UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Karakterisasi Rubisco Like Protein (RLP) rekombinan dari Chromohalobacter salexigen BKL5 berasal dari lingkungan halofilik
IRWAN SUDARMANTO, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; M.Saifur Rohman, S.P., M.Si., M.Eng., Ph.D
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ABSTRAK

KARAKTERISASI *RUBISCO LIKE PROTEIN* (RLP) REKOMBINAN DARI *Chromohalobacter salexigen* BKL 5 BERASAL DARI LINGKUNGAN HALOFILIK

Chromohalobacter salexigens BKL5 merupakan bakteri halofilik yang ditemukan dalam lumpur Bledug Kuwu, Jawa Tengah. Gen pengkode *Rubisco Like Protein* telah berhasil dikloning dan diekspresikan dalam sistem *Escherichia coli* BL21(DE3) menggunakan plasmid pCold IV. Hasil sekuensing dan analisis filogenetik menunjukkan bahwa protein tersebut merupakan keluarga *Rubisco* dengan jumlah residu sebanyak 429 asam amino dan berat 46 kDa. Prediksi struktur 3D menggunakan perangkat Alphafold menghasilkan akurasi di atas 90 %. Hasil validasi dengan Verify 3D dan ProSA memberikan hasil 92,54% dan nilai Z-score -6,57. Analisis PROCHECK menunjukkan Ramacandran plot berada pada area *most favoured region* 89,8%, *additional allowed region* 9,6% dan *generously allowed region* 0,5%. Pengujian dengan SOPMA menunjukkan jenis protein ini didominasi oleh struktur *random coil* sebesar 41,96% yang identik ditemukan pada spesies bakteri pada habitat ekstrem. Analisis molekuler dinamik menggunakan Yasara pada 10 ns menunjukkan bahwa protein memiliki kecenderungan untuk mengalami deformasi yang cukup besar namun tetap stabil. Kajian yang dilakukan secara komputasi menggunakan berbagai *tool* menunjukkan bahwa asam glutamat dan alanin sebagai pembeda antara *Rubisco Like Protein* halofilik dan non halofilik, selain itu asam glutamat sebagai asam amino penyusun protein menunjukkan bahwa pada protein halofilik lebih banyak terdistribusi bebas pada permukaan protein terutama area *loop* (87%) dan hanya 13 % yang digunakan untuk membentuk *saltbridge*. Fakta tersebut menunjukkan bahwa fungsi glutamat adalah untuk meningkatkan solubilitas mengingat glutamat memiliki kemampuan mengikat air yang tinggi. Rendahnya komposisi alanin pada RLP halofilik menyebabkan interaksi hidrofobik dalam protein menjadi rendah sehingga struktur RLP cenderung memiliki rasio *folding* yang lebih sedikit dibandingkan homolognya yang mesofilik mengakibatkan protein akan lebih terekspose oleh pelarut. Analisis dengan program SOPMA menunjukkan bahwa proporsi *random coil* (*unstructured protein*) lebih besar sehingga fleksibilitas dari RLP relatif tinggi, fakta tersebut diperkuat dengan *stiffnes rate* yang rendah. Glutamat dan alanin bersinergi dalam meningkatkan solubilitas RLP CS dalam lingkungan garam tinggi dengan peran yang berbeda. *Rubisco Like Protein* dari *Chromohalobacter salexigen* BKL 5 yang bersifat halofilik, memiliki *saltbridge* yang relatif rendah namun cukup efisien untuk mempertahankan stabilitas dalam cekaman garam tinggi. Studi yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh mutasi pada *saltbridge* posisi 185 (D185/*wild type*) terhadap stabilitas dan aktivitas RLP CS melalui pendekatan *insilico* dengan mengganti aspartat menjadi glutamat dan alanin (D185E dan D185A), menunjukkan bahwa mutasi *saltbridge* pada posisi 185 akan merubah struktur geometri RLP CS secara keseluruhan. Namun menariknya meskipun strukturnya berubah namun aktivitas protein tersebut relatif tetap yang ditandai dengan hasil *moleculer docking* yang memberikan nilai *binding energy* yang relatif sama yaitu sekitar -6,3 kcal/mol. Hal ini diperkuat dengan

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Karakterisasi Rubisco Like Protein (RLP) rekombinan dari Chromohalobacter salexigen BKL5 berasal dari lingkungan halofilik
IRWAN SUDARMANTO, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; M.Saifur Rohman, S.P., M.Si., M.Eng., Ph.D
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

analisis simulasi molekuler yang menunjukkan bahwa nilai RMSF pada area *active site* pada kedua mutan tidak berbeda dibanding *wild type*-nya. Pengukuran menggunakan CastP juga menunjukkan bahwa volume dan luas area *active site* relatif sama.

Keywords : Bleduk Kuwu, *Cloning*, *Chromohalobacter salexigens* BKL 5, halofilik, *Rubisco Like Protein*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Karakterisasi Rubisco Like Protein (RLP) rekombinan dari Chromohalobacter salexigen BKL5 berasal dari lingkungan halofilik
IRWAN SUDARMANTO, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; M.Saifur Rohman, S.P., M.Si., M.Eng., Ph.D
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT RUBISCO LIKE PROTEIN (RLP) FROM *Chromohalobacter salexigen* BKL 5 ORIGINATING FROM A HALOPHILIC ENVIRONMENT

Chromohalobacter salexigens BKL5 is a halophilic bacterium found in Bledug Kuwu Mud, Central Java. The gene encoding Rubisco Like Protein (RLP) has been successfully cloned and expressed in the Escherichia coli BL21(DE3) system using the pCold IV. The results of sequencing and phylogenetic analysis using MEGA software showed that the protein is a Rubisco family, namely RLP with a residue count of 429 amino acids and a weight of 46 kDa. 3D structure prediction using the Alphafold device produced an accuracy of above 90%. Validation results with Verify 3D and ProSA gave results of 92.54% and a Z-score value of -6.57. PROCHECK analysis showed that the Ramacandran plot was in the most favored region area of 89.8%, additional allowed region of 9.6% and generously allowed region of 0.5%. Testing with SOPMA showed that this RLP was dominated by a random coil structure of 41.96% which was identical to that found in bacterial species in extreme habitats. Molecular dynamic analysis of CS RLP using Yasara at 10 ns by testing the Rg, RMSF and RMSD values showed that the protein has a tendency to experience quite large deformation but remains stable.Computational research using various tools shows that glutamic acid and alanine are the distinguishing factors between halophilic and non-halophilic RLPs. Glutamate in halophilic RLPs is more distributed on the surface of the protein, especially the loop area (87%) and only 13% is used to form a saltbridge. This fact shows that the function of glutamate is to increase solubility considering that glutamate has a high water binding capacity.The low composition of alanine in halophilic RLP causes low hydrophobic interactions in the protein so that the RLP structure tends to have a lower folding ratio than its mesophilic homologue, causing the protein to be more exposed to solvents. Analysis with the SOPMA program shows that the proportion of random coils (unstructured proteins) is greater so that the flexibility of the RLP is relatively high, this fact is reinforced by the low stiffness rate. Glutamate and alanine synergize in increasing the solubility of RLP CS in high salt environments with different roles. In RLP *Chromohalobacter salexigen* BKL 5 (RLP CS) which is halophilic, the presence of saltbridges is not too much but is efficient enough to maintain stability in high salt stress. The study conducted to determine the effect of mutations in the saltbridge position 185 (D185/WT) on the stability and activity of RLP CS through an insilico approach by replacing aspartate with glutamate and alanine (D185E and D185A), showed that the saltbridge mutation at position 185 would change the overall geometric structure of RLP CS. Interestingly, although the structure changes, the activity of the protein remains relatively constant, which is indicated by the results of molecular docking which provide relatively the same binding energy value, which is around -6.3 kcal/mol. This MDS analysis shows that the RMSF value in the active site area of

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Karakterisasi Rubisco Like Protein (RLP) rekombinan dari Chromohalobacter salexigen BKL5 berasal dari lingkungan halofilik
IRWAN SUDARMANTO, Prof. Dr. drh. Wayan Tunas Artama; M.Saifur Rohman, S.P., M.Si., M.Eng., Ph.D
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

both mutants is no different than WT. Measurements using CastP also show that the volume and area of the active site are relatively the same.

Keywords: Bleduk Kuwu, *Cloning*, *Chromohalobacter salexigens* BKL 5, *halophilic*, *Rubisco Like Protein*