

**PEMODELAN DAN ANALISIS RESIDU KATALITIK ENZIM  
EKSOXILANASE DARI *Geobacillus thermoleovorans* IT-08**

**SKRIPSI**



**AMELIA RIZKY RETMAWATI**

**PROGRAM STUDI S-1 KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
2012**

**PEMODELAN DAN ANALISIS RESIDU KATALITIK ENZIM  
EKSOXILANASE DARI *Geobacillus thermoleovorans* IT-08**

**SKRIPSI**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains Bidang Kimia  
Pada Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga

Disetujui oleh:

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih  
NIP. 19630615 198701 2 001

Drs. Hery Suwito, M.Si  
NIP. 19630308 198701 1 001

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Pemodelan dan Analisis Residu Katalitik Enzim eksoxilanase  
dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08  
NIM : 080810108  
Tanggal Ujian :

Disetujui oleh :

Pembimbing I,

Pembimbing II,

Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si  
NIP. 19630615 198701 2 001

Drs. Hery Suwito, M.Si  
NIP. 19630308 198701 1 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kimia S-1  
Departemen Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Airlangga

Dr. Alfinda Novi Kristanti, DEA  
NIP. 19671115 199102 2 001

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis kepada Allah SWT karena telah melimpahkan Rahmat-Nya kepada penyusun sehingga dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “*Pemodelan dan Analisis Residu katalitik Enzim Eksoxilanase dari Geobacillus thermoleovorans IT-08*” dengan tepat waktu. Penulisan naskah skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penyusun ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si selaku dosen pembimbing I dan Drs. Hery Suwito, M.Si selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan waktu, nasihat, semangat, tenaga, dan pikiran kepada penyusun sehingga naskah skripsi dapat terselesaikan dengan baik.
2. Drs. Handoko Darmokoesoemo selaku dosen wali yang memberikan nasihat dan semangat selama penyusun belajar di Departemen Kimia.
3. Dr. Alfinda Novi Kristanti, DEA selaku Ketua Departemen Kimia yang telah memberikan fasilitas serta arahan selama penyusun belajar di Departemen Kimia.
4. Seluruh Staf Pengajar Program Studi S1 Kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penyusun.
5. Laboran dan staf administrasi Departemen Kima yang selalu membantu selama penyusunan pelaksanaan skripsi

6. Seluruh staf laboratorium Proteomik *Institute Tropical Disease* yang telah memberkan bimbingan, kritikan, nasehat, dan saran selama melakukan penelitian.
7. Kedua Orang Tua Drs. Mahmudi, M,Si dan Dra. Hayuni Retno W., M.Si serta adik-adikku Zainal, Sabilla, Natasha serta seluruh keluarga besarku yang telah memberikan kasih sayang, semangat, nasihat, serta dukungan materi dan do'a selama penyusunan naskah skripsi.
8. Riza, Mumun, Wike, Ve, Rista, Biokim Blast (Luluk, Amal, Nadia, Tea, Previta, dll) serta teman-teman seperjuangan S1 Kimia angkatan 2008 yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat, dukungan, doa, dan menjadi tempat berbagi senang serta keluh kesah selama penyusunan naskah skripsi.
9. M. Z. Fanani, S. Si yang selalu membantu dalam penyelesaian naskah skripsi ini.
10. Sahabatku Muhaimin yang telah meminjamkan laptopnya selama pengerjaan naskah skripsi ini serta dukungan dan doa yang telah diberikan.
11. Seluruh sahabatku di Plus Minus Digital yang telah memberikan semangat dan dukungannya.
12. Bapak Hari Soepriandono, S.Si., M.Si selaku pembina UKM Penalaran dan segenap keluarga besar UKM Penalaran yang telah memberikan semangat dan do'anya sehingga skripsi ini bisa terselesaikan.
13. Keluarga baruku, teman-teman KKN Semen Pinggir yang selalu memberikan semangat dan doa.

14. Teman-teman S1 Kimia angkatan 2009, 2010, dan 2011 yang telah memberikan semangat dan doa untuk kelancaran penyusunan naskah skripsi.

Naskah skripsi ini masih belum sempurna, untuk itu penyusun menerima segala kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan dalam penulisan skripsi di kemudian hari. Akhir kata, semoga naskah skripsi ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Juli 2011

Penyusun

Amelia Rizky R.



**Retmawati, A., R., 2012, Pemodelan dan Analisis Residu Katalitik Enzim Eksoxilanase dari *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08. Skripsi di bawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si dan Drs. Hery Suwito, M.Si. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga**

---

## ABSTRAK

Interaksi suatu enzim terhadap substrat dapat diketahui secara *in silico* maupun *in vivo*. Penelitian ini bertujuan memodelkan struktur 3D enzim eksoxilanase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 serta mengetahui residu aktif yang berperan sebagai residu katalitik enzim eksoxilanase. Validasi hasil modelling enzim dengan substrat pNP-X dan xiloo-ligosakarida dilakukan dengan menguji aktivitasnya menggunakan spektrofometer UV-VIS pada  $\lambda$  tertentu. Pemodelan yang dilakukan menggunakan metode threading dengan memasukkan sekuens asam amino enzim eksoxilanase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 pada software online Esyspred3D Web Server 1.0. Adanya aktivitas enzim dengan substrat dilakukan dengan uji aktivitas enzim eksoxilanase terhadap substrat pNP-X dengan melakukan pembacaan absorbansi pada  $\lambda$  405 nm dan diperoleh nilai aktivitasnya sebesar 0,730 U/ml. Sedangkan untuk uji aktivitas enzim eksoxilanase terhadap substrat xilooligosakarida dilakukan dengan metode DNS dan pembacaan absorbansi pada  $\lambda$  550 nm dan diperoleh nilai aktivitasnya sebesar 0,054 U/ml. Kompleks enzim pada sisi katalitik dengan substrat juga dapat diketahui dengan docking menggunakan Autodock4 dan Autodock vina yang masing-masing dianalisis menggunakan Autodock tools dan PyMol. Residu katalitik yang aktif berperan dalam mengikat substrat pNP-X, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, dan X<sub>4</sub> adalah Glu-476. Hasil docking menunjukkan model kompleks enzim-substrat pNP-X, energi bebas pengikatan, interaksi ikatan hydrogen dan interaksi Van Der Waals-elektrostatik.

Kata kunci: pemodelan struktur protein, threading, docking, eksoxilanase, uji aktivitas, residu katalitik



**Retmawati, A., R., 2012, Modeling and Analysis of Enzyme Catalytic Residues of Geobacillus Thermoleovorans Eksoxilanase IT-08. Final project under guidance Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si and Drs. Hery Suwito, M.Si. Departement of Chemistry, Faculty Science and Technology, Universitas Airlangga**

---

### ABSTRACT

Interaction of an enzyme to the substrate can be determined by *in silico* and *in vivo*. This study aims to model the 3D structure of eksoxilanase enzymes from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 and to know the active residue that acts as catalytic residues of eksoxilanase enzymes. Validation of enzyme modeling results with the substrate PNP-X and xilooligosakarida done by testing the activity using UV-VIS spektrofometer in particular  $\lambda$ . Modeling were performed using the method of threading by incorporating the enzyme amino acid sequence of *Geobacillus thermoleovorans* eksoxilanase IT-08 in the online software Esypred3D Web Server 1.0. The existence of the activity of the enzyme with substrate is done by testing the eksoxilanase enzyme activity against PNP-X by reading the absorbance at  $\lambda$  405 nm and the obtained value of the activity is 0.730 U / ml. As for the eksoxilanase enzyme activity against xylooligosacharyde substrate performed by the method of control and reading of absorbance at 550 nm and  $\lambda$  values obtained for the activity is 0.054 U / ml. On the side of the catalytic enzyme complex with the substrate can also be identified by docking using *AutoDock Vina*, *Autodock 4* and each of which is analyzed using tools *AutoDock* and *PyMol*. Residues of the active catalytic role in binding the substrate PNP-X, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, and X<sub>4</sub> is Glu-476. Docking results show a complex model of the enzyme-substrate pNP-X, the free energy binding, hydrogen bonding interactions and Van der Waals interactions-electrostatic .

Key words: protein structure modeling, threading, docking, eksoxilanase, activity assay, the catalytic residues

## DAFTAR ISI

<b>LEMBAR JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PERNYATAAN</b> .....	ii
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>LEMBAR PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>ABSTRAK</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Protein .....	5
2.1.1 Asam amino penyusun protein .....	5
2.1.2 Struktur protein .....	8
2.2 Enzim Eksoxilanase .....	9
2.3 Pemodelan Struktur Protein .....	10
2.3.1 Teknik pemodelan <i>threading</i> struktur protein .....	12
2.4 Protein <i>Docking</i> .....	13
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	15
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	15
3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....	15
3.2.1 Bahan penelitian .....	15
3.2.1.1 Bahan penelitian secara laboratoris .....	15
3.2.1.2 Bahan penelitian <i>in silico</i> .....	15
3.2.1.3 Sampel penelitian .....	16
3.2.2 Alat penelitian .....	16
3.3 Prosedur Penelitian .....	16
3.3.1 Validasi enzim eksoxilanase dengan substrat .....	16
3.3.1.1 Produksi enzim eksoxilanase .....	16
3.3.1.1.1 Pembuatan media padat .....	16
3.3.1.1.2 Pembuatan media cair .....	17

3.3.1.1.3 Produksi enzim eksoxilanase.....	17
3.3.1.2 Uji aktivitas enzim eksoxilanase rekombinan dengan substrat $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida .....	18
3.3.1.3 Uji aktivitas enzim eksoxilanase dengan substrat xilo-oligosakarida (metode DNS).....	18
3.3.2 Pemodelan struktur 3D enzim eksoxilanase IT-08 <i>wild type</i> .....	19
3.3.2.1 Pemodelan residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08 dengan metode <i>threading</i> .....	19
3.3.3 <i>Docking</i> molekuler .....	19
3.3.3.1 <i>Docking</i> menggunakan <i>Autodock4</i> .....	19
3.3.3.1.1 Persiapan ligan .....	19
3.3.3.1.2 Persiapan makromolekul .....	20
3.3.3.1.3 <i>Autogrid</i> .....	20
3.3.3.1.4 <i>Autodock</i> .....	22
3.3.3.2 <i>Docking</i> menggunakan <i>Autodock vina</i> .....	22
3.3.3.2.1 Persiapan ligan.....	22
3.3.3.2.2 Persiapan makromolekul .....	23
3.3.3.2.3 Persiapan parameter <i>grid</i> .....	23
3.3.3.2.4 <i>Docking Autodock vina</i> .....	24
3.3.3.3 Analisis hasil <i>docking</i> .....	24
3.4 Diagram Alir Penelitian .....	25
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	26
4.1 Produksi Enzim Eksoxilanase IT-08 Isolat pET-Eksoxyl dari <i>E Coli</i> BL21 .....	26
4.2 Uji Aktivitas Enzim Eksoxilanase terhadap Substrat $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNP-X) .....	27
4.3 Uji Aktivitas Enzim Eksoxilanase terhadap Substrat Xilooligosakarida (metode DNS) .....	28
4.4 Analisis Hasil Eksperimen <i>In Silico</i> .....	30
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	43
4.1 Kesimpulan .....	43
4.2 Saran .....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	45

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor</b>	<b>Judul Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Struktur 20 asam amino	7
2.2	Data protein dari PDB	34
4.1	Nilai absorbansi dan aktivitas eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X	27
4.2	Nilai absorbansi dan aktivitas eksoxilanase IT-08 Terhadap substrat xilooligosakarida	29
4.3	Parameter hasil docking dengan <i>Autodock 4</i> dan <i>Autodock Vina</i>	32

## DAFTAR GAMBAR

<b>Nomor</b>	<b>Judul Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1	Struktur 20 asam amino	7
2.2	Struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener dari protein	9
4.1	Reaksi hidrolisis xilosa dengan pNP-X	28
4.2	Reaksi hidrolisis xilosa dengan xilooligosakarida	29
4.3	Struktur 3D enzim eksoxilanase IT-08	30
4.4	Mekanisme reaksi hidrolisis anzim eksoxilanase terhadap substrat pNP-X (a), substrat xilobiose (b), dan substrat xilotriose (c)	41

## DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 terhadap pNP-X dan Xilooligosakarida (metode DNS)
2	Metode Pembuatan Buffer <i>Phospate Citrat</i> pH 6
3	Metode Pembuatan Larutan DNS



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Enzim merupakan molekul biopolimer yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim memegang peranan penting dalam berbagai reaksi di dalam sel. Sebagai protein, enzim diproduksi dan digunakan oleh sel hidup untuk mengkatalisis reaksi, antara lain konversi energi dan metabolisme pertahanan sel (Richana, 2008). Dalam fungsinya sebagai biokatalisator, enzim berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim-substrat sehingga terjadi perubahan substrat menjadi produk, reaksi tersebut berlangsung di daerah sisi katalitik atau sisi aktif (Dawn *et al*, 2000).

Saat ini, sekitar lebih dari 2.000 enzim telah teridentifikasi, masing-masing enzim berfungsi sebagai biokatalisator reaksi kimia dalam sistem hidup. Enzim merupakan unit fungsional dari metabolisme sel yang bekerja secara berurutan dan mengkatalis reaksi yang sangat sederhana sampai ke reaksi yang sangat kompleks. Masing-masing reaksi tersebut dikatalis oleh sejenis enzim tertentu (Yazid *et al*, 2006).

Xilanase merupakan suatu enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa, dalam hal ini ialah xilan atau polimer dari xilosa dan xilooligosakarida. Berdasarkan substrat yang dihidrolisis, xilanase dapat diklasifikasikan menjadi  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase (Richana,

2008). Eksoxilanase mampu memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek.

Pada tahun 2004, Puspaningsih melakukan penelitian mengenai enzim xilanolitik asal *Geobacillus Thermoleovorans* IT-08 dan telah berhasil mengklon gen penyandi xilanolitik yang mampu mengekspresikan tiga macam enzim xilanolitik yaitu  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, dan eksoxilanase. Ketiga gen penyandi enzim xilanolitik tersebut telah berhasil diklon ke dalam sel inang *E.coli* DH5 $\alpha$ , dan diperoleh satu klon positif yang diberi nama pTP510. Ketiga gen tersebut berhasil dipisahkan dan disubklon dari pTP 510 ke sistem pET xyl, pET abfa, dan pET-eksoxilanase (Puspaningsih, 2004). Pada tahun 2011, Asmarani dkk melakukan pengembangan penelitian terhadap ketiga rekombinan enzim xilanolitik, yaitu mengidentifikasi sinergisme antara  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, dan eksoxilanase dalam menghidrolisis xilan dengan analisa pengurangan produk gula yang dihasilkan. Aktivitas hidrolisis xilan menjadi xilosa tertinggi, terdapat pada campuran eksoxilanase dengan  $\beta$ -xilosidase yaitu sebesar 1,084 mg/ml. Dari penelitian Asmarani, dapat ditarik simpulan bahwa eksoxilanase berfungsi optimal jika direaksikan bersama dengan enzim lain, seperti dalam penelitian tersebut eksoxilanase direaksikan bersama dengan  $\beta$ -xilosidase.

Berdasarkan kajian pustaka yang telah dilakukan oleh peneliti, belum ditemukan penelitian yang melaporkan struktur 3D enzim eksoxilanase dan juga aktivitas terhadap substrat yang spesifik, sehingga perlu dilakukan penelitian



pendekatan pada tingkat interaksi molekul dengan melakukan simulasi pemodelan dan analisa struktur 3D enzim eksoxilanase terutama pada residu katalitik secara *in silico*. Pada penelitian ini, akan dilakukan pemodelan terhadap struktur 3D enzim eksoxilanase dengan metode pendekatan melalui program *modelling* dengan komputer, yaitu *threading* dan *docking* serta validasi hasil *modelling* enzim eksoxilanase terhadap substrat dengan menguji aktivitasnya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada  $\lambda$  tertentu.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Bagaimana struktur 3D enzim eksoxilanase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08?
2. Residu aktif apa yang dapat berperan sebagai residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08?
3. Bagaimana interaksi residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08 dengan substrat pNP-X dan xilooligosakarida ( $X_2 - X_4$ )?
4. Bagaimana aktivitas enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X dan xilooligosakarida?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang masalah dan rumusan masalah yang telah dikemukakan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui struktur 3D enzim eksoxilanase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08.
2. Mengetahui asam amino yang dapat berperan sebagai residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08.
3. Mengetahui interaksi residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08 dengan substrat pNP-X dan xilooligosakarida ( $X_2 - X_4$ ).
4. Mengetahui aktivitas enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X dan xilooligosakarida.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang interaksi sisi katalitik dengan substrat yang sesuai sehingga diharapkan dapat menambah wawasan ilmu pengetahuan yang berkaitan dengan perubahan aktivitas mutan-mutan eksoxilanase *Geobacillus thermoleovorans* IT-08.

## BAB II

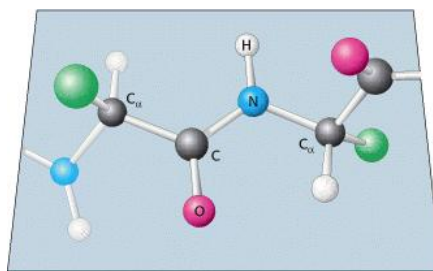
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Protein

Istilah protein pertama kali diperkenalkan pada tahun 1830-an oleh pakar kimia Belanda yang bernama Gerardus J. Mulder, salah satu dari beberapa peneliti yang pertama kali yang mempelajari kimia pada protein secara sistematis. Mulder memperkenalkan istilah protein berasal dari kata Yunani *proteis* yang memiliki arti tingkatan kepentingan pertama. Protein merupakan salah satu biomakromolekul dengan gabungan 20 jenis asam amino yang memiliki peranan penting bagi makhluk hidup dan bertanggungjawab untuk fungsi dan ciri-ciri makhluk hidup (Santoso, 2008). Struktur 3 dimensi protein ditentukan oleh jenis asam amino, urutan asam amino yang saling berikatan pada rantai polipeptida, dan hubungan ruang satu asam amino dengan yang lain (Martin *et al*, 1984).

##### 2.1.1 Asam amino penyusun protein

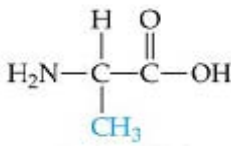
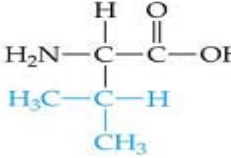
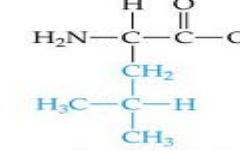
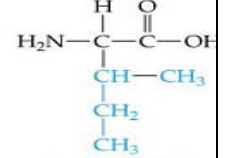
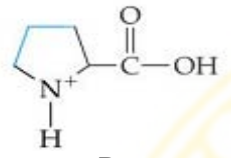
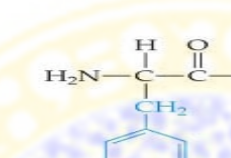
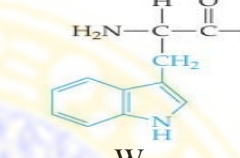
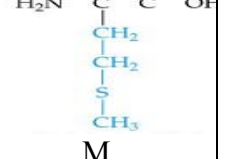
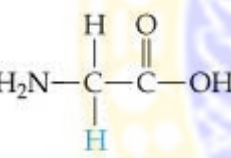
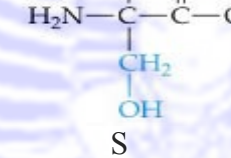
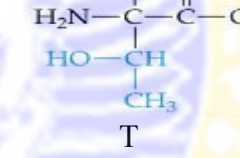
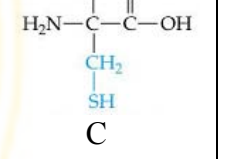
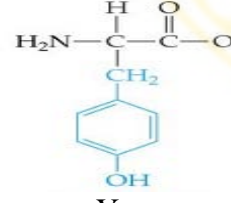
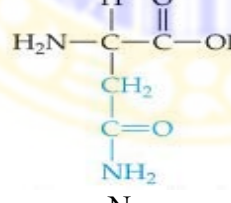
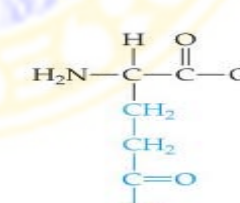
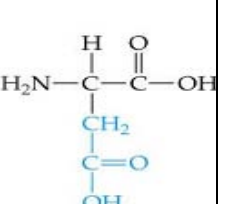
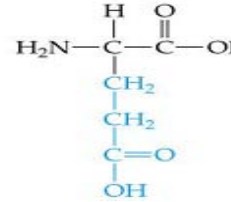
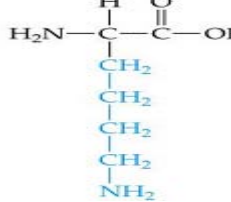
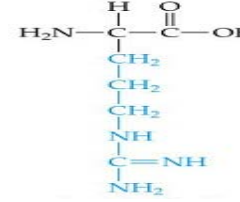
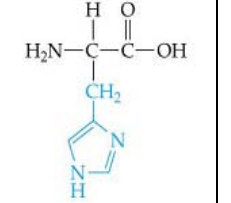
Asam amino merupakan unit dasar penyusun struktur protein yang mengandung atom karbon pusat (karbon  $\alpha$ ) yang mengikat gugus karboksil, atom hidrogen, dan rantai samping (Mathews *et al*, 2002). Kecuali Glisin, semua asam amino mempunyai atom karbon yang *asimetrik*, sehingga dapat terjadi beberapa isomer. Sebagian besar asam amino di alam memiliki konfigurasi L, tetapi dalam bakteri memiliki konfigurasi D (Tillman *et al*; 1986).



Gambar 2.1 Asam-asam amino membentuk protein dengan ikatan peptida (Stryer, 2007)

Terdapat 20 jenis asam amino yang dikode oleh gen pada semua organisme (Mathews *et al*, 2002). Keduapuluh asam amino tersebut, memiliki sifat berbeda yang ditentukan dari rantai samping yang dimiliki sehingga dapat diklasifikasikan menjadi empat kategori, yaitu: gugus samping non polar, polar tidak bermuatan, polar bermuatan negatif (asam), dan polar bermuatan positif (basa) (Armstrong, 1995; Page, 1997).

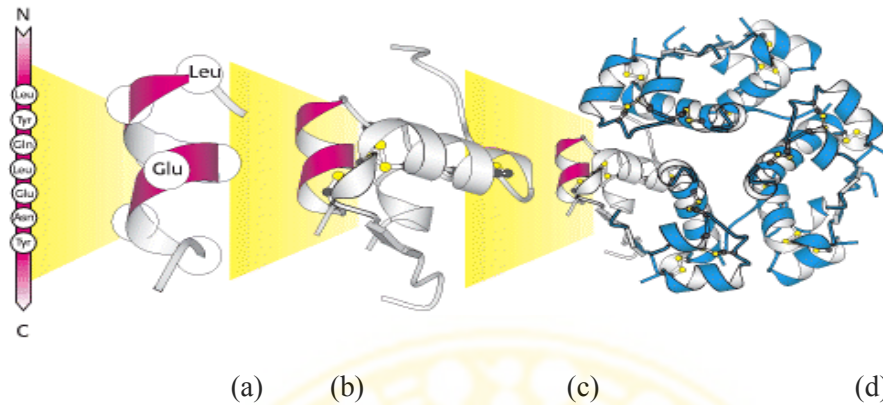
Tabel 2.1 Struktur 20 Asam Amino (Stryer, 2007)

Alanin (Ala)	Valin (Val)	Leusin (Leu)	Isoleusin (Ile)
			
A	V	L	I
Prolin (Pro)	Phenilalanin (Phe)	Triptophan (Trp)	Metionin (Met)
			
P	F	W	M
Glisin (Gly)	Serin (Ser)	Threonin (Thr)	Cystein (Cys)
			
G	S	T	C
Tyrosin (Tyr)	Asparagin (Asn)	Glutamin (Gln)	Aspartat (Asp)
			
Y	N	Q	D
Glutamat (Glu)	Lysin (Lys)	Arginin (Arg)	Histidin (His)
			
E	K	R	H

### 2.1.2 Struktur Protein

Struktur protein dapat dibedakan menjadi empat, yaitu : struktur primer, sekunder, tersier, dan kuartener (Stryer, 2007).

- a. Struktur primer terdiri dari asam-asam amino yang dihubungkan satu sama lain secara kovalen melalui ikatan peptida. Struktur ini menjadi rantai utama (*backbone*) protein yang dapat berotasi bebas disekitar ikatan tunggal yang menghubungkan C- $\alpha$  dan N pada ikatan peptide. Rotasi bebas ini akan mempengaruhi penetapan struktur 3-dimensi dari rantai polipeptida.
- b. Struktur sekunder dibentuk oleh ikatan hidrogen pada asam-asam amino penyusun protein yang membentuk pola tertentu bergantung pada orientasi ikatan hidrogennya. Terdapat dua jenis dari struktur sekunder, yaitu  $\alpha$ -heliks dan  $\beta$ -sheet yang saling beraturan dan berhubungan dengan struktur protein secara keseluruhan
- c. Struktur tersier mengacu pada pelipatan (*folding*) atau pelekukan suatu polipeptida yang menghasilkan kompleks berbentuk molekul globular. Ikatan kovalen yang terlibat dalam struktur tersier adalah ikatan disulfida yang terbentuk melalui oksidasi gugus sulfidril dari dua residu sistein.
- d. Struktur kuartener mengandung lebih dari satu rantai polipeptida, yang disebut subunit. Struktur kuartener dapat terbentuk oleh dua atau lebih subunit yang sama maupun berbeda yang bergabung dan berikatan secara nonkovalen.



Gambar 2.2 Struktur (a) primer, (b) sekunder, (c) tersier dan (d) kuartener dari protein (Stryer, 2007)

## 2.2 Enzim Eksoxilanase

Xilanase merupakan suatu enzim yang memiliki kemampuan menghidrolisis hemiselulosa, yaitu xilan atau polimer dari xilosa dan xilooligosakarida. Xilanase dapat diklasifikasikan berdasarkan substrat yang dihidrolisis, yaitu  $\beta$ -xilosidase, eksoxilanase, dan endoxilanase (Richana, 2008). Pada tahun 2004, Puspaningsih melakukan penelitian mengenai enzim xilanolitik asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 dan telah berhasil mengklon gen penyandi xilanolitik yang mampu mengekspresikan tiga macam enzim xilanolitik yaitu  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, dan eksoxilanase. Ketiga gen penyandi enzim xilanolitik tersebut telah berhasil diklon ke dalam sel inang *E.coli* DH5 $\alpha$ , dan diperoleh satu klon positif yang diberi nama pTP510. Ketiga gen tersebut berhasil dipisahkan dan disubklon dari pTP 510 ke sistem pET xil, pET abfa, dan pETeksoxilanase. Pada penelitian selanjutnya di tahun 2011, Asmarani dkk melakukan pengembangan penelitian terhadap ketiga rekombinan enzim

xilanolitik tersebut, yaitu mengidentifikasi sinergisme antara  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase, dan eksoxilanase dalam menghidrolisis xilan dengan analisa pengurangan produk gula yang dihasilkan. Aktivitas hidrolisis xilan menjadi xilosa tertinggi, terdapat pada campuran eksoxilanase dengan  $\beta$ -xilosidase yaitu sebesar 1,084 mg/ml.

Eksoxilanase diketahui memiliki kemampuan memutus rantai polimer xilosa (xilan) pada ujung reduksi, sehingga menghasilkan xilosa sebagai produk utama dan sejumlah oligosakarida rantai pendek (Richana, 2002; Jeffries, 1996). Eksoxilanase sangat potensial dalam industri xilosa karena mengandung sedikit aktivitas transferase (Beg *et al*, 2001). Salah satu penggunaan enzim eksoxilanase pada industri kesehatan adalah aplikasi xilosa sebagai penghasil xylitol (Paturau, 1969).

### 2.3 Pemodelan Struktur Protein

Pemodelan molekul merupakan salah satu bagian dari ilmu komputasi kimia yang mempelajari struktur, sifat, dan gerak suatu molekul dalam sistem molekul. Pemodelan molekul dapat digunakan untuk merancang suatu molekul sebelum dibuat di laboratorium sehingga dapat diperoleh molekul yang diinginkan secara lebih efisien. Saat ini, pemodelan molekuler terutama pemodelan struktur protein berperan sangat penting dalam studi protein secara komprehensif dan juga mendukung alternatif pencarian desain obat-obatan ataupun vaksin (Andry, 2010).

Pengetahuan mengenai struktur 3D protein, memberikan wawasan yang berharga bagi fungsi protein dengan dasar molekuler. Untuk memahami



mekanisme molekuler tersebut dapat menggunakan beberapa rancangan eksperimen misalnya seperti *site-directed mutagenesis*, pemetaan penyakit yang berkaitan dengan mutasi, dan rancangan struktur berbasis inhibitor spesifik sangat difasilitasi pengetahuan mengenai penataan ruang residu kunci asam amino dalam keseluruhan struktur 3D (Schwede *et al.*, 2008). Saat ini, sekitar 70.000 percobaan struktur protein telah dirilis oleh PDB yang dapat terlihat di Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Data Protein dari PDB ([www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do](http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do))

Metode Penelitian	Tipe Molekul				Total
	$\Sigma$ Protein	NA (Nucleic Acid)	Komplek Protein/NA	Lain-lain	
X-RAY	49912	1178	2298	17	53405
NMR	7113	882	151	7	8153
EM	176	16	69	0	261
HYBRID	18	1	1	1	21
Lain-lain	117	4	4	13	138

Prediksi struktur 3D protein dari sekuen asam amino menjadi permasalahan ilmiah mendasar dan menjadi pertimbangan sebagai tantangan dalam biologi dan kimia komputasi. Dalam memprediksi struktur 3D asam amino, terdapat empat tipe pendekatan berbeda yang biasa digunakan, yaitu (Schwede *et al.*, 2008):

- a. Metode komparatif atau homologi, merupakan pendekatan yang paling akurat. Metode ini didasarkan pada dua protein yang bersifat homolog, memiliki kesamaan struktur satu sama lain. Pada metode homologi, protein target ditentukan berdasarkan struktur protein *template* yang telah diketahui dan memiliki kemiripan sekuens dengan protein target.

- b. Metode pengenalan lipatan atau metode *threading*. Metode ini digunakan untuk memodelkan protein yang mempunyai kemiripan yang rendah dengan struktur protein yang diketahui (homologi rendah). Metode ini digunakan dengan menempatkan setiap urutan asam amino protein target ke posisi struktur cetakan dan mengevaluasi seberapa baik model protein target sesuai cetakan. Setelah cetakan terbaik dipilih, model struktural dibangun berdasarkan kesesuaian dengan cetakan yang dipilih.
- c. Metode *de novo* atau *ab initio*, memprediksi struktur protein murni dari urutan asam amino (*sequence*) primer menggunakan prinsip fisika yang menentukan pelipatan protein dan menggunakan informasi yang berasal dari struktur yang telah diketahui tanpa mengandalkan hubungan evolutioner untuk mengenali lipatan.
- d. Metode integratif atau *hybrid*. Metode ini mengkombinasikan informasi dari kumpulan variasi komputasional dan sumber eksperimen.

### 2.3.1 Teknik Pemodelan *Threading* Struktur Protein

Teknik pemodelan *threading* mulai digunakan sebagai metode pemodelan struktur protein di awal tahun 1990-an yang didasarkan atas kemiripan struktur tanpa kemiripan sekuens primer (Akutsu *et al*, 2000). Pada metode *threading*, langkah yang dilakukan untuk mendapatkan model yang baik adalah sebagai berikut (Huber, 2006):

- a. Mencari struktur cetakan dari basis data

Struktur protein dari basis data dipilih sebagai cetakan. Basis data yang biasa digunakan adalah PDB, FSSP, SCOP, atau CATH.

b. Mendesain fungsi penilaian (*scoring function*)

Fungsi penilaian didesain untuk mengukur kesesuaian antara urutan asam amino target dengan cetakan berdasarkan hubungan struktur dan urutan asam amino. Kualitas dari fungsi energi berkaitan dengan ketepatan prediksi, khususnya dengan ketepatan saat proses penjajaran.

c. Penjajaran *threading*

Sekuen target dijajarkan dengan beberapa struktur cetakan dan fungsi penilaian dioptimasi.

d. Prediksi *threading*

Penjajaran *threading* yang paling memungkinkan sebagai prediksi struktur *threading* dipilih kemudian dibentuk model struktur protein target dengan meletakkan rantai utama dari sekuen target sebagai posisi penjajaran dari struktur cetakan yang dipilih.

## 2.4 Protein Docking

*Docking* merupakan suatu proses yang melibatkan dua atau beberapa molekul untuk membentuk suatu kompleks melalui pendekatan *in silico* (Cazals *et al*, 2002). Pada *docking* molekuler, digunakan struktur tiga dimensi dari reseptor untuk mencari suatu molekul yang berpotensi sebagai ligan (McGovern *et al*, 2003). *Docking* molekuler membutuhkan struktur protein atau model homologi sebagai langkah awal (Hawkins & Skillman, 2006).

Metode *docking* yang biasa digunakan adalah molekular dinamik, metode Monte Carlo, genetik algoritma, dan metode komplemen. *Software docking* yang biasa digunakan adalah AutoDock, DOCK, FlexX, dan Gold (Kaapro & Ojanen, 2002).



## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Komputer Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi dan Laboratorium Proteomik, *Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dimulai dari bulan Februari hingga Juni 2012.

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

##### 3.2.1 Bahan penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah agar, tripton, NaCl, *yeast extract*, aquades, ampicilin, 0,4M IPTG/100, bufer PC pH 6, substrat  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNP-X), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M, 0,1-0,5 mM  $p$ -nitrofenol/mL, DNS, alkohol 70%, media LB (Luria Bertani). Program yang digunakan dalam penelitian ini adalah *ChemBio Office* 2008 untuk menggambar ligan, *ESyPred3D Web Server 1.0* untuk pemodelan 3D secara *threading*, *PyMOL Delano Scientific* dan *Discovery Studio Visualizer 1.5* untuk menampilkan struktur 3D protein, serta untuk *docking* molekuler menggunakan *Autodock Tools*, *Autodock Vina* dan *Autodock 4*. Program-program pemodelan protein dan *docking* yang digunakan didukung oleh program *Phyton 2.5.2*. Sistem operasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Microsoft Windows XP* versi 2002.

### 3.2.1.1 Sampel penelitian

Sampel penelitian urutan asam amino enzim eksoxilanase asal *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 yang diperoleh dari *European Bioinformatics Institute* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk)) dengan nomor akses DQ387047, isolat *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan pET-ekso-xilanase.

### 3.2.2 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop Toshiba AMD Dual Core Processor 2,1 GHz dengan RAM 2 Gb dan flashdisk 1 Gb, mikropipet 100 µl, mikropipet 1ml, cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer, tabung ependorf.

## 3.3 Prosedur Penelitian

### 3.3.1 Validasi enzim eksoxilanase dengan substrat

#### 3.3.1.1 Produksi enzim eksoxilanase

##### 3.3.1.1.1 Pembuatan media padat

Media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB). Media padat digunakan untuk meremajakan koloni koloni *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pET-eksoxilanase). Dibuat media padat 20 mL dengan komposisi: 0,4 g agar, 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 20 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Media steril yang telah suam-suam kuku ditambah dengan 20 µL ampisilin (100mg/mL), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri. Media yang telah memadat disimpan dalam lemari pendingin (Sambrook, 1989).

### 3.3.1.1.2 Pembuatan media cair

Media cair yang digunakan adalah media LB. Dibuat media cair 100 ml dengan komposisi: 1 g tipton, 1 g NaCl, dan 0,5 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 100 mL aquades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit. Media cair steril disimpan dalam lemari pendingin (Sambrook, 1989).

### 3.3.1.1.3 Produksi enzim eksoxilanase

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan biakan plasmid pET-eksoxilanase dari *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan ke dalam 10 mL media inokulum yang mengandung pET-eksoxilanase dan telah ditambahkan 10 µL ampisilin (100 mg/mL). Biakan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam. Satu persen biakan inokulum dimasukkan ke dalam 100 mL media produksi yang telah ditambahkan 100 µL ampisilin (100 mg/mL). Biakan pET-ekso-xilanase diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan kecepatan 150 rpm selama 2,5 jam, kemudian diukur pada OD<sub>600</sub>, jika absorbansi sebesar 0.7–0.8 ditambahkan 250 µL 0,4M IPTG/100 mL media dan diinkubasi kembali seperti kondisi sebelumnya. Semua sel dipanen setelah waktu inkubasi selesai dengan cara sentifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet sel dilarutkan dengan 5 mL bufer PC pH 6 dan dilisis dengan ultrasonikator dengan frekuensi 80 Hz selama 2 menit diulang 2 kali. Enzim didapat dari supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit (Sambrook, 1989).

### **3.3.1.1 Uji aktivitas enzim ekso-xilanase rekombinan dengan substrat $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida**

Sebanyak 50  $\mu$ L enzim ekso-xilanase ditambah 450 $\mu$ L substrat  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNP-X) diinkubasi pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Kontrol yang digunakan 50  $\mu$ L enzim ekso-xilanase yang diinaktifkan pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 5 menit dan 450 $\mu$ L substrat  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNP-X). Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur jumlah  $\rho$ -nitrofenol yang bebas. Pengamatan jumlah  $\rho$ -nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan spektrofotometri pada  $\lambda$  405 nm.

Standar  $\rho$ -nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1-0,5 mM  $\rho$ -nitrofenol dari stok  $\rho$ -nitrofenol 10 mM dalam pelarut bufer PC pH 6. 50  $\mu$ L masing-masing larutan standar  $\rho$ -nitrofenol dicampur dengan 150  $\mu$ L bufer PC pH 6 dan diinkubasi pada suhu 70<sup>0</sup>C dan 50<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 300  $\mu$ L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  405 nm (Puspaningsih, 2004).

### **3.3.1.2 Uji aktivitas enzim ekso-xilanase dengan substrat**

#### **xilooligosakarida (metode DNS)**

Aktivitas enzim ekso-xilanase ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat xilan. Seratus  $\mu$ L substrat tersebut ditambah 100  $\mu$ L enzim ekso-xilanase diinkubasi pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 60 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 600  $\mu$ L pereaksi DNS dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera



didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada  $\lambda$  550 nm. Kontrol yang digunakan 100  $\mu$ L enzim yang diinaktifkan pada suhu 100<sup>0</sup>C selama 5 menit, 100  $\mu$ L substrat xilan dan 600  $\mu$ L pereaksi DNS tanpa diinkubasi diperlakukan sama dengan kondisi di atas (Miller, 1959; Puspaningsih, 2004).

### **3.3.2 Pemodelan struktur 3D residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08 *wild type***

#### **3.3.2.1 Pemodelan residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08 dengan metode *threading***

Model 3D enzim ekso-xilanase IT-08 dengan metode *threading* diperoleh melalui *software online ESyPred3D Web Server 1.0*. Urutan asam amino ekso-xilanase IT-08 dimasukkan pada kolom urutan asam amino yang tersedia, kemudian diklik *submit* untuk dilakukan proses pemodelan.

### **3.3.3 Docking molekuler**

#### **3.3.3.1 Docking menggunakan *Autodock4***

##### **3.3.3.1.1 Persiapan ligan**

Ligan dipersiapkan menggunakan program *Autodock Tools* (Heuy and Morris, 2008). Ligan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pNP-X dan xilooligosakarida (X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, dan X<sub>4</sub>). Ligan tersebut diperoleh dengan menggambar pada program *ChemDraw Ultra* dan disimpan dalam format *\*.mol*. Selanjutnya kedua ligan tersebut dibuka dengan program *accelrys visualizer 2.5*, diklik *chemistry* → *hydrogen, add* dibuka dengan program dengan kemudian dirubah

dalam bentuk \*.pdb dengan program *Accelerys*. Langkah –langkah yang dilakukan untuk persiapan ligan adalah sebagai berikut:

- a. *Program Autodock Tools* dibuka.
- b. Diklik *Ligand* → *Input* → *Open*.
- c. *Edit* → *Hydrogen* → *Add* diklik, kemudian *Polar Only* dipilih, *noBonderOrder (for pdb file)* pada *Method* dipilih, *Yes* pada *Renumber Atoms to Include Hydrogen* dipilih.
- d. *Ok* dipilih.
- e. *Ligand* → *Torsion Tree* → *Chose Torsion* diklik, *Done* diklik.
- f. *Ligand* → *Torsion Tree* → *Set Number of Torsion* diklik, *Dismiss* diklik.
- g. Diklik *Ligand* → *Output* → *Save as PDBQT*.

### 3.3.3.1.2 Persiapan makromolekul

Makromolekul hasil pemodelan tahap sebelumnya disiapkan menggunakan program *Autodock Tools*. Langkah-langkah yang dilakukan untuk persiapan makromolekul adalah sebagai berikut:

- a. *File* → *Read molecule* diklik, *file pdb* struktur protein hasil pemodelan tahap sebelumnya dipilih.
- b. *Edit* → *Hydrogen* → *Add* diklik, *All Hydrogen* dipilih, *noBondOrder* pada *Method* dipilih, *Yes* pada *Renumber Atoms to Include* dipilih, kemudian *OK* dipilih.
- c. *Edit* → *Hydrogen* → *Merge Nonpolar* diklik.
- d. *Grid* → *Macromolecule* → *Choose* diklik dan dipilih protein yang akan *didocking*.

- e. Struktur protein dianjurkan untuk disimpan dalam *pdbqt*.
- f. Klik *Select* bulatan pada enzim dan residu aktif dipilih.

### 3.3.3.1.3 Autogrid

Penentuan parameter *docking* menggunakan tahap *Autogrid*, meliputi ukuran dan posisi *grid box*. Langkah-langkah yang dilakukan dalam tahap *autogrid* adalah sebagai berikut:

- a. *Grid* → *Grid box* dipilih, *Number of Point in X, Y, dan Z* diatur sesuai dengan ukuran sisi aktif protein, *Spacing* (amstrong) dipilih 1,000, *Center Grid Box X, Y, dan Z* diletakkan pada sisi aktif protein.
- b. *File* → *Close Saving Current* diklik.
- c. *Grid* → *Output* → *Save GPF* diklik.
- d. *Grid* → *Edit GPF* → *OK* diklik.
- e. *Run* → *cmd.exe* → *OK* diklik.
- f. Layar *Script* ditulis perintah untuk masuk ke folder yang berisi *file* bentuk *GPF*, ligan, dan makromolekul dalam bentuk *pdbqt* dengan *script* sebagai berikut:

```
cd [nama folder] [enter]  
dir [enter]
```

- g. Kemudian *script* ditulis sebagai berikut:

```
Autogrid4 (spasi) -p (spasi) [nama file].gpf (spasi) -l (spasi)[nama file].glg & [enter]
```

### 3.3.3.1.4 Autodock

*Autodock* merupakan tahap dalam proses *docking* yang dilakukan setelah *autogrid*. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. *Docking* → *Macromolecule* → *Set Rigid File Name* diklik dan *file Macromolecule* dipilih.
- b. *Docking* → *Ligand* → *Choose* diklik, *Ligand* dipilih → *Accept*.
- c. *Docking* → *Search Parameter* → *Genetic Algorithm* → *Accept* diklik.
- d. *Docking* → *Docking Parameter* → *Accept* diklik.
- e. *Docking* → *Output* → *Lamarckian GA (42)* diklik, *file* disave dalam *DPF*, diklik *Edit DPF* → *OK*.
- f. *Running docking* dilakukan dengan menulis *Script* sebagai berikut:  
  
*Autodock4 (spasi) -p (spasi) [nama file].dpf (spasi)-l (spasi) [nama file].dlg (spasi)[enter]*

### 3.3.3.2 Docking menggunakan Autodock vina

#### 3.3.3.2.1 Persiapan ligan

Ligan dipersiapkan menggunakan program *Autodock Tools* (Huey et al, 2008). Langkah –langkah yang dilakukan untuk persiapan ligan adalah sebagai berikut:

- a. *Program Autodock Tools* dibuka.
- b. Diklik *Ligand* → *Input* → *Open*.
- c. *Edit* → *Hydrogen* → *Add* diklik, kemudian *Polar Only* dipilih, *noBonderOrder (for pdb file)* pada *Method* dipilih, *Yes* pada *Renumber Atoms to Include Hydrogen* dipilih.
- d. *OK* dipilih.
- e. *Ligand* → *Torsion Tree* → *Chose Torsion* diklik, *Done* diklik.
- f. *Ligand* → *Torsion Tree* → *Set Number of Torsion* diklik, *Dismiss* diklik.
- g. Diklik *Ligand* → *Output* → *Save as PDBQT*

### 3.3.3.2.2 Persiapan makromolekul

Makromolekul hasil pemodelan tahap sebelumnya disiapkan menggunakan program *Autodock Tools*. Langkah-langkah yang dilakukan untuk persiapan makromolekul adalah sebagai berikut:

- a. *File* → *Read molecule* diklik, *file pdb* struktur protein hasil pemodelan tahap sebelumnya dipilih.
- b. *Edit* → *Hydrogen* → *Add* diklik, *All Hydrogens* dipilih, *noBondOrder* pada *Method* dipilih, *Yes* pada *Renumber Atoms to Include* dipilih, kemudian *OK* dipilih.
- c. *Edit* → *Hydrogen* → *Merge Nonpolar* diklik.
- d. *Grid* → *Macromolecule* → *Choose* diklik dan dipilih protein yang akan didocking.
- e. Struktur protein dianjurkan untuk disimpan dalam *pdbqt*

### 3.3.3.2.3 Persiapan parameter *grid*

Penentuan parameter *docking* menggunakan tahap *Autogrid*, meliputi ukuran dan posisi *grid box*. Langkah-langkah yang dilakukan dalam tahap *autogrid* adalah sebagai berikut:

- a. *Grid* → *Grid box* dipilih, *Number of Point in X, Y, dan Z* diatur sesuai dengan ukuran sisi aktif protein, *Spacing (amstrong)* dipilih 1,000, *Center Grid Box X, Y, dan Z* diletakkan pada sisi aktif protein.
- b. Ukuran dan *Center Grid Box X, Y, dan Z* dicatat.
- c. *Notepad* dibuka untuk membuat *file.txt* yang berisi data sebagai berikut:  
*receptor = [nama file].pdbqt*

*ligand = [nama file].pdbqt*

*Out = all.pdbqt*

*Center\_x = [diisi dengan angka untuk posisi grid box]*

*Center\_y = [diisi dengan angka untuk posisi grid box]*

*Center\_z = [diisi dengan angka untuk posisi grid box]*

*Size\_x = [diisi dengan angka untuk ukuran grid box]*

*Size\_y = [diisi dengan angka untuk ukuran grid box]*

*Size\_z = [diisi dengan angka untuk ukuran grid box]*

#### **3.3.3.2.4 Docking Autodock vina**

*Docking Autodockvina* dilakukan dengan menulis *script* sebagai berikut:

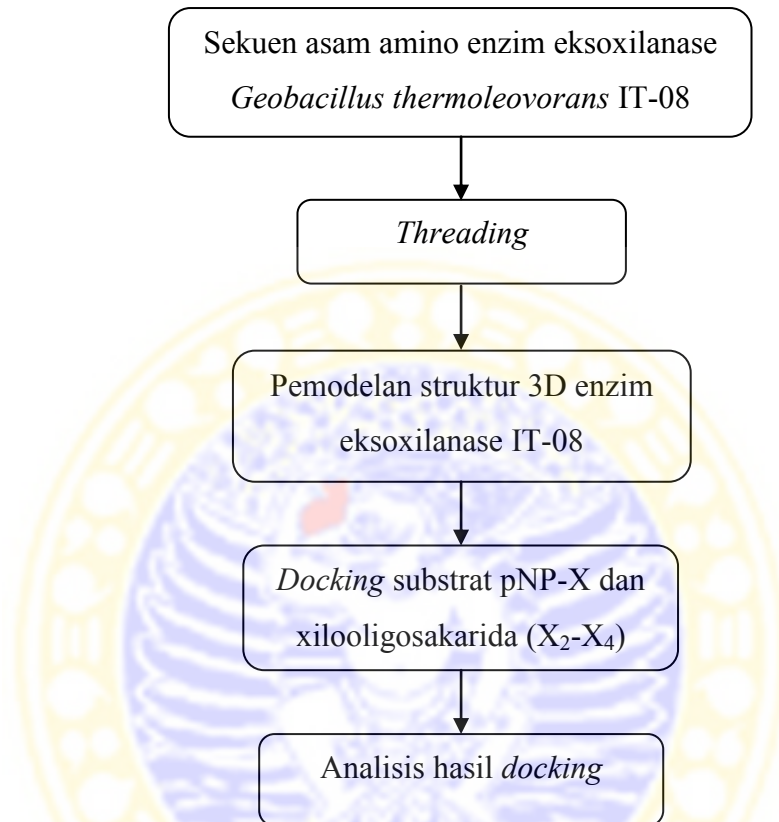
*“\Program Files\The Scripps Research Institute\Vina\vina.exe” (spasi) --config  
(spasi)[nama file].txt (spasi) --log (spasi) all\_out.pdbqt (spasi) & [enter]*

#### **3.3.3.3 Analisis hasil docking**

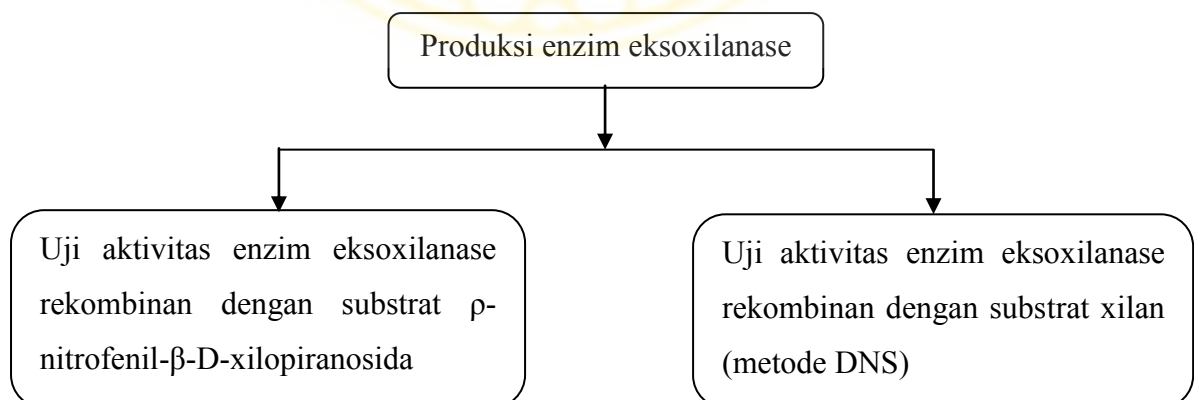
Hasil docking dari *Autodock4* dan *Autodock Vina* dianalisis dengan program *Autodock Tools* dan *PyMOL*. Analisis dilakukan untuk mengetahui interaksi ligan dengan sisi aktif protein dan energi bebas pengikatan minimum dari protein-ligan.

### 3.4 Diagram Alir Penelitian

#### 3.4.1 *Dry lab*



#### 3.4.2 *Wet lab*



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Produksi Enzim Eksoxilanase IT-08 isolat pET-Eksoxyl dari *E coli* BL21

Penelitian ini diawali dengan meremajakan kembali isolat pET-Eksoxyl dari *E coli* BL21 penghasil enzim eksoxilanase yang merupakan hasil rekombinan dari penelitian Puspaningsih (2004). Peremajaan isolat bakteri pET-Eksoxyl dilakukan dengan menginokulasikan isolat tersebut ke dalam media padat LB (Luria Bertani) steril yang telah ditambahkan 20 µl ampisilin (100mg/ml). Kemudian isolat dari media padat tersebut digores dan diinokulasikan ke dalam 10 ml media cair LB yang juga telah ditambahkan 10 µl ampisilin dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam. Selanjutnya biakan inokulum dimasukkan ke dalam 100 ml media produksi yang telah ditambah 100 µl ampisilin (100µg/ml) dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 2,5 jam. Semua sel tersebut kemudian dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Pelet sel dilarutkan dengan 5 ml buffer PC pH 6 dan dilisis dengan ultrasonikator dengan frekuensi 80Hz selama 2 menit sebanyak dua kali. Pelet sel dibuang dan enzim eksoxilanase diperoleh setelah dilakukan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.



#### 4.2 Uji Aktivitas Enzim Eksoxilanase terhadap substrat *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosida (pNP-X)

Aktivitas enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X ditunjukkan dari hasil pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  405 nm. Enzim eksoxilanase sebanyak 50  $\mu$ l dicampur dengan 450  $\mu$ l substrat pNP- $\beta$ -D-xilopiranosida 1 mM diinkubasi pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 50  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,4 M, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi sampel dan kontrol enzim eksoxilanase dengan substrat pNP-X untuk mendapatkan besarnya aktivitas enzim terhadap substrat tersebut. Satu unit aktivitas enzim (U/ml) didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang dapat menghidrolisis pNP- $\beta$ -D-xilopiranosida menghasilkan 1  $\mu$ mol *p*-nitrofenol dalam 1 menit. Kontrol yang digunakan pada uji aktivitas ini adalah enzim eksoxilanase yang dinaktifkan pada suhu 100<sup>0</sup> selama 5 menit. Hasil absorbansi dan nilai aktivitas yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 4.1 berikut:

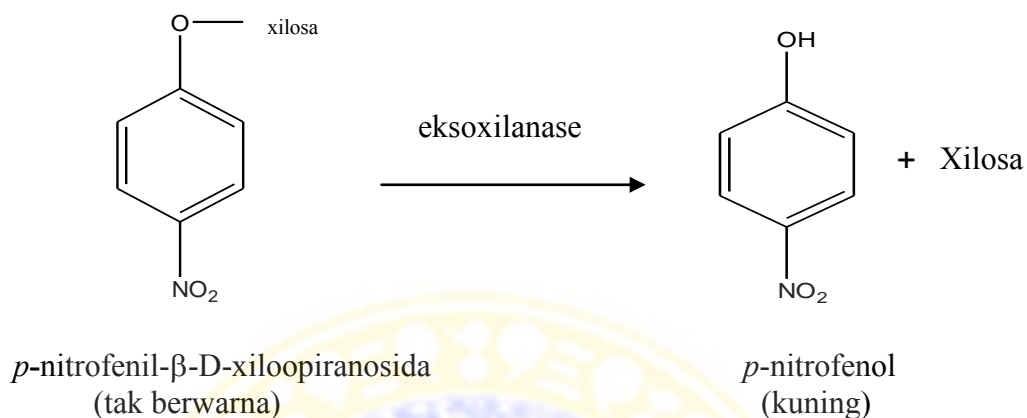
Tabel 4.1 Nilai absorbansi dan aktivitas eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X

Pengukuran	Absorbansi (nm)	Aktivitas (U/ml)
I	0,799	0,730
II	0,810	0,757
Rata-rata		0,744

Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas rata-rata enzim dengan substrat pNP-X menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoxilanase sebesar 0,744 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa enzim eksoxilanase memiliki aktivitas terhadap

substrat pNP-X namun aktivitasnya tergolong rendah terhadap substrat tersebut.

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis xilosa dengan pNP-X

### 4.3 Uji Aktivitas Enzim Eksoxilanase dengan substrat xilooligosakarida

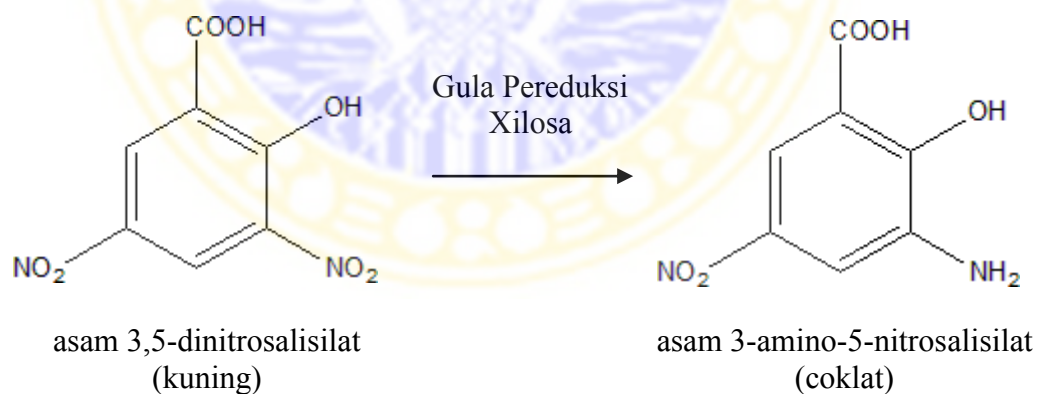
#### (metode DNS)

Pengukuran aktivitas enzim eksoxilanase terhadap substrat xilooligosakarida dilakukan dengan mengukur banyaknya xilosa yang bisa dihidrolisis menjadi glukosa. Substrat sebanyak 100  $\mu$ l dan enzim sebanyak 100  $\mu$ l diinkubasi pada suhu 50<sup>0</sup>C selama 60 menit, perlakuan ini bertujuan untuk mempercepat reaksi enzimatik antara enzim eksoxilanase dengan substrat xilooligosakarida agar reaksi berlangsung dengan sempurna. Hasil inkubasi tersebut ditambah dengan 600  $\mu$ l DNS selama 15 menit pada suhu 100<sup>0</sup>C untuk menginaktifkan enzim sehingga reaksi enzimatik berhenti. Selanjutnya, didinginkan dalam air es selama 20 menit. Pengukuran aktivitas enzim eksoxilanase dilakukan terlebih dahulu dengan pengukuran absorbansi pada  $\lambda$  550 nm. Hasil absorbansi dan nilai aktivitas yang diperoleh ditunjukkan pada Tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Nilai absorbansi dan aktivitas eksoxilanase IT-08 terhadap substrat xilooligosakarida

Pengukuran	Absorbansi (nm)	Aktivitas (U/ml)
I	2,041	0,054
II	2,053	0,057
Rata-rata		0,055

Nilai absorbansi digunakan untuk menghitung besarnya aktivitas enzim eksoxilanase dengan metode DNS berupa konsentrasi gula pereduksi dalam satuan U/ml. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1  $\mu\text{mol}$  produk per satuan waktu untuk setiap ml enzim (Miller, 1959). Berdasarkan hasil pengukuran aktivitas enzim dengan substrat xilooligosakarida menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoxilanase sebesar 0,055 U/mL. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :

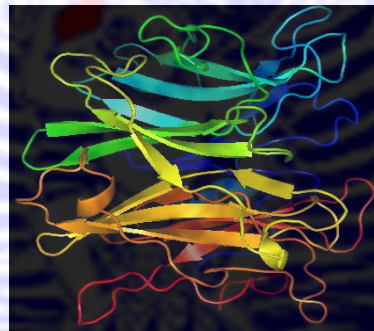


Gambar 4.2 Reaksi hidrolisis xilosa dengan DNS

Nilai aktivitas eksoxilanase terhadap xilooligosakarida lebih kecil jika dibandingkan dengan aktivitas eksoxilanase terhadap pNP-X. Hal ini menunjukkan bahwa enzim eksoxilanase memiliki aktivitas yang lebih tinggi untuk berinteraksi dengan pNP-X dibanding dengan xilooligosakarida.

#### 4.4 Analisis Hasil Eksperimen *In silico*

Eksperimen secara *in silico* pada penelitian ini diawali dengan melakukan pemodelan struktur 3D enzim eksoxilanase IT-08 menggunakan metode *threading*. Penggunaan metode pemodelan struktur protein tersebut dikarenakan belum adanya penelitian yang melaporkan mengenai struktur 3D eksoxilanase IT-08 dan hasil ko-kristalisasi dengan substratnya. Struktur 3D enzim eksoxilanase didapat dengan memasukkan sekuens asam amino pada program online Esypred3D Web Sever 1.0.



Gambar 4.1 Struktur 3D Enzim Eksoxilanase IT-08







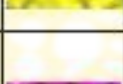

Struktur yang diperoleh tidak dapat mewakili keseluruhan struktur eksoxilanase IT-08 karena yang termodelkan hanya residu asam amino bagian tengah saja, yaitu His276 – Arg592.

Metode homologi tidak bisa diterapkan pada pemodelan enzim eksoxilanase IT-08 dikarenakan enzim ini memiliki tingkat homologi yang cukup rendah dan belum ada yang melaporkan struktur enzim eksoxilanase pada Protein Data Bank (PDB) serta belum adanya hasil struktur kokristalografi X-Ray dari

enzim eksoxilanase terhadap substrat. Hal ini membuat tidak bisa dilakukannya evaluasi struktur dari enzim eksoxilane karena tidak adanya cetakan yang sesuai.

Pengaruh residu katalitik terhadap kompleks enzim dengan substrat pNP-X dan xilooligosakarida ( $X_2 - X_4$ ) dianalisis dengan menggunakan program docking. Program *docking* yang digunakan adalah *Autodock tools*, *Autodock 4*, dan *Autodock Vina*. *Autodock tools* digunakan untuk mempersiapkan molekul enzim dan substrat, sedangkan *Autodock 4* dan *Autodock Vina* digunakan untuk menampilkan hasil interaksi antara enzim dan substrat yang dapat diketahui dari nilai afinitas dan energi bebas pengikatan. Hal pertama yang dilakukan dalam proses *docking* adalah menyiapkan molekul enzim, substrat pNP-X, dan substrat xilooligosakarida ( $X_2 - X_4$ ) menggunakan program *Autodock tools*. Program ini juga digunakan untuk melakukan analisis dari hasil *docking* yang diperoleh dari program *Autodock4*. Sedangkan untuk menganalisis hasil *docking* dari *Autodock Vina* digunakan program *Pymol*.

Hasil eksperimen secara *in silico* ditampilkan pada Tabel 4.3 berikut.

Jenis Substrat	Nilai Aktivitas (U/ml)	Autodock Vina			Autodock 4				
		Binding affinity (kcal/mol)	Residu Asam Amino yang Berikatan	Visualisasi Kompleks Enzim-Substrat	Binding affinity (kcal/mol)	Residu Asam Amino yang Berikatan	Koefisien Inhibisi (mM)	Visualisasi Kompleks Enzim-Substrat	Interaksi Van der Waals
pNP-X	0,799	-6,6	Gln476 Arg565		-2,34	Gln476 Arg565	19,97		Arg565 Val174 Trp344
Xilooligo-sakarida	0,054	-5,7	Asp287 Gln476 Arg565		-2,32	Asp287 Gln476 Arg565	20,03		Trp344 Arg565
		-5,7	Asp287 Gln476 Arg565		-0,45	Asp287 Gln476 Arg565	464,6		Leu493 Arg565 Ala438 Gly437 Val474 Trp344
		0,5	Asp287 Gln369 Arg565		22,76	Asp287 Gln369 Arg565	-		Arg565 Ile496 Leu493 Ser494 Val474 Ala438 Gly437 Leu411 Trp344

### *Analisa Hasil Eksperimen dengan Autodock Vina*

Berdasarkan Tabel 4.3, dapat diketahui posisi substrat pNP-X terhadap enzim eksoxilanase IT-08 menunjukkan bahwa gugus nitrofenil masuk ke dalam celah sisi katalitik dan gugus xilopiranosida berada di luar sisi katalitik. Sedangkan pada substrat xilobiose, xilotriose, dan xilotetraose menunjukkan hanya 1 gugus xilosa yang masuk ke dalam celah sisi katalitik dan gugus xilosa yang lain berada di luar sisi katalitik.

Interaksi enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X maupun xilooligosakarida masih belum ada yang melaporkan sampai saat ini, hal ini dikarenakan belum adanya penelitian mengenai substrat yang sesuai dengan enzim tersebut serta belum adanya data kokristalisasi antara struktur enzim eksoxilanase IT-08 dengan suatu ligan sehingga residu katalitiknya pun masih belum bisa ditentukan. Hanya saja diasumsikan mengacu pada penelitian Istri (2008), residu katalitik dari eksoxilanase IT-08 adalah Asp 287, Asp 412, Glu476 yang telah ditentukan sebelumnya menggunakan metode *site directed mutagenesis*. Dari hasil *docking Autodock Vina* dapat diketahui bahwa substrat pNP-X mengikat residu asam amino Glu476 dan Arg565 di daerah katalitik. Substrat xilobiose dan xilotriose mengikat residu asam amino di daerah katalitik, yaitu Asp287, Glu476, dan Arg565 dan xilotetraose mengikat residu asam amino Asp287, Glu369, dan Arg565.

Selain model posisi substrat terhadap sisi katalitik, hasil *docking* menggunakan *Autodock Vina* menghasilkan analisis energi bebas pengikatan. Dari data yang terdapat pada Tabel 4.3 dapat terlihat pengikatan eksoxilanase IT-08

dengan substrat pNP-X menghasilkan energi yang paling rendah, semakin rendahnya energi yang dihasilkan dapat membuktikan bahwa eksoxilanase IT-08 semakin mudah bereaksi dengan pNP-X. Nilai energi bebas dari pNP-X, xilobiose, dan xilotriose menunjukkan nilai negatif. Energi bebas pengikatan bernilai negatif menunjukkan bahwa kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X, eksoxilanase IT-08 - xilobiose, eksoxilanase IT 08 - xilotriose berlangsung spontan sehingga dapat menghasilkan produk jika berinteraksi dengan substratnya. Hal ini sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa jika energi bebas bernilai negatif maka reaksi berjalan spontan, jika energi bebas bernilai sama dengan nol maka reaksi berlangsung setimbang dan jika energi bebas bernilai positif maka reaksi berjalan tidak spontan ( Berg *et al.*, 2007). Meskipun kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X, eksoxilanase IT-08 - xilobiose, eksoxilanase IT 08 - xilotriose berlangsung spontan, namun nilai energi bebas eksoxilanase IT-08 - pNP-X lebih kecil dibandingkan dua kompleks tersebut. Hal ini dapat diakibatkan komplementaritas stereokimia antara eksoxilanase IT-08 dengan pNP-X lebih sesuai sehingga menghasilkan kompleks enzim-substrat yang lebih stabil. Hal ini juga didukung dari hasil perhitungan aktivitas antara enzim eksoxilanase IT-08 dengan pNP-X yang lebih besar, yaitu 0,744 U/ml dibandingkan dengan enzim eksoxilanase IT-08 dengan xilooligosakarida yaitu sebesar 0,055 U/ml. Enzim eksoxilanase IT-08 memiliki aktivitas yang mirip dengan enzim  $\beta$ -xylosidase asal *Geobacillus thermoleovorans IT-08* sehingga interaksi pengikatan enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat dapat dibandingkan dengan aktivitas enzim  $\beta$ -xylosidase terhadap substratnya



(Puspaningsih, 2004). Menurut penelitian Digvijay Verma, T. Satyanarayana (2011), kelompok enzim xilanase dari *Geobacillus thermoleovorans* yang dapat menghidrolisis xilooligosakarida (X<sub>2</sub>-X<sub>5</sub>) adalah endoxilanase, hal ini dapat menjadi acuan bahwa  $\beta$ -xilosidase maupun eksoxilanase tidak memiliki kemampuan untuk menghidrolisis xilooligosakarida menjadi xilosa.

#### *Analisa Hasil Eksperimen dengan Autodock 4*

Hasil *docking* dengan menggunakan *Autodock 4* dapat diperoleh informasi mengenai energi bebas pengikatan kompleks enzim-substrat, koefisien inhibisi kompleks enzim-substrat, dan interaksi Van der Waals atau elektrostatik di daerah katalitik. Analisis hasil *docking* dari *Autodock4* dilakukan dengan menggunakan program *Autodock tools*.

Perbedaan interaksi antara kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X, eksoxilanase IT-08 - xilobiose, eksoxilanase IT 08 - xilotriose ditunjukkan dari perbedaan jumlah ikatan hidrogen dan ikatan Van Der Waals. Pada model interaksi kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X terdapat 2 ikatan hidrogen yang terbentuk yaitu oleh residu Arg565 dan Glu476. Selain ikatan hidrogen yang terbentuk, juga terdapat adanya interaksi Van der Waals antara enzim dengan substrat, yaitu pada residu Arg565, Val174, Trp344. Model interaksi kompleks eksoxilanase IT-08 - xilobiose terdapat 3 ikatan hidrogen yang terbentuk yaitu oleh residu Asp287, Glu476, dan Arg565. Selain ikatan hidrogen yang terbentuk, juga terdapat adanya interaksi Van der Waals antara enzim dengan substrat, yaitu pada residu Trp344 dan Arg565. Model interaksi kompleks eksoxilanase -

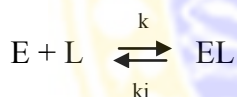
xilotriose terdapat 3 ikatan hidrogen yang terbentuk yaitu oleh residu Asp287, Glu476, dan Arg565. Selain ikatan hidrogen yang terbentuk, juga terdapat adanya interaksi Van der Waals antara enzim dengan substrat, yaitu pada residu Trp344, Gly437, Ala438, Val474, Leu495, Arg565. Model interaksi kompleks eksoxilanase IT-08 - xilotetraose terdapat 3 ikatan hidrogen yang terbentuk yaitu oleh residu Asp287, Glu369, dan Arg565. Selain ikatan hidrogen yang terbentuk, juga terdapat adanya interaksi Van der Waals antara enzim dengan substrat, yaitu pada residu Trp344, Leu411, Gly437, Ala438, Val472, Val474, Ser494, Leu495, Ile496, Arg565. Adanya perubahan jumlah ikatan hidrogen dan ikatan Van der Waals atau elektrostatik menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas enzimatik. Interaksi kompleks eksoxilanase IT-08 - xilotetraose memiliki jumlah interaksi Van der Waals paling banyak karena ukuran molekul dari xilotetraose juga cukup besar. Semakin banyak interaksi yang terjadi semakin besar pula energi yang dibutuhkan sehingga nilai dari energi bebas pengikatan juga besar yang akan mengakibatkan semakin kecilnya kestabilan kompleks enzim dengan substrat.

Energi bebas pengikatan dari model juga berbeda di tiap interaksi dengan tiap substrat untuk pNP-X, xilobiose, xilotriose, dan xilotetraose dengan masing-masing nilai -2,34 kkal/mol; -2,32 kkal/mol; -0,45 kkal/mol; 22,76 kkal/mol.. Energi bebas pengikatan bernilai negatif menunjukkan bahwa reaksi enzimatik enzim eksoxilanase IT-08 terhadap pNP-X, xilobiose, dan xilotriose berlangsung spontan. Kompleks eksoxilanase IT-08 – xilotetraose menghasilkan energi bebas pengikatan yang cukup besar dan bernilai positif, yang mengindikasikan bahwa interaksi kompleks eksoxilanase-substrat berlangsung tidak spontan. Energi yang

diperlukan untuk berinteraksi antara kompleks eksoxilanase IT-08 - xilotetraose cukup besar dikarenakan xilotetraose berukuran lebih besar sehingga dibutuhkan energi yang besar untuk melakukan interaksi dengan eksoxilanase.

Meskipun hasil energi bebas pengikatan dari program *Autodock 4* dan *Autodock Vina* memiliki nilai energi bebas yang berbeda namun urutan energi bebas dari yang terendah sampai tertinggi memiliki pola yang sama. Hasil energi bebas pada program *Autodock 4* cenderung lebih besar dibanding dengan *Autodock Vina*. Hal ini disebabkan karena pada docking dengan *Autodock 4* banyak interaksi yang terlibat, seperti interaksi antara ikatan hidrogen, Van der Waals atau elektrostatik sehingga energi yang dibutuhkan pun cukup besar.

Reaksi pembentukan kompleks enzim-ligan dapat dituliskan sebagai berikut.



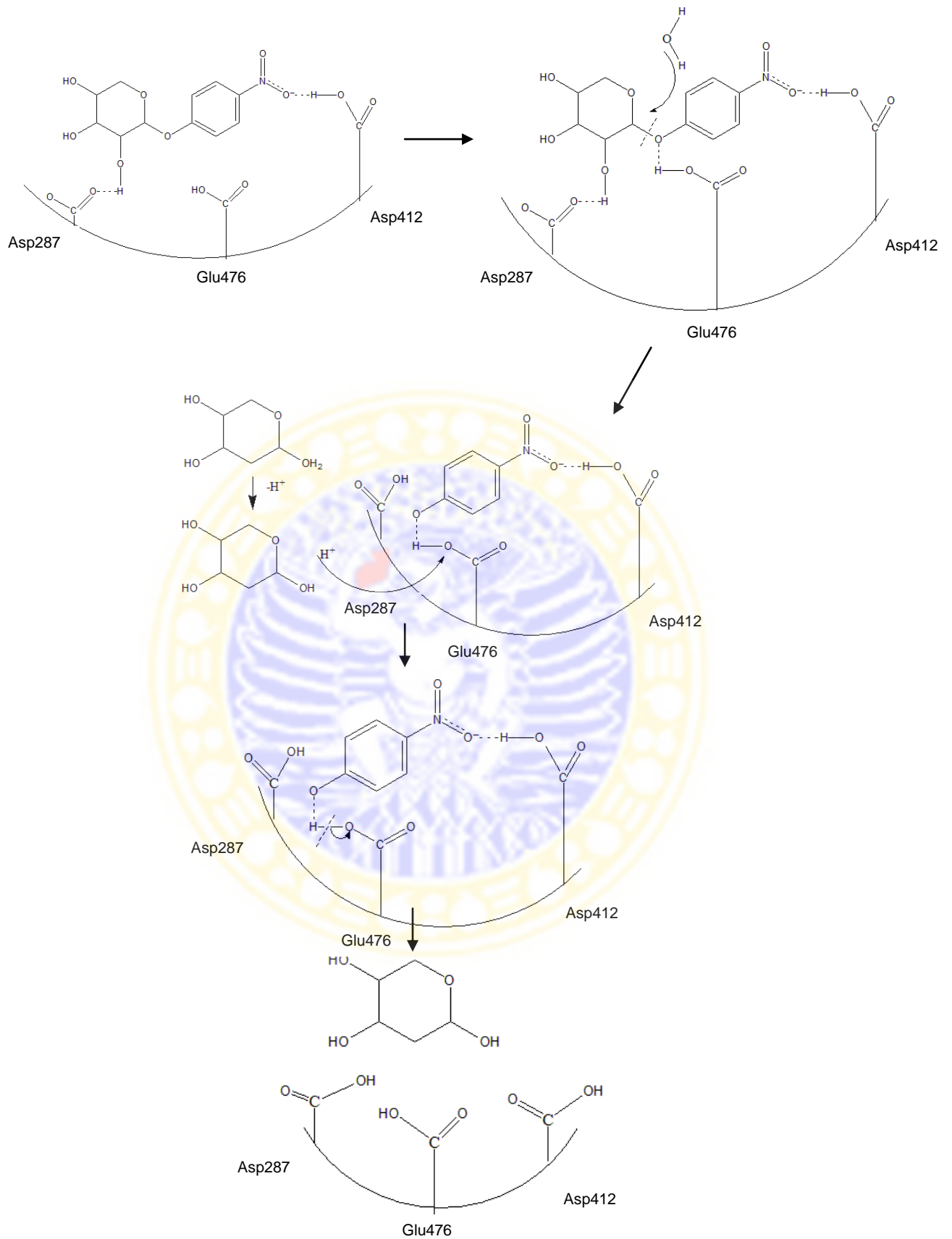
Berdasarkan persamaan di atas, maka besarnya  $K_i$  adalah:

$$K_i = \frac{[E][L]}{[EL]}$$

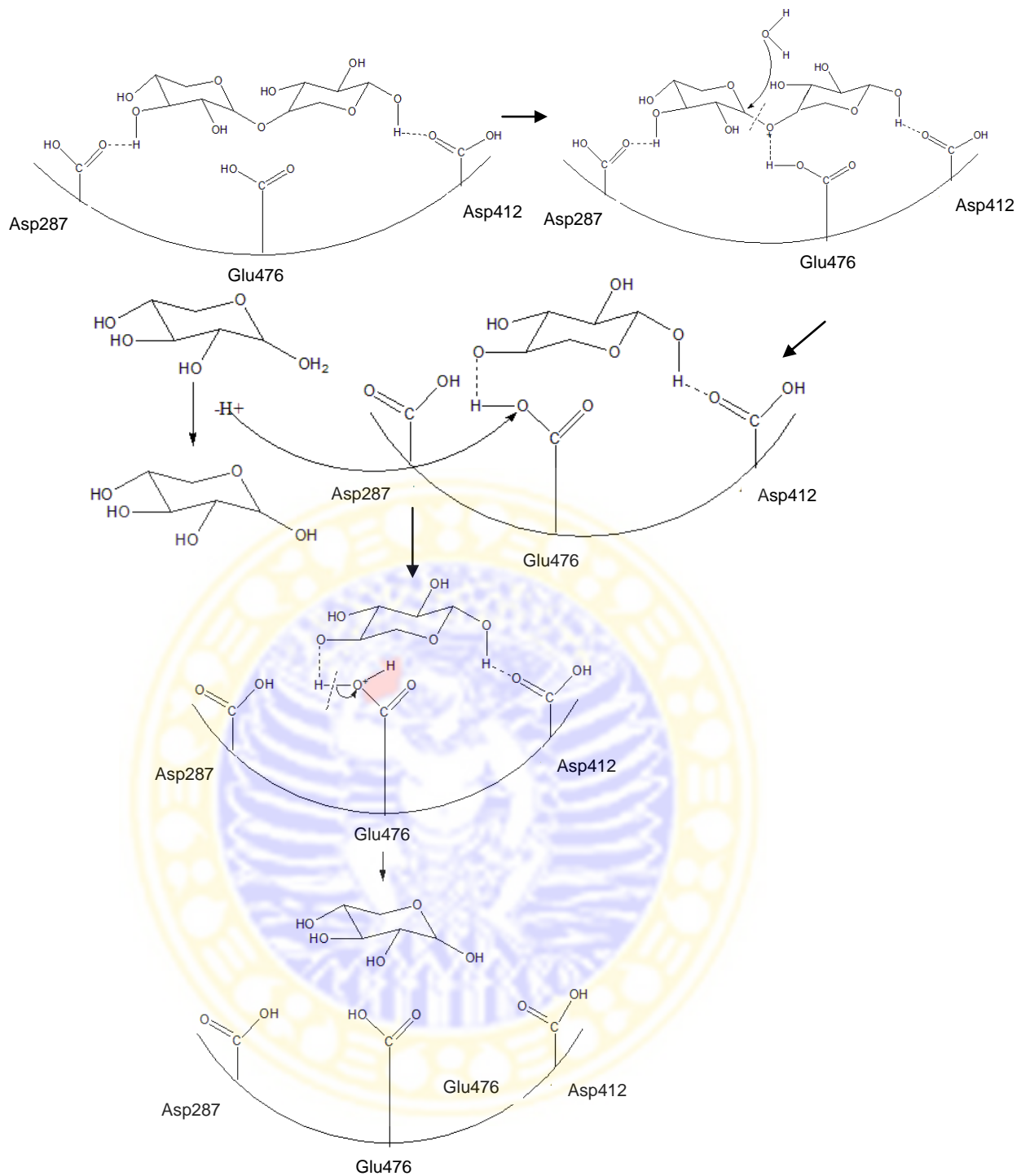
Hasil docking dengan *Autodock 4* diperoleh nilai Konstanta Inhibisi ( $K_i$ ) untuk enzim eksoxilanase IT-08 dengan substrat pNP-X, xilobiose, dan xilotriose yaitu masing-masing 19,97 mM, 20,03 mM, dan 464,6 mM. Dari data tersebut dapat dilihat bahwa harga  $K_i$  terbesar dimiliki oleh kompleks eksoxilanase – xilotetraose karena ukuran molekul dari xilotetraose pun cukup besar. Hal ini sesuai dengan kestabilan kompleks eksoxilanase-pNP-X lebih besar dibandingkan dengan kompleks eksoxilanase-xilobiose ataupun eksoxilanase-xilotriose.

Dari hasil docking eksoxilanase IT-08 dengan substrat pNP-X, xilobiose, dan xilotriose diperoleh hasil yang sama para residu asam amino di daerah katalitik yang diikat, yaitu Glu476. Berdasarkan data tersebut dapat diasumsikan bahwa Glu476 merupakan residu aktif yang berperan sebagai *general acid* pada mekanisme katalitik. Glutamat memiliki rantai samping  $-\text{COOH}$  yang dapat memprotonasi ikatan glikosidik dari substrat sehingga dapat memfasilitasi pembelahan ikatan dengan menstabilisasi gugus pergi. Gugus karboksilat dari glutamat berfungsi sebagai *general acid* untuk mengaktivasi molekul air yang masuk dimana akan menyerang karbon anomer gula pada intermediate glikosil-enzim untuk membentuk produk gula bebas dan membentuk kembali enzim kemudian menyelesaikan siklus katalitik (Bravman *et al*, 2001). Sedangkan residu asam amino yang lain berfungsi untuk mempertahankan kestabilan kompleks enzim-substrat.

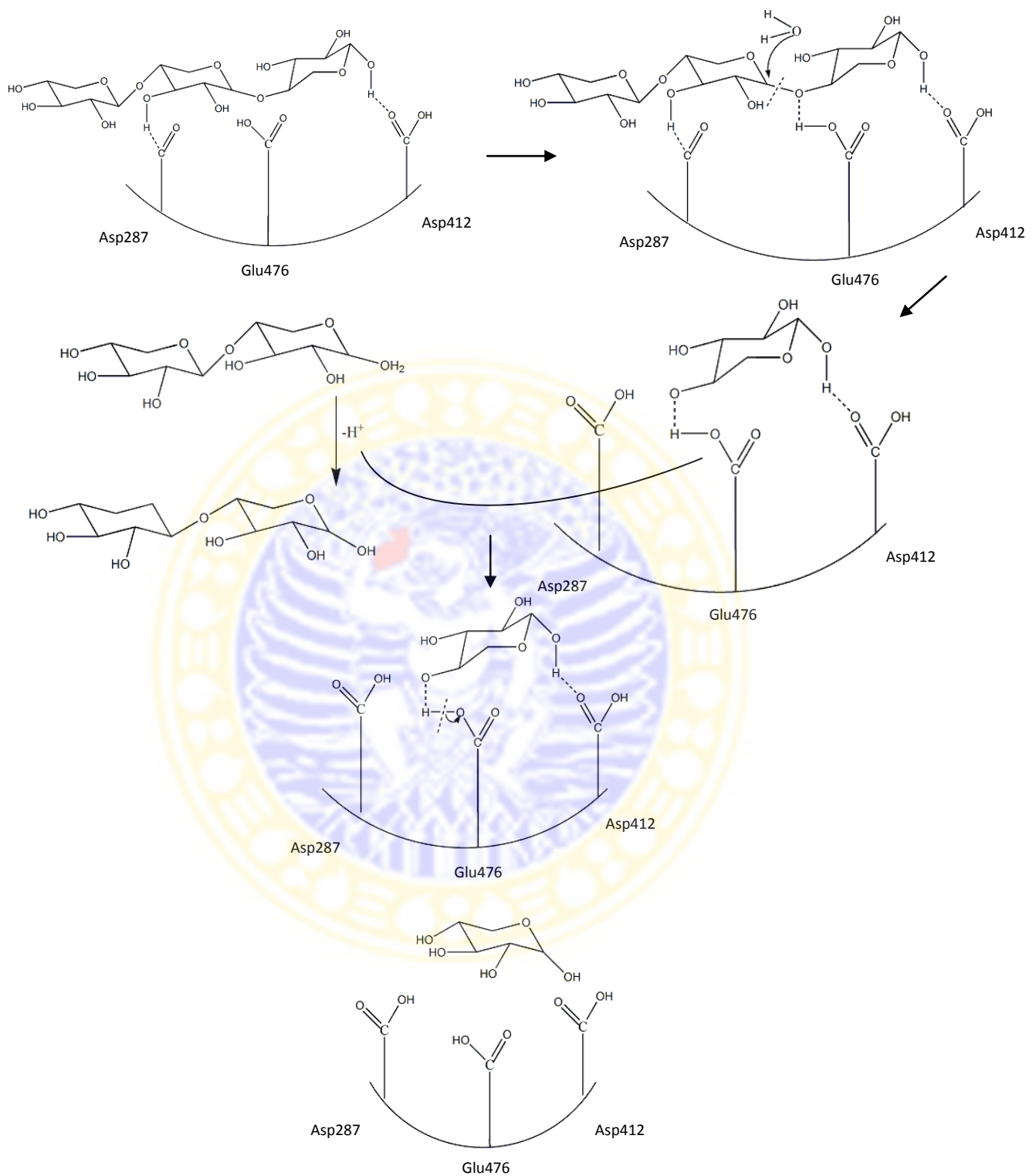
Mekanisme reaksi hidrolisis bertikut antara enzim eksoxilanase IT-08 terhadap xilobiose tergolong tipe inversi yang dinyatakan sebagai berikut.



(a) Mekanisme reaksi hidrolisis enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat pNP-X



(b) Mekanisme reaksi hidrolisis enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat Xilobiose



(c) Mekanisme reaksi hidrolisis enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat Xilotriose

Gambar 4.4 Mekanisme reaksi hidrolisis anzim eksoxilanase terhadap substrat pNP-X (a) dan substrat xilobiose (b), dan xilotriose (c)

Perbedaan pada hasil *docking* dengan aktivitas disebabkan banyaknya kondisi lingkungan yang tidak sesuai dengan yang dilakukan dengan laboratorium basah, di antaranya banyak molekul yang disederhanakan, seperti tidak adanya molekul air, ketidaksesuaian pH dan temperatur sehingga hasil dari *docking* tidak dapat sepenuhnya digunakan untuk mengganti penelitian laboratorium.





## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

- a. Struktur 3D enzim eksoxilanase IT-08 tidak dapat secara utuh diperoleh karena yang dapat termodelkan hanya residu asam amino His276-Arg592
- b. Residu aktif yang berperan sebagai residu katalitik enzim eksoxilanase IT-08, sebagai berikut:
  - Kompleks eksoxilanase IT-08-pNP-X adalah Glu476 dan Arg565
  - Kompleks eksoxilanase IT-08-Xilobiose adalah Asp287, Glu476, Arg565
  - Kompleks eksoxilanase IT-08-Xilotriose adalah Asp287, Glu476, Arg56
- c. Glu476 merupakan residu aktif yang berperan sebagai *general acid* pada mekanisme katalitik enzim eksoxilanase IT-08 terhadap substrat.
- d. Aktivitas kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X lebih besar dibandingkan dengan kompleks eksoxilanase IT-08 – xilooligosakarida, yang diketahui dari nilai aktivitas yang diperoleh:  
Kompleks eksoxilanase IT-08 - pNP-X sebesar 0,799 U/ml  
Kompleks eksoxilanase IT-08 – xilooligosakarida 0,054 U/ml

#### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penentuan kokristalografi antara enzim eksoxilanase IT-08 dengan substrat agar dapat diketahui secara pasti residu katalitik dari

eksoxilanase IT-08 sehingga dapat memudahkan penelitian mengenai enzim eksoxilanase IT-08 selanjutnya.



## DAFTAR PUSTAKA

- Armstrong F.B., 1995, *Buku Ajar Biokimia, Edisi ketiga*, Alih Bahasa : Maulany RF, EGC, Jakarta
- Asmarani, O., Wardoyo, B.P.E., Puspaningsih, N.N.T., 2011, **The Synergy of Recombinant Xylanolytic Enzyme on Xylan Hydrolysis**, *Makara Teknologi*, Vol. 15, No.1, hal. 82-88
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. **Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: A Review**. *Appl. Microb. Biotechnol.*, Vol. 56, p. 326–338
- Bravman, T., Mechaly, A., Shulami, S., Belakhov V., Baasov T., Shomam G., Shoham Y., 2001, **Glutamic Acid 160 is The Acid-Base Catalyst of  $\beta$ -Xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6: A Family 39 Glycoside Hydrolase**, *FEBS Letters* 495 p. 115 – 119
- Cazals, F., Lewiner, T., 2003, *Molecular Shape Analysis Based Upon The Morse-Smale Complex and The Connolly Function*, The Symposium on Computational Geometry, Rio de Janeiro
- Dawn M., Allan M., Collen S, 2000, *Biokimia Kedokteran Dasar, Sebuah Pendekatan Klinis*, hal. 98-101
- Hawkins, P., Skillman, G., 2006, **Ligand-Based Design Workflow**, [http://images.apple.com/science/pdf/ligandbased\\_design\\_workflow.pdf](http://images.apple.com/science/pdf/ligandbased_design_workflow.pdf), 5 Desember 2011

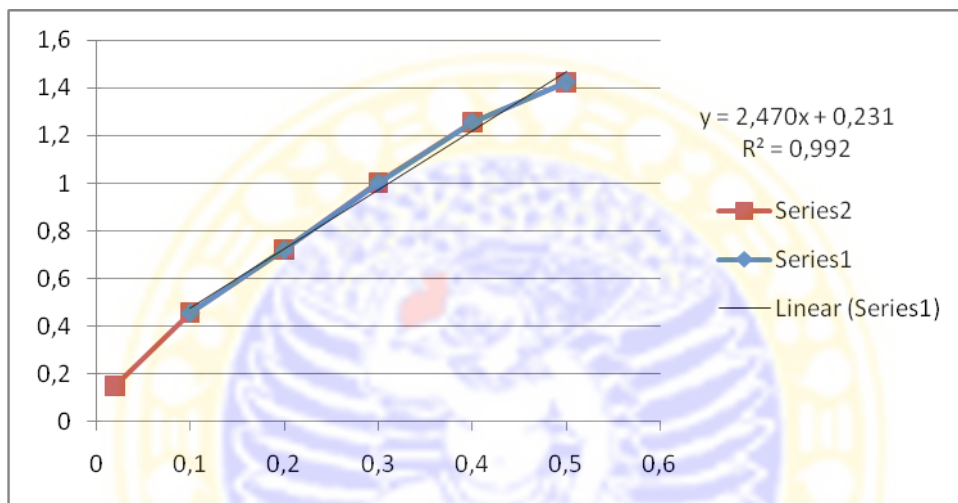
- Huber, K., 2006, **Homology Modelling via Protein Threading**, <http://ecs.umass.edu/~mettu/ece697s/lectures/HomologyModeling.pdf>, 1 Desember 2011
- Huey, R., Morris, G. M., 2008, *Using AutoDock4 with AutoDockTools: A Tutorial*, The Script Research Institute, USA
- Jeffries, T.W., 1996, **Biochemistry and Genetics of Microbial Xylanase**, [http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/xylanase\\_review/xyl\\_rev.html#RTFToC3](http://calvin.biotech.wisc.edu/jeffries/xylanase_review/xyl_rev.html#RTFToC3), 28 November 2011
- Kaapro, A., Ojanen J., 2002, **Protein Docking**, <http://Ice.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf>, 5 Desember 2011
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahren, K. G., 2000, *Biochemistry, 3<sup>rd</sup> edition*, Addison Wesley Publishing Company, San Francisco, p. 187
- Page, D. S., 1997, *Prinsip-prinsip Biokimia, Edisi kedua*, diterjemahkan oleh Drs. R. Soendoro, Erlangga, Jakarta, hal. 22
- Paturau, J.M., 1969, **By-Products Of The Cane Sugar Industry, An Introduction To Their Industrial Utilization**, Elseveir Publishing Company, New York
- Puspaningsih, N. N. T., 2004, **Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di *E. coli* DH5 $\alpha$** , Penelitian S3, IPB Bogor dan JSPS Short-course Program, September-November, Mie University, Jepang
- Richana, N., 2002, **Produksi dan Prospek Enzim Xilanase dalam Pengembangan Bioindustri di Indonesia**, *Bulletin Agrobio*, Vol 5(1):29-36

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Santoso, H., 2008, **Protein dan Enzim**, <http://www.heruswn.teachnology.com>, 30 November 2011
- Schwede, T., Sali. A., Eswar, N., Peitsch, M.C., 2008, **Protein Structure Modeling**. In *Computational Structural Biology*, (eds. T. Schwede, and M.C. Peitsch, World Scientific Publishing, Singapore
- Stryer, L., Berg, J. M., Tymoczko, J. L., 2007, *Biochemistry, 5<sup>th</sup> edition*, W. H. Freeman and Company, New York
- Tillman, A.D., 1984, *Ilmu Makanan Ternak Dasar Cetakan Kedua*, diterjemahkan oleh Hartadi H, Reksohadiprodjo S, Prawirokusumo S, Lebdoesoekojo, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Yazid, E., Nursanti, L., 2006, *Penuntun Praktikum Biokimia*, Penerbit Andi, Yogyakarta

## Lampiran 1. Hasil Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 terhadap pNP-X dan Xilooligosakarida (metode DNS)

*Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 terhadap pNP-X*

Kurva Standar pNP



$y = \text{Absorbansi sampel rata-rata} = 0,810$

Dimasukkan dalam persamaan  $y = 2,470x + 0,231$

$$\text{Nilai } x : x = \frac{y - 0,231}{2,47} = \frac{0,810 - 0,231}{2,47} = 0,23$$

$y = \text{Absorbansi kontrol} = 0,419$

$$\text{Nilai } x : x = \frac{0,419 - 0,231}{2,47} = 0,076$$

Hasil perhitungan di atas digunakan pada rumus perhitungan uji aktivitas sebagai

$$\text{berikut: } \text{Aktivitas} \left( \frac{U}{ml} \right) = \frac{(ks - kk) \times fp \times 20}{t \times BM}$$

Keterangan:

Fp = faktor pengenceran

t = Waktu

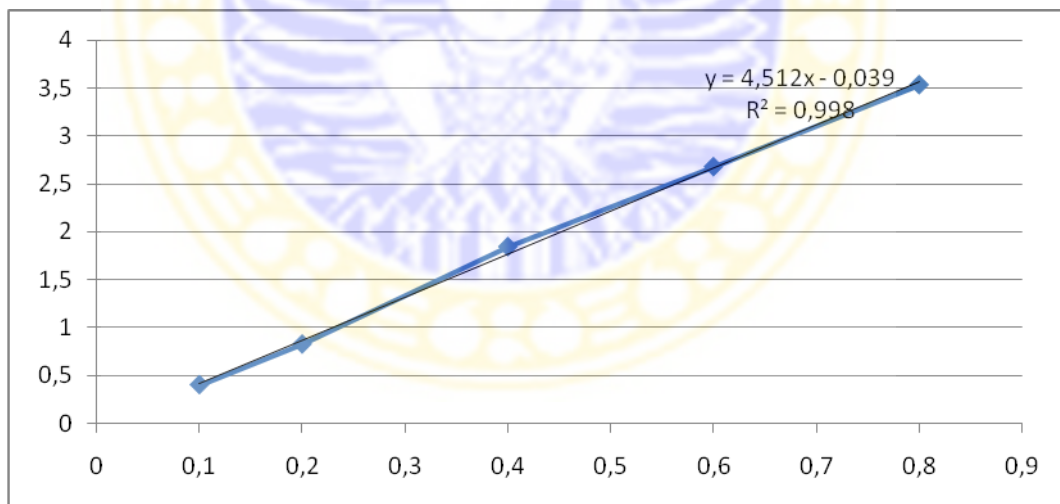
BM = berat molekul

$$x = \frac{(0,23 - 0,076) \times 1000 \times 20}{30 \times 139,11} = 0,730$$

Jadi, didapat nilai aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 : 0,730 U/ml

*Hasil) Perhitungan Aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 terhadap pNP-X dan Xilooligosakarida (metode DNS)*

Kurva standar xilosa



y = Absorbansi sampel rata-rata = 2,039

Dimasukkan dalam persamaan  $y = 4,512x - 0,039$  (kurva standar xilosa)

$$\text{Nilai } x : x = \frac{y + 0,039}{4,512} = \frac{2,039 + 0,039}{4,512} = 0,464$$

$y = \text{Absorbansi kontrol} = 1,82$

$$\text{Nilai } x : x = \frac{1,82 + 0,039}{4,512} = 0,412$$

Hasil perhitungan di atas digunakan pada rumus perhitungan uji aktivitas sebagai

berikut:  $\text{Aktivitas} \left( \frac{U}{ml} \right) = \frac{(ks - kk) \times fp \times 20}{t \times BM}$

Keterangan:

Fp = faktor pengenceran

t = waktu inkubasi

BM = berat molekul

$$x = \frac{(0,464 - 0,412) \times 1000 \times 20}{60 \times 150} = 0,054$$

Jadi, didapat nilai aktivitas Enzim Eksoxilanase IT-08 : 0,054 U/ml



## Lampiran 2. Metode Pembuatan Buffer *Phospate Citrat* pH 6

Membuat larutan stok asam sitrat 0,1 M

$$\begin{aligned}M &= M \times V \times Mr \\ &= 0,1 \times 50 \times 192,13 \\ &= 960,65 \text{ mg} = 0,96 \text{ g}\end{aligned}$$

Membuat larutan stok  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2M

$$\begin{aligned}M &= M \times V \times Mr \\ &= 0,2 \times 50 \times 178 \\ &= 1870 \text{ mg} = 1,78 \text{ g}\end{aligned}$$

0,96 g Asam Sitrat  
+  
1,78 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

} Dilarutkan dalam  
labu ukur 50 ml



### Lampiran 3. Metode Pembuatan Larutan DNS

1 g NaOH dalam 60 ml aquades + 18,2 g Rochele + 1 g DNS



Diaduk perlahan menggunakan stirer



+ 0,2 g Fenol + 0,05 g Natrium Sulfit



Diencerkan pada labu ukur 100 mL sampai tanda batas, kocok hingga homogen

