuan ini memberikan informasi biofisika molekuler yang penting sebagai landasan bagi pengembangan strategi rekayasa enzim untuk meningkatkan termostabilitas PETase dalam aplikasi bioteknologi lingkungan, khususnya untuk bioremediasi plastik di wilayah dengan temperatur tinggi.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lambung Mangkurat atas dukungan fasilitas komputasi yang memungkinkan pelaksanaan simulasi dinamika molekuler dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Abraham, M., Alekseenko, A., Bergh, C., Blau, C., Briand, E., Doijade, M., Fleischmann, S., Gapsys, V., Garg, G., Gorelov, S., Gouaillardet, G., Gray, A., Irrgang, M. E., Jalalypour, F., Jordan, J., Junghans, C., Kanduri, P., Keller, S., Kutzner, C., ... Lindahl, E. (2023). *GROMACS 2023.3 Manual*. Zenodo.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.10017699>
- Aier, I., Varadwaj, P. K., & Raj, U. (2016). Structural insights into conformational stability of both wild-type and mutant EZH2 receptor. *Scientific Reports*, 6(1), 34984. <https://doi.org/10.1038/srep34984>
- Apicella, A., Marascio, M., Colangelo, V., Soncini, M., Gautieri, A., & Plummer, C. J. G. (2017). Molecular dynamics simulations of the intrinsically disordered protein amelogenin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(8), 1813–1823.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2016.1196151>
- Bagewadi, Z. K., Yunus Khan, T. M., Gangadharappa, B., Kamalapurkar, A., Mohamed Shamsudeen, S., & Yaraguppi, D. A. (2023). Molecular dynamics and simulation analysis against superoxide dismutase (SOD) target of *Micrococcus luteus* with secondary metabolites from *Bacillus licheniformis* recognized by genome mining approach. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(9), 103753.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103753>
- Burgin, T., Pollard, B. C., Knott, B. C., Mayes, H. B., Crowley, M. F., McGeehan, J. E., Beckham, G. T., & Woodcock, H. L. (2024). The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme. *Communications Chemistry*, 7(1).
<https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x>
- Deng, B., Yue, Y., Yang, J., Yang, M., Xing, Q., Peng, H., Wang, F., Li, M., Ma, L., & Zhai, C. (2023). Improving the activity and thermostability of PETase from *Ideonella sakaiensis* through modulating its post-translational glycan modification. *Communications Biology*, 6(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s42003-023-04413-0>
- Gao, Y., Mei, Y., & Zhang, J. Z. H. (2015). Treatment of Hydrogen Bonds in Protein Simulations. *Advanced Materials for Renewable Hydrogen Production, Storage and Utilization*.
<https://doi.org/10.5772/61049>
- Ghahremanian, S., Rashidi, M. M., Raeisi, K., & Toghraie, D. (2022). Molecular dynamics simulation approach for discovering potential inhibitors against SARS-CoV-2: A structural review. *Journal of Molecular Liquids*, 354, 118901.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118901>
- Gordon, J. C., Myers, J. B., Folta, T., Shoja, V., Heath, L. S., & Onufriev, A. (2005). H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server issue), W368-71.
<https://doi.org/10.1093/nar/gki464>
- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron*, 99(6), 1129–1143.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011>
- Ke, Q., Gong, X., Liao, S., Duan, C., & Li, L. (2022). Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 365, 120116.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120116>
- Kim, H., Fábrián, B., & Hummer, G. (2023). Neighbor List Artifacts in Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 19(23), 8919–8929.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00777>
- Kumar, G., Mishra, R. R., & Verma, A. (2022). Introduction to Molecular Dynamics Simulations. In A. Verma, S. Mavinkere Rangappa, S. Ogata, & S. Siengchin (Eds.), *Forcefields for Atomistic-Scale Simulations: Materials and Applications* (pp. 1–19). Springer Nature Singapore.
https://doi.org/10.1007/978-981-19-3092-8_1
- Lemkul, J. A. (2024). Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. *The Journal of Physical Chemistry B*, 128(39), 9418–9435. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.4c04901>
- Mackay, D. H. J., Cross, A. J., & Hagler, A. T. (1989). The Role of Energy Minimization in Simulation Strategies of Biomolecular Systems. *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, 317–358.
https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1571-1_7
- Masson, P., & Lushchekina, S. (2022). Conformational Stability and Denaturation Processes of Proteins Investigated by Electrophoresis under Extreme

- Conditions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(20).
<https://doi.org/10.3390/molecules27206861>
- Oktafiansyah, R., Herry Santjojo, D. J. D., Sakti, S. P., Zafirah, T. N., Ghufro, M., Khusnah, N. F., & Masruroh. (2020). Swelling Effect Observation of The Copper Phthalocyanine Layer on QCM and Its Effect on Surface Roughness and Morphology Changes. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 833(1), 12082.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/833/1/012082>
- Rasjava, A. R., Kurniawati, D., Rizki, W. O. S., Kurniati, N. F., & Hertadi, R. (2025). Development of inulin nanocarrier for effective oral delivery of insulin: synthesize, optimization, characterization, and biophysical study. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 36(8), 963–986.
<https://doi.org/10.1080/09205063.2024.2436297>
- Sabari V L, D., Rajmohan, G., S B, R., S, S., Nagasubramanian, K., G, S. K., & Venkatachalam, P. (2025). Improving the binding affinity of plastic degrading cutinase with polyethylene terephthalate (PET) and polyurethane (PU); an in-silico study. *Heliyon*, 11(2), e41640.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41640>
- Skarmoutsos, I., & Guardia, E. (2025). Molecular Dynamics of High-Pressure Liquid Water: Going from Ambient to Near-Critical Temperatures. *Chemistry – A European Journal*, 31(28), e202500423.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.202500423>
- Soong, Y. H. V., Sobkowicz, M. J., & Xie, D. (2022). Recent Advances in Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate (PET) Plastic Wastes. *Bioengineering*, 9(3), 1–27.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering9030098>
- Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). Ideonella sakaiensis sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813–2818.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058>
- Urbanek, A. K., Kosiorowska, K. E., & Mironczuk, A. M. (2021). Current Knowledge on Polyethylene Terephthalate Degradation by Genetically Modified Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(November), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.771133>