



**INTERAKSI ENZIM β -XILOSIDASE DENGAN XILOOLIGOSAKARIDA:
KAJIAN *IN SILICO***

SKRIPSI

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

OLEH :

LULU'ATUL HAMIDATU ULYA

NIM: 080810133

Tanggal Lulus :

16 Juli 2012

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**

LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

Judul : Interaksi Enzim β -xilosidase dengan Xilooligosakarida:
Kajian *In Silico*
Penyusun : Lulu'atul Hamidatu Ulya
NIM : 080810133
Pembimbing I : Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si
Pembimbing II : Drs. Hery Suwito, M.Si
Tanggal Ujian : 16 Juli 2012

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 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.

Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat-Nya kepada penyusun sehingga dapat menyelesaikan naskah skripsi yang berjudul “Interaksi Enzim β -xilosidase dengan Xilooligosakarida: Kajian *In Silico*” 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 ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Dr. Sri Sumarsih, M. Si selaku dosen penguji I dan Drs. Yusuf Syah, M.S selaku dosen penguji II yang telah memberikan banyak masukan dan saran untuk naskah skripsi ini.
3. Kedua orang tua penyusun yang telah memberikan kasih sayang, semangat, nasihat, dukungan dan do'a selama penyusunan naskah skripsi.
4. Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan nasihat, semangat dan arahan untuk kelancaran proses studi S1 Kimia.
5. Kementrian Agama Republik Indonesia yang telah memberikan beasiswa penuh selama penulis menempuh studi S1 di Universitas Airlangga.
6. Seluruh staf pengajar program studi S1 Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi yang telah memberikan bekal ilmu yang semoga memberikan manfaat di kemudian hari.

7. Teman-teman kelompok penelitian biokimia yang saling memberikan semangat, dukungan dan saran dalam proses penyusunan skripsi.
8. Teman-teman kelompok penelitian organik, analitik, anorganik dan fisik yang saling memberikan semangat dalam proses penyelesaian skripsi.
9. Teman-teman penerima PBSB (Program Beasiswa Santri Berprestasi) Kemenag RI di Universitas Airlangga yang telah berjuang bersama-sama dari awal matrikulasi hingga saat ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penyusun menerima segala kritik dan saran yang membangun sehingga dapat menyempurnakan dalam penulisan skripsi di kemudian hari. Semoga naskah skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Surabaya, Juli 2011

Penyusun

Lulu'atul Hamidatu Ulya

Ulya, L. H., 2012, Interaksi Enzim β -xilosidase dengan Xilooligosakarida: Kajian *In Silico*. Skripsi ini dibawah bimbingan Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si dan Drs. Hery Suwito, M.Si. Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Enzim β -xilosidase tergolong dalam kelompok xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa. Pada penelitian ini, dilakukan *docking* enzim β -xilosidase dengan substrat *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosida (pNP-X) dan substrat xilooligosakarida rantai pendek (X_2 - X_3) serta uji aktivitas enzim β -xilosidase untuk validasi hasil *docking*. Dari hasil uji aktifitas enzim β -xilosidase, aktivitas pada substrat pNP-X lebih besar daripada pada substrat xilooligosakarida. Dari hasil *docking* menggunakan *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4* afinitas pengikatan kompleks enzim β -xilosidase-pNP-X lebih kecil daripada kompleks enzim β -xilosidase-xilooligosakarida dan koefisien inhibisi kompleks enzim β -xilosidase-pNP-X lebih besar daripada kompleks enzim β -xilosidase-xilooligosakarida. Hasil kajian *in silico* yang diperoleh dari *docking* antara enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida menunjukkan hasil yang sesuai dengan hasil validasi secara laboratoris.

Kata Kunci : enzim β -xilosidase, xilooligosakarida, pNP-X, *docking*, kompleks enzim-substrat

Ulya, L. H., 2012, Interaction of β -xylosidase and Xylooligosaccharide: *In Silico* Study. Final project is under advisement of Prof. Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, M.Si and Drs. Hery Suwito, M.Si. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Airlangga University

ABSTRACT

β -xylosidase is one of xylanase which hydrolyse short xylooligosaccharide to free xylose. In this research, β -xylosidase was docked to p -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (pNP-X) and short xylooligosaccharide (X₂-X₃), and also enzyme activity assay of β -xylosidase is used to docking result validation. The result from β -xylosidase activity assay, the activity at pNP-X substrate is greater than xylooligosaccharide substrate. The result from docking using *AutoDock Vina* and *AutoDock 4*, binding affinity of β -xylosidase-pNP-X complex is smaller than β -xylosidase-xylooligosaccharide complex and inhibition coefficients of β -xylosidase-pNP-X complex is greater than β -xylosidase-xylooligosaccharide complex. The result of *in silico* study from *docking* between β -xylosidase with pNP-X substrate and xylooligosaccharide substrate shows suitability with the validation using wet laboratory.

Keywords : β -xylosidase, xylooligosaccharide, pNP-X, *docking*, enzyme-substrate complex

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Protein	5
2.1.1 Asam amino penyusun protein	5
2.1.2 Struktur protein	8
2.3 Enzim β -xilosidase.....	10
2.2 Pemodelan Protein	11
2.3 Protein <i>Docking</i>	13
2.4 Identifikasi Sisi Aktif.....	15
BAB III METODE PENELITIAN	17
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	17
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	17
3.2.1 Bahan penelitian secara laboratoris.....	17
3.2.2 Bahan penelitian <i>in silico</i>	17
3.2.3 Alat penelitian secara laboratoris.....	18
3.2.4 Alat penelitian <i>in silico</i>	18
3.3 Diagram Alir Penelitian.....	19
3.4 Prosedur Penelitian	20
3.3.1 Isolasi enzim β -xilosidase.....	20
3.3.1.1 Pembuatan media padat.....	20
3.3.1.2 Pembuatan media cair	20
3.3.1.3 Produksi enzim β -xilosidase	20
3.3.2 Uji aktivitas enzim β -xilosidase.....	21
3.3.2.1 Uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat <p style="margin-left: 20px;">p-nitrofenil β-D-xilopiranosida</p>	21

3.3.2.2 Uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida (metode DNS).....	22
3.3.3 Protein <i>docking</i>	23
3.3.3.1 <i>Docking</i> menggunakan <i>AutoDock 4</i>	23
3.3.3.1.1 Persiapan ligan.....	23
3.3.3.1.2 Persiapan makromolekul	24
3.3.3.1.3 <i>Autogrid</i>	24
3.3.3.1.4 <i>Autodock</i>	25
3.3.3.2 <i>Docking</i> menggunakan <i>AutoDock Vina</i>	26
3.3.3.2.1 Persiapan ligan.....	26
3.3.3.2.2 Persiapan makromolekul	26
3.3.3.2.3 Persiapan parameter <i>grid</i>	27
3.3.3.2.4 <i>Docking AutoDock Vina</i>	28
3.3.3.3 Analisis hasil <i>docking</i>	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Isolasi Enzim β -xilosidase	29
4.2 Uji Aktivitas Enzim β -xilosidase	30
4.2.1 Uji Aktivitas Enzim β -xilosidase dengan substrat p -nitrofenil- β -D-xilopiranosida	30
4.2.2 Uji Aktivitas Enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida	31
4.3 Analisis Hasil Eksperimen <i>In Silico</i>	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

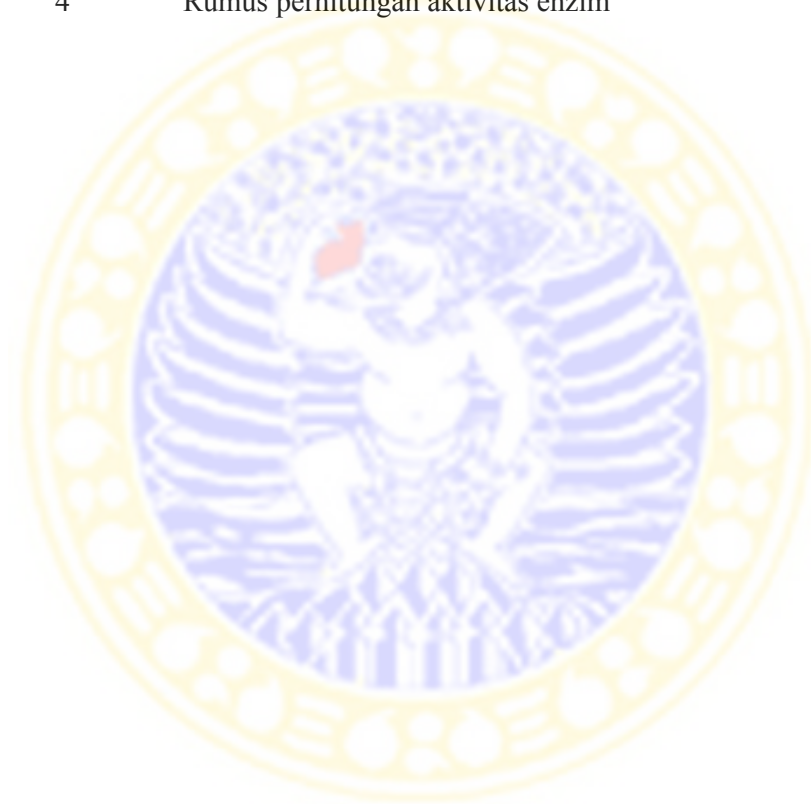
Nomor	Judul Tabel	Halaman
2.1	Struktur 20 asam amino.....	6
2.2	Data protein dari <i>Protein Data Bank</i> (PDB).....	12
4.1	Hasil uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X.....	30
4.2	Hasil uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida.....	32
4.3	Hasil analisis <i>docking</i> menggunakan <i>AutoDock Vina</i> dan <i>AutoDock 4</i>	34

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
2.1	Struktur umum asam amino.....	5
2.2	Struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener dari protein.....	9
2.3	(I) Struktur β -xilosidase dari <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08 yang tersusun atas a) domain β -sandwich dan b) 5-bladed β -propeller (II) Domain 5-bladed β -propeller dengan sisi katalitik β -xilosidase dari <i>Geobacillus thermoleovorans</i> IT-08. Residu katalitik: Glu-177, Asp-14, dan Asp-121.....	11
4.1	Mekanisme reaksi hidrolisis enzim β -xilosidase terhadap substrat pNP-X (a) terhadap substrat xilobiosa (b).....	38

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul Lampiran
1	Cara membuat bufer fosfat sitrat pH 6
2	Kurva standar ρ -nitrofenol
3	Kurva standar xilosa
4	Rumus perhitungan aktivitas enzim



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia mempunyai biodiversitas mikroorganisme yang dapat digunakan dalam pengembangan IPTEK yang bernilai ekonomis. Kemajuan ilmu bioteknologi saat ini memacu kreativitas para peneliti untuk memanfaatkan keanekaragaman mikroorganisme dalam berbagai bidang, seperti industri pangan, peternakan, bioenergi, lingkungan dan kesehatan. Pemanfaatan mikroba meliputi produk hasil metabolisme ataupun enzim (Anam, 2009).

Salah satu enzim yang seringkali dimanfaatkan adalah enzim penghidrolisis hemiselulosa. Enzim penghidrolisis hemiselulosa banyak digunakan dalam industri pulp dan kertas ataupun industri *feedstock* (Buchert *et al.*, 1992). Salah satu enzim yang dapat mendegradasi hemiselulosa adalah enzim β -xilosidase. Enzim β -xilosidase tergolong dalam kelompok xilanase yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida rantai pendek menjadi xilosa (Reilly, 1991; Dekker, 1983). Enzim β -xilosidase berperan sebagai pengganti cara kimia pada proses *bleaching* sehingga pencemaran racun limbah kimia dapat dihindari dan biaya pengolahan limbah lebih murah (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995).

Pada tahun 2004, Puspaningsih telah berhasil mengklon gen penyandi enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 ke dalam sel inang *E.coli* DH5 α , dan diperoleh satu klon positif yang diberi nama pTP510. Klon ini mampu mengekspresikan tiga macam enzim xilanolitik yaitu: β -xilosidase, α -L-

arabinofuranosidase, dan ekso-xilanase. Gen penyandi β -xilosidase telah berhasil disubklonkan dari pTP510 ke sistem pET101/DTOPO dalam inang *E.coli* BL21 (DE3 star) dan disebut pETxyl. pETxyl bersifat termostabil dengan menunjukkan kestabilan pada suhu 50°C dan menunjukkan aktivitas optimum pada pH 6. Aktivitas yang dimiliki enzim β -xilosidase 2,37 U/mL sebelum pemurnian dan 14,3 U/mL setelah pemurnian optimum pada pH 6 dengan stabilitas pH 5-7.

Namun, enzim β -xilosidase tersebut belum ditentukan struktur 3D-nya. Sehingga, untuk mendapatkan struktur 3D enzim β -xilosidase, maka Amalina (2011) membuat pemodelan struktur 3D enzim β -xilosidase dengan membandingkan pemodelan enzim β -xilosidase menggunakan metode homologi dan metode *threading*, dan diperoleh model terbaik menggunakan metode homologi dengan *multiple template*. Selain itu, Amalina (2011) juga menganalisis pengaruh mutasi D121N dan D139N terhadap kompleks enzim β -xilosidase-substrat pNP-X melalui *docking* protein. Akan tetapi, akurasi pemodelan enzim β -xilosidase yang dilakukan oleh Amalina (2011) belum diketahui validitasnya.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka pada penelitian ini akan dilakukan validasi menggunakan uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X secara laboratoris. Selain menguji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X, juga akan dilakukan uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida yang merupakan substrat sintesis yang dapat mewakili substrat alam.

Tahap berikutnya, dilakukan *docking* enzim β -xilosidase dengan variasi substrat xilooligosakarida rantai pendek (X_2 - X_3) dan dibandingkan hasilnya

dengan hasil *docking* enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X yang telah dibuat oleh Amalina (2011). Hasil *docking* yang diperoleh selanjutnya dianalisis untuk mengetahui interaksi antara enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida rantai pendek (X_2 - X_3) dan menentukan residu katalitiknya serta asumsi mekanisme reaksi hidrolisis yang terjadi. Program yang digunakan untuk *docking* pada penelitian ini ada dua macam yaitu *AutoDock 4* dan *AutoDock Vina*. Visualisasi hasil *docking* dilakukan dengan program *PyMol*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah akurasi hasil kajian *in silico* interaksi enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida jika dibandingkan dengan hasil kajian secara laboratoris?
2. Residu asam amino manakah yang menjadi residu katalitik pada enzim β -xilosidase?
3. Bagaimanakah asumsi mekanisme reaksi yang terjadi antara residu katalitik β -xilosidase dengan substratnya?

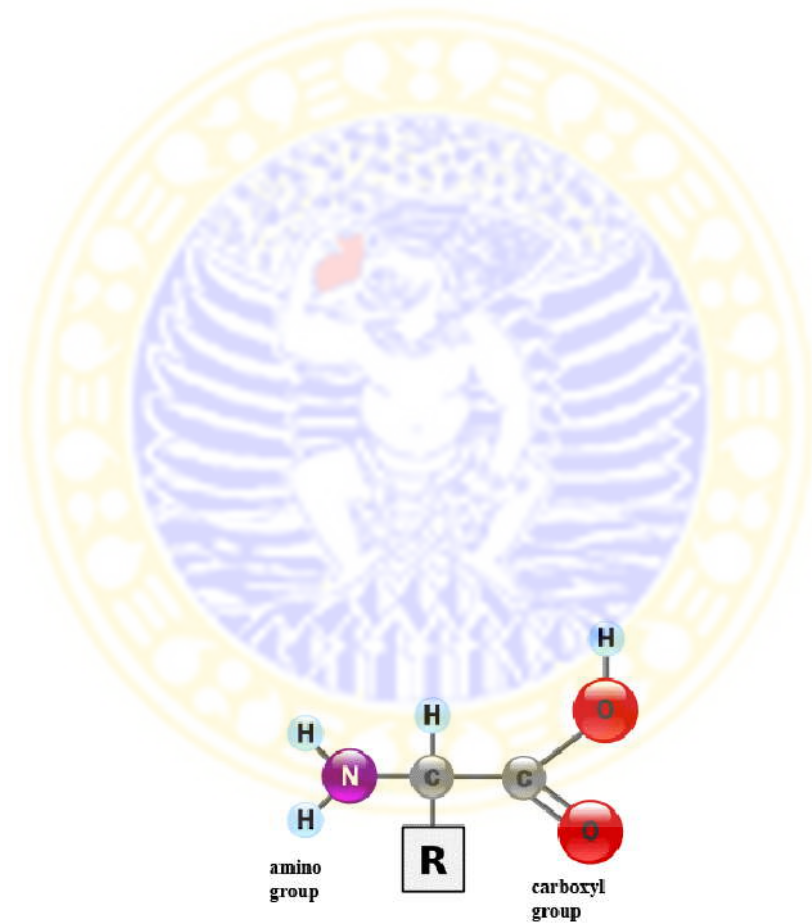
1.3 Tujuan

1. Mengetahui akurasi hasil kajian *in silico* interaksi enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida jika dibandingkan dengan hasil kajian secara laboratoris.
2. Menentukan residu asam amino yang menjadi residu katalitik pada enzim β -xilosidase.

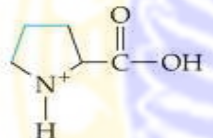
3. Memprediksi asumsi mekanisme reaksi yang terjadi antara residu katalitik β -xilosidase dengan substratnya.

1.4 Manfaat

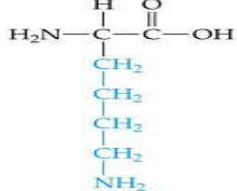
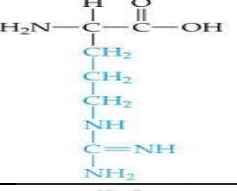
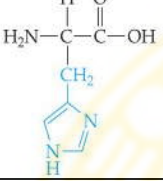
Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui akurasi hasil kajian *in silico* interaksi enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida jika dibandingkan dengan hasil kajian secara laboratoris, dan dari hasil kajian *in silico* dapat ditentukan residu katalitiknya yang nantinya dapat digunakan untuk memprediksi asumsi mekanisme reaksi yang terjadi antara enzim β -xilosidase dengan substratnya, sehingga dapat memudahkan dalam pengembangan rekayasa genetika lebih lanjut.



Tabel 2.1 Struktur 20 Asam Amino

Struktur Asam Amino	Nama	Singkatan 3 Huruf	Singkatan 1 Huruf
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Alanin	Ala	A
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Valin	Val	V
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Leusin	Leu	L
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Isoleusin	Ile	I
	Prolin	Pro	P
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$	Fenilalanin	Phe	F
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$	Triptofan	Trp	W
$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N} \quad \text{C} \quad \text{C} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Metionin	Met	M
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	Glisin	Gly	G

$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Serin	Ser	S
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Treonin	Thr	T
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$	Sistein	Cys	C
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Tirosin	Tyr	Y
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Asparagin	Asn	N
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	Glutamin	Gln	Q
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Aspartat	Asp	D
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Glutamat	Glu	E

	Lisin	Lys	K
	Arginin	Arg	R
	Histidin	His	H

2.1.2 Struktur protein

Terdapat 4 tingkat struktur dari protein yaitu primer, sekunder, tersier dan kuartener (Murray, 2000).

a. Struktur primer

Struktur primer suatu protein adalah urutan linear asam amino yang disatukan oleh ikatan peptida.

b. Struktur sekunder

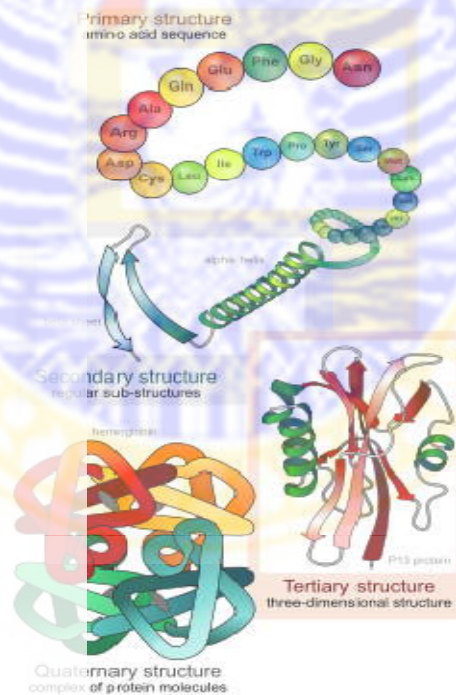
Terdapat 3 macam struktur sekunder yaitu α -heliks, β -sheet dan *loop*. Struktur α -heliks terjadi akibat adanya ikatan hidrogen antara atom-atom dalam satu rantai, struktur β -sheet terjadi akibat adanya ikatan hidrogen antara atom-atom dari dua rantai yang berbeda dan struktur *loop* terjadi akibat adanya ikatan hidrogen antara atom-atom yang jaraknya jauh dalam satu rantai sehingga dapat membentuk *loop*.

c. Struktur tersier

Terjadi karena adanya pelipatan polipeptida dari struktur sekunder, yang difasilitasi oleh adanya gugus R residu asam amino.

d. Struktur kuartener

Terdiri dari subunit yang disatukan oleh jenis interaksi nonkovalen yang sama dengan yang berperan dalam struktur tersier yaitu interaksi elektrostatis dan hidrofobik serta ikatan hidrogen. Protein yang tersusun dari dua atau empat subunit masing-masing disebut protein dimerik atau tetramerik.



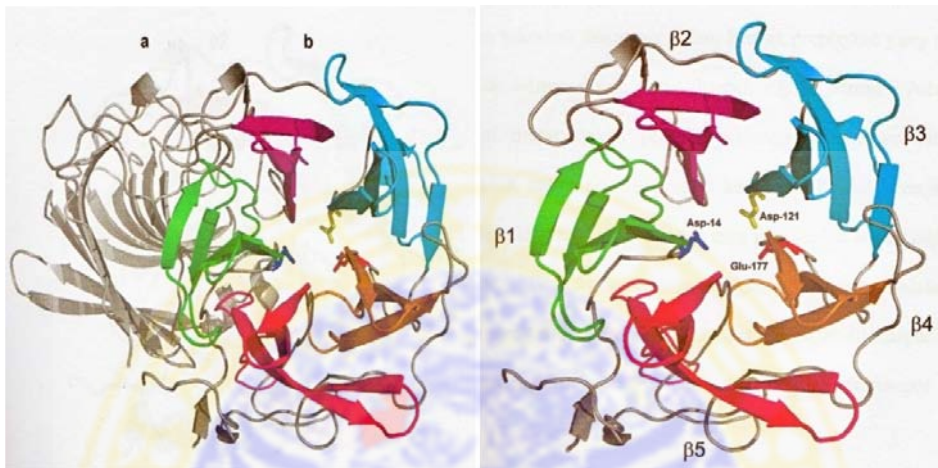
Gambar 2.2 Struktur primer, sekunder, tersier dan kuartener dari protein (Stryer, 2007)

2.2 Enzim β -xilosidase

Enzim 1,4- β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) kadangkala disebut dengan 1,4- β -D-xilan xilohidrolase. Nama lain dari 1,4- β -D-xilosidase adalah xilobiase dan ekso-1,4- β xilosidase. Enzim ini terlibat dalam hidrolisis xilooligosakarida. Enzim β -xilosidase merupakan enzim xilanolitik yang mampu menghidrolisis xilooligosakarida (terutama xilobiosa) dari ujung non-pereduksi menjadi xilosa-xilosa (Dodd & Cann, 2009).

Enzim β -xilosidase telah disekuensing dan dikarakterisasi dari berbagai macam spesies fungi berfilamen. Di antaranya yaitu *xylA* dari *Aspergillus oryzae* (Kitamoto *et al.*, 1999) dan *xylII* dari *Aureobasidium pullulans* strain ATCC 20524 (Ohta *et al.*, 2010) yang termasuk dalam famili 3 glikosida hidrolase (GH). β -xilosidase dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 termasuk famili GH43. Pusparningsih (2004) telah berhasil mengklon gen penyandi enzim xilanolitik dari *Geobacillus thermoleovorans* IT-08 ke dalam sel inang *E. coli* DH5 α , dan didapatkan satu klon positif yang diberi nama pTP510. Klon ini mampu mengekspresikan tiga macam enzim xilanolitik yaitu: β -xilosidase, α -L-arabinofuranosidase, dan eksoxilanasase. Gen penyandi β -xilosidase telah berhasil disubklon dari pTP510 ke sistem pET101/DTOPO dalam inang *E. coli* BL21 (DE3 star) dan disebut pETxyl yang bersifat termostabil dengan menunjukkan kestabilan pada suhu 50°C.

Penggunaan enzim β -xilosidase telah dimanfaatkan pada industri karena dapat mengurangi biaya produksi dan dampak lingkungan dalam beberapa aplikasi bioteknologi seperti pemutihan kertas dan industri pulp (Beg *et al.*, 2001;



Pengetahuan struktur tiga-dimensi (3D) protein memberikan wawasan yang sangat bermanfaat untuk fungsi protein. Rancangan eksperimen yang bertujuan untuk memahami mekanisme molekuler seperti *site-directed mutagenesis*, pemetaan penyakit yang berkaitan dengan mutasi, dan rancangan struktur berbasis inhibitor spesifik sangat dipengaruhi oleh pengetahuan tentang penataan ruang residu kunci asam amino dalam keseluruhan struktur 3D protein (Schewede *et al.*, 2008). Sampai saat ini, sudah ada 77.394 percobaan struktur protein yang telah dirilis oleh PDB yang dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Data Protein dari *Protein Data Bank* (PDB)

Metode Penelitian	\sum Protein	\sum NA (<i>Nucleic Acid</i>)	\sum Komplek Protein/NA	Lain-lain	Total
X-RAY	63259	1323	3075	2	67659
NMR	7994	962	181	7	9144
EM	266	22	101	0	389
HYBRID	42	3	1	1	47
Lain-lain	133	4	5	13	155
Total	71694	2314	3363	23	77394

Sumber: www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do

Metode pemodelan protein untuk memprediksi struktur 3D protein menjadi fokus penelitian. Prediksi struktur 3D protein dari urutan asam amino menjadi permasalahan ilmiah mendasar dan menjadi pertimbangan sebagai tantangan dalam biologi dan kimia komputasi. Terdapat empat tipe pendekatan berbeda yang biasa digunakan untuk memprediksi struktur 3D asam amino, yaitu (Schwede *et al.*, 2008):

- a. Metode komparatif atau homologi (*homology method*), merupakan pendekatan yang paling akurat. Metode ini menggunakan peruraian struktur secara

eksperimental dari famili protein sebagai cetakan untuk memodelkan struktur protein yang diinginkan. Metode homologi dapat digunakan jika cetakan dari struktur yang diketahui telah tersedia struktur cetakan hasil eksperimental yang sebelumnya.

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

2.4 Protein Docking

Docking mempelajari bagaimana interaksi dua struktur molekul atau lebih, misalnya obat dan enzim atau protein reseptor. Dengan kata lain, permasalahan

yang ada seperti menyelesaikan puzzle 3-dimensi. Contoh permasalahan yang terjadi seperti protein yang berbahaya bagi tubuh dapat dihambat dengan penemuan inhibitor yang terikat pada protein. *Software docking* molekuler sebagian besar digunakan pada industri obat-obatan. Aplikasi yang paling utama dari *software docking* adalah penapisan secara virtual. Pada penapisan secara virtual, molekul yang paling menarik dan menjanjikan dipilih dari basis data yang ada untuk penelitian lebih lanjut. Hal ini memerlukan penggunaan metode komputasional yang cepat dan dapat diandalkan. Aplikasi lain dari *docking* molekuler adalah penelitian molekul kompleks (Kaapro & Ojanen, 2002).

Docking molekuler biasanya digunakan untuk memprediksi struktur kompleks yang dibentuk antara dua molekul atau lebih, baik berupa protein-protein, protein-ligan, maupun ligan-ligan. Ligan merupakan molekul kecil yang berinteraksi dengan protein pada sisi pengikatannya. Sisi pengikatan protein adalah sisi aktif dari suatu protein yang dapat membentuk suatu senyawa, di mana dapat terbentuk konformasi dari ikatan yang muncul. Hal ini biasanya disebut modus pengikatan (Kaapro & Ojanen, 2002).

Ada dua permasalahan dalam *docking*, yang pertama yaitu perkembangan fungsi *scoring*/fungsi energi yang dapat membedakan secara benar atau mendekati benar orientasi *docking* dari orientasi *docking* yang tidak benar, yang kedua yaitu pengembangan metode penelitian yang akan dapat menemukan orientasi *docking* yang mendekati benar dengan kemungkinan yang layak. Metode yang paling sederhana, tapi masih sering digunakan adalah fungsi *scoring* yang merupakan

bentuk komplementer. Untuk menggunakan ini, butuh menggambarkan bentuk permukaan protein (Connoly, 1983; Sanner *et al.*, 1996).

Software docking yang biasa digunakan adalah AutoDock, DOCK, FlexX, dan Gold (Kaapro & Ojanen, 2002). Kualitas aplikasi *docking* bergantung pada nilai fungsi dalam mengevaluasi konformasi ligan yang mungkin dan pencarian metode yang efisien untuk menemukan energi afinitas minimum dari kompleks protein-ligan. Idealnya, antara molekul ligan dan protein membutuhkan pemodelan yang fleksibel dalam menentukan energi ikatan kompleks protein-ligan untuk membuat simulasi *docking* secara nyata (Stefan *et al.*, 2008).

2.5 Identifikasi Sisi Aktif

Burgyone dan Jackson (2006) membandingkan kekuatan prediksi dari perbedaan sifat permukaan dan menemukan bahwasannya lebih mudah untuk identifikasi perkiraan hubungan protein-ligan dibandingkan hubungan protein-protein. Deteksi sisi ikat dan sifat desolvasi, seperti halnya konservasi urutan dan beberapa potensial elektrostatik telah diidentifikasi sebagai sinyal yang paling kuat untuk memprediksi hubungan antara protein-ligan.

Sejak sisi pengikatan ligan terlibat dalam banyak kasus yang ada pada lengkung sisi pengikatan di permukaan protein, deteksi ruang pengikatan atau rongga protein pantas mendapatkan perhatian yang khusus. Kadangkala, daerah lengkung seringkali kurang ditemukan pada permukaan protein dan sedikit tipe permukaan yang berlingkung untuk hubungan protein-protein. Beberapa

algoritma berdasarkan prinsip deteksi yang berbeda telah didisain dalam kurun waktu terakhir (Leis *et al.*, 2010).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Komputer Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Proteomik Lembaga Penyakit Tropis (LPT) Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dimulai dari bulan Februari hingga Juni 2012.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Bahan penelitian secara laboratoris

Isolat yang digunakan untuk memproduksi enzim β -xilosidase adalah *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pETxyl), media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB), *bactoagar*, tripton, NaCl, *yeast extract*, akuades, ampisilin (100 μ g/mL), IPTG (Isopropil Tio Galakto Piranosa) 0,4 M, bufer fosfat sitrat pH 6, substrat ρ -nitrofenil- β -D-xilopiranosida (pNP-X), Na₂CO₃ 0,4 M, ρ -nitrofenol 10 mM, pereaksi DNS dan substrat xilooligosakarida.

3.2.2 Bahan penelitian *in silico*

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah model 3-D enzim β -xilosidase dari metode homologi dengan *multiple template* (Amalina, 2011) dan struktur ligan xilooligosakarida rantai pendek (X₂-X₃).

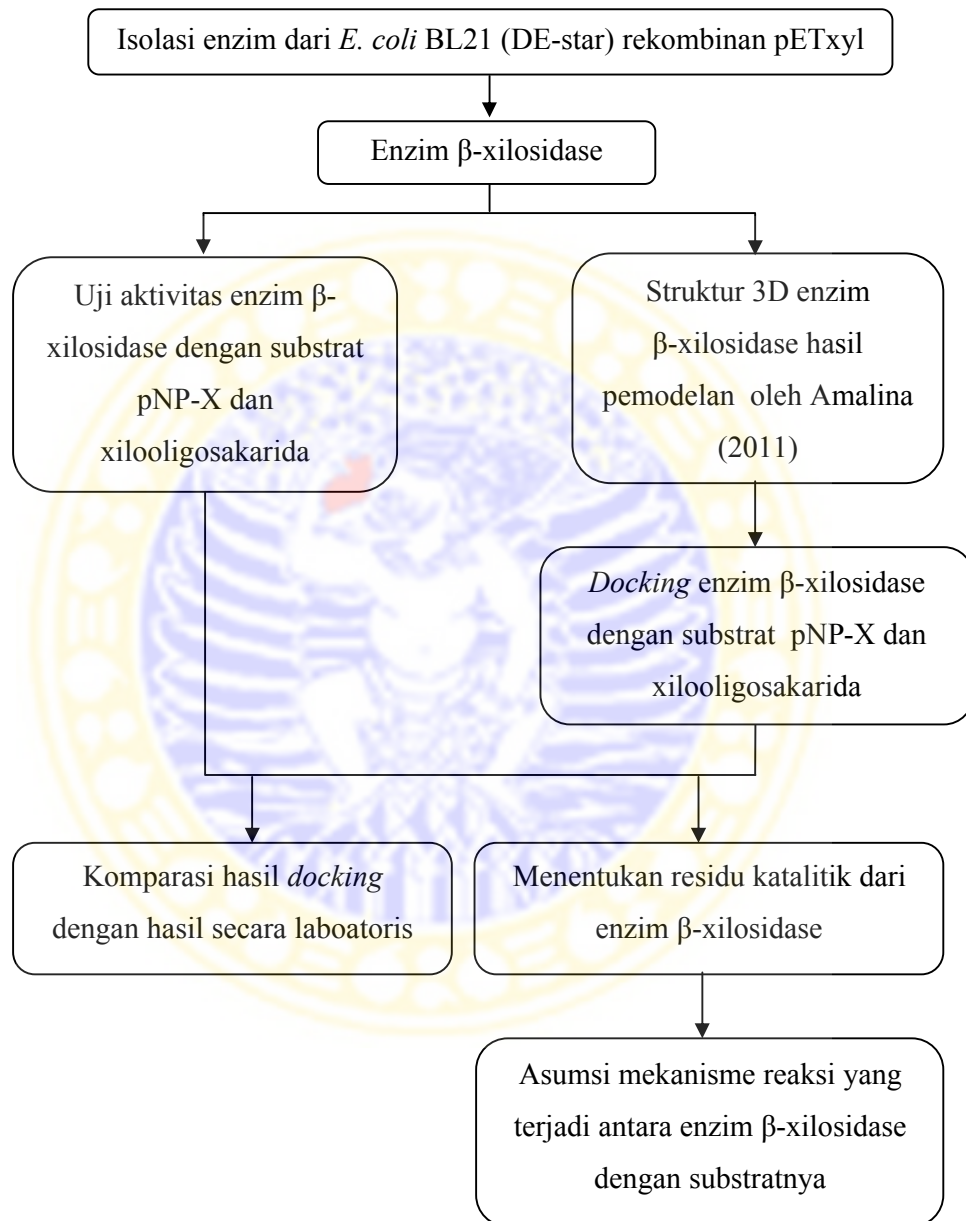
3.2.3 Alat penelitian secara laboratoris

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: labu Erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet, cawan petri, pembakar spiritus, shaker, gunting, spatula, autoklaf, tabung Eppendorf, *valcon*, gelas *beaker*, laminar, Spektrofotometer UV-Vis dan neraca timbangan.

3.2.4 Alat penelitian *in silico*

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *netbook Acer Intel Atom* 1,60 GHz dengan RAM 1 Gb; flashdisk 4 G; program *ChemDraw Ultra* untuk menggambar ligan, *software Accelrys Visualizer 2.5* dan *AutoDock Tools* digunakan untuk menyiapkan molekul enzim dan substrat, *AutoDock 4* dan *AutoDock Vina* digunakan untuk menampilkan hasil interaksi antara enzim dan substrat melalui nilai afinitas dan energi bebas pengikatan, kemudian analisis hasil yang diperoleh menggunakan *AutoDock Tools* untuk hasil dari *AutoDock 4* dan *PyMol* untuk hasil dari *AutoDock Vina*.

3.4 Diagram Alir Penelitian



3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Isolasi enzim β -xilosidase

3.3.1.1 Pembuatan media padat

Media yang digunakan merupakan media Luria Bertani (LB). Media padat digunakan untuk meremajakan koloni *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pETxyl). Dibuat media padat 20 mL yang berisikan 0,4 g agar, 0,2 g tripton, 0,2 g NaCl, dan 0,1 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 20 mL akuades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit. Media steril yang telah hangat-hangat kuku ditambah dengan 20 μ L ampisilin (100 μ g/mL), dihomogenkan kemudian dituang ke dalam cawan petri (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.1.2 Pembuatan media cair

Media cair yang digunakan adalah media LB. Media cair 100 mL berisikan 1 g tripton, 1 g NaCl, dan 0,5 g *yeast extract*, dilarutkan dalam 100 mL akuades, disterilkan dengan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.1.3 Produksi enzim β -xilosidase

Media inokulum merupakan media cair LB. Inokulum dibuat dengan menginokulasikan masing-masing biakan *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pETxyl) ke dalam 10 mL media inokulum yang mengandung 10 μ L ampisilin (100 μ g/mL). Biakan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 18 jam. Satu persen biakan inokulum dimasukkan ke dalam 100 mL media cair yang sebelumnya telah ditambahkan 100 μ L ampisilin (100 μ g/mL) dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama 2,5 jam. Jika biakan

sudah mencapai absorbansi sebesar 0.7–0.8 pada OD₆₀₀, ditambahkan 250 µL IPTG 0,4 M dan diinkubasi kembali seperti kondisi sebelumnya. Semua sel dipanen setelah waktu inkubasi selesai dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet sel disuspensi dengan 5 mL bufer fosfat sitrat pH 6 dan dilisis dengan ultrasonikator dengan frekuensi 80 Hz selama 2 menit dan diulang 2 kali. Enzim didapat dari supernatan hasil sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.2 Uji aktivitas enzim β-xilosidase

3.3.2.1 Uji aktivitas enzim β-xilosidase dengan substrat ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosida

Sebanyak 100 µL enzim β-xilosidase ditambah 900 µL substrat ρ-nitrofenil-β-D-xilopiranosida 1 mM diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 µL Na₂CO₃ 0,4 M. Kontrol yang digunakan 100 µL akuades dan 900 µL substrat pNP-X diperlakukan sama dengan kondisi sampel di atas. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur konsentrasi ρ-nitrofenol yang bebas. Pengamatan konsentrasi ρ-nitrofenol yang dilepaskan diamati dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 405 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak dua kali (duplo).

Standar ρ-nitrofenol digunakan pada kisaran 0,1-0,5 mM ρ-nitrofenol dari stok ρ-nitrofenol 10 mM dalam pelarut bufer fosfat sitrat pH 6. Dipipet 100 µL masing-masing larutan standar ρ-nitrofenol dicampur dengan 300 µL bufer fosfat pH 6 dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan

menambahkan 600 μL Na_2CO_3 0,4 M. Absorbansi dibaca pada λ 405 nm (Puspaningsih, 2004).

3.3.2.2 Uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida (metode DNS)

Aktivitas enzim β -xilosidase juga ditentukan dengan mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat xilooligosakarida. Dipipet 100 μL substrat xilooligosakarida 1 mM, kemudian ditambah 100 μL enzim xilosidase dan diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit. Hasil inkubasi ditambah dengan 600 μL pereaksi DNS dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada λ 550 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak dua kali (duplo). Komposisi kontrol sama dengan sampel tetapi berbeda dalam hal proses inkubasi serta urutan penambahan masing-masing komposisinya. Perlakuan untuk kontrol dilakukan tanpa proses inkubasi, sedangkan sampel dengan diinkubasi. Urutan penambahan komposisi pada kontrol yaitu enzim yang telah diinaktifkan terlebih dahulu, kemudian DNS dan terakhir ditambahkan substrat.

Standar xilosa dibuat pada kisaran 0,1-1 mg xilosa/mL dari stok xilosa 10 mg/mL. 1 mL masing-masing larutan standar dicampur dengan 1 mL akuades, kemudian ditambah 3 mL pereaksi DNS, dikocok kuat. Tabung dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit, kemudian segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Absorbansi dibaca pada λ 550 nm (Miller, 1959).

3.3.3 Protein docking

3.3.3.1 Docking menggunakan *AutoDock 4*

3.3.3.1.1 Persiapan ligan

Ligan dipersiapkan menggunakan program *AutoDock Tools* (Heuy and Morris, 2008). Ligan xilooligosakarida rantai pendek (X_2 - X_3) diperoleh dengan penggambaran pada program *ChemDraw Ultra* dan disimpan dalam format **.mol*, kemudian dirubah dalam bentuk **.pdb* dengan menggunakan program *Accelrys Visualizer 2.5* dengan cara *Accelrys Visualizer 2.5* dibuka, diklik *chemistry hydrogen* → *add*, disimpan dalam format **.pdb*. Tahap-tahap 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*.
- h. Dilakukan untuk masing-masing xilooligosakarida rantai pendek.

3.3.3.1.2 Persiapan makromolekul

Makromolekul hasil pemodelan enzim β -xilosidase disiapkan menggunakan program *AutoDock Tools*. Langkah-langkah yang dilakukan untuk persiapan makromolekul adalah sebagai berikut:

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

3.3.3.1.3 Autogrid

Penentuan parameter *docking* menggunakan tahap *autogrid*, meliputi ukuran dan letak *grid box*. Tahap-tahap yang dilakukan dalam tahap *autogrid* adalah sebagai berikut:

- a. *Grid* \rightarrow *Grid box* dipilih, *Number of Point in X, Y, dan Z* diatur sesuai dengan ukuran sisi aktif protein, *Spacing* (Angstrom) dipilih 1,000, *Center Grid Box X, Y, dan Z* diletakkan pada sisi aktif protein.
- b. *File* \rightarrow *Close Saving Current* diklik.
- c. *Grid* \rightarrow *Output* \rightarrow *Save GPF* diklik.
- d. *Grid* \rightarrow *Edit GPF* \rightarrow *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 (spasi) & [enter]
```

3.3.3.1.4 Autodock

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

- a. *Docking* → *Macromolecule* → *Set Rigid File Name* diklik dan *file Macromolecule* dipilih.
- b. *Docking* → *Ligand* → *Choose* diklik, *Ligand* dipilih.
- 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* (Heuy and Morris, 2008). Ligan xilooligosakarida rantai pendek (X_2 - X_3) diperoleh dengan penggambaran pada program *ChemDraw Ultra* dan disimpan dalam format **.mol*, kemudian dirubah dalam bentuk **.pdb* dengan menggunakan program *Accelrys Visualizer 2.5* dengan cara *Accelrys Visualizer 2.5* dibuka, diklik *chemistry hydrogen* → *add*, disimpan dalam format **.pdb*. Tahap-tahap 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 enzim β -xilosidase disiapkan menggunakan program *AutoDock Tools*. Tahap-tahap 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 letak *grid box*. Tahap-tahap 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]
center_y = [diisi dengan angka]
center_z = [diisi dengan angka]

size_x = [diisi dengan angka]

size_y = [diisi dengan angka]
size_z = [diisi dengan angka]

3.3.3.2.4 Docking AutoDock Vina

Docking AutoDock Vina dilakukan dengan menulis *script* sebagai berikut:

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

3.3.4 Analisis hasil docking

Hasil docking dari *AutoDock 4* dan *AutoDock Vina* dianalisis dengan menggunakan program *AutoDock Tools* dan *PyMOL*. Analisis dilakukan untuk mengetahui interaksi ligan dengan sisi aktif protein dan energi afinitas minimum dari protein-ligan. Kemudian dari hasil docking ini ditentukan akurasinya dibandingkan dengan hasil kajian secara laboratoris.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Enzim β -xilosidase

Penelitian ini diawali terlebih dahulu dengan meremajakan kembali isolat *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pETxyl) penghasil enzim β -xilosidase yang merupakan hasil rekombinan dari penelitian Puspaningsih (2004). Peremajaan isolat ini dilakukan pada media padat Luria Bertani (LB) yang mengandung ampisilin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Selanjutnya isolat tersebut diinokulasi pada media cair dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam, digojog dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *shaker incubator* untuk memperoleh biakan inokulum. Selanjutnya, biakan inokulum dipindahkan ke media produksi yang mengandung ampisilin dan diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu 37°C dengan penggojogan berkecepatan 150 rpm. Setelah 2,5 jam, biakan tersebut diambil dan ditambah dengan 250 μL IPTG 0,4 M yang berfungsi sebagai *inducer* dan diinkubasi kembali seperti kondisi sebelumnya selama 18 jam.

Biakan yang diperoleh dari media cair, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan antara pelet sel dan supernatan. Pelet sel yang diperoleh disuspensi dengan 5 mL bufer fosfat sitrat pH 6, kemudian dilisis dengan ultrasonikator pada frekuensi 80 Hz selama 2 menit dan diulang 2 kali. Enzim diperoleh melalui sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit.

4.2 Uji Aktivitas Enzim β -xilosidase

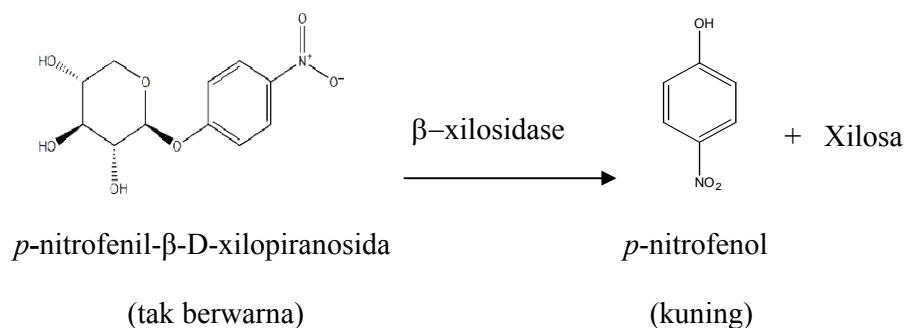
4.2.1 Uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat p -nitrofenil- β -D-xilopiranosida

Enzim β -xilosidase diuji aktivitas hidrolisisnya melalui reaksi antara enzim dengan substrat p -nitrofenil- β -D-xilopiranosida (pNP-X). Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur konsentrasi p -nitrofenol yang dilepaskan (Renganathan *et al*, 1995). Konsentrasi p -nitrofenol yang dilepaskan, diamati dengan Spektrofotometer UV-Vis pada λ 405 nm. Satu unit aktivitas enzim β -xilosidase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1μ mol p -nitrofenol dalam waktu 1 menit pada kondisi percobaan (Krisana *et al.*, 2005). Hasil uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dengan pengenceran 10 kali ditampilkan pada tabel 4.1 berikut.

Tabel 4.1 Hasil uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X

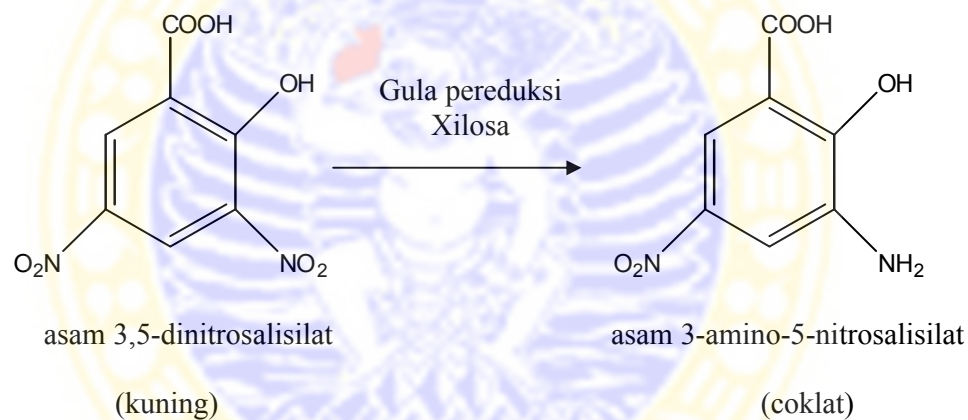
Pengukuran	Absorbansi	Aktivitas (U/ml)
I	0,499	1,534
II	0,495	1,480
Rata-rata		1,507

Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa enzim β -xilosidase ini mempunyai aktivitas yaitu sebesar 1,507 U/ml. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



4.2.2 Uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida menggunakan metode dinitrosalisilat (DNS)

Penentuan aktivitas enzim β -xilosidase dari isolat *E. coli* BL21 (DE-star) rekombinan (pETxyl) dilakukan terhadap substrat xilooligosakarida dengan metode DNS. Substrat xilooligosakarida dihidrolisis menjadi unit xilosa. Xilosa merupakan gula pereduksi yang mampu menghidrolisis larutan DNS sehingga menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Hal ini dapat dilihat dari perubahan warna dari kuning tua menjadi coklat tua. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Pada pengukuran ini, selain sampel juga digunakan kontrol yang berfungsi untuk membandingkan banyaknya produk yang dihasilkan. Komposisi kontrol sama dengan sampel tetapi berbeda dalam hal proses inkubasi serta urutan penambahan masing-masing komposisinya. Perlakuan untuk kontrol dilakukan tanpa proses inkubasi, sedangkan sampel dengan diinkubasi. Urutan penambahan komposisi pada kontrol yaitu enzim yang telah dinaktifkan terlebih dahulu, kemudian DNS dan terakhir ditambahkan substrat. Hal ini bertujuan supaya enzim tidak mampu bereaksi dengan substrat. Sedangkan pada sampel yaitu enzim terlebih dahulu ditambahkan substrat kemudian diinkubasi selama 30 menit

supaya enzim bereaksi dengan substrat kemudian produk hidrolisis direaksikan dengan DNS.

Uji aktivitas menggunakan metode DNS dilakukan dengan menginkubasi enzim dan substrat pada suhu 50°C selama 60 menit. Pada proses tersebut terjadi degradasi xilooligosakarida menjadi xilosa oleh enzim β -xilosidase. Pemanasan dalam air mendidih bertujuan untuk menyempurnakan reaksi dengan DNS, sedangkan air es berfungsi untuk menghentikan reaksi. Banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm (Miller, 1959). Satu unit aktivitas enzim β -xilosidase ini didefinisikan sebagai banyaknya enzim yang diperlukan untuk membentuk 1 μ mol produk per satuan waktu untuk setiap mL enzim (Miller, 1959). Hasil uji aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida dengan pengenceran 10 kali ditunjukkan pada tabel 4.2 berikut.

Tabel 4.2 Hasil uji aktivitas β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida

Pengukuran	Absorbansi	Aktivitas (U/ml)
I	0,764	0,187
II	0,759	0,186
Rata-rata		0,1865

Berdasarkan hasil pengukuran, aktivitas enzim β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida sebesar 0,1865 U/mL. Hal ini menunjukkan bahwa β -xilosidase memiliki aktivitas terhadap substrat xilooligosakarida. Adanya aktivitas terhadap xilooligosakarida menandakan bahwa β -xilosidase memiliki kemampuan menghidrolisis ikatan glikosidik pada xilooligosakarida menghasilkan xilosa (Henrissat dan Bairoch, 1996).

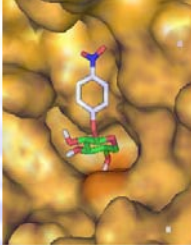

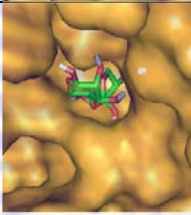
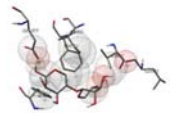
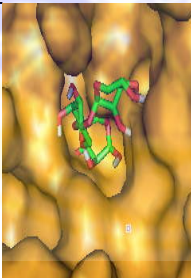
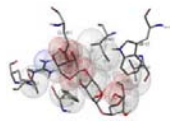
Aktivitas yang diperoleh dari uji aktivitas β -xilosidase dengan substrat xilooligosakarida lebih rendah dari aktivitas β -xilosidase dengan substrat pNP-X. Hal ini menunjukkan bahwa spesifitas substrat pNP-X lebih tinggi daripada substrat xilooligosakarida.

4.3 Analisis Hasil Eksperimen *in silico*

Pada eksperimen ini dilakukan *docking* menggunakan dua program *docking* yaitu *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4*. Hasil yang diperoleh dari *docking* menggunakan *AutoDock Vina* adalah afinitas pengikatan dari kompleks pengikatan enzim terhadap substrat dan posisi struktur substrat pNP-X dan xilooligosakarida pada struktur enzim β -xilosidase. Posisi struktur substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida pada enzim β -xilosidase dianalisis dengan program *PyMol*.

Sedangkan hasil yang diperoleh dari *docking* menggunakan *AutoDock 4* adalah afinitas pengikatan dari kompleks enzim-substrat, koefisien inhibisi kompleks enzim-substrat dan interaksi substrat di area sisi aktif. *AutoDock Tools* digunakan untuk menganalisis hasil *docking* dari *AutoDock 4*. Berikut tabel hasil analisis hasil *docking* menggunakan *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4*.

Tabel 1. Hasil analisis hasil *docking* menggunakan *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4*

Jenis Substrat	Aktivitas (U/mL)	<i>AutoDock Vina</i>			<i>AutoDock 4</i>				
		Afinitas Ikatan (kkal/mol)	Residu yang berikatan	Visualisasi kompleks enzim-substrat	Afinitas Ikatan (kkal/mol)	Residu yang berikatan hidrogen	Interaksi Van Der Walls dan elektrostatik	Koefisien Inhibisi	Visualisasi kompleks enzim-substrat
pNP-X	1,507	-5,6	Glu 177 Arg 269 Trp 117		-1,94	Glu 177 Arg 269 Phe 480	Phe 480 Ile 120 Phe 480 Trp 177 Thr 197 Phe 73	37,55	
X2	0,1865	-2,3	Glu177 Asp 121 Asp 14 Arg 269		-0,40	Glu 177 Phe 480 Val 91	Ile 120 Phe 480 Phe 73 Leu 93 Val 91	504,83	
X3		5,9	Glu 177 Glu 121 Asp 14 Arg 269 Trp 117 His 254 Thr 197 His 238		0,83	Glu 177 Arg 269 Phe 480	Ile 120 Phe 480 Trp 177 Thr 197 Val 91	-	

Analisis hasil eksperimen dengan program AutoDock Vina

Berdasarkan tabel 4.3, dapat diketahui bahwa posisi substrat pNP-X pada enzim β -xilosidase menunjukkan bahwa gugus gula masuk ke dalam celah sisi aktif dari enzim dan gugus nitro fenil berada di luar celah sisi aktif. Sedangkan pada substrat xilobiosa dan xilotriosa menunjukkan bahwa hanya satu gugus xilosa yang masuk ke dalam celah sisi aktif dari enzim dan gugus gula yang lain berada di luar celah sisi aktif.

Berdasarkan data afinitas pengikatan, baik pNP-X maupun xilobiosa memiliki harga yang negatif. Hal ini mengindikasikan bahwa kompleks enzim-pNP-X dan kompleks enzim-xilobiosa terbentuk secara spontan. Sedangkan afinitas ikatan kompleks enzim-xilotriosa memiliki harga yang positif, sehingga hal ini mengindikasikan bahwa kompleks enzim-xilotriosa terbentuk tidak spontan.

Walaupun kompleks enzim-pNPX dan enzim-xilobiosa terbentuk secara spontan, tetapi harga afinitas ikatan enzim-pNP-X lebih besar daripada kompleks enzim-xilobiosa. Hal ini diduga karena komplementaritas stereokimia antara enzim dengan pNP-X lebih sesuai, sehingga menghasilkan kompleks enzim ligan yang lebih stabil.

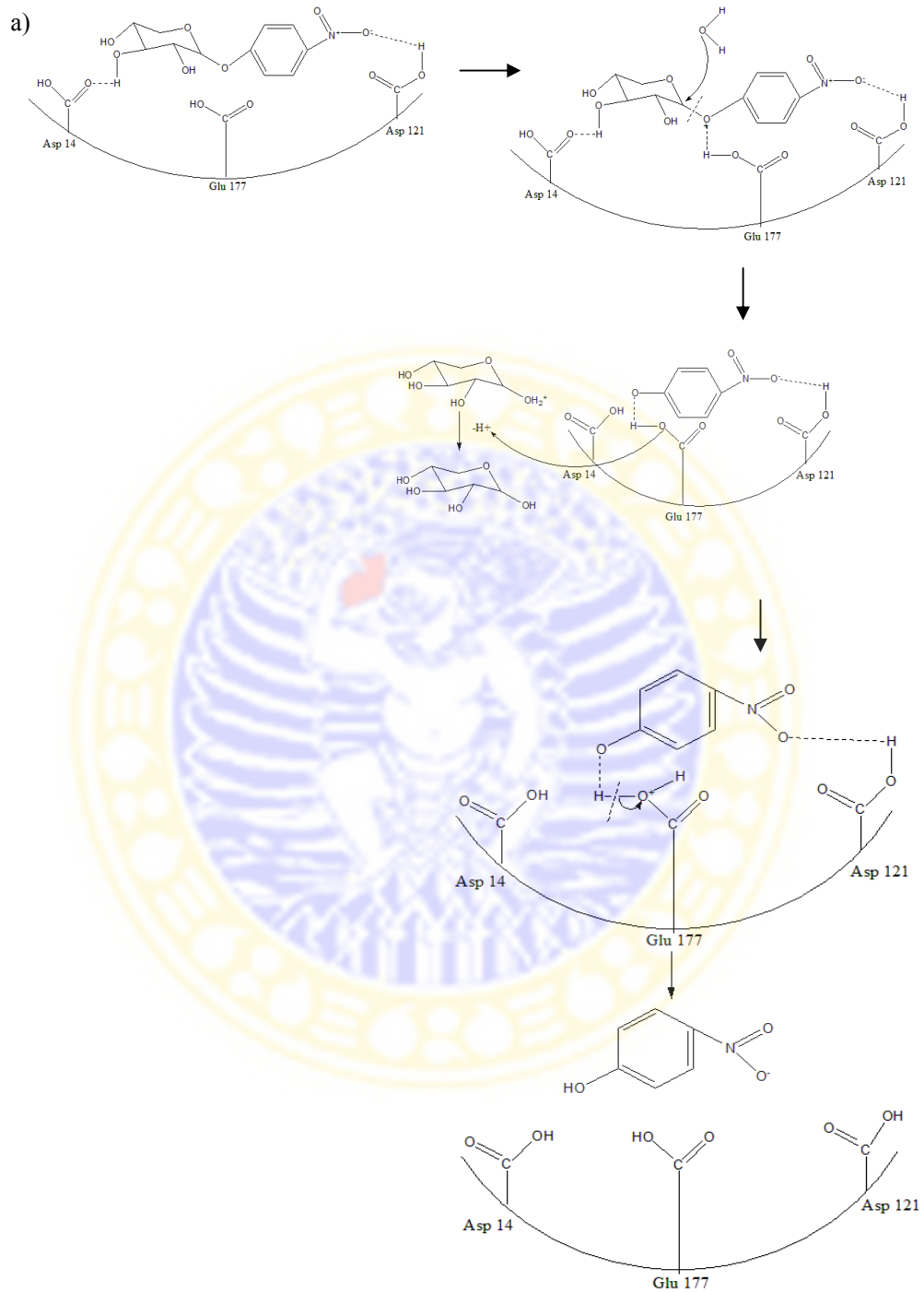
Model posisi substrat pNP-X terhadap sisi aktif enzim β -xilosidase menunjukkan posisi substrat dekat dengan residu Glu 177, Arg 269 dan Trp 117. Sedangkan, pada substrat xilobiosa dekat dengan residu Glu177, Asp 14, Asp 121 dan Arg 269 pada substrat xilotriosa dekat dengan residu Trp 117, Asp 121, Asp 14, His 254, Thr 197, Glu 177, Arg 269 dan His 238.

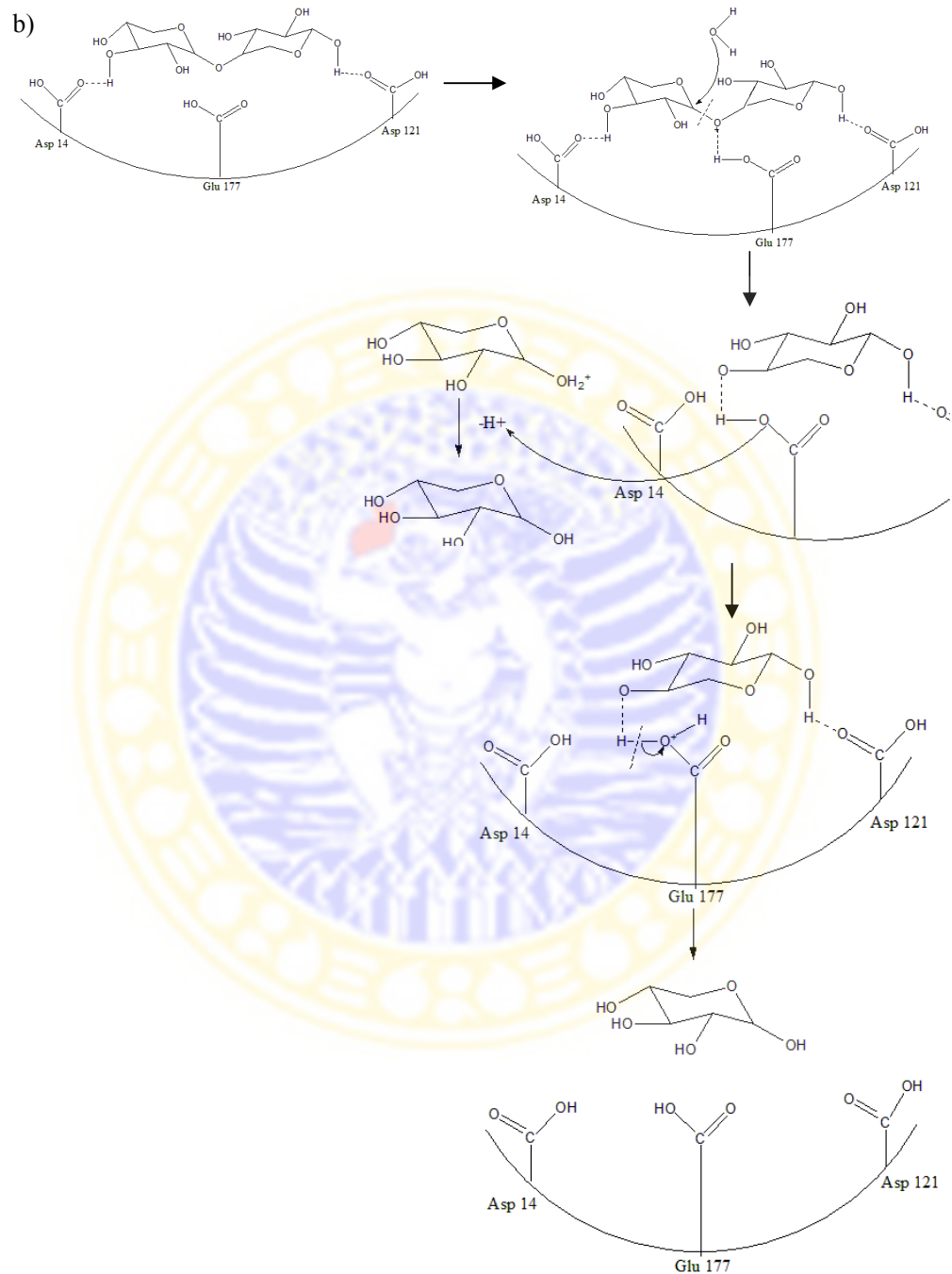
Sampai saat ini belum ada penelitian yang melaporkan residu asam amino aktif yang terlibat dalam reaksi katalitik. Rohman (2007) hanya melaporkan struktur enzim β -xilosidase ini tanpa ko-kristalisasi dengan suatu ligan. Hanya saja diasumsikan bahwa residu aktif yang terlibat dalam reaksi katalitik adalah Asp 14, Asp 121 dan Glu 177.

Hasil *docking* substrat pNP-X, xilobiosa, dan xilotriosa selalu diperoleh bahwa Glu 177 terlibat dalam reaksi tersebut. Mekanisme katalitik dari enzim β -xilosidase melibatkan residu glutamat sebagai asam general (Brux *et al.*, 2006) yang berfungsi untuk memprotonasi reaksi enzimatik yang terjadi. Berdasarkan hal tersebut, peneliti berasumsi bahwa Glu 177 merupakan residu aktif yang berperan dalam protonisasi ikatan glikosidik pada pNP-X, xilobiosa dan xilotriosa. Sedangkan dua residu asam amino yang lain berfungsi untuk mempertahankan kestabilan kompleks enzim-ligan.

Mekanisme reaksi pada enzim β -xilosidase yang termasuk famili 43 ini adalah mekanisme reaksi hidrolisis inversi (Braun *et al.*, 1993). Yaitu, reaksi yang menyebabkan perubahan konformasi setelah hidrolisis (Zechel *et al.*, 2000).

Dari pembahasan tersebut, peneliti mengajukan asumsi mekanisme reaksi hidrolisis inversi antara enzim β -xilosidase terhadap substrat pNP-X dan xilobiosa seperti gambar berikut.





Gambar 4.1 Mekanisme reaksi hidrolisis enzim β -xilosidase terhadap substrat pNP-X (a) terhadap substrat xilobiosa (b)

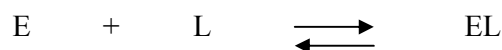
Analisis hasil eksperimen dengan program AutoDock 4

Berdasarkan tabel 4.3, pada hasil analisis dengan program *AutoDock 4* dapat diketahui residu yang berikatan hidrogen yang terjadi antara enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X, xilobiosa dan xilotriosa. Dari semua residu yang berikatan tersebut, residu Glu 177 selalu terlibat. Selain itu, dapat diketahui pula residu yang terlibat pada ikatan Van Der Waals dan elektrostatis yang terjadi.

Harga afinitas pengikatan untuk substrat pNP-X, xilobiosa dan xilotriosa saat *docking* menggunakan *AutoDock 4* berbeda dengan *docking* menggunakan *AutoDock Vina*. Hal tersebut, dikarenakan setiap program memiliki metode perhitungan yang berbeda. Namun, kecenderungan harga afinitas berada pada substrat yang sama.

Substrat pNP-X terhadap sisi aktif enzim β -xilosidase berikatan hidrogen dengan residu Glu 177, Arg 269 dan Phe 480. Sedangkan, pada substrat xilobiosa dengan residu Glu 177, Phe 480 dan Val 91. Pada substrat xilotriosa dengan residu Glu 177, Phe 480, Arg 269. Residu Glu 177 tersebut berfungsi sebagai asam general yang membentuk ikatan hidrogen dengan substrat, sedangkan dua residu yang lain berfungsi untuk mempertahankan kestabilan kompleks enzim-ligan.

Reaksi pembentukan kompleks enzim-ligan dapat dituliskan sebagai berikut.



Berdasarkan persamaan reaksi tersebut, maka besarnya koefisien inhibisi (K_i) adalah:

$$= \frac{[][]}{[]}$$

Hasil *docking* dengan *AutoDock 4* diperoleh harga K_i untuk pNP-X sebesar 37,55 mM dan xilobiosa sebesar 504,83. Hal tersebut menyatakan bahwa kompleks enzim-pNP-X lebih banyak terbentuk dibanding kompleks enzim-xilobiosa. Hal ini sesuai dengan kestabilan kompleks enzim-pNP-X yang lebih stabil jika dibanding dengan kompleks enzim-xilobiosa. Pada kompleks enzim β -xilosidase-xilotriosa nilai koefisien inhibisi tidak terdeteksi, terjadinya hal ini dimungkinkan oleh nilai koefisien inhibisi yang terlalu besar dan produk hasil yang sangat kecil.

Aktifitas enzim β -xilosidase pada substrat pNP-X lebih besar daripada pada substrat xilooligosakarida, jika dibandingkan dengan hasil *docking* menggunakan *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4*, hal ini sesuai dengan hasil *docking* berdasarkan energi bebas pengikatan dan koefisien inhibisi. Afinitas pengikatan kompleks enzim β -xilosidase-pNP-X lebih kecil daripada kompleks enzim β -xilosidase-xilooligosakarida. Hal ini menunjukkan bahwa kompleks enzim-pNP-X lebih stabil daripada kompleks enzim-xilooligosakarida, sehingga aktifitas enzim β -xilosidase lebih tinggi pada substrat pNP-X daripada pada substrat xilooligosakarida.

Docking yang dilakukan dengan menggunakan program *AutoDock Vina* dan *AutoDock 4* ini memiliki beberapa kelemahan karena ketidaksesuaian dengan keadaan sebenarnya, diantara kelemahannya adalah reaksi yang terjadi berada pada keadaan vakum, sedangkan pada kondisi sebenarnya tidak vakum, kemudian bentuk enzim yang *didocking* berbentuk rigid atau kaku, padahal dalam keadaan

sebenarnya enzim dapat berubah bentuk sesuai dengan substratnya seperti halnya teori pengikatan enzim-substrat *induced fit*. Selain itu, tidak adanya molekul air juga merupakan kelemahan pada program *docking* ini.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- a. Hasil kajian *in silico* yang diperoleh dari hasil *docking* antara enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida menunjukkan hasil yang sesuai dengan hasil validasi secara laboratoris.
- b. Residu asam amino yang berperan pada reaksi katalitik enzim β -xilosidase adalah residu Glu 177.
- c. Reaksi yang terjadi antara enzim β -xilosidase dengan substrat pNP-X dan substrat xilooligosakarida melibatkan residu Glu 177.

5.2 Saran

Perlu dilakukan ko-kristalisasi struktur 3-D kristal enzim β -xilosidase dengan suatu ligan tertentu untuk digunakan sebagai perbandingan hasil uji *in silico*, sehingga dapat diketahui validitas hasil yang lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalina, I., 2011, *Pemodelan Struktur 3-dimensi Enzim β -xilosidase (D121N dan D139N) dengan Metode Homologi dan Threading serta Docking Menggunakan Substrat *p*-nitrophenyl-xylopiranoside*, Penelitian S1, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Anam, K., 2009, *Produksi Enzim Mananase*, Bioteknologi Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. and Hoondal, G. S., 2001, **Microbial xylanases and their industrial applications: a review**, *Appl Microbiol Biot* Vol 56, p. 326-338.
- Branden, C. and John, T., 1991, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc. New York.
- Brux, C., Ben-David, A., Shallom-Shezifi, D., Leon, M., Niefind, K., Shoham, G., Shoham, Y., and Schomburg, D., 2006. *J. Mol. Biol.* **359**, 97-109.
- Buchert, J., Ranua, M., Kantelinen, A. and Viikari, L., 1992, **The role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pine kraft pulp**, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol 37, p. 825–829.
- Burgoyne, N. J. and Jackson, R. M., 2006, **Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein-protein and protein-ligand interfaces**, *Bioinformatics*, Vol 22, p. 1335-1342.
- Campbell, M. K. and Farrel, S. O., 1995, *Biochemistry*, Nelson Education, Ltd., Canada.
- Connolly, M. L., 1983, **Analytical molecular-surface calculation**. *J Appl Crystallogr*, Vol 16, p. 548-558.
- Dekker, R. F. H., 1983, **Bioconversion of hemicellulose: Aspect of hemicelluloses production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose**. *Biotechnol. Bioeng.* Vol 25, p. 1127-1146.
- Dodd, D. and Cann, I. K. O., 2009, **Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production**, *Global Change Biol. Bioenergy* Vol 1, p. 2–17.
- Galbe, M. and Zacchi, G., 2002, **A review of the production of ethanol from softwood**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol 59, p. 618–628.

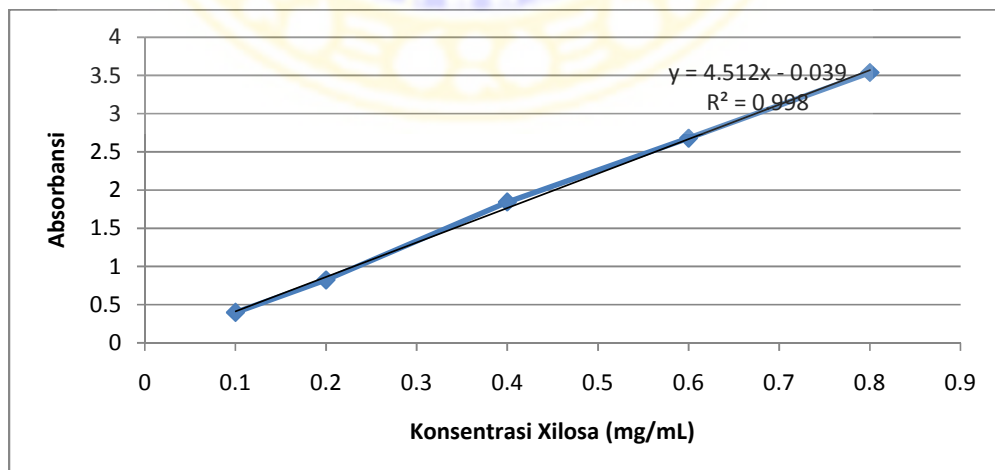
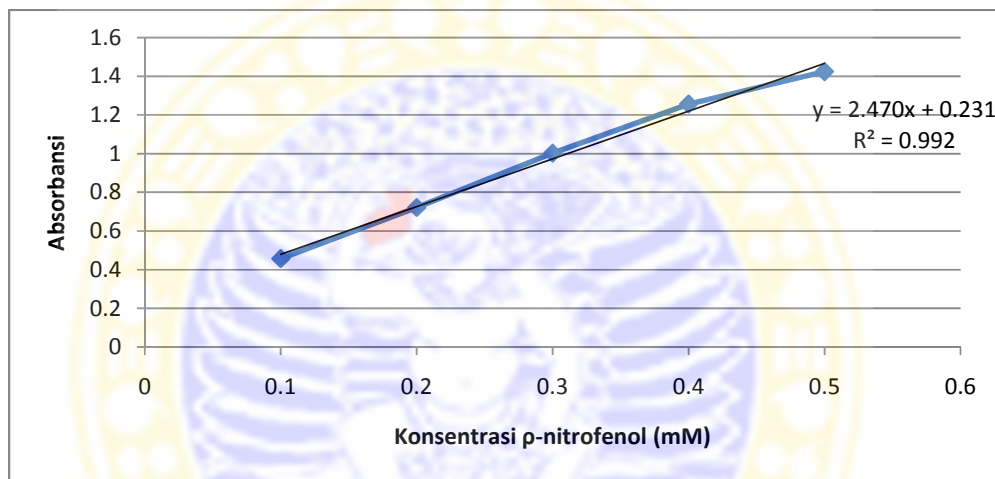
- Henrissat, B. and Bairoch, A., 1993, **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities**, *Biochem. J.* 293: 781–788.
- Huey, R. and Morris, G. M., 2008, *Using AutoDock 4 With AutoDockTools : A Tutorial*. The Scripps Research Institute MGL, California, USA.
- Jahn, M., Marles, J., Warren, R. A. and Withers, S. G., 2003, **Thioglycoligases: mutant glycosidases for thioglycoside synthesis**, *Angew Chem. Int. Ed. Engl* Vol 42, p. 352–354.
- Kaapro, A. and Ojanen, J., 2002, **Protein Docking**, <http://Ice.hut.fi/teaching/S-114.500/k2002/Protdock.pdf>, 20 Desember 2011.
- Kitamoto, N., Yoshino, S., Ohmiya, K. and Tsukagoshi, N., 1999, **Sequence analysis overexpression, and antisense inhibition of a β -xylosidase gene, xylA, from *Aspergillus oryzae* KBN616**, *Appl Environ Microbiol* Vol 65, p. 20–24.
- Krisana, A., Rutchadaporn, S., Jarupan, G., Lily, E., Sutipa, T. and Kanyawim, K., 2005, **Endo-1,4- β -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 Isolated in Thailand: Purification, Characterization and Gene Isolation**, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 38, No. 1, pp. 17-23.
- Leis, S., Schneider, S. and Zacharias, M., 2010, **In Silico Prediction of Binding Sites on Proteins**, *Current Medicinal Chemistry* Vol 17, p. 1550-1562.
- Mielenz, J. R., 2001, **Ethanol production from biomass: technology and commercialization status**, *Curr. Opin. Microbiol* Vol 4, p. 324–329.
- Miller, L.G., 1959, **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**, *Anal Chem* Vol 31, p. 426-428.
- Murray, R. K., 2000, *Harper's Biochemistry*, Appleton & Lange, New York.
- Ohta, K., Fujimoto, H., Fujii, S. and Wakiyama, M., 2010, **Cell-associated β -xylosidase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524: Purification, properties, and characterization of the encoding gene**, *J. Biosci Bioeng* Vol 110, p. 152–157.
- Pandey, B. N., 2007, *Bioinformatics*, SB Nangia, New Delhi.

- Puspaningsih, N. N. T., 2004, *Kloning Gen Penyandi Enzim Xilanolitik di E. coli DH5 α* , Penelitian S3, IPB Bogor dan JSPS Short-course Program, September-November, Mie University, Jepang.
- Ranganathan, R., Malicki, D. M. and Zuker, C. S., 1995, **Signal transduction in *Drosophila* photoreceptors**. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 283-317.
- Reilly, P. J., 1991, **Xylanase: Structure and Function**, In Hollander, A. (Ed.). *Proceeding of A Symposium on Trend in Biotechnology of Fermentation for Fuels and Chemicals*, Plenum Press, New York.
- Rohman, A., 2007, **Thermostability Improvement of A Recombinant β -Xylosidase**. *ITSF Seminar on Science and Technology*.
- Rohman, A., Oosterwijk, N., Kralj, S., Dijkhuizen, L., Dijkstra, B. and Puspaningsih, N., T., 2007, **Purification, crystallization, and preliminary X-ray analysis of a thermostable glycoside hydrolase family 43 β -xylosidase from *Geobacillus thermoleovorans* IT-08**. *Acta Cryst.* F63. 932-935.
- Ruiz-Arribas, A., Abalos, J. M. F., Sanchez, P., Garda, A. L. and Santamaria, R. I., 1995, **Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanases (xyl) from *Streptomyces halstedii* JM8**, *Appl Environ Microbiol* Vol 61, p. 2414-2419.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanner, M. F., Olson, A. J. and Spehner, J. C., 1996, **Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces**, *Biopolymers* Vol 38, p. 305-320.
- Schwede, T., Sali, A., Eswar, N. and Peitsch, M. C., 2008, **Protein Structure Modeling**. In *Computational Structural Biology*, (eds. T. Schwede, and M.C. Peitsch, World Scientific Publishing, Singapore.
- Stefan, J., Merkle, D. and Middendorf, M., 2008, **Molecular Docking with multi-objective Particle Swarm Optimization**, *Applied Soft Computing*, Vol. 8, p. 666-675.
- Stryer, L., Berg, J. M. and Tymoczko, J. L., 2007, *Biochemistry*, 5th edition, W. H. Freeman and Company, New York.

Suurnakki, A., Li, T.Q., Buchert, J., Tenkanen, M., Viikari, L., Vuorinen, T. and Odberg, L., 1997, **Effects of enzymatic removal of xylan and glucomannan on the pore size distribution of kraft fibres**, *Holzforschung* Vol 51, p. 27-33.

<http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>, 17 Desember 2011





Lampiran 4. Rumus Perhitungan Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim β -xilosidase (U/ml) dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim (U/ml)} = \frac{\times \times}{\times}$$

Ket:

c = konsentrasi enzim (β -xilosidase)

fp = faktor pengenceran

t = waktu inkubasi

BM = berat molekul hasil hidrolisis (ρ -nitrofenol/xilosa)

