# DIKTAT

# PENGANTAR STRUKTUR ELEKTRONIK ZAT PADAT



## OLEH

# DR. RATNAWULAN, M.SI

- Massachuku ( Dischaftereiche)	AT INTEREMENT OF THE OWNER OF THE REAL PROPERTY OF THE PROPERTY OF
MILIK FEAPUS	TAKAAN UHIV. HEGERI PADAN G
NITERINA TEL	12-03-2014
SUMBER/HARE	A: Hd
XOI - USI	· Cı1
NO. INVESTABLE	569 (hall 2014, p. (c)
KLASIFIKASI	I second se

## JURUSAN FISIKA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM UNIVERSITAS NEGERI PADANG

2008



#### KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah Yang Maha Kuasa, karena berkat Ridho-Nya jualah penulis dapat merampungkan diktat ini yang diberi nama "Struktur Elektronik Zat Padat". Diharapkan diktat ini dapat digunakan sebagai buku penunjang dalam matakuliah "Struktur Elektronik Zat Padat" di Jurusan Fisika Universitas Negeri Padang.

Struktur elektronik zat padat adalah ilmu yang mempelajari tentang kaitan struktur internal bahan dengan energi elektronik bahan tersebut. Secara garis besar diktat ini berisikan diagram energi molekul, cara mengetahui struktur internal molekul dan cara menghitung energi elektronik molekul berdasarkan struktur internalnya.

Dalam penyusunan diktat ini, penulis telah banyak menerima bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis mengucapkan terimakasih banyak atas bantuan yang telah diberikan. Penulis menyadari bahwa diktat ini masih terdapat kekurangan di sana-sini. Kristik dan saran dari pembaca sekalian akan penulis terima dengan hati terbuka demi kesempurnaan buku ini. Semoga buku ini ada manfaatnya.

Padang, Februari 2008

Penulis

# DAFTAR ISI

BAB I. TINJAUAN TEORI FISIKA LUCIFERASE	1
BAB II. ENERGI ELEKTRONIK MOLEKUL	6
BAB III. PENENTUAN KOORDINAT INTERNAL MOLEKUL	9
BAB IV. STUDI KASUS KARAKTERISTIK FISIS PEMBENTUKAN	
KEADAAN EKSITASI FENOMENA BIOLUCIFERASE	
PADA BAKTERI	11
41 Tinjauan Energi pada Reaksi Luciferase	13
4.2 Model Reaksi Pembentukan Keadaan Eksitasi	15
4.3 Penentuan Jumlah Molekul Substrat FMNH <sub>2</sub> yang	
Terikat pada Luciferase	16
<ul><li>4.4 Prediksi Dudukan aktif dari luciferase</li><li>4.5 Mekanisme Pembentukan Keadaan Eksitasi pada Reaksi</li></ul>	21
luciferase	28
4.6 Profil Perbedaan Energi Potensial pada Reaksi luciferase	36
4.7 Analisa dan Diskusi	40

DAFTAR PUSTAKA

# BAB I TINJAUAN TEORI FISIKA LUCIFERASE

Sebuah molekul organik dapat divisualisasikan sebagai kumpulan dari inti yang bergerak relatif lambat dan elektron yang menempati orbital spesifik mengelilingi inti. Setiap orbital ini diisi oleh maksimum dua elektron. Keadaan elektronik dalam molekul organik berhubungan dengan distribusi spasial tertentu dari elektron yang menempati orbital dengan energi tertentu. Sesuai dengan kaidah mekanika kuantum, energi keadaan elektronik yang stabil hanya dapat mempunyai nilai diskrit tertentu.

Molekul dalam keadaan dasar dapat menyerap energi sehingga berada dalam keadaan tereksitasi. Eksitasi ini dapat ditimbulkan oleh absorbsi gelombang elektromagnetik, absorbsi thermal atau reaksi kimia seperti reaksi bioluciferase. Proses absorbsi untuk berbagai peristiwa terjadi dalam waktu sekitar 10<sup>-18</sup> detik atau kurang. Dalam selang waktu tersebut, atom tidak mengalami gerakan. Kenyataan ini merupakan dasar prinsip Frank-Condon yang menyatakan bahwa molekul-molekul umumnya memasuki keadaan tereksitasi setelah adanya penyerapan elektronik.

Sebenarnya semua molekul organik mempunyai tingkat dasar tunggal (singlet), kecuali radikal-radikal bebas yang dinyatakan dengan S<sub>0</sub>, keadaan tunggal tereksitasi yang dinyatakan sebagai S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> dan seterusnya berdasarkan tingkat kenaikan energi dan keadaan triganda (triplet) yang dinyatakan dengan T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> dan seterusnya. Biasanya molekul organik yang telah menyerap energi cenderung menempati keadaan tereksitasi singlet daripada keadaan triplet karena peralihan S<sub>0</sub>  $\rightarrow$  T<sub>1</sub>. Hal ini menyangkut perubahan kelipatgandaan spin yang terlarang keras.

Adanya dua keadaan singlet dan triplet yang disebabkan elektron-elektron yang berpasangan pada keadaan dasar S<sub>0</sub> yakni sepasang untuk tiap orbital. Pada saat tereksitasi, salah satu elektron pindah kepada orbital yang mempunyai energi yang lebih tinggi. Salah satu dari kedua spin pada kedua elektron dalam keadaan tereksitasi dapat sama yakni keduanya +1/2 atau -1/2, atau kedua elektron itu mempunyai spin yang berlawanan yakni +1/2 dan -1/2. Kelipatgandaan suatu keadaan adalah sama dengan 2|S|+1 dimana S adalah jumlah bilangan spin, baik +1/2 maupun -1/2. Bila

kedua elektron mempunyai spin yang sama maka S =1 dan 2|S|+1=3 sehingga diperoleh keadaan triplet. Bila elektron-elektron mempunyai spin berlawanan maka S=0 dan 2|S|+1=1 sehingga diperoleh keadaan singlet.

Proses eksitasi membawa molekul yang biasanya berada pada keadaan dasar dengan tingkat vibrasi terendah ke keadaan singlet tereksitasi. Molekul dalam keadaan tereksitasi dapat mengalami beberapa kemungkinan yang akan dijelaskan dengan diagram Jablonski pada Gambar 1.4.

Suatu transisi spektrum yakni suatu garis absorbsi yang ditandai dengan huruf "a" pada Gambar 1.4, merupakan selisih energi antara dua keadaan molekul yang melakukan absorbsi energi. Bila molekul mengabsorbsi energi hanya pada panjang gelombang tunggal maka spektrum akan terdiri dari garis-garis tunggal seperti pada spektrum emisi atom-atom. Biasanya molekul-molekul tidak hanya memiliki energi elektronik  $E_T$  tetapi juga energi vibrasi  $E_v$  dan energi rotasi  $E_R$ . Setiap peralihan elektronik akan memberikan banyak garis (pita) dan jumlah energi yang dipindahkan sebanding dengan jumlah irisan semua garis tersebut.



Gambar 1.4 Diagram Jablonski untuk molekul (Yamada, 1982).

Emisi radiasi yang menghasilkan peralihan molekul dari keadaan tereksitasi ke keadaan dasar tanpa mengalami perubahan dalam kelipatgandaan dinamakan fluoresensi dan ditandai dengan huruf "b" pada Gambar 1.4. Fluoresensi terjadi khas dengan waktu paroh sekitar 10<sup>-9</sup> s.d 10<sup>-7</sup> detik. Karena itu fluoresensi praktis selalu terjadi dari keadaan tereksitasi terendah kelipatgandaan singlet sebab inilah satu-

satunya kelipatgandaan dengan waktu paruh yang lebih lama daripada waktu yang diperlukan untuk berbagai tumbukan.

Karena fluoresensi biasa terjadi dari keadaan vibrasi terendah S<sub>1</sub> maka emisi seperti halnya absorbsi, selalu tegak, menurun dari tingkat vibrasi tereksitasi ke keadaan dasar. Hal ini adalah kebalikan dari kejadian absorbsi dimana transisi terjadi dari tingkat vibrasi v yang paling rendah (v = 0) pada S<sub>0</sub> dan molekul akan berakhir pada tingkat vibrasi yang lebih tinggi dengan v > 0 pada S<sub>1</sub>. Akibatnya spektrum fluoresensi timbul pada panjang gelombang yang lebih besar atau frekuensi yang lebih kecil daripada spektrum absorbsi.

Proses lain transisi molekul yang tereksitasi ialah sesuatu yang terlarang yang disebut persilangan antar sistem yang menyangkut perubahan spin. Proses ini ditandai dengan huruf "c" pada Gambar 1..4. Proses ini terjadi melalui kopling orbit spin dalam hal ini keadaan dengan momen sudut spin yang berbeda dan momen sudut orbital yang sedikit bercampur, karena mempunyai momen sudut total yang sama.

Persilangan antar sistem dari singlet tereksitasi terendah ke triplet terendah adalah suatu hal yang penting dalam proses fotokimia karena mempunyai waktu hidup yang panjang. Kehilangan energi karena perpindahan triplet terendah ke keadaan dasar dapat terjadi disebabkan oleh proses radiatif yang disebut fosforesensi. Spektrum fosforesensi timbul pada panjang gelombang yang lebih besar dari pada spektrum fluoresensi. Proses fosforesensi ditandai dengan huruf "d" pada Gambar 1.4.

Jenis proses terjadinya pemancaran cahaya beserta skala waktunya dapat disimpulkan pada table 1.2. (Orchin dan Jaffe, 1980)

Jenis Proses	Transisi	Waktu hidup t
		(sec)
Eksitasi	$hv_0 + S_0 \rightarrow S_1, S_2,, S_n$	$10^{-15} - 10^{-12}$
Konversi internal	$S_n,, S_2 \rightarrow S_1 + panas$	$10^{-13} - 10^{-10}$
Konversi internal	$S_1 \rightarrow S_0 + panas$	10 <sup>-10</sup>
Persilangan antar sistem	$S_1 \rightarrow T_1 + panas$	10 <sup>-7</sup>
Persilangan antar sistem	$T_1 \rightarrow S_0 + panas$	$10^{-2} - 10^{2}$
Fluoresensi	$S_1 \rightarrow S_0 + hv_{fluor}$	$10^{-11} - 10^{-8}$
Fosforesensi	$T_1 \rightarrow S_0 + hv_{fosfor}$	> 10 <sup>-6</sup>
Kemiluciferase	Energi + $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_0 + hv_{kemilum}$	> 10 <sup>-6</sup>

Tabel 1.2 Jenis Proses Pemancaran Cahaya Beserta Skala Waktunya

Kemiluciferase adalah pemancaran radiasi elektromagnetik sebagai hasil dari reaksi kimia yang menghasilkan molekul tereksitasi secara elektronik yang kembali ke keadaan dasar atau pada saat mentransfer energinya ke molekul lain, sambil memancarkan cahaya tampak. Kemiluciferase yang terjadi pada organisme hidup disebut dengan bioluciferase.

Ada tiga kondisi yang diperlukan untuk reaksi kemiluciferase (Kricka dan Gary, 1983). Kondisi pertama adalah reaksi kimia harus eksotermik untuk membebaskan energi yang cukup untuk membentuk molekul keadaan tereksitasi, Kondisi kedua adalah reaksi kimia harus mampu menyokong terbentuknya molekul keadaan eksitasi. Sedangkan kondisi ketiga adalah molekul keadaan eksitasi harus mampu memancarkan cahaya sendiri atau mentransfer energinya ke molekul lain untuk memancarkan cahaya.

Secara umum, reaksi kemiluciferase dapat dihasilkan oleh dua mekanisme dasar. Mekanisme pertama adalah reaksi langsung yang melibatkan dua reaktan bereaksi dalam kehadiran kofaktor untuk membentuk sebuah produk keadaan tereksitasi elektronik. Produk tersebut kemudian mengalami relaksasi ke keadaan dasar sambil memancarkan sebuah foton. Reaksi langsung dapat dinyatakan sebagai berikut

$$A+B \rightarrow C^* + D \tag{1.6}$$

$$C^* \rightarrow C + h\nu \tag{1.7}$$

dimana A dan B reaktan dan C\* adalah produk tereksitasi. Ilustrasi proses energi eksitasi untuk reaksi langsung kemiluciferase ditunjukkan pada Gambar 1.5.



Gambar 1.5 Proses energi pada reaksi kemiluciferase / bioluciferase untuk reaksi :  $A + B \rightarrow C^* + D \rightarrow C + h\nu$  (Orchin dan Jaffe, 1980).

Gambar 1.5 memperlihatkan proses energi untuk reaksi kemiluciferase dimana  $\Delta H_A$ adalah energi enthalpi yang tersimpan dalam reaktan dan  $\Delta H_A^*$  adalah energi enthalpi aktivasi pada keadaan eksitasi yang selanjutnya relaksasi ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak. Proses reaksi kemiluciferase dapat terjadi jika  $\Delta H_A^* < \Delta H_A$ . Karena pada proses kemiluciferase menyaratkan energi yang terlibat harus eksotermik maka reaksi terbatas hanya pada reaksi redoks yang menggunakan oksigen dan hidrogen peroxida atau oksidan potensial lainnya.

Mekanisme kedua adalah reaksi tidak langsung yang didasarkan atas transfer energi dari molekul tereksitasi ke molekul lain untuk memancarkan cahaya. Reaksi tidak langsung dapat dinyatakan sebagai berikut.

$$A+B \rightarrow P^* + D \tag{1.8}$$

$$P^* + F \rightarrow P + F^* \tag{1..9}$$

$$F^* \rightarrow F + hv \tag{1.10}$$

Dalam pers. 1.8, intermediat keadaan eksitasi dibentuk oleh reaksi kimia. Selanjutnya energi kimia dalam intermediat kemudian ditransfer untuk mengeksitasi molekul lain F sesuai pers. 1:9. Akhirnya kemiluciferase terjadi ketika molekul tereksitasi mengalami relaksasi kembali ke keadaan dasar dengan memancarkan cahaya.

#### **BAB II**

### **ENERGI ELEKTRONIK MOLEKUL**

Energi elektronik molekul dapat dihitung dengan menggunakan metode MNDO-PM3. (Modified Neglect of Diatomic Overlap-Parametric Method Number 3). Metode ini merupakan penjabaran dari persamaan Schrodinger yang dapat mengakomodasi sistem yang mempunyai jumlah elektron yang banyak.

Metode MNDO-PM3 adalah salah satu metode semi empiris yang dapat digunakan untuk menghitung struktur elektronik suatu molekul. Metode ini tergabung dalam perangkat lunak MOPAC dengan kata kunci PM3.

Metode MNDO-PM3 bertujuan untuk menyelesaikan persamaan parameter yang menghasilkan nilai dan fungsi eigen yang dicari. Perhitungan variasi tersebut dilakukan secara empirik melalui iterasi yang berulang-ulang yang dikenal dengan *metoda Self Consistent Field (SCF)*. Persamaan yang akan diselesaikan dalam bentuk

$$|H - ES| = 0 \tag{2.1}$$

atau dapat dinyatakan dalam bentuk

$$|H - E| = 0 \tag{2.2}$$

H adalah determinan sekular dan E adalah perangkat dari nilai eigen.

Persamaam sekular dalam metode MNDO-PM3 ini dikenal sebagai persamaan Hall-Roothaan

$$c_i \left| F - \varepsilon_i S_0 \right| c_i = 0 \tag{2.3}$$

dimana  $c_i$  adalah vektor eigen, F adalah matrik Fock,  $\varepsilon_i$  adalah nilai eigen, dan S<sub>0</sub> adalah matrik overlap. Energi total sistem dinyatakan dengan persamaan sebagai berikut

$$E = \frac{1}{2}P(H+F)$$
 (2.4)

dimana P adalah matrik densitas dan H adalah matrik satu elektron. Elemen matrik Fock secara umum dapat ditulis

$$F^{\alpha}_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + \sum_{\lambda} \sum_{\sigma} \left[ P^{\alpha+\beta}_{\lambda\sigma} \langle \mu\nu | \lambda\sigma \rangle - P^{\alpha}_{\lambda\sigma} \langle \mu\lambda | \nu\sigma \rangle \right]$$
(2.5)

atau dalam bentuk tanpa spin, persamaan dapat ditulis

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} + \sum_{\lambda} \sum_{\sigma} \left[ P_{\lambda\sigma} \langle \mu \upsilon | \lambda \sigma \rangle - \frac{1}{2} P_{\lambda\sigma} \langle \mu \lambda | \upsilon \sigma \rangle \right]$$
(2.6)

Metode MNDO-PM3 menggunakan set dasar minimum yang terdiri dari maksimum satu buah orbital atom untuk setiap bilangan quantum anggular. Perangkat dasar normal untuk sembarang atom dari satu orbital s dan tiga orbital p ( $p_x$ ,  $p_y$ , dan  $p_z$ ).

Jika integral overlap yang timbul dari overlap dari dua orbital atom yang berbeda adalah diabaikan maka pengabaian ini menyebabkan matrik overlab tereduksi menjadi matrik satuan. Metode ini disebut dengan *Neclect of Diatomic Differential Overlap Integral* (NDDO). Persamaan sekular tereduksi dapat ditulis

$$c_i | F - \varepsilon_i | c_i = 0 \tag{2.7}$$

Dalam teori semiempirik, digunakan matrik density Coulson

$$P^{\alpha}_{\lambda\sigma} = \sum_{i}^{\infty} c^{\alpha}_{\lambda i} c^{\alpha}_{\sigma i} \tag{2.8}$$

dimana penjumlahan dilakukan pada semua orbital molekul spin yang ditempati. Dalam perhitungan RHF, hanya matrik densitas total yang dihitung sehingga persamaan dapat ditulis

$$P_{\lambda\sigma} = 2\sum_{i}^{\infty} c_{\lambda i} c_{\sigma i}$$
(2.9)

dimana penjumlahan dilakukan untuk semua orbital molekul yang ditempati.

Jika sistem lebih dari setengah orbital atom yang terisi, maka matrik densitas dapat ditulis

$$P^{\alpha}_{\mu\nu} = 1 - \sum_{i=occ+1}^{N} c^{\alpha}_{\lambda i_i} c^{\alpha}_{\sigma i}$$
(2.10)

dan

$$P_{\mu\nu} = 2 - 2 \sum_{i=0, c \neq 1}^{N} c_{\lambda i} c_{\sigma i}$$
(2.11)

Perhitungan untuk integral dua pusat satu elektron  $H_{\mu\nu}$  didekati dengan persamaan

$$H_{\mu\nu} = S_{\mu\nu} \frac{1}{2} (U_{\mu\mu} + U_{\nu\nu})$$
(2.12)

dimana  $S_{\mu\nu}$  adalah integral overlap antara atom orbital  $\varphi_{\mu}$  untuk sebuah atom dan  $\varphi_{\nu}$  untuk atom yang lain dan nilai U adalah konstanta orbital atom.

Jika semua integral dua elektron yang timbul dari overlap dari dua orbital atom pada pusat yang berbeda diabaikan, maka elemen matrik NDDO tereduksi dapat ditulis

$$F^{\alpha}_{\mu\nu} = H_{\mu\nu} - \sum_{\lambda}^{A} \sum_{\sigma}^{B} P^{\alpha}_{\lambda\sigma} \langle \mu \lambda | \nu \sigma \rangle$$
(2.13)

Modifikasi dari aproksimasi NDDO memberikan aproksimasi MNDO-PM3 (Modified Neclect of Diatomic Overlap-Parametric Number 3). Untuk setiap atom terdapat maksimum lima integral dua elektron satu pusat yaitu  $\langle ss|ss\rangle, \langle ss|pp\rangle, \langle sp|sp\rangle, \langle pp|pp\rangle, dan\langle pp'|pp'\rangle$ , dimana p dan p' adalah dua orbital atom jenis p yang berbeda. Lima integral ini diberi nama sebagai berikut

$$\langle ss | ss \rangle = G_{ss} \langle pp | pp \rangle = G_{pp} \langle sp | sp \rangle = H_{sp}$$

$$\langle pp | pp \rangle = G_{pp} \langle pp | p' p' \rangle = G_{p^2}$$

$$(2.14)$$

Dengan definisi ini, kontribusi satu pusat dua elektron ke matrik Fock dapat ditulis

$$F_{ss}^{\alpha} = P_{ss}^{\beta}G_{ss} + \left(P_{p_{x}}^{\alpha+\beta} + P_{p_{yx}}^{\alpha+\beta} + P_{p_{yx}}^{\alpha+\beta}\right)G_{sp} - \left(P_{p_{x}}^{\alpha} + P_{p_{yx}}^{\alpha} + P_{p_{yx}}^{\alpha}\right)H_{sp}$$

$$F_{sp}^{\alpha} = 2P_{sp}^{\alpha+\beta}H_{sp} - P_{sp}^{\alpha}(H_{sp} + G_{sp})$$

$$F_{pp}^{\alpha} = P_{sp}^{\alpha+\beta}G_{sp} - P_{sp}^{\alpha}H_{sp} + P_{pp}^{\beta}G_{pp} + \left(P_{p'p'}^{\alpha+\beta} + P_{p'p'}^{\alpha+\beta}\right)G_{p2} - \frac{1}{2}\left(P_{p'p'}^{\alpha} + P_{p'p'}^{\alpha}\right)(G_{pp} - G_{p2}) \quad (2.15)$$

$$F_{pp'}^{\alpha} = P_{pp'}^{\alpha+\beta}(G_{pp} - G_{p2}) - \frac{1}{2}P_{pp'}^{\alpha}(G_{pp} + G_{p2})$$

Integral refulsif inti-inti pada pendekatan MNDO dinyatakan dengan persamaan  $E_N(A, B) = Z_A Z_B(\langle s_A s_A | s_B s_B \rangle (1 + e^{-\alpha_A R_{AB}} + e^{-\alpha_B R_{AB}}))$ (2.16) Jika interaksi O-H dan N-H diperlakukan berbeda, maka persamaan dapat ditulis

$$E_N(A,B) = Z_A Z_B \left( \left\langle s_A s_A \middle| s_B s_B \right\rangle \left( 1 + e^{-\alpha_A R_{AB}} R_{AB} + e^{-\alpha_B R_{AB}} \right) \right)$$
(2.17)

Bentuk interaksi inti-inti dari PM3 dapat ditulis

$$E_{N}(A,B) = E_{N}^{MNDO}(A,B) + \frac{Z_{A}Z_{B}}{R_{AB}} \left( \sum_{k} \alpha_{kA} e^{-b_{kA}(R_{AB}-c_{kA})^{2}} + \sum_{k} \alpha_{kB} e^{-b_{kB}(R_{AB}-c_{kB})^{2}} \right)$$
(2.18)

Dari persaman interaksi inti-inti pada metode PM3 dimasukkan persamaan refulsif inti-inti menurut pendekatan MNDO sehingga metoda PM3 disebut juga metoda MNDO-PM3.

### **BAB III**

### PENENTUAN KOORDINAT INTERNAL MOLEKUL

Dari persamaan MNDO-PM3 yang telah dibahas pada BAB II terlgambar bahwa untuk menghitung energi elektronik dari molekul diperlukan informasi dari struktur internal molekul. Struktur internal molekul merupakan spesifikasi dari geometri internal yang menghubungkan atom satu dengan ataom yang lain. Spesifikasi geometri internal menunjukkan posisi relatif antara dua atom terdekat yang membentuk ikatan kimiawi seperti yang diperlihatkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Sistem geometri internal

Untuk spesifikasi ikatan ini diperlukan tiga besaran yaitu : jarak antar atom yang berikatan, sudut antara dua ikatan dalam satu bidang dan sudut antar bidang ikatan yang berdekatan. Format data secara lengkap dapat ditulis :

No	Panjang	Sudut	Sudut	Atom	Atom	Atom
Atom	Ikatan	Ikatan	Bidang	1	2	3

### Untuk atom pertama cukup dinyatakan

1	0	0	0	0	0	0

Untuk atom kedua perlu dinyatakan panjang ikatan terhadap atom pertama

	2	r <sub>12</sub>	0	0	1	0	0
I						· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

Untuk atom ketiga perlu dinyatakan panjang iktan terhadap atom kedua dan sudut ikatan yang dibentuk terhadap atom pertama

3 $r_{23}$ <( $r_{12}, r_{23}$ )	0	2	1	0
----------------------------------	---	---	---	---

Untuk atom keempat perlu dinyatakan panjang ikatan terhadap atom ketiga, sudut ikatan yang dibentuk terhadap atom kedua dan sudut antar bidang yang dibentuk oleh bidang atom keempat – ketiga – kedua dan bidang atom ketiga – kedua – pertama.

4	Г34	<(r <sub>23</sub> , r <sub>34)</sub>	$<(r_{23} \times r_{34})$	3	2	1
			$r_{12} \times r_{23}$ )			

Untuk atom-atom berikutnya berlaku hal yang sama. Untuk atom kelima karena atom ini tidak terikat pada atom keempat melainkan pada atom kedua, sehingga diberikan kebebasan untuk menyatakan sudut antar bidang ikatan yang berdekatan. Sedangkan sudut antara dua ikatan dalam satu bidang tidak berubah, yaitu dalam hal ini  $<(r_{25}, r_{23})$ .

5	r <sub>25</sub>	$<(r_{25}, r_{23})$	$<(r_{25} \times r_{23},$	2	3	1
			r <sub>23</sub> x r <sub>12</sub> )			

atau

5	r <sub>25</sub>	<(r <sub>25</sub> , r <sub>23)</sub>	$<(r_{25} \times r_{23},$	2	3	4	
			r <sub>23</sub> x r <sub>34</sub> )				

dan variasi lainnya.

Selanjutnya nomor atom digantikan dengan nama unsur atom yang dimaksud, misalnya H (hydrogen), C (karbon), N (nitrogen) dan O (oksigen) serta atom-atom lainnya.

#### BAB IV

# STUDI KASUS KARAKTERISTIK FISIS PEMBENTUKAN KEADAAN EKSITASI FENOMENA BIOLUMINISENSI PADA BAKTERI

Fenomena bioluciferase pada organisme hidup telah menjadi objek perhatian semenjak zaman dahulu kala. Ketika Cristopher Columbus menyeberangi laut Atlantik, ia sering melihat cahaya luciferase misterius di sekitar kapalnya. Saat itu, dijelaskan bahwa luciferase yang ditemukan di laut dihubungkan dengan monster atau misteri lain yang belum diketahui (Harvey, 1920 dikutip dari Floyd, 1997).

Usaha serius pertama ilmuwan untuk menyelidiki asal muasal luciferase pada organisme dimulai pada pertengahan tahun 1600 Masehi. Saat itu Boyle menguji pengaruh oksigen pada luciferase yang teramati pada daging yang sudah mati. (Harvey, 1952 dikutip dari Kruse dan Boyle, 2000). Pada tahun 1830, ilmuwan Jerman, G.A. Michaelis, menemukan bahwa luciferase dari daging yang sudah mati disebabkan oleh sesuatu yang hidup (Harvey, 1920 dikutip dari Biron, 2003). Penemuan G.A. Michaelis ini merupakan titik awal para peneliti untuk mengobservasi luciferase pada makluk hidup. Saat ini, bioluciferase telah diobservasi pada ribuan spesies meliputi kunang-kunang, jamur, binatang laut dan bakteri.

Salah satu spesies yang menarik perhatian adalah bakteri luciferase. Bakteri luciferase mayoritas ditemukan di alam dalam bentuk simbiosis dengan makluk hidup yang lain seperti ikan, cumi dan ada juga yang mampu hidup bebas di alam (Meyer-Rochow, 2001). Dalam peristiwa simbiosa, bakteri menggunakan inang sebagai habitat untuk penumbuhan dan memperoleh makanan, dan pada waktu yang sama inang menggunakan cahaya yang dihasilkan bakteri untuk komunikasi, pertahanan, dan mencari mangsa (Hasting, 1998). Dalam hal komunikasi, cahaya dipancarkan agar dikenali spesies atau identitasnya oleh individu lain. Cahaya juga digunakan sebagai alat pertahanan bagi inang karena berfungsi memindahkan perhatian dari pemangsa dengan cara mengelabui pemangsa di malam terang bulan. Cahaya juga digunakan untuk mencari mangsa karena cahaya dapat digunakan sebagai penerangan untuk menangkap mangsa.

Holt dkk. (1994) mengungkapkan bahwa bakteri luciferase dapat dikelompokkan atas tiga genus: pertama *Photobacterium*, kedua *Vibrio*, dan ketiga *Photorhabdus*. Genus yang ada pada lingkungan laut dikelompokkan sebagai *Photobacterium* dan *Vibrio*. Genus *Photobacterium* kebanyakan bersimbiosa pada organ cahaya dari binatang laut sedangkan genus *Vibrio* selain ada dalam keadaaan bersimbiosa juga ditemukan dalam keadaaan hidup bebas di dalam laut. Sedangkan genus *Photorhabdus* hidup bebas di lingkungan darat.

Hasting (1971) telah merumuskan reaksi bioluciferase untuk bakteri yaitu melibatkan enzim yang disebut luciferase. Luciferase ini mengkatalis tiga substrat yaitu flavin mononukleotida tereduksi (FMNH<sub>2</sub>), molekul oksigen (O<sub>2</sub>) dan aldehid rantai panjang (RCOH). Reaksi tersebut membebaskan flavin (FMN), asam lemak rantai panjang (RCOOH), molekul air (H<sub>2</sub>O) sambil memancarkan cahaya tampak (*hv*) sebagai berikut.

$$FMNH_2 + O_2 + RCOH \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O + hv$$
 (4.1a)

Untuk menjelaskan proses bioluciferase pada bakteri, Hasting dkk. (1973) membagi reaksi bioluciferase atas empat intermediat kunci sesuai dengan urutan reaksi yaitu intermediat I (substrat FMNH<sub>2</sub> terikat pada luciferase), intermediat II (penambahan substrat O<sub>2</sub> pada reaksi intermediat I), intermediat III ( penambahan substrat RCOH pada reaksi intermediat II) dan intermediat IV\* (keadaan eksitasi dari reaksi yang akan meluruh kekeadaan dasar sambil memancarkan cahaya) sesuai persamaan berikut.



#### 4.1 Tinjauan Energi pada Reaksi Luciferase

Dari sudut pandang energi, reaksi bioluciferase terjadi ketika sebagian besar energi kimia yang eksoterm  $\Delta H$  diubah menjadi energi eksitasi elektronik  $\Delta H$  \* yang meluruh ke keadaan dasar sambil memancarkan cahaya tampak (*hv*). Secara ringkas prosesnya dapat dirumuskan sebagai berikut

$$\Delta H \to \Delta H^* \to h\nu \tag{4.1c}$$

Langkah  $\Delta H \rightarrow \Delta H^*$  disebut langkah pembentukan keadaan eksitasi (kemieksitasi) dan langkah  $\Delta H^* \rightarrow hv$  disebut langkah proses pemancaran cahaya (kemiluciferase). Persyaratan energi ditentukan berdasarkan kriteria dari Gracia-Compana dkk. (2001) sebagai berikut

$$-\Delta G \ge hc \ \lambda \tag{4.2}$$

dimana  $\Delta G$  adalah perubahan energi bebas Gibbs, h adalah konstanta Planck (6,626x10<sup>-34</sup> J.s), c adalah kecepatan penjalaran cahaya dalam ruang vakum (3x10<sup>8</sup> m.s<sup>-1</sup>) dan  $\lambda$  adalah panjang gelombang cahaya yang dipancarkan.

Hubungan antara perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$  dengan perubahan enthalpi  $\Delta H$  dapat ditulis

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \tag{4.3}$$

Perubahan entropi △S dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut

$$\Delta S = 4,6 (\log k - 10,7 - \log T)$$
(4.4)

dimana k adalah konstanta peluruhan dan T adalah temperatur reaksi pada skala Kelvin. Hubungan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dengan energi aktivasi E<sub>a</sub> dapat ditulis sebagai berikut

$$\Delta H^* = E_a + RT \tag{4.5}$$

Sedangkan hubungan perubahan energi bebas Gibbs pada keadaan eksitasi  $\Delta G^*$  dengan perubahan enthalpi pada keadaan eksitasi  $\Delta H^*$  dapat dinyatakan sebagai berikut

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T \Delta S^* \tag{4.6}$$

Sedangkan perubahan entropi pada keadaan eksitasi  $\Delta S^*$  dapat dinyatakan dalam persamaan empiris (Lehrer dan Barker, 1970 dikutip dari Tu, 1979) sebagai berikut

$$\Delta S^* = 4.6 \{ \log k - 10.7 - \log T + E_a/(4.6 T) \}$$
(4.7)

Karena reaksi bioluciferase dapat dirumuskan ke dalam dua langkah energi yaitu langkah kemieksitasi dan langkah kemiluciferase, maka mekanisme fotonik bioluciferase bakteri dapat dijelaskan dengan menggabungkan seluruh informasi yang terkandung pada kedua langkah tersebut. langkah kemieksitasi atau pembentukan keadaan eksitasi akan dijelaskan sebagai berikut.

#### 4.2 Model Reaksi Pembentukan Keadaan Eksitasi

Model reaksi pembentukan keadaan eksitasi pada bakteri luciferase dapat ditulis sebagai berikut :

(x)FMNH <sub>2</sub>	+	А	$\rightarrow$	$(x_1)FMNH^++AH^+$	(4.8)
(x1)FMNH <sup>-</sup>	+	O <sub>2</sub>	→	(x <sub>2</sub> )FMNHOO <sup>-</sup>	(4.9)
(x <sub>2</sub> )FMNHOO <sup>-</sup>	+	BH	→	(x <sub>3</sub> )FMNHOOH + B <sup>-</sup>	(4.10)
(x3)FMNHOOH	+	RCOH	$\rightarrow$	(x <sub>4</sub> )FMNHOO-CHOH-R	(4.11)
(x <sub>4</sub> )FMNHOO-CHOH-	R -	RCOOF	I→	(x5)FMNHOH*	(4.12)

dimana A merepresentasikan katalis asam yang terlibat dalam proses deprotonisasi dan B merepresentasikan katalis basa yang terlibat dalam proses protonisasi dan "x" menyatakan jumlah molekul FMNH<sub>2</sub> yang terikat pada luciferase. Pers. 4.8 s.d 4.10 merepresentasikan intermediat I dan intermediat II, pers. 4.11 merepresentasikan intermediat III dan pers. 4.12 merepresentasikan intermediat IV\* atau keadaan eksitasi.

Karena massa elektron atau proton yang terlibat dalam reaksi relatif kecil, maka efek kuantum seperti perubahan muatan dan pemutusan ikatan sangat sukar diobservasi di dalam eksperimen. Untuk mengatasi masalah ini, maka mekanisme pembentukan keadaan eksitasi dari reaksi luciferase dilakukan secara komputasi. Namun sebelumnya perlu mengetahui energi awal yang tersedia pada reaksi luciferase dengan mengidentifikasi jumlah molekul substrat FMNH<sub>2</sub> yang terlibat dalam reaksi. Tahapan perhitungan secara komputasi adalah sebagai berikut: pertama, memprediksi dudukan aktif dari luciferase dan kedua, menghitung perbedaan energi potensial dari reaksi luciferase menggunakan metode MNDO-PM3 yang tergabung dalam perangkat

lunak MOPAC versi 7 dengan kata kunci PM3. Garis besar metode MNDO-PM3 dapat dilihat pada BAB II..

4.3 Penentuan Jumlah Molekul Substrat FMNH<sub>2</sub> yang Terikat pada Luciferase Untuk mengetahui nilai awal "x" pada pers. 4.8 s.d 4.12, maka perlu dilakukan penentuan jumlah sisi pengikatan FMNH<sub>2</sub> secara kinetik. Jumlah substrat FMNH<sub>2</sub> yang terikat pada luciferase didapatkan dari hubungan antara kecepatan reaksi yang dikatalis oleh luciferase dengan konsentrasi FMNH<sub>2</sub>. Pada kondisi pH dan temperatur tertentu konsentrasi substrat bertambah sehingga kecepatan reaksi akan meningkat. Pada harga konsentrasi tertentu, kecepatan maksimum V<sub>max</sub> akan tercapai.

Model reaksi luciferase dapat diturunkan dari model Michaelis dan Menten sebagai berikut

$$E + S \xrightarrow[k_{-1}]{k_1} ES \xrightarrow{k_2} ES^0 \to h\upsilon$$
(4.13)

dimana E adalah konsentrasi enzim, S adalah konsentrasi substrat FMNH<sub>2</sub>, ES adalah konsentrasi intermediat enzim-substrat dan ES<sup>0</sup> adalah konsentrasi intermediate II. Jumlah dari ES<sup>0</sup> yang terbentuk dalam reaksi ini adalah

$$(ES^{0}) = (ES) = \frac{(E_{T})(S)}{K_{d} + (S)}$$
(4.14)

dimana  $K_d$  adalah konstanta disosiasi (k<sub>-1</sub>/k<sub>1</sub>) untuk pengikatan Luciferase-FMNH<sub>2</sub>, dan (E<sub>T</sub>) adalah konsentrasi pengikatan substrat pada luciferase total {(E)+(ES)}. Jika kecepatan reaksi yang dikatalis oleh luciferase sebanding dengan jumlah intermediat stabil (ES<sup>0</sup>), maka pers. 4.14 dapat ditulis dalam bentuk persamaan Michaelis dan Menten sebagai berikut

$$v = \frac{V_{maks}(S)}{K_d + (S)} \tag{4.15}$$

atau dapat ditulis dalam bentuk

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{maks}} + \frac{K_d}{V_{maks}} \left(\frac{1}{S}\right)$$
(4.16)

dimana v adalah kecepatan reaksi dan  $V_{max}$  adalah kecepatan reaksi maksimum pada saat konsentrasi FMNH<sub>2</sub> tersaturasi. Jika orde reaksi (n) terhadap FMNH<sub>2</sub> juga ditinjau, maka pers.4.15 dapat ditulis

$$v = \frac{V_{maks}(S)^{n}}{K_{d} + (S)^{n}}$$
(4.17)

atau dapat ditulis dalam bentuk

$$\log\left(\frac{V_{maks}}{v} - 1\right) = \log k_d - n\log(S)$$
(4.18)

Berdasarkan data eksperimen dapat diplot hubungan antara log (V<sub>maks</sub>/v-1) dengan log (S) sesuai pers. 4.18 dan hasilnya diperlihatkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Plot dari log (V<sub>max</sub>/v -1) terhadap log S untuk luciferase.

Berdasarkan persamaan garis  $log (V_{maks}/v-1) = -1,174 log S -7,8901$  yang diperoleh pada Gambar 4.1 dan hubungannya dengan pers. 4.18 dapat disimpulkan bahwa orde reaksi bioluciferase (n) terhadap FMNH<sub>2</sub> adalah 1,1. Dengan kata lain, reaksi pada luciferase yang dinyatakan dengan pers.4.18 mempunyai kebergantungan orde satu terhadap konsentrasi FMNH<sub>2</sub> sesuai kemiringan garis n =1,1.

Selanjutnya data eksperimen pengikatan  $FMNH_2$  pada luciferase dapat diplot hubungan antara 1/v dengan 1/S untuk dua konsentrasi luciferase yang berbeda sesuai dengan pers. 4.16 dan hasilnya diperlihatkan pada Gambar 4.2.



(b)

Gambar 4.2 Hubungan antara resiprok dari intensitas cahaya awal (1/v) dengan resiprok konsentrasi FMNH<sub>2</sub> (1/S) untuk luciferase dengan konsentrasi (a) 1,06x10<sup>-8</sup> mol/liter dan (b) 10,6x10<sup>-8</sup> mol/liter.

Berdasarkan persamaan garis  $1/v = 2x10^{-7} (1/S) + 1,0621$  yang diperoleh pada Gambar 4.2(a) dan hubungannya dengan pers. (4.16) dapat disimpulkan bahwa konstanta disosiasi K<sub>d</sub> dari FMNH<sub>2</sub> untuk luciferase dengan konsentrasi 1,06x10<sup>-8</sup> mol/liter adalah 0,89x10<sup>-7</sup> M dan V<sub>max</sub> adalah 0,9/s. Sedangkan berdasarkan persamaan garis  $1/v = 10^{-7} (1/S) + 1,1223$  yang diperoleh pada Gambar 4.2(b) dan hubungannya dengan pers. (4.16) dapat disimpulkan bahwa K<sub>d</sub> untuk luciferase dengan konsentrasi 10,6x10<sup>-8</sup> mol/liter adalah 1,89x10<sup>-7</sup> M dan V<sub>max</sub> adalah 0,53/s. Nilai K<sub>d</sub> yang kecil menunjukkan bahwa afinitas luciferase terhadap pengikatan susbtrat adalah besar (Stryer, 1995). Untuk mengetahui jumlah sisi pengikatan  $FMNH_2$  pada luciferase berdasarkan hubungan konsentrasi substrat bebas (S<sub>f</sub>) dengan konsentrasi substrat total (S), maka komplek enzim-substrat (ES) dapat ditulis

$$(S_t) = (S) - (ES) = (S) - v/V_{\max}(E_T)$$
(4.19)

dimana  $E_T$  adalah konsentrasi sisi pengikatan substrat FMNH<sub>2</sub>. Dengan mensubsitusikan pers. 4.15 ke pers. 4.19 didapatkan hubungan

$$\frac{V_{\max}}{v} = 1 + \left\{ K_d + (E_T)(1 - v / V_{\max}) \right\} 1 / (S)$$
(4.20)

Berdasarkan data eksperimen, dapat diplot hubungan antara  $V_{max}/v$  terhadap 1/S pada dua konsentrasi luciferase yang berbeda sesuai pers. 4.20 dan hasilnya diperlihatkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hubungan dari V<sub>max</sub>/v terhadap 1/S pada konsentrasi LUCIFERASE yang berbeda {1,02 x 10<sup>-7</sup> mol/liter (segiempat hitam) dan 3,06 x 10<sup>-7</sup> mol/liter (segitiga hitam)}.

Gambar 4.3 memperlihatkan bahwa plot dari  $V_{max}/v$  terhadap 1/S untuk data eksperimen sesuai pers. 4.20 pada konsentrasi substrat tinggi, v mendekati  $V_{max}$  sehingga  $(1-v/V_{max}) \rightarrow 0$  dan kemiringan garis menjadi  $k_d$ . Sebaliknya pada konsentrasi substrat rendah, v mendekati 0 sehingga  $(1-v/V_{max}) \rightarrow 1$  dan kemiringan garis menjadi  $(K_d + E_T)$  dapat ditentukan dari kemiringan garis pada nilai yang tinggi dari 1/S. Pada konsentrasi substrat yang tinggi, kemiringan garis berkurang dan

mendekati nilai  $K_d$  namun dapat lebih sederhana ditentukan dari kemiringan garis pada konsentrasi enzim rendah {( $E_T$ )<< $K_d$ }. Konsentrasi pengikatan FMNH<sub>2</sub> kemudian dapat ditentukan. Kesimpulan dari hasil yang diperoleh pada Gambar 4.3 ditampilkan pada Tabel 4.1.

Konsentrasi LUCIFERASE (mol/liter)	Konsentrasi Sisi pengikatan FMNH <sub>2</sub> (mol/liter)	Sisi pengikatan FMNH <sub>2</sub> per molekul LUCIFERASE
1,06 x 10 <sup>-8</sup>	1,1 x 10 <sup>-8</sup>	1,03
10,6 x 10 <sup>-8</sup>	11,1 x 10 <sup>-8</sup>	1,04

Tabel 4.1 Jumlah Pengikatan FMNH2 pada LUCIFERASE

Tabel 4.1 memperlihatkan bahwa LUCIFERASE dengan berat molekul 79 kD mengandung hanya satu pengikatan untuk FMNH<sub>2</sub>. Hasil ini akan menjadi data awal dalam penentuan dudukan aktif LUCIFERASE dimana hanya ada satu sisi pengikatan untuk FMNH<sub>2</sub> permolekul LUCIFERASE.

#### 4.4 Prediksi Dudukan aktif dari LUCIFERASE

Berdasarkan data-data eksperimen pada Tabel 4.1 bahwa hanya ada satu molekul substrat FMNH<sub>2</sub> yang terikat pada LUCIFERASE, maka reaksi pembentukan keadaan eksitasi pada LUCIFERASE sesuai pers 4.8 s.d 4.12 dapat ditulis sebagai berikut :

FMNH <sub>2</sub>	+ A	$\rightarrow$ FMNH <sup>-</sup> +AH <sup>+</sup>	(4.21)
FMNH	+ O <sub>2</sub>	→ FMNHOO <sup>-</sup>	(4.22)
FMNHOO <sup>-</sup>	+BH	$\rightarrow$ FMNHOOH + B <sup>-</sup>	(4.23)
FMNHOOH	+ RCOH	→ FMNHOO-CHOH-R	(4.24)
FMNHOO-CHOH-R	(4.25)		

Dudukan aktif A merepresentasikan katalis asam yang berfungsi sebagai penerima proton dan B merepresentasikan katalis basa yang berfungsi sebagai pemberi proton. Dudukan aktif A dan B dapat diprediksi menggunakan metode MNDO-PM3 dengan menghitung perbedaan energi potensial akibat perpindahan proton untuk beberapa residu asam amino yang bersifat asam dan basa berdasarkan pers. 4.21 s.d 4.25. Dudukan aktif pada LUCIFERASE akan diprediksi berdasarkan kriteria perbedaan

energi potensial dari Sugimoto dkk. (1999). Tiga skenario dari Sugimoto dinyatakan pada skema dalam Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Skema energi yang berpola *up, down* dan *barrier* berdasarkan kriteria Sugimoto dkk. (1999). Tanda panah menunjukkan perubahan jarak antara dua molekul yang saling mendekati satu sama lain

Kurva energi yang berpola up menunjukkan bahwa reaksi sukar terjadi, kurva energi yang berpola barrier dengan energi barrier aktivasi (energi aktivasi)  $E_a$  menunjukkan bahwa reaksi dapat terjadi sedangkan kurva energi yang berpola *down* menunjukkan bahwa reaksi spontan terjadi. Berdasarkan fungsi LUCIFERASE yang merendahkan energi *barrier* aktivasi  $E_a$  supaya reaksi bioluciferase dapat terjadi maka skenario energi yang dipilih berdasarkan Gambar 4.4 adalah skenario adanya energi barrier aktivasi ( $E_a$ ) atau berpola *down*. Tetapi bila terjadi energi barrier aktivasi pada semua reaksi maka skenario yang dipilih adalah reaksi dengan energi barrier minimum. Hal ini didasarkan atas asumsi bahwa energi barrier minimum akan mempercepat laju reaksi sesuai persamaan Arhenius (pers.I4.9) dimana nilai  $E_a$  adalah besar bila laju reaksi adalah kecil sehingga kriteria  $E_a$  minimum terpenuhi.

Verifikasi energi aktivasi dilakukan dengan cara mencocokkan energi aktivasi yang diperoleh dari perhitungan dengan yang diperoleh dari eksperimen. Berdasarkan kriteria tersebut, maka diuji beberapa jenis residu asam amino yang bersifat asam dan basa. Pemilihan jenis asam amino yang bersifat asam dan basa ini adalah berdasarkan asumsi bahwa reaksi bioluciferase pada bakteri adalah reaksi reduksi-oksidasi. Oleh karena itu, perpindahan elektron akibat reaksi ini dimediasi oleh residu asam amino yang bersifat asam sebagai penerima proton dan basa sebagai pemberi proton.

Berdasarkan pengelompokkan jenis residu asam amino baku maka asam amino yang bersifat asam adalah Asparagin (Asn) dan Asam aspartat (Asp), sedangkan asam amino yang bersifat basa adalah Lisin (Lys-H<sup>+</sup>) dan Histidin (His).

Untuk menghitung perbedaan energi potensial akibat perpindahan proton pada setiap pers. 4.21 s.d 4.25 diperlukan data masukan geometri internal dari molekul-molekul yang bersangkutan. Susunan molekul menunjukkan posisi relatif antara dua atom yang berdekatan sehingga membentuk ikatan kimiawi molekul. Untuk menspesifikasi ikatan ini, diperlukan tiga besaran yaitu jarak antar atom yang berikatan, sudut antara dua ikatan dalam bidang dan sudut antara bidang ikatan yang berdekatan (*dihedral angle*). Selain itu diperlukan juga label atom-atom terdekat. Penjelasannya lebih detail tentang penentuan koordinat internal molekul diberikan dalam Lampiran G.

Struktur geometri dan keadaan elektronik setiap molekul dioptimasi terhadap energi total menggunakan metoda MNDO-PM3. Kurva energi potensial setiap reaksi diperoleh setelah melakukan minimisasi energi total terhadap semua parameter geometri kecuali jarak tegak lurus antara molekul R. Contoh jarak tegak lurus antara dua molekul dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Jarak tegak lurus antara dua molekul R

Kurva energi potensial diperoleh berdasarkan perbedaan energi total  $\Delta E$  yang difenisikan sebagai berikut

$$\Delta \mathbf{E} = \mathbf{E}(\mathbf{R}) \cdot \mathbf{E}_0 \tag{4.26}$$

dimana E(R) adalah energi total sistem pada jarak R dan E<sub>0</sub> adalah energi total sistem pada jarak acuan R<sub>0</sub> = 4Å. Dalam penelitian ini digunakan dua sisi pengikatan pada FMNH<sub>2</sub> yaitu sisi N<sub>1</sub> dan sisi C<sub>4a</sub>. Sisi N<sub>1</sub> digunakan sebagai tempat pengikatan residu asam amino yang bersifat asam dan sisi C<sub>4a</sub> digunakan sebagai tempat pengikatan residu asam amino yang bersifat basa. Pemilihan sisi N<sub>1</sub> dan C<sub>4a</sub> dari FMNH<sub>2</sub> sebagai sisi pengikatan adalah sesuai dengan hasil penemuan Vervoort dkk.(1986a dan 1986b), Wada dkk. (1997 dan 1999) dan Sugimoto dkk. (1999), bahwa sisi N<sub>1</sub> adalah tempat deprotonisasi dan sisi C<sub>4a</sub> adalah tempat protonisasi. Dalam penelitian ini dipilih molekul lumiflavin (R=-CH<sub>3</sub>) sebagai substrat FMNH<sub>2</sub>.

Model interaksi dan kurva perbedaan energi potensial dari pengikatan Asp pada FMNH<sub>2</sub> sesuai pers. (4.21) diperlihatkan pada Gambar 4.6.



(b)

Gambar 4.6 (a) Model interaksi Asp dan FMNH<sub>2</sub> dan (b) kurva perbedaan energi potensial pengikatan dudukan aktif asam amino Asp pada FMNH<sub>2</sub>.

Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asp menuju sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub>.

Gambar 4.6 memperlihatkan model interaksi dan kurva perbedaan energi potensial yang dihitung berdasarkan reaksi pada pers. 4.21. R didefinisikan sebagai jarak antara sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> dengan atom terminal O dari grup  $-COO^-$  pada rantai sisi Asp. Perhitungan perbedaan energi potensial dimulai pada jarak acuan R = 4 Å dimana bidang FMNH<sub>2</sub> tegak lurus dengan bidang Asp. Pada saat Asp mendekati FMNH<sub>2</sub> maka kurva perbedaan energi potensial bertambah secara cepat dan maksimum pada jarak 2,4 Å. Energi barrier akibat reaksi ini adalah 5,4 e4.

Model interaksi dan kurva perbedaan energi potensial dari pengikatan Asn pada  $FMNH_2$  sesuai pers. (4.21) diperlihatkan pada Gambar 4.7.



**(b)** 

Gambar 4.7(a) Model interaksi Asn dan FMNH<sub>2</sub> dan (b) kurva perbedaan energi potensial pengikatan dudukan aktif asam amino Asn pada FMNH<sub>2</sub>. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asn menuju sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub>.

Gambar 4.7 memperlihatkan model interaksi dan kurva perbedaan energi potensial yang dihitung berdasarkan reaksi pada pers. 4.21. R didefinisikan sebagai jarak antara sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> dengan atom terminal O dari grup —CONH<sub>2</sub> pada rantai sisi Asn. Perhitungan perbedaan energi potensial dimulai pada jarak acuan R = 4 Å dimana bidang FMNH<sub>2</sub> tegak lurus dengan bidang Asn. Pada saat Asn mendekati FMNH<sub>2</sub> maka kurva perbedaan energi potensial bertambah secara cepat dan maksimum pada jarak 2,4 Å. Pertambahan energi potensial maksimum terjadi ketika Asn mendekati FMNH<sub>2</sub> pada jarak 2,4 Å. Energi barrier akibat reaksi ini adalah 0,17 eV {Gambar 4.6(b)}.

Model interaksi dan kurva perbedaan energi potensial pengikatan dudukan aktif asam amino LysH dan His pada FMNHOO<sup>-</sup> sesuai pers. 4.23 diperlihatkan pada Gambar 4.7 dan Gambar 4.8.





(b)

Gambar 4.8(a) Model interaksi His dan FMNHOO<sup>-</sup> dan (b) kurva perbedaan energi potensial pengikatan dudukan aktif asam amino His pada FMNHOO<sup>-</sup>.
 Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul His menuju atom O<sub>B</sub> pada FMNHOO<sup>-</sup>.



Gambar 4.9(a) Model interaksi Lys dan FMNHOO<sup>-</sup> dan (b) kurva perbedaan energi potensial pengikatan dudukan aktif asam amino Lys pada FMNHOO<sup>-</sup>. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Lys-H<sup>+</sup> menuju atom O<sub>B</sub> pada FMNHOO<sup>-</sup>.

Gambar 4.8 dan Gambar 4.9 memperlihatkan kurva perbedaan energi potensial hasil perhitungan untuk reaksi sesuai pers. 4.23. Simbol R didefinisikan sebagai jarak antara atom  $O_B$  dari atom  $O_2$  yang telah direaksikan sebelumnya dengan FMNH<sup>-</sup> sesuai pers. (4.22) dengan atom terminal N dari grup  $-NH_2$  pada rantai sisi His dan LysH. Perhitungan perbedaan energi potensial dimulai pada jarak acuan R = 4 Å dimana bidang FMNHOO<sup>-</sup> tegak lurus dengan bidang His atau LysH. Pada saat His mendekati atom  $O_B$  dari atom  $O_2$  maka kurva perbedaan energi potensial bertambah secara cepat pada jarak R=3 Å dan makin tinggi ketika His makin mendekati atom  $O_B$  (Gambar 4.8). Berbeda dengan hasil ditunjukkan oleh residu His, maka residu LysH menunjukkan penurunan drastis energi potensial ketika ia mendekati atom  $O_B$  pada jarak R = 3 Å (Gambar 4.9). Tidak ada energi barrier untuk reaksi dengan residu Lys sehingga reaksi bersifat spontan. Hasil perhitungan dengan metoda MNDO-PM3 ditunjukkan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Energi potensial hasil perhitungan dengan metode MNDO-PM3

Model reaksi	Asam amino	Jarak transfer	Potensial barrier	
	(B, AH)	proton R <sub>H</sub> (Å)	$E_a(eV)$	
Pers. 4.21	Asn	2,4	0,17	
	Asp	2,4	5,7	
Pers. 4.23	$Lys-H^+$	3	Down (Spontan)	
	His	-	Up	

Berdasarkan kriteria pemilihan dudukan aktif dari Sugitomo dkk. (1999) yang telah dijelaskan sebelumnya dapat disimpulkan bahwa residu asam amino yang berfungsi sebagai dudukan aktif adalah Asn yang terlibat dalam proses deprotonisasi dan Lys yang terlibat dalam proses protonisasi.

### 4.5 Mekanisme Pembentukan Keadaan Eksitasi pada Reaksi LUCIFERASE

Untuk mendapatkan pembentukan keadaan eksitasi (kemieksitasi), pers. 4.21 s.d 4.25 diganti dengan memasukkan dudukan aktif Asn yang bersifat asam A dan dudukan aktif Lys yang bersifat basa B. Setiap persamaan dihitung perubahan energi potensial terhadap jarak antar molekul akibat proses reaksi. Dengan asumsi bahwa reaksi

bioluciferase pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* adalah reaksi redoks yang melibatkan perpindahan elektron atau proton, maka dapat juga ditinjau perubahan muatan pada sisi pengikatan substrat. Contoh perhitungan perbedaan energi potensial  $\Delta E$  dan muatan total Q pers. 4.21 pada jarak antar molekul R = 3,9 Å dapat dilihat pada Lampiran H.

Kurva perbedaan energi potensial  $\Delta E$  dan muatan total Q reaksi pembentukan keadaan eksitasi sesuai pers. 4.21 s.d 4.25 diperlihatkan pada Gambar 4.12 s.d 4.14.





(c) Gambar 4.10(a) Model interaksi Asn dan FMNH<sub>2</sub>, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan proton sesuai pers. 4.21 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Asn menuju sisi N1 dari FMNH<sub>2</sub>.





(c)
 Gambar 4.11 (a) Model interaksi O<sub>2</sub> dan FMNH<sup>-</sup> (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan molekul O<sub>2</sub> sesuai pers.
 4.22 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan atom O<sub>A</sub> menuju sisi C<sub>4a</sub> dari FMNH<sup>-</sup>.







(c) Gambar 4.12 (a) Model interaksi Lys dan FMNHOO, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi pengikatan Lys sesuai pers. 4.23 terhadap jarak molekul R Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Lys-H<sup>+</sup> menuju atom O<sub>B</sub> pada FMNHOO<sup>-</sup>.



(a)





(c) Gambar 4.13(a) Model interaksi aldehid dan FMNHOOH, (b) kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total untuk reaksi penambahan aldehid sesuai pers. 4.24 terhadap jarak molekul R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul Aldehid menuju atom  $O_B$  pada FMNHOOH.





(c)

Gambar 4.14(a) Model interaksi RCOOH dan FMNHOO-CHOH-R, (b) Kurva perbedaan energi potensial dan (c) muatan total akibat pelepasan RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R sesuai pers. 4.25 sebagai fungsi jarak R. Tanda panah pada gambar menunjukkan arah pergerakan molekul RCOOH menjauhi sisi O<sub>A</sub> pada FMNHOO-CHOH-R.

Gambar 4.10 memperlihatkan bahwa sebuah proton ditransfer dari sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> ke atom terminal O dari –CNH2O<sup>-</sup> dari rantai sisi Asn pada jarak R=2,4 Å {Gambar 4.10(b)}. Transfer proton ini ditandai pengurangan muatan total secara drastis pada atom N<sub>1</sub> pada jarak R = 2,4 Å dan pada saat yang sama terjadi perpindahan proton dari sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> ke Asn {Gambar 4.10(c)}. Perpindahan proton ke Asn hanya pada sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> karena muatan total pada sisi lain dari FMNH<sub>2</sub> seperti pada sisi C<sub>4a</sub> adalah konstan. Energi barrier dari reaksi ini adalah 0,17 eV sedangkan molekul baru yang dihasilkan adalah FMNH<sup>-</sup>

Gambar 4.11 memperlihatkan bahwa perbedaan energi potensial dan muatan total pada sisi N<sub>5</sub> dan C<sub>4a</sub> FMNH<sup>-</sup>sebagai fungsi dari R dimana R adalah jarak sisi C<sub>4a</sub> dari FMNH<sup>-</sup> dengan atom O<sub>A</sub> dari O<sub>2</sub>. Perbedaan energi potensial dihitung mulai pada jarak R = 4 Å dimana arah awal ikatan O-O diasumsikan paralel dengan bidang FMNH<sup>-</sup>. Besarnya energi barrier akibat reaksi ini adalah 0,8 eV pada R = 2 Å {Gambar 4.11(b)}. Proton berpindah dari atom O<sub>A</sub> pada O<sub>2</sub> menuju sisi C<sub>4a</sub>. Perpindahan proton ditandai oleh pertambahan muatan total di C<sub>4a</sub> dan pengurangan muatan di O<sub>A</sub> pada jarak R = 2Å. Penambahan O<sub>2</sub> menyebabkan sisi N<sub>5</sub> pada FMNH<sup>-</sup> ikut menyumbang muatan kepada sisi C<sub>4a</sub>{Gambar 4.11(c)}. Akibat penambahan O<sub>2</sub> ini pada FMNH<sup>-</sup> maka dihasilkan molekul baru FMNHOO<sup>-</sup>.



Gambar 4.12 memperlihatkan penurunan energi potensial secara drastis terjadi pada jarak R = 3 Å ketika residu LysH mendekati atom O<sub>B</sub>. Tidak ada energi barrier untuk reaksi Lys sehingga reaksi bersifat spontan {Gambar 4.12(b)}. Akibat reaksi ini adalah sebuah proton secara spontan bergerak dari LysH ke atom O<sub>B</sub> yang terikat pada FMNOO<sup>-</sup> pada R = 3 Å. Pada sisi lain muatan total di O<sub>B</sub> bertambah {Gambar 4.12(c)}. Akibat reaksi ini terbentuk molekul baru FMNHOOH.

Gambar 4.13 memperlihatkan pengikatan atom terminal C dari RCOH dengan atom  $O_B$  dari molekul FMNHOOH dengan jarak R. Pada saat RCOH mendekati  $O_B$  pada jarak R=3,6 Å maka kurva energi potensial bertambah secara cepat dan maksimum pada energi potensial 0,9 eV {Gambar 4.13(b)}. Penambahan RCOH pada molekul FMNHOOH menyebabkan sebuah proton ditransfer dari atom  $O_B$  ke atom  $O_A$  yang ditandai penurunan muatan total di  $O_B$  {Gambar 4.13(c)}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOO-CHOH-R.

Gambar 4.14 memperlihatkan bahwa pelepasan molekul RCOOH dari FMNHOO-CHOH-R menyebabkan penurunan energi potensial secara drastis pada jarak R = 1,7Å {Gambar 4.14(b)}. Tidak ada energi barrier yang terjadi akibat reaksi pelepasan ini sehingga reaksi bersifat spontan. Akibat pelepasan molekul RCOOH pada molekul FMNHOO-CHOH-R menyebabkan atom O<sub>B</sub> mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak 1,7 Å dan atom O<sub>A</sub> mendapatkan tambahan sebuah proton pada jarak R = 2,6 Å {Gambar 4.14(c)}. Molekul baru yang dihasilkan adalah FMNHOH yang diduga sebagai molekul dalam keadaan eksitasi.

Perubahan panjang ikatan dan muatan total dari enam bentuk flavin akibat reaksi sesuai pers. 4.21 s.d 4.25 diperlihatkan pada Gambar 4.15. Berdasarkan Gambar 4.15(a) dapat disimpulkan bahwa panjang ikatan dari sisi  $C_4$ - $C_{4a}$  dan  $C_{4a}$ - $C_{10a}$  dari flavin bertambah akibat interaksi dudukan aktif LUCIFERASE dengan substrat-substratnya. Pertambahan panjang ikatan pada kedua sisi ini berhubungan dengan peran sisi  $C_{4a}$  sebagai penerima proton (protonisasi) dari dudukan aktif Lys melalui molekul  $O_2$ . Sebaliknya terjadi pemendekan panjang ikatan sisi  $N_{10}$ - $C_{10a}$  dan  $N_1$ - $C_{10a}$  yang berhubungan dengan peran sisi  $N_1$  sebagai penterima proton pada dudukan aktif Asn. Sedangkan Gambar 4.13.(c) memperlihatkan bahwa muatan total pada sisi  $N_1$ 

dari flavin cenderung berkurang dan muatan total pada sisi C4a cenderung bertambah selama tahapan reaksi. Muatan total pada sisi yang lain dari flavin seperti  $N_{10}$ ,  $N_5$ ,  $O(C_2)$  dan  $O(C_4)$  cenderung konstan selama reaksi.









Gambar 4.15 (a) Model struktur  $FMNH_2$ , (b) perubahan panjang ikatan dan (c) muatan total dari enam jenis flavin akibat reaksi sesuai pers. 4.21 s.d 4.25.

### 4.6 Profil Perbedaan Energi Potensial pada Reaksi LUCIFERASE

Untuk mendapatkan model mekanisme pemancaran cahaya pada LUCIFERASE, digunakan model kurva reaksi yang dikembangkan dari Gambar II.5 seperti diperlihatkan pada Gambar 4.14



Proses reaksi

Gambar 4.16 Kurva perbedaan energi potensial pada reaksi LUCIFERASE.

Suatu reaksi pada Gambar 4.16 dapat berlangsung bila molekul-molekul substrat mengalami keadaan aktif dengan energi aktivasi  $E_a$ . Contoh perhitungan energi aktivasi  $E_a$  setiap keadaan intermediat telah dibahas pada Bab 4.4. Dalam keadaan demikian ikatan dalam molekul dapat terputus atau bersatu sehingga memungkinkan terbentuknya produk. Keadaan molekul dimana substrat berada dalam keadaan aktif disebut keadaan transisi. Sedangkan energi aktivasi diartikan sebagai jumlah energi (dalam kalori) yang dibutuhkan oleh satu mol zat pada temperatur tertentu untuk membawa semua molekul (dari satu mol zat) ke keadaan aktifnya. Keadaan transisi memiliki energi bebas Gibbs, enthalpi dan energi potensial lebih tinggi dari keadaan yang berdekatan yang terletak pada lintasan tersebut. Berdasarkan Gambar 4.16 dapat dibuat profil energi potensial reaksi LUCIFERASE dengan terlebih dahulu menghitung enthalpi pembentukan ( $\Delta H_f$ ), substrat dan molekul baru yang terbentukan kakibat reaksi sesuai pers. (4.21) s.d (4.25). Secara kuantum, enthalpi pembentukan

standar  $\Delta H_f$  suatu senyawa diperoleh berdasarkan jumlah semua interaksi yang terjadi dalam molekul yaitu energi elektronik total (E<sub>elek</sub>), energi repulsif inti-inti (E<sub>nuc</sub>), energi yang diperlukan untuk mengionisasi elektron valensi dari atom-atom {E<sub>isl</sub>(A)} dan panas atomisasi {E<sub>atom</sub>(A)}. Enthalpi pembentukan standar  $\Delta H_f$  dapat ditulis

$$\Delta H f = E_{elec} + E_{nuc} + \sum_{A}^{E} E_{isol} (A) + \sum_{A}^{E} a_{lom} (A)$$
(4.26)

dimana A adalah atom ke-a. Perubahan enthalpi dari setiap keadaan intermediat (KI) dan energi barrier dari setiap keadaan transisi (KT) dirangkum pada Gambar 4.17. Berdasarkan perubahan enthalpi pembentukan dan energi barrier aktivasi pada Gambar 4.17 dapat dihitung energi yang tersimpan dalam setiap keadaan intermediat yang dinyatakan dalam bentuk perubahan enthalpi reaksi ∆H sebagai berikut

$$\Delta H = \Delta H_{f(\text{produk})} - \Delta H_{f(\text{reaktan})}$$
(4.27)

Selanjutnya jumlah energi pada setiap KI yang digunakan untuk melakukan kerja bioluciferase dapat dihitung berdasarkan perubahan energi bebas Gibbs  $\Delta G$  sesuai pers. 4.3 dimana  $\Delta H$  pada persamaan tersebut dihitung dari pers. 4.27.

Diagram energi hasil perhitungan  $\Delta H$  dan  $\Delta G$  setiap KI dapat dilihat pada Gambar 4.18.



Gambar 4.17 Mekanisme model reaksi LUCIFERASE, (a) FMNH<sub>2</sub> ( $\Delta H_f = -82,28$  kkal/mol), (b) KT-1 ( $E_a = 3,9$  kkal/mol), (c) KI-1 ( $\Delta H_f = -84,86$  kkal/mol), (d) KT-2 ( $E_a = 18,5$  kkal/mol), (e) KI-2 ( $\Delta H_f = -87,120$  kkal/mol), (f) KT-3 ( $E_a = 20$  kkal/mol), (g) KI-3 ( $\Delta H_f = -97,50$  kkal/mol), (h) KE atau IV\* ( $E_a = 0$  kkal/mol,  $\Delta H_f = -97,5$  kkal/mol) dan (i) FMN ( $\Delta H_f = -17,28$  kkal/mol).



Gambar 4.18. Diagram energi reaksi bioluciferase LUCIFERASE.

Pembentukan keadaan eksitasi dapat dijelaskan berdasarkan Gambar 4.18 dimana pada keadaan awal energi yang tersimpan dalam sistem adalah -65 kkal/mol dan berasal dari substrat FMNH<sub>2</sub>. Pengikatan FMNH<sub>2</sub> dengan dudukan aktif LUCIFERASE menyebabkan molekul mengalami keadaan aktifnya dengan energi aktivasi  $E_a = 3,9$  kkal/mol dan kemudian terbentuk sebuah intermediat baru yang disebut KI-1 dengan energi -67,6 kkal/mol. Oksidasi keadaan ini menyebabkan KI-1 mengalami keadaan aktifnya dengan energi aktivasi  $E_a = 18,5$  kkal/mol dan kemudian terbentuk sebuah intermediat baru yang disebut KI-2 dengan energi -69,8 kkal/mol. Penambahan substrat RCOH menyebabkan KI-2 mengalami lagi keadaan aktifnya dengan energi aktivasi  $E_a = 20$  kkal/mol dan intermediat baru yang terbentuk disebut KI-3 dengan energi -80,2 kkal/mol. KI-3 ini secara spontan meluruh melepaskan RCOOH sehingga terbentuk keadaan eksitasi dengan energi -80,2 kkal/mol.

#### 4.7 Analisa dan Diskusi

Mekanisme pembentukan keadaan eksitasi pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* sampai terjadi proses fotonik dapat dijelaskan sebagai berikut: reaksi dimulai dengan mereduksi FMN menjadi substrat FMNH<sub>2</sub> dengan perubahan enthalpi adalah  $\Delta H = -$ 65 kkal/mol. Tahap selanjutnya adalah deprotonisasi sisi N<sub>1</sub> dari FMNH<sub>2</sub> oleh Asn membentuk KT-1 dengan energi aktivasi E<sub>a</sub> = 3,9 kkal/mol. Pengikatan FMNH<sub>2</sub> ke Asn membentuk keadaan molekul sementara FMNH yang disebut KI-1 dengan perubahan enthalpi adalah  $\Delta H = -67$ , 6 kkal/mol. Selanjutnya pengikatan O<sub>2</sub> ke sisi C<sub>4a</sub> dari FMNH<sub>2</sub> menyebabkan molekul kembali ke keadaan transisi dan keadaan ini disebut KT-2. Energi aktivasi dari KT-2 adalah  $E_a = 18,5$  kkal/mol. Pengikatan KI-1 ke O<sub>2</sub> menyebabkan perpindahan proton dari dudukan aktif LysH menuju sisi C4a dari H-FMNOO<sup>-</sup> membentuk FMNHOOH dan keadaan ini disebut KI-2. Perubahan enthalpi KI-2 adalah  $\Delta H = -69,8$  kkal/mol. Tahap selanjutnya adalah pengikatan KI-2 ke substrat aldehid (RCOH) menghasilkan KT-3 dengan energi aktivasi  $E_a = 20$ kkal/mol. Interaksi KT-3 dengan RCOH menghasilkan molekul baru FMNHOO-CHOH-R yang disebut KI-3. Perubahan enthalpi KI-3 adalah  $\Delta H = -80,2$ kkal/mol. Peluruhan KI-3 dari RCOOH membentuk FMNHOH sebagai KE dengan perubahan enthalpi adalah  $\Delta H = -80,2$  kkal/mol. Karakteristik energi aktivasi untuk setiap tahapan reaksi terangkum pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Karakteristik Energi Aktivasi untuk Setiap Tahapan Reaksi pada Pers. 4.21 s.d 4.25

Model Reaksi	Energi Aktivasi	Jarak Transfer	Arah Transfer Proton
	E <sub>a</sub> (eV)	Proton, R <sub>H</sub> , (Å)	
Pers. 4.21	0,17	2,4	Dari sisi N <sub>1</sub> ke Asn
Pers. 4.22	0,8	2,0	Dari O <sub>A</sub> ke C <sub>4a</sub>
Pers. 4.23	spontan	3,0	Dari Lys ke O <sub>B</sub>
Pers. 4.24	0,9	2,0	Dari O <sub>B</sub> ke O <sub>A</sub>
Pers. 4.25	spontan	1,7	Dari RCOOH ke O <sub>A</sub>

Untuk menvalidasi model fotonik dari reaksi bioluciferase pada bakteri *Photobacterium phosphoreum* berdasarkan pembentukan keadaan eksitasi, hasilnya dicocokan dengan hasil karakteristik keadaan fisis pemancaran cahaya yang dihitung dengan memakai pers. 4.2 dengan data input karakteristik fisis cahaya yang telah didapatkan pada Bab I4. Pencocokan energi bebas Gibss antara pembentukan keadaan eksitasi dengan keadaan fisis pemancaran cahaya terangkum dalam Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Perhitungan Energi Bebas Gibss untuk Pembentukan KeadaanEksitasi Dan Keadaan Fisis Pemancaran Cahaya

No	Ea (kkal/ mol)	ΔH (kkal/ mol)	$\begin{array}{c} \Delta H_{total} \\ (\Delta H + Ea-RT) \\ (kkal/mol) \end{array}$	$\Delta S_{total}$ (eu)	$\Delta G_{hitung}$ (kkal/ mol)	ΔG <sub>amat</sub> (kkal/ mol)	KR
<b>KT-1</b>	3,90	-65,0	-68,3	-57,0	-85,28	-	-
KT-2	18,5	-67,6	-86,1	-8,3	-83,02	-77,862	6%
<b>KT-3</b>	20,0	-69,8	-89,8	-3,3	-88,22	-81,422	8%

KE	0,00	-80,2	-80,2	-70,4	-59,22	-55,228	7%
And in case of the local division of the local division of the	CONTRACTOR OF A DESCRIPTION OF A DESCRIP	COLOR OF A DESCRIPTION OF A DESCRIPTION OF A DESCRIPTIONO	CONTRACTOR OF THE OWNER	ALL COMPANY OF THE OWNER OF T	CONTRACTOR OF A DESCRIPTION OF A DESCRIPTION OF	And the second se	

Keterangan : KT = keadaan transisi, KE = keadaan eksitasi, KR=kesalahan relatif

Dari Tabel 4.4 dapat disimpulkan bahwa nilai perubahan energi bebas Gibbs pembentukan keadaan eksitasi yang diperoleh secara komputasi mendekati nilai perubahan energi bebas Gibss yang diperoleh secara eksperimen berdasarkan analisis karakteristik fisis pemancaran cahaya.

Pada sisi lain, prediksi dudukan aktif dari reaksi LUCIFERASE menggunakan metode MNDO-PM3 menyimpulkan bahwa residu asam amino Asn dan Lys berfungsi sebagai dudukan aktif. Preparasi senyawa aktif pada Bab III menunjukkan bahwa LUCIFERASE terdiri dari dua subunit yaitu  $\alpha$  dan  $\beta$  sedangkan sisi pengikatan LUCIFERASE hanya pada salah satu subunit  $\alpha$  atau  $\beta$ . Untuk mengetahui pada subunit mana dudukan aktif tersebut berada maka telah dilakukan pula prediksi dudukan aktif dengan metode Mekanika Molekul (MM). Model awal yang digunakan adalah struktur luciferase dari bakteri lain yang terdapat pada Bank Data Protein. Hasil prediksi dudukan aktif dengan metoda MM menggunakan luciferase dari bakteri lain yang karakteristik fisisnya mendekati LUCIFERASE menunjukkan bahwa dudukan aktif Asn dan Lys terletak pada subunit  $\alpha$ . Detail dan hasil perhitungan prediksi dudukan aktif dengan metode MM dapat dilihat pada Lampiran I.

Untuk melengkapi hasil ini juga telah digunakan metoda dinamika molekul (DM) dengan mengasumsikan bahwa perubahan konformasi akibat pengikatan subtratsubstrat FMNH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, dan RCOH pada dudukan aktif LUCIFERASE yaitu Asn dan Lys akan mengubah panjang ikatan atom-atom sehingga akan mengubah energi potensialnya. Metode dinamika molekul adalah sebuah metode yang bertujuan untuk mengeksplorasi keadaan molekul dan konformasi pengikatan subtrat-substrat pada senyawa-senyawa aktif seperti protein atau enzim berdasarkan penambahan atau pengurangan energi kinetik terhadap pertambahan atau pengurangan temperatur (Rathore, 2002).

Hasil perhitungan dengan metoda DM mendapatkan perubahan energi potensial terhadap waktu untuk setiap keadaaan pada reaksi LUCIFERASE sebagai berikut: Energi potensial terhadap waktu pembentukan substrat FMNH<sub>2</sub> adalah 30 kkal/mol,

KT-1 adalah 58 kkal/mol, KI-1 adalah 44 kkal/mol, KT-2 adalah 56 kkal/mol, KI-2 adalah 41 kkal/mol, KT-3 adalah 55 kkal/mol, KI-3 adalah 43 kkal/mol, KT-4 adalah 46 kkal/mol, dan pembentukan produk FMN adalah 40 kkal/mol. Energi potensial setiap keadaan reaksi LUCIFERASE hasil simulasi DM memperlihatkan hasil pola yang konsisten dengan metode MNDO-PM3.

Beberapa aspek dinamika molekul yang dapat dijelaskan adalah setiap interaksi substrat-substrat FMNH<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, dan RCOH dengan dudukan aktif LUCIFERASE yaitu Asn dan Lys diikuti dengan perubahan konformasi (geometri) sehingga mengubah panjang ikatan susunan atom-atom yang selanjutnya menyebabkan perubahan energi potensial terhadap waktu. Perubahan konformasi ini dapat diinterpretasi bahwa selama reaksi, atom-atom berinteraksi satu sama lain sehingga gaya aksi akan mengubah posisi atom-atom terhadap yang lainnya sehingga akan mengubah struktur geometrinya. Bukti perubahan konformasi dari luciferase selama reaksi bioluciferase juga dilaporkan oleh Li dan Meighen (1994).

### **DAFTAR PUSTAKA**

- Balny, C dan Hasting, J.W. (1975) : Fluorescence and Bioluminescence of Bacterial Luciferase Intermediates, *Biochemistry*, 14, 4719 4723.
- Biron, K. (2003) : Fireflies, Dead Fish and a Glowing Bunny: a Primer on Bioluminescence, J.Bio. Teach., 1, 19 25.
- Choi, H., Tang, C.K., dan Tu, S.C.. (1995) : Catalytically Active Forms of the Individual Subunits of Vibrio harveyi Luciferase and Their kinetic and Binding Properties, J. Biol. Chem., 270, 16813 – 16819.
- Fisher, A.J., Raushel, F.M., Baldwin, T.O., dan Rayment, I. (1995) : Three-Dimensional Structure of Bacterial Luciferase from Vibrio harveyi at 2.4 A Resolution, Abstract, *Biochemistry*, 34, 6581 – 6586.
- Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.D., Baldwin, T.O., dan Rayment, I. (1996) : The 1,5 A Resolution Crystal Structure of Bacterial Luciferase in Low Salt Conditions, J. Biol. Chem., 271, 21956 – 219678.
- Floyd, E R. (1997) : Bermuda Triangle Continues to Mystify. The Augusta Chronicle Online http://www.augustachronicle.com/stories/030297.

- Flynn, G.C., Beckers, C.J.M., Baase, W.A., dan Dahlquist, F.W. (1993) : Individual Subunits of Bacterial Luciferase are Molten Globules and Interact with Molecular Chaperones, Proc. Natl. Acad, Sci, USA, 90, 10826 - 10830.
- Francisco, W.A., Abu-Soud, H.M., Topgi, R., Baldwin, T.O., dan Raushel., F.M. (1996) : Interaction of Bacterial Luciferase with 8-Substituted Flavin Mononucleotide Derivatives, *J.Biol.Chem.*, 271, 104–110.
- Garcia, A.M., Baeyens, W.R.G., Zhang, X., Ale, F, dan Gamiz, I. (2001) : Unfamiliar Though Exciting Analytical Detection in Flowing Streams: Chemiluminescence, Ars Pharmaceutica, 42, 81 - 107.
- Haddix, P.L dan Werner, T.F. (2003) : A Simplified Bacterial Growth Curve Using Bioluminescence, *Bioscene*, 29, 9-12.
- Hasting, J.W, Balny, C, Peuch, C.L, dan Douzou, P. (1973): Spectral Properties of an Oxygenated Luciferase-Flavin Intermediate Isolated by Low-Temperature Chromatography, *Proc.Nat.Acad. Sci.USA*, **70**, 3468 3472.
- Hasting, J.W. (1998): Bioluminescence, In: Cell Physiology, 2nd Edition, Academic Press, New York, 984-1000.
- Hasting, J.W. (1971) : Ventral Luminescence to Camouflage the Silhouete, *Science*, **173**, 1016-1017.
- Hasting, J.W., Baldwin, T.O., dan Nicoli, M.Z. (1978) : Bacterial Luciferace: Assay, Purification and Properties, *Methods in Enzimology*, LVII, 135-151.
- Hasting, J.W., Balny, dan Claude. (1975) : The Oxygenated Bacterial Luciferase-Flavin Intermediate "Reaction Products Via The Light And Dark Pathways", J.Biol.Chem., 250, 7288 - 7293.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., dan Williams, S.T. (1994) : Bergey's Manual of Determinative bacteriology, 9<sup>th</sup> Edition, Williams & Wilkins, USA.
- Kasai, S., Matsui, K., and Nakamura, T. (1987): Purification and Some Properties of FP<sub>390</sub> from Photobacterium. phosphoreum, Flavin and Flavoprotein (Edmonton, D.E and Mccormic), Walter de Gruyter, Berlin and New York, 647-650.
- Kratasyuk., 4.A, Asimbekova., E.N, and Vetrova., E.V, (2004) : Enzyme-Based Biosensor Based on Bacterial Bioluminescence for Environmental Monitoring, 13 th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence Symposium Abstract.
- Kricka, L.K., dan gary, H.G.T. (1983) : Chemiluminescent and Bioluminescent Methods in Analytical Chemistry. Analyst., 108, 1274-1293.
- Kruse, M, dan Boyle, R. (2000) : <u>http://library.thinkquest.org/COO5358/</u> index2.htm? tqskip1=1&tqtime=0429.

- Kurfurst, M., Ghisla, S., dan Hasting, J.W. (1984) : Characterization and Postulated Structure of The Primary Emitter in The Bacterial Luciferase Reaction, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 81, 2990 - 2994.
- Lee, J.D.J., O'Kane., dan Gibson., B.G. (1988) : Dynamic Fluorescence Properties of Bacterial Luciferase Intermediates, *Biochemistry*, 25, 8062 8067.
- Lehninger, A.L. (1982) : *Principles of Biochemistry* Second Edition, Amsterdam: Elsievier Publishing Co.
- Li, Z., dan Meighen, E.A. (1994): The Turnover of Bacterial Luciferase is Limited by a Slow De Composition of The Ternary Enzyme-product Complex of Luciferase, FMN, and Fatty Acid, J. Biol. Chem., 269, 6640 - 6644.
- Lin, L.Y.C., Sulea, T., Szittner, R., Vassilyev, 4., Purisima, E.O., dan Meighen, E.A. (2001) : Modeling of the Bacterial LUCIFERASE-Flavin mononucleotide Complex Combining Flexible Docking with Structure-Activity Data, *Protein Science*, 10, 1563 -1571.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., dan Randall, R.J. (1951) : Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
- Macheroux, P., Ghisla, S., dan hasting, J.W. (1993) : Spectral Detection of an Intermediate Preceding The Excited State in The Bacterial Luciferase Reaction, *Biochemistry*, 32, 14183 - 14186.
- Madden, D., dan Lidesten, B.M. (2001) : Bacterial illumination; Culturing Luminous Bacteria, *Bioscience Explained*, 1, 18-25.
- Matheson, I.B.C., Lee, J., dan Muller, F. (1981) : Bacterial Bioluminescence: Spectral Study of The Emitters in The In Vitro Reaction, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78, 948-952.
- Mc Pherson. (1984): Preparation and Analysis of Protein Crystal, New York: John Willey and Sons.
- Meighen, E.A., dan Bartlet, I. (1980) : Complementation of Subunits from Different Bacterial Luciferases ; Evidence for The Role of The  $\beta$  Subunit in The Bioluminescent Mechanism, *J.Biol.Chem*, **255**, 11181 -11187.
- Meyer-Rochow, 4.B. (2001) : Light of My Life-Messages in The Dark. Biologist (London) 48, 163 165.
- Moore, S.A., dan James, M.N. (1995) : Structural Refinement of The Non-Fluorescent Flavoprotein from *Photobacterium leiognathi* at 1,60 A Resolution, J. Mol. Biol, 249, 195 - 214.
- Nicoli, M.Z, Meighen, E.A, Hasting, J.W. (1974): Bacterial Luciferase, Chemistry of The Reactive Sulfhydryl, J. Biol. Chem, 249, 2385-2392.
- Orchin, M dan Jaffe, H.H. (1980) : The Vocabulary of Chemistry, John Wiley & Son, New York.

Pharmacia Fine Chemical Sweden. (1980): Ion Exchange Chromatography.

- Pringgenies, D. (2003) : Kehadiran Bakteri pada Organ Cahaya Cumi-Cumi Loligo duvauceli, Disertasi Program Doktor, Institut Teknologi Bandung.
- Rathore, R.S. (2002) : Molecular Dynamics Study of a Tripeptide Z-Ala-Ala-LeupNA, J. Indian Inst. Sci, 82, 227 - 233.
- Sandalova, T., dan Lindqvist, Y. (1995) : Three-Dimensional Model of The Alpha-Subunit of Bacterial Luciferase, *Proteins*, 23, 241 – 55.
- Scope, R.K. (1994) : Protein Purification: Principles and Practice, New York : Springer Verlag Inc.
- Stryer, L. (1995) : *Biochemistry*, Third edition, New York, W.H. Freeman and company.
- Sugimoto, T., Wada, N., Watanabe, H., dan Tu, S.C. (1999) : Effect of Deprotonation of Reduced Flavin on Its Reactivity in The Bacterial LUCIFERASE Reaction as Studied by The MNDO-PM3 Method. In *Bioluminescence and Chemiluminescence* (Edited by A. Roda, M. Pazzagli, L. J. Kricka and P. E. Stanley), 429-432.
- Swanson, R., Weaver, L.H., Remingtong, S.J., Matthewsg, B.W., dan Baldwin, T.O. (1985) : Crystals of Luciferase from *Vibrio harveyi*; A preliminary characterization, *J.Biol.Chem*, 260, 1287 - 1289.
- Tanner, J.J, Lei, B., Tu, S.C., dan Krause, K.L (1996) : Flavin Reductase P: Structure of Dimeric Enzyme That Reduces Flavin, *Biochemistry*, 35, 13531 – 13539.
- Tanner, J.J, Miller, M.D, Wilson, K.S, Tu, S.C, dan Krause, K.L (1997) : Structure of Bacterial Lüciferase Beta 2 Homodimer: Implications for Flavin Binding, *Biochemistry*, 36, 665 – 72.
- Thoden, J.B., Holden, H.M., Fisher, A.J., Sinclair, J.F., Wesenberg, G., Baldwin, T.O., dan Rayment, I. (1997) : Structure of The Beta<sub>2</sub> Homodimer of Bacterial Luciferase from Vibrio harveyi: X-ray Analysis of a Kinetic Protein Folding Trap, Protein Science, 6, 13 - 23.
- Tu, S.C. (1979) : Isolation and Properties of Bacterial Luciferase-Oxygenated Flavin Intermediate Complexed with Long-Chain Alcohols, *Biochemistry*, 79, 5940-5945.
- Vervoort, J., Muller, F, Lee, J., Van den Berg, W.A.M., dan Moonen, C.T.W. (1986 (a)) : Identifications of the True Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of The Stable Intermediate II in Bacterial Luciferase, *Biochemistry*, 25, 8062 -8067.
- Vervoort, J., Muller, F., O'Kane, D.J., Lee, J., dan Bacher, A. (1986(b)) : Bacterial Luciferase: A Carbon-13, Nitrogen-15, and Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Investigation, *Biochemistry*, 25, 8067 -8075.

- Wada, N., Sugimoto, T., Watanabe, H., Tu, S.C., dan Mager, H.I.X. (1997) : A Theoretical Approach to Elucidate a Mechanism of O2 Addition to Intermediate I in Bacterial Bioluminescence. In *Bioluminescence and Chemiluminescence*, 58-61.
- Wada, N., Sugimoto., T., Watanabe, H., dan Tu, S.C. (1999): Computational Analysis of the Oxygen Addition at the C4a Site of Reduced Flavin in the Bacterial Luciferase Bioluminescence Reaction, *Photochemistry and Photobiology*, 70, 116-122.
- Waddle, J., dan Baldwin, T.O. (1991) Individual alpha and beta subunits of bacterial luciferase exhibit bioluminescence activity. *Biochem Biophys. Res. Commun*, 178, 1188-1193.
- Weber, K., dan Osborn, M, (1969): The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244, 4406-4415.
- Wiseman, A. (1985) : Handbook of Enzyme Biotechnology. Second edition, New York, John Willey & Sons.
- Yamada, K. (1982): Experiment of Organic Chemistry, Maruzen, Tokyo.