



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**KLONING GEN XILANASE ALKALOTERMOFILIK  
PADA *ESCHERICHIA COLI* DH5 $\alpha$   
DAN KARAKTERISASI PRODUK GENNYA**

**TESIS**

**SHAF A NOER  
0906495293**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**KLONING GEN XILANASE ALKALOTERMOFILIK  
PADA *ESCHERICHIA COLI* DH5 $\alpha$   
DAN KARAKTERISASI PRODUK GENNYA**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains**

**SHAFI NOER  
0906495293**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KIMIA  
DEPOK  
JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Shafa Noer

NPM : 0906495293

Tanda Tangan : 

Tanggal : 15 Juli 2011

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Shafa Noer  
NPM : 0906495293  
Program Studi : Magister Ilmu Kimia  
Judul Tesis : Kloning gen xilanase alkalotermofilik pada  
*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  dan karakterisasi produk  
gennya

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing	: Dr. Endang Saepudin	(  )
Pembimbing	: Dr. Is Helianti, M.Sc	(  )
Penguji	: Prof. Dr. Sumi Hudyono PWS	(  )
Penguji	: Dr. Herry Cahyana	(  )
Penguji	: Dr. Amarila Malik Apt., M.Si	(  )
Penguji	: Dr. Emil Budianto	(  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 15 Juli 2011

## KATA PENGANTAR/UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan keajaiban tak terbatas, sehingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul “Kloning gen xilanase alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5a dan karakterisasi produk gennya”. Shalawat dan salam juga semoga senantiasa tercurah ke atas tauladan sepanjang masa, Rasulullah SAW beserta para sahabat dan para pengikutnya yang setia sampai akhir zaman.

Penulisan dan penyusunan tesis ini tentu tidak terlepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Endang Saepudin, selaku pembimbing pertama sekaligus Ketua Program Studi Magister Ilmu Kimia, yang telah memberikan banyak dukungan, pertolongan dan motivasi sehingga penulis yakin bisa menyelesaikan semua ini.
2. Dr. Is Helianti, M.Sc. selaku pembimbing kedua yang telah bersedia memberikan ilmunya, meluangkan waktu dan pikirannya, serta kesabaran yang tak terbatas yang telah diberikannya untuk penulis selama menyelesaikan penelitian dan penulisan tesis ini.
3. Semua pahlawan tanpa jasa yang telah mengajarkan penulis tentang isi dunia dari TK sampai sekarang.
6. Keluargaku tercinta : Ayahanda Dr. Mohammad Noer atas dukungan penuhnya baik di bidang moril, spirituil maupun materiil. Ibunda Farhanah Salim, Dra (Almh), yang dengan cinta kasihnya yang tak pernah pergi, telah memberi kekuatan dan keyakinan pada penulis untuk bertahan dalam badai yang tak pernah henti ini. Kakanda Fatimah Noer, M.Si dan Abangda Indra, S.H. atas semua perhatian, dukungan dan motivasinya yang membuat penulis merasa harus menyelesaikan segera semua ini. Saudara kembarku Marwah Noer, S.Si. yang telah sangat setia menemani penulis dari dalam kandungan

sampai sekarang, tempat penulis menumpahkan segala kegelisahan, yang dengan kata-kata sederhana ajaibnya selalu memberikan kekuatan lebih kepada penulis untuk bangkit dari keterpurukan. Khalid Iyhabullah, keponakanku tersayang yang selalu mampu membuat hari-hari lebih ceria.

7. Sahabat seperjuanganku : Maria Ulfah, S.Si., Keis Pirlu, S.Si., dan Lina Mulyawati, S.Si. Tanpa kalian, mungkin penulis telah lama menyerah dengan keadaan. Terimakasih telah menjadi “*terapis paling mujarab*” dalam keseharian penulis selama ini.
8. Staf, peneliti dan teman-teman di Laboratorium Bioindustri BPPT, Serpong : Bu Niknik, Mba Titut, Mas Galih Kusuma Aji, Mba Sari Nafsiah, Mba Ika R, Mba Reni Giarni, Rubi, Farida, Dian, Teh Rita, Nailul, Mas Ucup, Mba Rini, Erna, Mba Farah, Mas Ari, Mba Fajar, Fika dan yang lainnya yang tak bisa penulis tuliskan satu persatu. Terima kasih untuk setiap bantuan, bimbingan, dan persahabatan indahny.
9. Teman-teman penulis di Program Studi Magister Ilmu Kimia UI : Mba Tanti, Mba Evi, Mba Nurul, Bu Ellya, Bu Yeti, Desti, Mba Sofa, Rizky, Mba Dila, Harry, Reza, Pak Inal, Mas Randy dan lainnya, yang telah banyak memberikan kontribusi bagi penulis dalam menyelesaikan kuliah.

Akhir kata, semoga Allah SWT membalas setiap kebaikan dengan kebaikan yang jauh lebih besar kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini. Penulis menyadari tesis ini masih jauh dari sempurna, namun penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat kepada yang membutuhkan.

**Penulis**

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Shafa Noer  
NPM : 0906495293  
Program Studi : Magister Ilmu Kimia  
Departemen : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :  
Kloning gen xilanase alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5a dan karakterisasi produk gennya

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal : 24 Mei 2011  
Yang menyatakan



( Shafa Noer )

## ABSTRAK

Nama : Shafa Noer  
Program Studi : Magister Ilmu Kimia  
Judul : Kloning gen xilanase alkalotermofilik pada *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  dan karakterisasi produk gennya

Enzim merupakan biokatalis yang banyak dimanfaatkan dalam industri sebagai alternatif dari penggunaan bahan-bahan kimia yang mencemari lingkungan, salah satu diantaranya adalah enzim xilanase. Xilanase dalam industri dapat digunakan dalam proses pemutihan kertas, campuran pakan ternak, penjernihan sirup, produksi gula xilosa, dan sebagainya. Teknologi proses dalam industri umumnya dilakukan pada suhu dan pH yang tinggi, oleh karena itu dibutuhkan xilanase yang bersifat alkalotermofilik. Teknologi DNA rekombinan dilakukan agar enzim yang diproduksi mudah dimanipulasi dan dikembangkan untuk efisiensi.

Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Laboratorium Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) yang berada di Puspiptek, Serpong, Jawa Barat telah mengisolasi isolat CMU dari Sumber Air Panas Cimanggu yang positif menghasilkan xilanase alkalotermofilik. Tujuan penelitian ini adalah untuk melakukan kloning gen penyandi enzim xilanase alkalotermofilik serta ekspresi enzim rekombinannya pada *Escherichia coli*. Hasil identifikasi daerah 16S rRNA secara parsial pada isolat ini menunjukkan bahwa isolat CMU berafiliasi pada *Bacillus halodurans*. Gen penyandi xilanase alkalotermofilik telah berhasil diamplifikasi dari genom isolat CMU dan dikloning ke dalam *E.coli* DH5 $\alpha$  dengan menggunakan vektor pGEM-T Easy. Dari proses transformasi hasil ligasi vektor dan produk PCR menghasilkan 2 bakteri rekombinan, yang membawa gen xilanase yang mempunyai perbedaan sekuens, dinamakan Klon 2 dan Klon 3. Analisa aktivitas produk gen dari *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan Klon 2 dan Klon 3 menunjukkan bahwa bakteri rekombinan ini menghasilkan enzim xilanase yang alkalotermofilik dengan profil berbeda. Aktivitas enzim xilanase pada Klon 2 optimal pada pH 11 dan suhu 70°C (16,52 U/mg) sedangkan Klon 3 optimal pada pH 8 dan suhu 60°C (17,65 U/mg).

Kata Kunci : xilanase, alkalotermofilik, kloning, enzim  
xiii+67 halaman ; 16 gambar; 3 tabel  
Daftar Pustaka : 74 (1976-2011)



## ABSTRACT

Name : Shafa Noer  
Program Study : Magister of Chemistry  
Title : Cloning of alkalothermophilic xylanase genes in *E.coli* DH5 $\alpha$   
and characterization of the genes product

Enzyme known as a catalyst that has been widely used in industries as an alternative of chemicals process that polluted the environment. One of the important enzymes in industries is xylanase enzyme. Xylanase in industry can be used for bleaching process of pulp, rarefaction of syrup, producing of xylose sugar, mixed fodder, and so forth. Technology process in industry are generally conducted at high temperature and pH. Therefore, it requires a xylanase that has alkalothermophilic character. Recombinant DNA technology can make the gene product easily manipulated for efficiency. Center for Bio-industrial technology, The Agency for the Assessment and Application of Technology (BPPT) has isolated an isolate from Cimanggu Hot Spring that potentially produced an alkalothermophilic xylanase. The isolate designed as CMU. The purpose of this study is to clone the encoding gene of alkalothermophilic xylanase and to express this gene in *Escherichia coli*. The region identification result of 16S rRNA of this isolate showed that the CMU isolate is closed relative to *Bacillus halodurans* species. The gene encoding for alkalothermophilic xylanase has been amplified from chromosomal DNA of CMU isolate and succesfully cloned into *E.coli* DH5 $\alpha$  using the pGEM-T Easy vector. The ligation and transformation produces two recombinant bacteria with different sequence, namely Clone- 2 and Clone- 3. Xylanase activity assay showed that both recombinant *E. coli* have xylanase activity. The maximum activity of xylanase in clone-2 and clone-3 were reached at pH 11 and 70<sup>0</sup>C (16.52 U/mg), and at pH 8 and 60<sup>0</sup>C (17.65 U/mg), respectively.

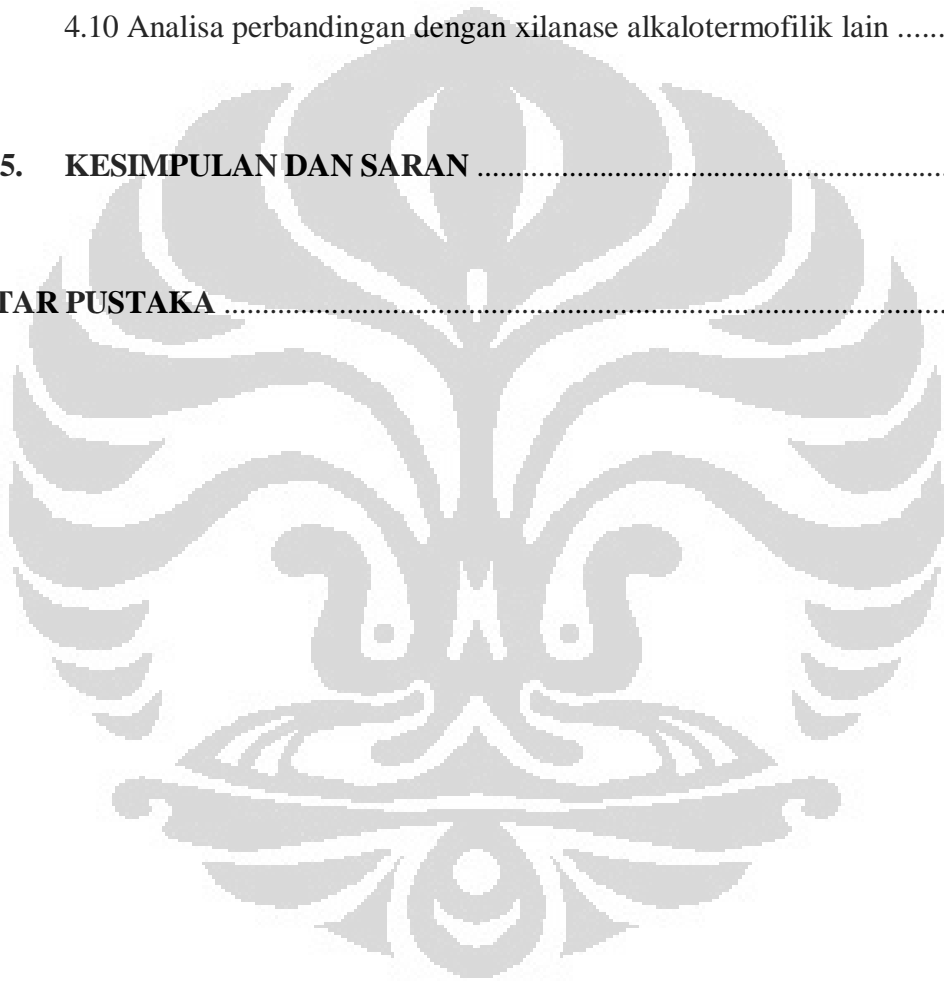
Keywords : Xylanase, alkalothermofilic, cloning, enzyme  
xiii+67 pages ; 16 pictures; 3 tables  
Bibliography : 74 (1976-2011)

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vii
ABSTRAK .....	viii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Enzim Xilanase .....	4
2.1.1 Klasifikasi .....	4
2.1.2.Sifat .....	5
2.1.3 Aktivitas .....	6
2.1.4 Aplikasi Enzim Xilanase.....	8
2.2 Teknologi DNA Rekombinan.....	10
2.3 Kloning Gen.....	13
2.4 Ekspresi Gen.....	17

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
3.1 Alat dan Bahan.....	21
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.3 Prosedur Perlakuan.....	21
3.3.1 Konfirmasi isolat berdasarkan zona bening.....	21
3.3.2 Ekstraksi genom isolat CMU.....	21
3.3.3 Amplifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU .....	22
3.3.4 Purifikasi hasil PCR .....	22
3.3.5 Analisa hasil sekuensing 16S rRNA .....	23
3.3.6 Amplifikasi gen alkaloxilanase (alkxyn) dengan PCR dan deteksi hasil PCR dengan elektroforesis gel .....	23
3.3.7 Ligasi produk PCR alkxyn ke vektor pGEM-T Easy .....	24
3.3.8 Transformasi hasil ligasi ke <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	24
3.3.9 Ekstraksi plasmid .....	25
3.3.10 Konfirmasi dengan enzim restriksi .....	26
3.3.11 Analisa hasil amplifikasi gen alkxyn .....	26
3.3.12 Sonikasi sel <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	26
3.3.13 Pengukuran aktivitas xilanase (Bailey, 1992) pada <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ rekombinan .....	27
 <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	 <b>29</b>
4.1 Konfirmasi Isolat Berdasarkan Zona Bening .....	29
4.2 Ekstraksi genom isolat CMU .....	30
4.3 Identifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU .....	31

4.4 Amplifikasi gen alkalofilixilanase (alkxyn) .....	35
4.5 Ligasi produk PCR alkxyn ke vektor pGEM-T Easy.....	36
4.6 Transformasi hasil ligasi ke <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	37
4.7 Ekstraksi plasmid rekombinan .....	38
4.8 Analisa hasil sekuensing gen alkxyn .....	42
4.9 Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .....	49
4.10 Analisa perbandingan dengan xilanase alkalotermofilik lain .....	51
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>58</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>59</b>

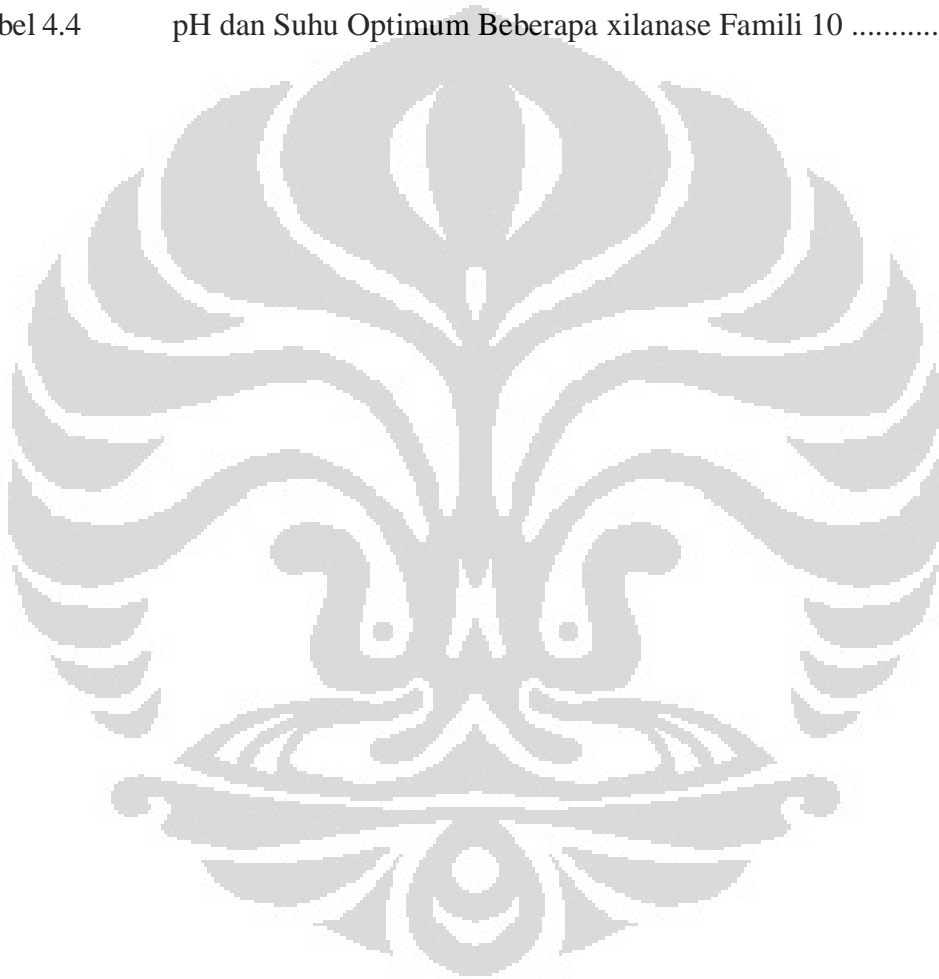


## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Mekanisme Hidrolisis Xilan..... 7
Gambar 2.2	Reaksi PCR ..... 12
Gambar 2.3	Mekanisme Sintesis Protein ..... 18
Gambar 4.1	Zona Bening Isolat CMU pada Berbagai pH ..... 30
Gambar 4.2	Hasil Elektroforesis Ekstraksi Genom Isolat CMU ..... 31
Gambar 4.3	Hasil Elektroforesis Daerah 16S rRNA Isolat CMU ..... 32
Gambar 4.4	Pohon Filogenetik Isolat CMU ..... 35
Gambar 4.5	Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen Alkxyn ..... 36
Gambar 4.6	Peta Vektor pGEM-T Easy ..... 37
Gambar 4.7	Koloni Biru Putih Hasil Transformasi ..... 38
Gambar 4.8	Hasil Elektroforesis Ekstraksi Plasmid ..... 40
Gambar 4.9	Hasil Elektroforesis Konfirmasi Restriki ..... 41
Gambar 4.10	Perbedaan Asam Amino Antara Klon 2 dan klon 3 ..... 48
Gambar 4.11	Grafik Pengukuran Aktivitas Spesifik Xilanase Klon 2 dan Klon 3 ..... 50
Gambar 4.12	Pengaruh suhu pada Aktivitas Xilanase dari Klon 2 dan Klon 3 ..... 51
Gambar 4.13	Struktur Barrel Xilanase 2UWF dengan Katalitik Residu Glutamat ..... 55

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil BLAST Daerah 27 F Isolat CMU .....	34
Tabel 4.2 Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 2 dan Klon 3 .....	45
Tabel 4.3 Perbandingan Parameter Protein Beberapa Xilanase .....	46
Tabel 4.4 pH dan Suhu Optimum Beberapa xilanase Famili 10 .....	53



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Medium, Larutan dan Buffer yang digunakan .....	66
Lampiran 2. Skema Alur Penelitian.....	68
Lampiran 3. Kurva Standar Xilosa .....	69
Lampiran 4. Kurva Standar Protein .....	69
Lampiran 5. Hasil <i>Alignment</i> Daerah Forward dan Reverse Gen Alkxyn Klon 2 .....	70
Lampiran 6. Hasil <i>Alignment</i> Daerah Forward dan Reverse Gen Alkxyn Klon 3 .....	72
Lampiran 7. Alignment Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 2 .....	74
Lampiran 8. Alignment Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 3.....	76
Lampiran 9. Singkatan dan Struktur Asam Amino .....	78
Lampiran 10. Hasil Prediksi <i>Signal Peptide</i> Xilanase Klon 2 Menggunakan SignalP Server.....	79
Lampiran 11. Hasil Prediksi <i>Signal Peptide</i> Xilanase Klon 3 Menggunakan SignalP Server.....	81
Lampiran 12. Hasil Prediski Beberapa Parameter Protein Klon 2 Menggunakan ExPASy Proteomics Server.....	83
Lampiran 13. Hasil Prediski Beberapa Parameter Protein Klon 3 Menggunakan ExPASy Proteomics Server.....	85
Lampiran 14. Penampakan Permukaan Sisi Aktif Beberapa Xilanase Famili 10.....	87
Lampiran 15. Pencarian Kemiripan Xilanase Klon 2 dan 3 Menggunakan Server <i>Swiss-Model Workspace</i> .....	88
Lampiran 16. Tabel Karakterisasi pH Aktivitas Xilanase .....	90
Lampiran 17. Tabel Karakterisasi Suhu Aktivitas Xilanase .....	91
Lampiran 18. Kromatogram Hasil Sekuensing 16S rRNA 27F Isolat CMU.....	92
Lampiran 19. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 2 – M13F.....	93
Lampiran 20. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 2 – M13R .....	95
Lampiran 21. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 3 – M13F.....	97
Lampiran 22. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 3 – M13R .....	99

## **BAB 1 PENDAHULUAN**

Indonesia saat ini termasuk produsen kertas terbesar di Asia. Tercatat sebelum krisis ekonomi global ekspor pulp & kertas Indonesia cenderung meningkat, sejalan dengan tingginya kebutuhan pemakaian produk kertas di dalam maupun luar negeri. Ekspor kertas hingga 2008 tercatat meningkat sekitar 5,1% per tahun. Sedangkan ekspor bahan bakunya (pulp), mengalami stagnasi di kisaran 2,4 juta ton. Tingginya kinerja ekspor tersebut, karena industri pulp & kertas Indonesia semakin kompetitif dibanding produk dari negara lain, khususnya dari negara-negara maju seperti Amerika Serikat dan Kanada. Tingginya kebutuhan pulp & kertas dalam periode tersebut, tercermin dari meningkatnya kapasitas produksi. Selama periode 2004 – 2008, kapasitas pulp domestik meningkat rata-rata 0,6% per tahun, yaitu dari 5,2 juta ton menjadi 6,4 juta ton per tahun. Pada 2009, kapasitasnya meningkat lagi menjadi 6,9 juta ton per tahun. Pada periode yang sama, kapasitas produksi kertas juga mengalami peningkatan yang berarti, dari 10 juta ton menjadi 10,9 juta ton per tahun (Kusdriana, 2010).

Kegiatan utama dalam industri pulp dan kertas adalah proses *pulping* (proses pembuatan pulp). Saat ini sebagian besar teknologi *pulping* yang digunakan dalam industri pulp dan kertas di Indonesia adalah proses kraft dan proses sulfat, sedangkan untuk *bleaching* banyak digunakan klorin. Proses kraft diakui mempunyai banyak segi positif, diantaranya mampu mengolah semua jenis bahan baku dengan berbagai macam kualitas dan dapat menghasilkan pulp dengan kualitas yang baik. Di sisi lain, proses konvensional ini juga mempunyai beberapa kelemahan, salah satunya adalah kontribusinya dalam pencemaran lingkungan. Penggunaan klorin sebagai bahan pemutih telah menjadi persoalan yang serius dan merupakan titik berat permasalahan dalam industri pulp dan kertas. Dampak negatif yang ditimbulkannya adalah berupa senyawa organoklor yang berbahaya bagi lingkungan sekitar (Batubara, 2006).

Dewasa ini teknologi pemutihan nampaknya cenderung lebih banyak ke arah pemakaian klordioksida dan oksigen untuk *prebleaching*. Penggunaan klordioksida pada tahap awal pemutihan menghasilkan buangan dengan



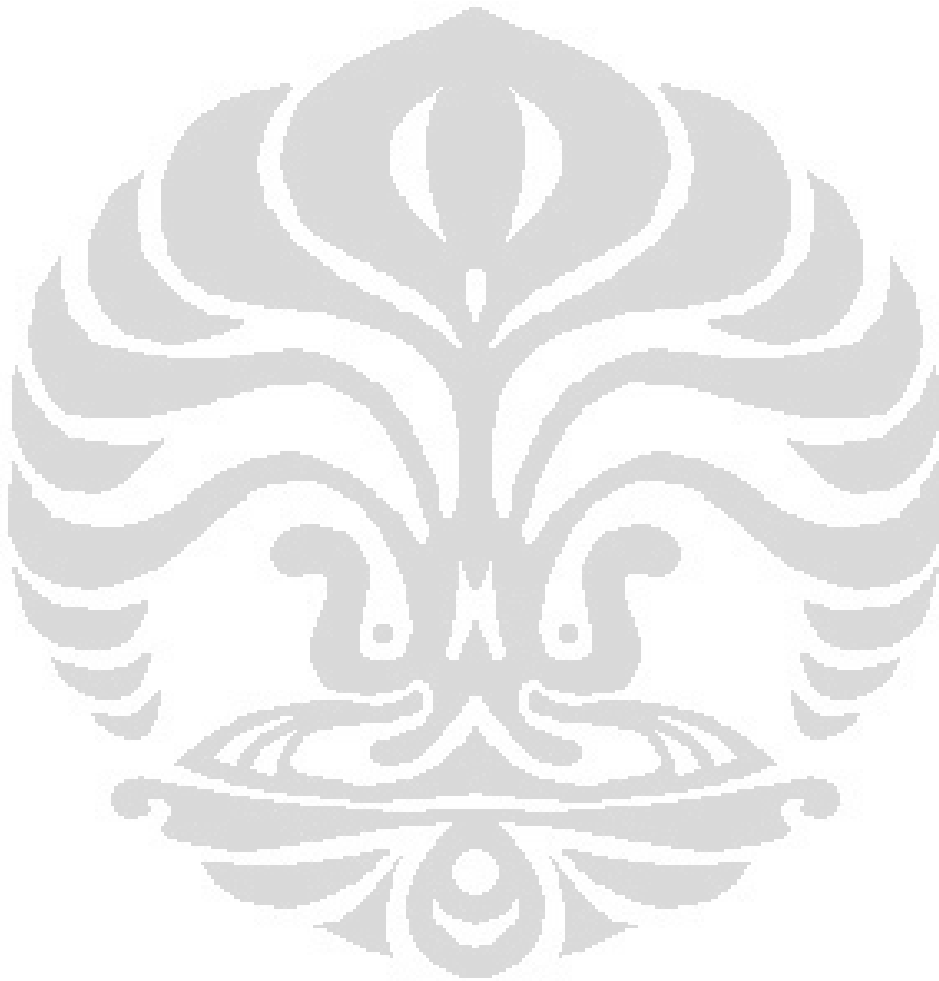
kandungan bahan beracun yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan klor. Namun demikian, sebagian besar industri kertas menggunakan pemutih yang mengandung klorin. Salah satu cara yang dapat digunakan sebagai alternatif dalam mengatasi permasalahan lingkungan ini adalah pemanfaatan bioteknologi. Aplikasi bioteknologi dalam industri kertas telah dilakukan sejak lama dan sampai saat ini masih berkembang baik di dunia penelitian maupun aplikasi di dunia industri. *Biobleaching* merupakan salah satu penerapan bioteknologi dalam industri kertas yang dianggap dapat mengatasi masalah lingkungan.

*Biobleaching* adalah proses pemutihan pulp dengan memanfaatkan enzim. Enzim yang paling umum digunakan dalam *biobleaching* adalah enzim xilanase. Menurut Christoper (2007), keuntungan penerapan aplikasi bioteknologi dalam industri kertas meliputi : penghematan bahan-bahan kimia yang digunakan untuk *pulping*, *bleaching* dan *deinking*, peningkatan kualitas pulp dan peningkatan kualitas limbah menjadi lebih aman untuk lingkungan.

Dalam penerapannya di bidang industri, enzim yang digunakan haruslah bersifat sesuai dengan kondisi perlakuan pada industri agar dapat berkerja secara maksimal. Dalam industri kertas (*biobleaching*) dibutuhkan enzim xilanase yang tahan terhadap kondisi basa dan juga tahan dalam kondisi panas. Namun secara alami, mikroba penghasil enzim tersebut tidak selalu mempunyai sifat mudah untuk dikultur sehingga sangat sulit untuk mendapatkan produk enzim dalam jumlah besar. Untuk memenuhi kebutuhan enzim tersebut, aplikasi dalam bidang rekayasa genetika perlu dilakukan. Dengan teknologi DNA rekombinan diharapkan akan terjadi *strain improvement*, dimana akan dihasilkan suatu strain yang menyandi gen penghasil enzim yang diinginkan dengan kualitas yang jauh lebih baik dari sifat alaminya, sekaligus dapat meningkatkan produktivitas enzim target. Selain itu pendekatan rekayasa genetika juga dimaksudkan agar produksi enzim mudah dimanipulasi untuk efisiensi.

Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) yang berada di LAPTIAB, PUSPIPTEK, Serpong, Jawa Barat telah berhasil mengisolasi mikroba penghasil enzim xilanase alkalotermofilik dari Sumber Air Panas Cimanggu.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan kloning gen penyandi enzim xilanase alkalotermofilik serta karakterisasi enzim rekombinannya pada *Escherichia coli*. Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya isolat rekombinan yang potensial memproduksi xilanase yang nantinya dapat digunakan untuk kepentingan industri. Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah gen penyandi xilanase alkalotermofilik dapat dikloning sebagai enzim fungsional pada *E. coli*.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Enzim Xilanase

#### 2.1.1 Klasifikasi

Xilanase termasuk ke dalam kelompok enzim hidrolase yang menghidrolisis xilan. Enzim xilanase disebut juga dengan 1,4- $\beta$ -D-xilan xylanohidrolase (Rahman, 2005). Berdasarkan *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB) enzim ini termasuk ke dalam golongan E.C.3.2.1. Angka 3 di depan kode tersebut menunjukkan bahwa xilanase termasuk ke dalam golongan hidrolase, yang berarti bahwa enzim ini memerlukan air dalam memecah ikatan C-O, C-N, O-P dan C-S. Angka 3.2 menunjukkan bahwa enzim ini termasuk ke dalam sub golongan enzim glycosilase. Berdasarkan kesamaan sekuen asam aminonya, xilanase secara umum diklasifikasikan ke dalam dua famili glikosil hidrolase, yaitu: famili 10 dan famili 11 (Henrissat, 1991). Sisi aktif famili 10 berpusat disekitar daerah *conserved* residu asam glutamat (Tull dkk, 1991).

Menurut Polizeli (2005) enzim xilanase terdiri atas lima macam enzim, yaitu:

- a. Endo-1,4- $\beta$  xilanase (EC 3.2.1.8) atau nama lainnya : endo-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -xylan xylanohidrolase; endo-1,4-xylanase; xylanase;  $\beta$ -1,4-xylanase; endo-1,4-xylanase; endo- $\beta$ -1,4-xylanase; endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase; 1,4- $\beta$ -xylan xylanohidrolase;  $\beta$ -xylanase;  $\beta$ -1,4-xylan xylanohidrolase; endo-1,4- $\beta$ -xylanase;  $\beta$ -D-xylanase.
- b.  $\beta$ -D-xilosidase (EC 3.2.1.37) atau nama lainnya : xylobiase;  $\beta$ -xylosidase; ekso-1,4- $\beta$ -xylosidase;  $\beta$ -D-xylopyranosidase;  $\beta$ -xylosidase; ekso-1,4-xylosidase; ekso-1,4- $\beta$ -D-xylosidase; 1,4- $\beta$ -D-xylan xylohidrolase
- c. Asetilxilan esterase (EC 3.1.1.6) atau nama lainnya : C-esterase; acetic ester hidrolase; chloroesterase; p-nitrophenyl acetate esterase; Citrus acetylesterase

- d.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) atau nama lainnya :  $\alpha$ -L-arabinofuranosides,  $\alpha$ -L-arabinans containing (1,3)- dan/atau (1,5)-linkages, arabinoxylans dan arabinogalactans, hydrolyse  $\alpha$ -L-arabinosides.
- e.  $\alpha$ -glukoronidase (EC 3.2.1.1) atau nama lainnya : glycogenase;  $\alpha$ -amylase; endoamylase; Taka-amylase A; 1,4- $\alpha$ -D-glucan glucanohydrolase.

### 2.1.2 Sifat

Endoxilanase yang masuk ke dalam glikosil hidrolase famili 10 secara umum mempunyai berat molekul yang lebih besar (lebih dari 40 kDa) bila dibandingkan dengan glikosil hidrolase famili 11 yang mempunyai berat molekul sekitar 20 kDa. Mikroba yang menghasilkan xilanase dari famili 10 biasanya juga mempunyai aktivitas selulase. Hal ini tidak terjadi pada mikroba penghasil xilanase dari famili 11. Ukuran yang kecil dan bentuk yang padat dari xilanase famili 11 membuatnya mudah masuk ke jaringan serat selulosa tanpa harus merusak serat sehingga enzim ini sangat cocok digunakan dalam *biobleaching* (Oakley dkk, 2003).

Ihsanawati dkk (2005), mengatakan bahwa kisaran suhu untuk mencapai aktivitas optimum enzim xilanase adalah antara 45°C – 90°C. Menurut Tuncer dan Ball (1999), enzim endoxilanase yang dihasilkan oleh *Thermomonospora fusca* mempunyai aktivitas yang relatif stabil pada kisaran pH 6,5 – 9,5. Kulkarni (1999) melaporkan bahwa enzim xilanase dari *Bacillus* sp. C-59-2 memiliki pH optimum berkisar antara 6 sampai 8. Sedangkan aktivitas enzim xilanase yang diisolasi dari *Bacillus* sp. TAR-1, C-125 dan alkalofilik *Bacillus* sp. NCL-86-6-10 optimal pada pH 9-10.

Gupta dkk (2000) melaporkan telah berhasil mengisolasi mikroba alkalofilik obligat, *Bacillus* sp. NG-27, yang dapat memproduksi xilanase yang optimal bekerja pada suhu 70°C dan pH 8,4 serta dapat mempertahankan aktivitasnya sampai 70% pada pH 11.

Wang dkk (2009) berhasil mendapatkan gen XynBYG yang aktif pada kondisi alkali. Gen ini didapat dari *Bacillus pumilus* BYG yang diisolasi dari buangan pabrik kertas. Xilanase yang dihasilkan optimum pada pH 8-9 dan suhu 50°C. *Site-directed mutagenesis* dilakukan pada situs-situs tertentu dalam gen ini dan berhasil menaikkan temperatur optimumnya sampai 5°C.

Helianti ddk (2007) telah berhasil mengamplifikasi, mengklon dan mengekspresikan gen pengkode endo- $\beta$ -1,4-xilanase dari *Bacillus licheniformis* strain I5. Didapat sebesar 642 pb sekuen nukleotida yang memperlihatkan satu daerah *Open Reading Frame* (ORF) pengkode xilanase. Berdasarkan sekuen nukleotidanya, berat molekul dari enzim tersebut sebesar 23 kDa. Xilanase ini diperkirakan mempunyai *putative signal peptide*, namun pada *E.coli* protein aktif sebagian besar berlokasi pada bagian intraselular. Aktivitas xilanase dapat terdeteksi baik pada supernatan kultur maupun fraksi periplasmik pada *E.coli* rekombinan. Asam amino gen ini mempunyai kemiripan sebesar 91 % terhadap endoxylanase dari *Bacillus subtilis*. Aktivitas optimal dari enzim rekombinan ni adalah pada pH 7 dan suhu 55°C.

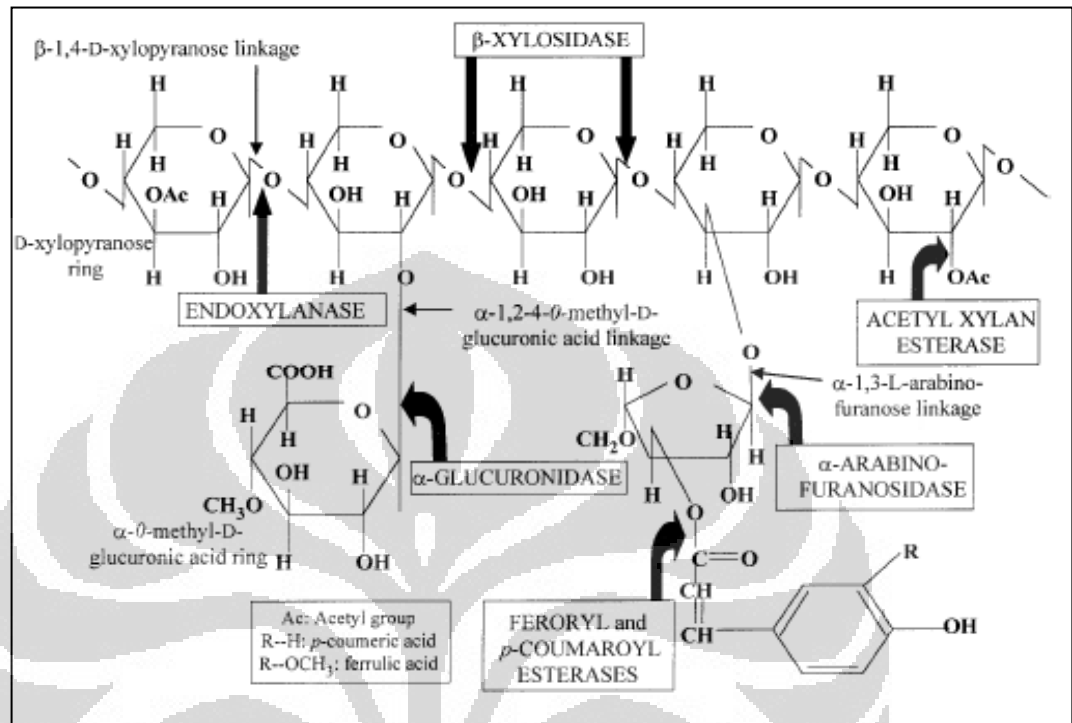
### 2.1.3 Aktivitas

Menurut Sadikin (2002) satu unit enzim ialah jumlah enzim yang diperlukan untuk mengubah 1  $\mu\text{mol}$  produk dalam waktu 1 menit, dalam suhu dan pH yang telah ditentukan. Satu unit aktivitas xilanase menurut Gessesse dan Gashe (1997) adalah kemampuan enzim untuk menghasilkan 1  $\mu\text{mol}$  xilosa per menit pada suhu dan pH yang telah ditentukan.

Xilanase termasuk ke dalam kelompok enzim penghidrolisis senyawa polimer. Xilanase (1,4- $\beta$ -D-xilan xylanohidrolase/E.C.3.2.1) mampu menghidrolisis bermacam-macam xilan dan menghasilkan xilooligosakarida berantai pendek (Zul dan Martina, 2003). Dekker (1983) menyatakan bahwa hidrolisis xilan merupakan hasil kerjasama enzim endo-1-4- $\beta$ -D-xilanase eksoglikosidase seperti :  $\beta$ -D-xilosidase,  $\beta$ -L-arabinosidase, dan  $\beta$ -D-glukoronidase. Hidrolisis sempurna dari berbagai xilanase ini dapat dilihat dari jumlah D-xilosa, L-arabinosa, dan asam D-glukoronat yang dihasilkan.

Polizeli (2005) menyatakan bahwa setiap enzim pendegradasi xilan yakni endo-1,4- $\beta$  xilanase,  $\beta$ -D-xilosidase, asetilxilan esterase, arabinase, dan  $\alpha$ -glukoronidase, mempunyai mekanisme hidrolisis xilan yang berbeda namun bekerja secara sinergis. Endo-1,4- $\beta$ -xilanase menghidrolisis xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa.  $\beta$ -D-xilosidase menghidrolisis xilooligosakarida menjadi xilosa. Asetilxilan esterase memutuskan O-asetil dari posisi 2 atau 3 pada  $\beta$ -D-xilopiranosil. Arabinase memutuskan L-arabinosa yang tersubsitusi pada

posisi 2 atau 3 dari  $\beta$ -D-xilopiranosil.  $\alpha$ -Glukoronidase menghidrolisis asam glukuronik dengan  $\beta$ -D-xilopiranosil (gambar 2.1).



Gambar 2.1. Mekanisme hidrolisis xilan oleh beberapa enzim xilanase

[Polizeli, 2005]

Aktivitas enzim xilanase dapat diukur antara lain dengan menggunakan metode Bailey. Aktivitas xilanase pada metode ini ditentukan dengan mengukur gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis xilan dengan bantuan asam dinitro salisilat (DNS). DNS merupakan senyawa aromatik yang akan bereaksi dengan gula pereduksi dan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Senyawa ini dapat diukur menggunakan spektrofotometer dengan  $\lambda = 540$  nm (Bailey dkk, 1992).

Aktivitas enzim menurut Suhartono (1989), dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain :

a. pH

Perubahan pH akan langsung mempengaruhi sifat ionik dari gugus-gugus amino dan gugus karboksilat, dan dengan sendirinya akan mempengaruhi bagian aktif dan konfigurasi molekul enzim. pH yang terlalu tinggi dan

terlalu rendah akan mengakibatkan denaturasi protein enzim sehingga enzim tersebut menjadi tidak aktif lagi.

b. Suhu

Suhu yang tinggi akan mengakibatkan perubahan konformasi enzim. Pada suhu tertentu, bisa menghilangkan fungsi kerja enzim karena mengalami denaturasi. Denaturasi protein adalah terbentuknya suatu rantai polipeptida yang memanjang (*unfolded*) dari suatu protein yang sebelumnya menggulung-melipat (*folded*) sehingga gugus asam amino terletak di luar dan berhubungan dengan pelarut.

c. Konsentrasi Substrat

Kecepatan meningkat jika konsentrasi substrat ditingkatkan sampai titik dimana enzim telah jenuh dengan substrat (Moat, 1979).

d. Konsentrasi Enzim

Aktivitas dari enzim yang derajat kemurnian tinggi dalam batas-batas tertentu akan meningkat sejalan dengan konsentrasi enzim.

#### 2.1.4 Aplikasi Enzim Xilanase

Xilanase merupakan enzim yang penting dalam bidang bioteknologi, baik digunakan tunggal maupun dikombinasikan dengan enzim lain. Xilanase adalah salah satu enzim yang bekerja secara sinergis dengan enzim lain untuk mengubah limbah polimer yang melimpah menjadi bahan berguna seperti kertas, xilose, pemanis rendah kalori (xilitol) dan bioetanol (Helianti dkk, 2007).

a) Aplikasi Xilanase dalam Proses Pembuatan Kertas

Xilanase digunakan pada pembuatan kertas untuk menghilangkan hemiselulosa dalam proses *bleaching*. Penggunaan enzim dalam industri ini sebagai pengganti penggunaan senyawa kimia, sehingga pencemaran racun limbah kimia dapat dihindari. Bahan baku kayu yang digunakan dalam proses pembuatan kertas setelah melalui proses digester dan pencucian, sebenarnya

masih dalam keadaan kotor (derajat putihnya rendah). Untuk menghasilkan kertas yang bermutu tinggi perlu dilakukan proses pemutihan. Proses pemutihan bertujuan untuk menghilangkan lignin, hemiselulosa penyebab warna coklat dan zat ekstraktif yang tersisa dari hasil pencucian dan penyaringan (Richana dan Lestina, 2003).

Penggantian penggunaan klorin untuk pemutihan kertas telah memberikan peluang untuk aplikasi bioteknologi. Xilanase merupakan enzim yang pertama kali digunakan untuk pemutihan kertas dan sekarang telah diaplikasikan pada beberapa pabrik kertas. Dalam proses pembuatan kertas dibutuhkan xilanase yang bersifat termostabil dan tahan pada pH alkali (Richana dan Lestina, 2003).

Hidrolisis hemiselulosa dapat melepaskan ikatan antara kromofor dan lignin, namun penghilangan xilan tidaklah disarankan karena akan mengurangi hasil pulp, dan jika dilakukan secara ekstrim maka penghilangan xilan akan mengurangi kekuatan pulp. Xilanase melarutkan lignin dengan cara menghidrolisis xilan yang merupakan penyusun utama hemiselulosa serta membuka struktur pulp selulosa sehingga struktur lignin tersebut terbuka dan lebih mudah larut (Polizeli dkk, 2005). Kertas yang dihasilkan menggunakan xilanase memiliki kualitas kecerahan yang lebih tinggi, lebih lentur, dan permukaannya lebih halus (Rifaat dkk, 2005).

Penggunaan xilanase sebagai agen *bleaching* non kimia untuk menghasilkan kraft pulp memerlukan aktivitas atau reaksi yang memodifikasi residu xilan pada kraft pulp. Salah satu metode untuk memperkirakan aktivitas xilanase pada kraft pulp adalah dengan mengukur kadar pelepasan gula reduksi dari pulp yang diikuti oleh hidrolisis secara enzimatis. Walaupun demikian, sampai saat ini belum ada keterangan yang jelas yang menunjukkan korelasi antara pelepasan gula reduksi selama perlakuan enzimatis dengan peningkatan pulp *bleaching* (Morris dkk, 1998).

#### b) Aplikasi Xilanase dalam Produksi Gula Xilitol

Gula xilitol yang berasal dari xilosa banyak digunakan untuk konsumsi penderita diabetes. Malaysia menggunakan gula xilitol untuk campuran pasta gigi karena dapat berfungsi memperkuat gusi. Xilosa sebagai bahan baku xilitol ini diproduksi dari xilan. Xilan banyak diperoleh dari limbah pertanian dan industri



makanan. Dengan demikian, pengembangan proses hidrolisis secara enzimatik juga merupakan prospek baru untuk penanganan limbah hemiselulosa (Richana dan Lestina, 2003).

#### c) Aplikasi Xilanase dalam Makanan Ternak

Van Paridon dkk (1992) telah melakukan penelitian pemanfaatan xilanase untuk campuran makanan ayam boiler, dengan melihat pengaruhnya terhadap berat yang dicapai dan efisiensi konversi makanan serta hubungannya dengan viskositas pencernaan, hal yang sama juga dilakukan oleh Bedford dan Classen (1992). Para peneliti di atas melaporkan bahwa campuran makanan ayam boiler dengan xilanase ternyata mampu memperbaiki penyerapan gizi, sehingga meningkatkan pencapaian berat dan efisiensi konversi makanan.

#### d) Aplikasi Xilanase dalam Industri Makanan dan Minuman

Xilanase dapat juga digunakan untuk menjernihkan *juice*, ekstraksi kopi, minyak nabati, dan pati. Kombinasi dengan selulase dan pektinase dapat digunakan untuk penjernihan *juice* (Richana dan Lestina, 2003).

#### e) Aplikasi Xilanase dalam produksi roti

Penelitian tentang xilanase yang berasal dari *Aspergillus niger var awamori* setelah ditambahkan ke dalam adonan roti ternyata menghasilkan kenaikan volume spesifik roti. Kombinasi penambahan amilase dan xilanase juga dapat meningkatkan kualitas roti (Richana dan Lestina, 2003).

## 2.2 Teknologi DNA Rekombinan

Dasar dari semua penelitian yang berbasis bioteknologi modern adalah kemampuan untuk memanipulasi DNA. Hal utama yang perlu dilakukan oleh peneliti dalam bidang ini adalah mengisolasi DNA dari organisme target. Mengisolasi DNA bakteri merupakan prosedur isolasi DNA yang paling mudah karena sel bakteri mempunyai struktur membran dan dinding sel yang sederhana.

*E.coli* adalah bakteri yang paling banyak digunakan dan paling disenangi dalam memanipulasi berbagai macam gen. Hal ini dikarenakan kemudahan dalam mengisolasi DNA *E.coli* (Clark dan Pazdernik, 2009). Kelebihan lain dari bakteri

ini adalah mudah dimanipulasi dan dikultur, tingkat pertumbuhannya cepat, dapat menerima gen asing dengan berbagai macam teknik yang telah diuji coba, serta telah banyak diperoleh informasi mengenai genom bakteri tersebut (Mc Kane dan Kandel, 1996).

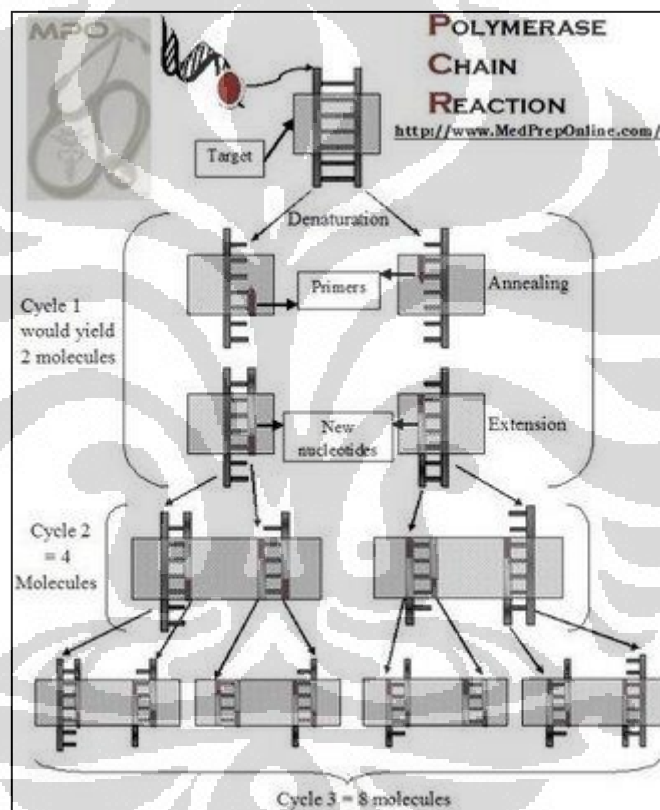
*Polymerase Chain Reaction (PCR)*, adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu secara *in vitro*. Metode ini pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis, seorang peneliti di perusahaan *CETUS Corporation*. Metode ini sekarang telah banyak digunakan untuk berbagai macam manipulasi dan analisis genetik. Pada awal perkembangannya metode ini hanya digunakan untuk melipatgandakan molekul DNA, tetapi kemudian dikembangkan lebih lanjut sehingga dapat digunakan pula untuk melipatgandakan dan melakukan kuantifikasi molekul mRNA (Yuwono, 2006).

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuens DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan. Sekuens yang diketahui disebut dengan primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam PCR (Yuwono, 2006).

Empat komponen utama pada proses PCR adalah : (1) DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), yang terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase, yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Yuwono, 2006).

Reaksi pelipatgandaan suatu fragmen DNA dimulai dengan melakukan denaturasi DNA *template* (cetakan) sehingga rantai DNA yang berantai ganda akan terpisah menjadi rantai tunggal. Denaturasi DNA dilakukan dengan menaikkan suhu 95°C (tergantung kandungan GC nya) selama 1-2 menit, kemudian suhu diturunkan menjadi 55°C sehingga primer akan menempel (*annealing*) pada cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal.

Primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Suhu  $55^{\circ}\text{C}$  yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah, tetapi biasanya akan terjadi *mispriming* yaitu penempelan primer pada tempat yang salah. Pada suhu yang lebih tinggi, spesifisitas reaksi amplifikasi akan meningkat, tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun (Yuwono, 2006). Secara umum, reaksi PCR dapat dilihat dalam gambar berikut :



Gambar 2.2. Reaksi PCR

[Sumber: [www.MedPrepOnline.com](http://www.MedPrepOnline.com/)]

Primer yang digunakan dalam PCR ada dua yaitu oligonukleotida yang mempunyai sekuen yang identik dengan salah satu rantai DNA cetakan pada ujung 5'-fosfat, dan oligonukleotida yang kedua identik dengan sekuen pada ujung 3'-OH rantai DNA cetakan yang lain. Proses *annealing* biasanya dilakukan selama 1-2 menit. Setelah dilakukan *annealing* oligonukleotida primer dengan

DNA cetakan, suhu inkubasi dinaikkan menjadi 72°C selama 1,5 menit. Pada suhu ini DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerisasi, rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. DNA rantai ganda yang terbentuk dengan adanya ikatan hidrogen antara rantai DNA cetakan dengan rantai DNA baru hasil polimerasi selanjutnya akan didenaturasi lagi dengan menaikkan suhu inkubasi menjadi 95°C. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya akan berfungsi sebagai cetakan bagi reaksi polimerasi berikutnya .

Reaksi tersebut berulang terus sampai 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi. Akan tetapi, pada umumnya aktivitas DNA polimerase Taq menjadi menurun setelah 25-30 siklus amplifikasi (Sambrook dkk, 2001).

### 2.3 Kloning Gen

Istilah kloning menjadi lebih populer setelah lahirnya domba Dolly yang merupakan hasil kloning (reproduktif) dari induknya. Sejak itu kloning menjadi istilah yang sangat populer dipakai oleh kalangan ilmuwan untuk menjelaskan duplikasi material biologis walaupun diperoleh dengan proses yang berbeda. Dalam pengertian umum sebuah klon adalah suatu cetakan yang identik dari suatu organisme, organ, sel tunggal, maupun makromolekul DNA (Helianti, 2010).

Paling tidak dibutuhkan 5 komponen umum untuk melakukan kloning gen, yaitu sebagai berikut :

1. Vektor kloning DNA
2. Fragmen DNA target yang akan diklon
3. Enzim restriksi
4. Enzim ligase
5. Bakteri inang yang kompeten

Vektor kloning adalah molekul DNA yang dapat membawa DNA asing (target) ke dalam sel inang, bereplikasi di dalam sel, dan menghasilkan cetakan dari dirinya sendiri dan DNA asing yang dibawanya. Karakter substansial yang harus dimiliki oleh sebuah vektor DNA diantaranya adalah dapat melakukan propagasi di dalam sel inang, mempunyai situs *multiple cloning* untuk memasukkan DNA asing/target ke dalamnya, dan mempunyai gen marker (gen tahan antibiotik atau gen reporter) yang memungkinkan untuk menyeleksi bakteri rekombinan yang mengandung plasmid dengan DNA asing (Helianti, 2010).

Terdapat berbagai macam vektor yang biasa digunakan dalam rekayasa genetika. Diantaranya adalah plasmid, faga, kosmid, *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC) dan *Yeast Artificial Chromosomes* (YAC). Plasmid adalah molekul DNA sirkular yang terdapat bebas dalam sel bakteri. Di dalam sel, posisinya terpisah dengan kromosom dan plasmid mempunyai gen-gen ori (*origin of replication*) sehingga mampu mereplikasi sendiri tanpa harus tergantung pada kromosom (Muladno, 2002).

Plasmid mempunyai beberapa keistimewaan yang membuatnya sangat berguna sebagai vektor kloning. Rangkaian basa yang lengkap pada banyak plasmid sudah diketahui, karena itu, lokasi situs pemotongan yang tepat oleh enzim restriksi untuk menyisipkan DNA asing sudah dapat dipetakan. Plasmid berukuran lebih kecil daripada kromosom inang sehingga mudah dipisahkan dari kromosom tersebut, dan DNA yang diinginkan mudah dilepaskan lewat pemotongan plasmid dengan enzim yang spesifik untuk situs restriksi yang ke dalamnya disisipkan potongan asli DNA (Murray dkk, 2003).

Faga adalah turunan dari virus yang menginfeksi bakteri, bisa berasal dari faga lamda ataupun faga M13. Faga biasanya mempunyai molekul DNA linear yang ke dalamnya dapat disisipkan DNA asing pada beberapa situs enzim restriksi. DNA kimera dikumpulkan setelah faga berkembang lewat siklus lisisnya dan menghasilkan partikel faga yang matang serta infeksi. Kelebihan utama pada vektor faga adalah kemampuannya untuk menerima fragmen DNA dengan panjang 10-20 kb, sementara plasmid hanya mampu menerima potongan DNA dengan panjang sekitar 6-10 kb (Murray dkk, 2003).

Fragmen DNA yang lebih besar pun dapat diklonkan di dalam kosmid, yang menggabungkan sifat terbaik plasmid dan faga. Kosmid merupakan plasmid yang mengandung rangkaian DNA, yang dinamakan *pac cos*, yang diperlukan untuk mengemas lambda DNA ke dalam partikel faga. Vektor ini tumbuh dalam bentuk plasmid ke dalam bakteri, tetapi karena banyak lambda DNA yang tidak diperlukan sudah dikeluarkan, maka lebih banyak DNA kimera yang dapat dikemas ke dalam kepala faga. Tidak jarang kosmid membawa sisipan DNA kimerik yang panjangnya 35-50 kb. Bahkan potongan DNA yang lebih besar dapat disatukan ke dalam *Bacterial Artificial Chromosomes* (BAC), dan *Yeast Artificial Chromosomes* (YAC). Vektor ini akan menerima dan memperbanyak sisipan DNA yang panjangnya beberapa ratus kb atau lebih (Murray dkk, 2003).

Enzim restriksi atau endonuklease restriksi adalah enzim yang memotong DNA pada rangkaian DNA spesifik di dalam molekul. Keberadaannya pada suatu bakteri tertentu akan membatasi pertumbuhan virus bakteri yang disebut bakteriofaga. Enzim restriksi memotong DNA dari sumber apapun menjadi potongan yang pendek dengan cara yang spesifik menurut rangkaiannya. Enzim defensif ini melindungi DNA bakteri yang menjadi inang dari DNA yang berasal dari organisme asing terutama organisme faga yang infeksi. Meskipun demikian, enzim tersebut hanya terdapat pada sel yang juga mempunyai enzim pendamping yang melakukan metilasi DNA inang sehingga membuatnya menjadi substrat yang tidak sesuai untuk dicernakan oleh enzim restriksi (Murray dkk, 2003).

Enzim restriksi diberi nama menurut bakteri yang merupakan asal enzim tersebut diisolasi. Misalnya *EcoRI* berasal dari *Escherichia coli*, dan *BamHI* dari *Bacillus amyloliquefaciens*. Tiga huruf pertama pada enzim restriksi terdiri dari huruf pertama yang menyatakan genus (E), dan dua huruf berikutnya yang menyatakan spesies (co). Tiga huruf ini dapat diikuti dengan simbol strain (R) dan angka romawi (I) untuk menunjukkan urutan penemuan. Setiap enzim akan mengenali dan memotong rangkaian DNA untai ganda yang spesifik, yaitu rangkaian dengan panjang 4-7 pb. Potongan DNA ini akan menghasilkan ujung tumpul (*blunt-end*) atau ujung lengket (*sticky-end*) menurut mekanisme pemotongan yang dilakukan oleh enzim tersebut (Murray dkk, 2007).

Jika nukleotida didistribusikan secara acak dalam suatu molekul DNA tertentu, kita akan dapat menghitung frekuensi pemotongan bagian DNA oleh enzim tertentu. Untuk setiap posisi dalam molekul DNA terdapat empat kemungkinan yaitu A, C, G dan T. Oleh karena itu enzim restriksi yang mengenali rangkaian 4 pb akan memotong rata-rata sekali setiap 256 pb ( $4^4$ ), sedangkan enzim lainnya yang mengenali rangkaian 6 pb akan memotong sekali setiap 4096 pb ( $4^6$ ). Potongan tertentu DNA mempunyai susunan linear yang khas untuk berbagai enzim, dengan demikian dapat dibuat peta restriksi. Jika DNA dicerna dengan enzim restriksi tertentu, ujung semua fragmennya akan mempunyai rangkaian DNA yang sama. Fragmen yang dihasilkan dapat diisolasi dengan elektroforesis pada agarosa atau poliakrilamida. Perlakuan ini merupakan tahap yang esensial dalam proses kloning (Murray dkk, 2007).

Enzim ligase menyabungkan kedua ujung fragmen DNA dengan membentuk ikatan fosfodiester antara kedua fragmen tersebut. Pada umumnya enzim ligasi yang digunakan dalam rekayasa genetika adalah enzim yang dimurnikan dari *Escherichia coli* yang telah diinfeksi oleh faga T4. Enzim ini dikenal dengan nama T4 DNA ligase (Brown, 1991).

Langkah selanjutnya dalam kloning gen adalah memasukkan molekul DNA tersebut ke dalam sel hidup, umumnya bakteri. Masuknya molekul DNA rekombinan ke dalam ini disebut transformasi (Muladno, 2002). *E. coli* adalah bakteri inang yang paling umum digunakan untuk menerima gen asing dalam proses kloning gen. Kelebihan bakteri ini adalah mudah dimanipulasi dan dikultur, tingkat pertumbuhannya cepat, dapat menerima gen asing dengan berbagai macam teknik yang telah diuji coba, serta telah banyak diketahui informasinya (Mc Kane & Kandel, 1996).

*E. coli* pada keadaan normal sulit mengakomodasi DNA dari luar. Agar proses transformasi dapat berlangsung secara efisien, bakteri harus mengalami perlakuan fisika atau kimiawi tertentu, sehingga dapat meningkatkan kemampuannya dalam mengambil DNA. Sel yang telah mengalami perlakuan ini disebut sel yang bersifat kompeten (Brown, 1991).

Jadi secara umum, sel inang kompeten adalah sel bakteri yang telah dimodifikasi secara genetis, sehingga tidak mempunyai restriksi terhadap DNA

dari luar, juga dapat mengakomodasi sifat-sifat yang diperlukan untuk melakukan seleksi hasil rekombinasi DNA dan tidak bersifat patogen (Helianti, 2010).

Contoh strain *E. coli* yang sering digunakan sebagai sel inang kompeten diantaranya adalah *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* JM 109, dan *E. coli* BL21.

## 2.4 Ekspresi Gen

Salah satu fungsi dasar yang harus dijalankan oleh DNA sebagai materi genetik adalah fungsi fenotipik. Artinya, DNA harus mampu mengatur pertumbuhan dan diferensiasi individu organisme sehingga dihasilkan suatu fenotipe tertentu. Fenotipe organisme sangat ditentukan oleh hasil interaksi protein-protein di dalam sel. Setiap protein tersusun dari sejumlah asam amino dengan urutan tertentu, dan setiap asam amino pembentukannya disandi oleh urutan basa nitrogen di dalam molekul DNA. Rangkaian proses ini, mulai dari DNA hingga terbentuknya asam amino, dikenal sebagai dogma sentral biologi molekuler (Susanto, 2002).

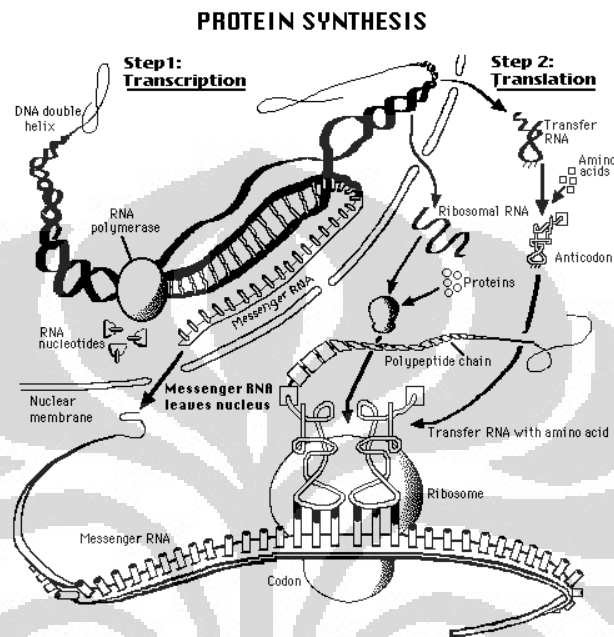
Perubahan urutan basa di dalam molekul DNA menjadi urutan basa molekul RNA dinamakan transkripsi, sedangkan penerjemahan urutan basa RNA menjadi urutan asam amino suatu protein dinamakan translasi. Jadi, proses transkripsi dan translasi dapat dilihat sebagai tahap-tahap ekspresi urutan basa DNA. Namun, tidak semua urutan basa DNA akan diekspresikan menjadi urutan asam amino. Urutan basa DNA yang pada akhirnya menyandi urutan asam amino disebut sebagai gen. Dengan demikian, secara kimia gen adalah urutan basa nitrogen tertentu pada molekul DNA yang dapat diekspresikan melalui tahap-tahap transkripsi dan translasi menjadi urutan asam amino tertentu (Susanto, 2002).

Translasi, atau pada hakekatnya sintesis protein, berlangsung di dalam ribosom, suatu struktur organel yang banyak terdapat di dalam sitoplasma. Ribosom terdiri atas dua subunit, besar dan kecil, yang akan menyatu selama inisiasi translasi dan terpisah ketika translasi telah selesai. Ukuran ribosom sering dinyatakan atas dasar laju pengendapannya selama sentrifugasi sebagai satuan yang disebut satuan *Svedberg* (S). Pada kebanyakan prokariot ribosom mempunyai ukuran 70S, sedangkan pada eukariot biasanya sekitar 80S. Tiap



ribosom mempunyai dua tempat pengikatan tRNA, yang masing-masing dinamakan tapak aminoasil (tapak A) dan tapak peptidil (tapak P).

Mekanisme sintesis protein secara skema garis besar dapat dilihat pada Gambar berikut :



Gambar 2.3. Mekanisme Sintesis Protein

[Sumber : [www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/protein\\_synthesis.gif](http://www.emc.maricopa.edu/faculty/farabee/biobk/protein_synthesis.gif)]

Organisme menyesuaikan diri dengan perubahan lingkungan melalui ekspresi gen yang terus berubah. Proses perubahan ekspresi gen telah diteliti secara rinci pada bakteri serta virus, dan umumnya melibatkan interaksi protein pengikat spesifik dengan berbagai regio DNA tepat disekitar situs mula transkripsi. Proses ini dapat memberi efek positif atau negatif terhadap transkripsi. Sel-sel eukariota menggunakan paradigma dasar ini walaupun juga memanfaatkan mekanisme lain untuk mengatur transkripsi. Proses seperti penggalakan (*enhancement*) atau represi; ekspresi spesifik-jaringan; pengaturan oleh hormon, logam berat dan zat-zat kimia; amplifikasi gen; penyusunan kembali gen; modifikasi pascatranskripsi; dan stabilitas RNA juga dipakai untuk mengontrol ekspresi gen (Murray dkk, 2003).

Menurut Karp (2008), gen yang mengkode jalur metabolik enzim pada bakteri biasanya dikelompokkan bersama dalam kromosom menjadi kompleks

fungsional tertentu yang disebut operon. Semua gen pada operon dikoordinasikan dan dikontrol oleh suatu mekanisme yang pertama kali dijelaskan pada tahun 1961 oleh Francois Jacob dan Jacques Monod dari Pateur Institute di Paris.

Secara umum, operon bakteri terdiri dari :

- Gen struktural : adalah gen yang mengkode enzim itu sendiri. Gen struktural pada operon biasanya terletak berdampingan satu sama lain, dan RNA *polymerase* berpindah dari satu gen struktural ke gen struktural yang lain, mengubah gen-gen tersebut menjadi mRNA tunggal. Perpanjangan mRNA ini kemudian diterjemahkan ke dalam berbagai enzim spesifik dalam jalur metabolik.
- Promotor : adalah daerah dimana RNA *polymerase* terikat pada DNA sebagai awal dari proses transkripsi.
- Operator : adalah daerah yang terletak berdekatan atau tumpang tindih dengan promotor, dan merupakan tempat perlekatan protein yang disebut repressor. Repressor adalah contoh dari protein regulator yaitu protein yang mengenali sekuen spesifik tertentu dan berikatan dengan sekuen tersebut dengan afinitas tinggi.
- Gen Regulator : gen yang mengkode protein repressor. Kunci pada ekspresi operon berada pada repressor. Bila repressor mengikat operator, promotor tidak dapat berikatan dengan polimerase dan transkripsi tidak terjadi.

Untuk tujuan komersial dan peningkatan nilai ekonomis dari produksi xilanase sangatlah penting untuk mencari organisme yang mampu melakukan *overproduksi* enzim tersebut. Teknik rekombinasi DNA merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memperbaiki produksi xilanase (Satria, 2008).

Aktivitas xilanase yang digunakan pada industri kertas diharapkan bebas dari aktivitas selulase, oleh sebab itu Biely (1985) mengatakan bahwa tujuan dari kloning gen xilanase adalah : (i) untuk mengkonstruksi produser yang menghasilkan sistim xilanolitik yang bebas dari enzim selulolitik; (ii) Memperbaiki karakteristik industrial mikroorganisme dengan memasukkan gen xilanase dan xilosidase.

Sejumlah gen xilanase telah di kloning baik secara heterologus maupun homologus. Pada kloning heterologus menggunakan *E. coli* sebagai inang aktivitas xilanase sering mengalami penurunan yang disebabkan oleh adanya modifikasi pasca translasi dan adanya akumulasi xilanase rekombinan di dalam sel (Kulkarni *dkk*, 1999). Untuk menghindari hal tersebut, teknik *over*-ekspresi banyak dilakukan dengan menggunakan promoter kuat pada vektor yang digunakan.

Pada tahun 1998, Chen dan Westpheling telah berhasil melakukan kloning gen xilanase dari *Streptomyces coelicolor* yang mempunyai kemiripan 99% dengan gen xynB dari *Streptomyces lividans*. Daerah promoter gen ini ditentukan dengan cara *transcriptional fusion* antara daerah *upstream* gen xynB *S.coelicolor* dengan reporter gen xylE. Selanjutnya, Chen dan Westpheling menggabungkan gen xynA dari *Thermotoga maritima* dengan gen xynB yang mengandung promoter tadi. Gen xynA *Thermotoga maritima* telah diketahui sebelumnya mengkode xilanase thermostabil yang cocok digunakan dalam *bleaching kraft pulp*. Penggabungan antara gen xynB promoter dan xyn A ini kemudian disubklon dan diekspresikan pada *Streptomyces* dan didapatkan xilanase yang thermostabil serta terdapat pada fraksi supernatan (ekstraselular).

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

Penelitian ini dilakukan secara *wet-lab* di dalam laboratorium dengan beberapa parameter yang diuji dan *in-silico* untuk perancangan beberapa perangkat penelitian.

### 3.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain alat-alat gelas, inkubator, *shaker incubator* (Kuhner), *vortex mixer*, spektrofotometer, autoklaf, pH meter, mikropipet, timbangan, Mini Spin (Eppendorf), *thermal cycler* PCR (Eppendorf), *termomixer* (Eppendorf), *electroforesis* (Mupid), *Cold sentrifuse* (Sorvale Fresco), konsentrator (Eppendorf), oven, *Gel Documentation* (Kodak) dll

Bahan-bahan yang digunakan adalah bahan-bahan yang biasa digunakan dalam penelitian biologi molekular antara lain Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA), enzim restriksi EcoR1, enzim T4 DNA ligase, vektor pGEM-T Easy, dll.

### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari Agustus 2010 sampai Mei 2011 di Laboratorium Teknologi Bioindustri, Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), LAPTIAB, PUSPIPTEK, Serpong, Jawa Barat.

### 3.3 Prosedur Perlakuan

#### 3.3.1 Konfirmasi isolat berdasarkan zona bening

Isolat bakteri dengan kode CMU yang diperoleh dari hasil isolasi sebelumnya dari sumber air panas Cimanggu ditumbuhkan dalam medium cair LB. Kultur bakteri ini ditumbuhkan dalam *shaker* inkubator 150 rpm, 55°C, semalaman.

Kultur bakteri kemudian diteteskan sebanyak 2 $\mu$ L ke medium agar LB-xilan pH 7, 8, 9, 10, dan 11, kemudian diinkubasi 24 jam dalam inkubator 55°C.

### 3.3.2 Ekstraksi genom isolat CMU

Satu koloni tunggal bakteri diinokulasikan ke dalam medium LB cair pH 7,2 sebanyak 50 mL dan diinkubasi semalaman pada *shaker* inkubator 150 rpm, 55°C. Sel dikumpulkan dengan sentrifugasi 5800 x g, 4°C selama 20 menit. Pelet sel diresuspen dengan 2,5 mL 50 mM Tris HCl pH 8 dan 50 mM EDTA. Lalu dibekukan selama 30 menit pada suhu -80°C. Larutan *lysozyme* segar ditambahkan sebanyak 0,25 mL pada sel beku dan dibiarkan mencair pada suhu ruang dengan diaduk perlahan. Setelah mencair, diletakkan di dalam es selama 45 menit. Setelah itu, di pindahkan ke dalam mikro tubes masing-masing sebanyak 300 µL.

Larutan STEP dan serbuk proteinase K (konsentrasi 1 mg/mL) ditambahkan sebanyak 50 µL pada masing-masing mikro tubes dan dicampur sampai rata. Inkubasi pada suhu 50°C selama 1 jam dengan sesekali diguncang perlahan. Sebanyak 300 µL Tris Buffer fenol ditambahkan, dicampur perlahan (tidak memakai vorteks) selama 5 menit. Untuk memisahkan lapisan dilakukan sentrifugasi pada 2900 x g, 4°C, selama 15 menit. DNA berada pada lapisan atas. Lapisan atas ditransfer ke tabung steril. Natrium asetat 3 M sebanyak 0,1% dari volume di atas ditambahkan, dicampur dengan perlahan. Ditambahkan 2 kali volume etanol, diaduk dengan membolak-balik, DNA dan RNA akan mengendap berbentuk globe. Lalu disentrifugasi 5800 x g, 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang. Pelet dicuci dengan etanol 70%, diguncang perlahan. Disentrifugasi 12500 x g 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang. DNA dikeringkan pada suhu 37°C selama 1 jam atau dikeringkan pada konsentrator selama 15 menit. DNA dilarutkan dalam TE atau air steril. Disimpan pada suhu -20°C.

### 3.3.3 Amplifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU

Daerah 16S rRNA isolat CMU diamplifikasi menggunakan tehnik PCR. Primer yang digunakan dipesan dari *Eurogentec Ait* (Singapura). Komposisi reaksi PCR (100 µL) yaitu : 10 µL 10xPCR Buffer; 10 µL dNTPs (2 mM); 1µL primer 27f (10 mM); 1 µL primer 1527r (10 mM); 2 µL Genom CMU; 1 µL Taq polimerase (NEB) dan 77 µL ddH<sub>2</sub>O. Program PCR untuk reaksi ini adalah : *Denaturation* pada suhu 94°C selama 1 menit, *Annealing* pada suhu 50°C selama

35 detik, *Extension* pada suhu 72°C selama 2 menit. Jumlah siklus yang dilakukan sebanyak 30 siklus. Pada siklus terakhir dilakukan *final ekstension* selama 10 menit.

#### 3.3.4 Purifikasi hasil PCR

Hasil PCR dipurifikasi dengan menggunakan Geneaid Gel/PCR DNA *Fragments Extraction Kit*. Prosedur yang dilakukan adalah : 100 µL produk PCR dengan 500 µL DF Buffer lalu divortex. Campuran tersebut lalu dipindahkan ke DF *Column*. Sentrifugasi 14000 x g dilakukan selama 30 detik. Cairan yang tertampung dibuang lalu ditambahkan 600 µL *wash* buffer. Disentrifugasi 14000 x g selama 30 detik. Cairan yang tertampung dibuang lalu disentrifugasi lagi 14000 x g selama 3 menit. Kolom DF dimasukkan ke dalam mikro *tubes* baru, lalu ditambahkan *elution* buffer 50 µL ke tengah-tengah membran, didiamkan 2 menit. Disentrifugasi 14000 x g selama 1,5 menit. Hasil saringan disimpan pada suhu -20°C.

#### 3.3.5 Analisa hasil sekuensing 16S rRNA

Hasil purifikasi produk PCR kemudian dikirimkan ke *Genetika Science* untuk sekuensing daerah 16S rRNA isolat CMU. Terhadap hasil sekuensing kemudian dilakukan pencarian kemiripan sekuen dengan *database* yang tersedia. Teknik yang digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan menggunakan server *on-line* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

#### 3.3.6 Amplifikasi gen alkaloxilanase (alkxyn) dengan PCR dan deteksi hasil PCR dengan elektroforesis gel.

Kloning gen dilakukan dengan amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer yang telah dirancang sebelumnya oleh tim dan dipesan dari *Genetika Science*. Campuran reaksi PCR untuk 50 µL sampel adalah 5 µL 10x Buffer PCR; 1,5 µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2,5 µL dNTP (2mM); 1 µL Primer (masing-masing untuk *reverse* dan *forward*); 2 µL genom isolat CMU; 0,25 µL taq Platinum; 36,75 µL ddH<sub>2</sub>O. Program PCR diset dengan kondisi *Hot Start* 94°C selama 3 menit; *Denaturation* 94°C selama 30 detik; *Annealing* 56°C selama 45 detik; *Extension*

72°C selama 3 menit; *Final extension* 72°C selama 10 menit. Jumlah siklus yang dilakukan sebanyak 30 siklus.

Hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (b/v). Gel dimasukkan ke dalam perangkat elektroforesis dan dituangkan buffer TAE 1x sampai gel terendam. Sebanyak 3 µL produk PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye*, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan tip pipet mikro. Campuran ini kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Marker DNA sebanyak 1 µL juga dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Alat elektroforesis dihubungkan dengan tegangan 100 V. Setelah migrasi dapar *loading* mencapai 70%, alat elektroforesis dimatikan. Gel agarosa lalu direndam dalam larutan Etidium Bromida selama 15 menit. Hasil elektroforesis dilihat di atas UV transluminator dan difoto dengan kamera Polaroid.

### 3.3.7 Ligasi produk PCR *alkxyn* ke vektor pGEM-T Easy

Ligasi dilakukan menurut panduan ligasi Promega untuk pGEM-T Easy. Sebanyak 3 µL hasil PCR (gen *alkxyn*), 1 µL vektor pGEM-T Easy, 5 µL buffer ligase 2x, dan 1 µL T4 DNA ligase dicampur dalam mikro tubes dan diinkubasi pada 4°C semalaman.

### 3.3.8 Transformasi hasil ligasi ke *E.coli* DH5α

Sebelum dilakukan transformasi, *E.coli* DH5α harus dipersiapkan menjadi kompeten sel agar mempunyai efisiensi yang tinggi dalam menerima DNA dari luar pada proses transformasi. Pembuatan sel kompeten didasarkan pada metode Inoue (1989). Kultur *E.coli* DH5α dari stok di gores pada media LB agar, dan diinkubasi ± 16 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal DH5α dari *plate* diinokulasi ke media SOB 50 mL lalu diinkubasi pada 150 rpm, 30°C sampai nilai OD<sub>600</sub> = 0,4-0,8. Kultur bakteri kemudian diinkubasi dalam es sampai dingin setelah itu disentrifugasi pada 2900 x g selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis. Pelet disuspensikan dengan bantuan pipet dengan menambahkan TB buffer dingin sebanyak 16,75 mL, inkubasi di es selama 10 menit. Setelah itu disentrifugasi lagi pada 2900 x g selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan cara aseptis. Pelet disuspensikan dengan bantuan

pipet dengan menambahkan TB buffer dingin sebanyak 4 mL, diinkubasi di es selama 10 menit. Ditambahkan Dimetil Sulfoxida (DMSO) 0,3 mL lalu diinkubasi dalam es selama 10 menit. Dipindahkan pada tabung mikro *tubes* masing-masing sebanyak 0,2 mL, dan disimpan dalam -80°C.

Transformasi hasil ligasi ke *E.coli* DH5 $\alpha$  dilakukan dengan metode kejut panas Sambrook (2001) modifikasi. Kompeten sel yang telah dibekukan paling tidak 1 jam dicairkan di dalam es. Sebanyak 10  $\mu$ L hasil ligasi dimasukkan ke kompeten sel tersebut, suspen dengan tangan sampai tercampur sempurna, diinkubasi dalam es selama 30 menit. Kemudian segera diinkubasi dalam *termomixer* 42°C selama 1 menit dan diinkubasi kembali dalam es selama 2 menit. Setelah itu ditambahkan medium SOC sebanyak 800  $\mu$ L dan diinkubasi dalam *shaker* inkubator 150 rpm, 37°C selama satu jam. Setelah itu, sel disentrifugasi 5800 x g selama 5 menit, sebanyak 800  $\mu$ L supernatan dibuang, dan sisanya diresuspen kembali dengan pelet dan disebar merata ke medium LB agar yang mengandung antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 100  $\mu$ g/mL, Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,1 M dan 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-GAL) 4%. Diinkubasi semalaman pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan *screening* koloni putih-biru. Koloni yang diduga positif (koloni putih) lalu di ambil dan dikultur dalam media LB-ampisilin cair untuk selanjutnya diekstrak plasmidnya.

### 3.3.9 Ekstraksi plasmid

Ekstraksi plasmid dari koloni terduga positif (koloni putih hasil transformasi) dilakukan dengan metode alkali. Sebanyak 3 mL kultur *E.coli* rekombinan dalam LB-ampisilin yang telah di tumbuhkan semalaman disentrifugasi 5800 x g, 4°C, selama 5 menit. Supernatan dibuang, lalu pelet di campur dengan 100  $\mu$ L *Solution* I dan didiamkan dalam suhu ruang selama 5 menit. Sebanyak 200  $\mu$ L *Solution* II ditambahkan dan tabung diguncang perlahan ke atas dan ke bawah lalu diinkubasi dalam es selama 5 menit. Segera ditambahkan 150  $\mu$ L *Solution* III, diguncang dengan kuat dan diinkubasi di es selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi pada 12500 x g, 4°C, selama 20 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke mikro *tubes* baru lalu ditambahkan 300  $\mu$ L isopropanol sambil membolak-balikan tubes.



Diinkubasi dalam suhu ruang selama 30 menit kemudian disentrifugasi kembali 12500 x g, 4°C, selama 30 menit, supernatan dibuang. Pelet kemudian dicuci dengan 0,5 mL etanol 70 %, lalu disentrifugasi 12500 x g, 4°C, selama 5 menit, supernatan dibuang. Pelet dikeringkan dan dilarutkan dalam 50 µL Tris-HCl 10 mM pH 8 + RNase 1mg/mL.

Untuk keperluan sekuensing, plasmid yang didapat perlu dipurifikasi terlebih dahulu agar tidak mengganggu proses sekuensing. Tiga puluh µL Polyethylene glycol (PEG) 20% 2,5 M NaCl ditambahkan ke dalam larutan plasmid, lalu diguncang sampai tercampur sempurna, kemudian diinkubasi dalam es selama 1 jam. Disentrifugasi 12500 x g, 4°C selama 10 menit dan di cuci dengan etanol 70 % sebanyak 100 µL, lalu disentrifugasi lagi 12500 x g, 4°C selama 5 menit. Supernatan dibuang lalu pelet dikeringkan menggunakan konsentrator. Pelet kering kemudian dilarutkan dalam 20 µL Tris-HCl 10 mM pH 8.

### 3.3.10 Konfirmasi dengan enzim restriksi

Konfirmasi apakah plasmid yang telah diekstrak mengandung insert atau tidak dilakukan menggunakan enzim restriksi Eco-RI. Sebanyak 0,5 µL buffer Eco-RI; 2 µL plasmid yang akan dikonfirmasi; 0,1 µL BSA; 0,1 µL enzim restriksi Eco-RI; dan 2,3 µL ddH<sub>2</sub>O dicampur dalam mikro tubes dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Hasil restriksi kemudian dilihat menggunakan gel elektroforesis.

### 3.3.11 Analisa hasil amplifikasi gen alkxyn

Hasil amplifikasi gen alkxyn dikirimkan ke *Genetika Science* untuk sekuensing. Terhadap hasil sekuensing kemudian dilakukan pencarian kemiripan sekuen dengan *database* yang tersedia. Teknik yang digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan menggunakan server *on-line* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

### 3.3.12 Sonikasi sel *E.coli* DH5α

Koloni tunggal *E.coli* DH5α rekombinan ditumbuhkan semalaman dalam media LB-ampisilin 7 mL sebagai *starter*. Selanjutnya sebanyak 5mL kultur

bakteri tersebut diinokulasikan ke dalam 50 mL media LB-xilan-ampisilin. Bakteri tersebut ditumbuhkan semalaman dalam 37°C, 150 rpm. Kultur tersebut selanjutnya disentrifugasi 5800 x g, 4°C selama 15 menit. Pelet yang telah diperoleh selanjutnya dipecah dengan sonikator. Pemecahan ini bertujuan untuk mengeluarkan protein rekombinan. Pelet dipisahkan dari supernatan, sebanyak 5 mL 50 mM buffer Na fosfat pH 7+ mercaptoetanol ditambahkan pada pelet, sambil diresuspen. Resuspen pelet kemudian disonikasi selama 5 min; 20 sec on, 20 sec off (skala 8 dari 10 Hz). Sonikasi dilakukan dalam keadaan dingin (di atas es) dengan tujuan agar tidak terjadi kenaikan suhu selama sonikasi yang dapat menyebabkan kerusakan protein rekombinan. Selanjutnya resuspen pelet ini disentrifugasi dengan kecepatan 5800 x g, selama 5 min 4°C. Supernatan diambil dan dilakukan pengukuran aktivitas.

### 3.3.13 Pengukuran aktivitas xilanase (Bailey, 1992) pada *E.coli* DH5 $\alpha$ rekombinan

Besarnya kadar gula pereduksi dihitung sebagai xilosa berdasarkan kurva standar. Substrat *oat spelt xylan* dibuat dengan cara melarutkan 0,5 gr *oat spelt xylan* ke dalam 50 mL buffer diberbagai pH (untuk dilakukan karakterisasi). Sebanyak 50  $\mu$ L enzim kasar dicampur dengan 450  $\mu$ L substrat *oat spelt xylan*. Campuran antara enzim kasar dan substrat diinkubasi pada suhu 50°C selama 5 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 750  $\mu$ L DNS, lalu direndam dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Blanko dibuat dengan cara menginkubasi 450  $\mu$ L substrat *oat spelt xylan* pada suhu 50°C selama 5 menit, lalu ditambahkan 50  $\mu$ L buffer Tris-HCl 0,5 M. Kemudian ditambahkan 750  $\mu$ L DNS, lalu direndam dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar xilosa adalah grafik yang dibuat berdasarkan hubungan antara konsentrasi standar xilosa di dalam larutan buffer. Sebanyak 450  $\mu$ L larutan xilosa dari masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 5 menit, ditambah 750  $\mu$ L DNS, kemudian direndam dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, campuran tersebut diukur

absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar adalah grafik hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi xilosa. Aktivitas enzim didapatkan melalui persamaan sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(X) \times 1000 \times \text{faktor pengenceran}}{\text{BM xilosa} \times t \times V}$$

Keterangan :

X : jumlah gula pereduksi (mg)

1000 : Faktor konversi dalam  $\mu\text{mol}$

BM : Berat molekul xilosa yaitu 150,13 g/mol

t : Waktu inkubasi pada suhu optimum (menit)

V : Jumlah (volume) enzim yang digunakan dalam analisis (mL)

1 Unit aktivits xilanase  $\sim 1 \mu\text{mol/min}$

Aktivitas spesifik enzim didapat dengan membagi hasil aktivitas enzim (U/mL) dengan kadar protein enzim. Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Bradford (1976) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 50  $\mu\text{l}$  enzim kasar direaksikan dengan 2,5 ml larutan pereaksi Bradford yang telah diencerkan 5 kali pada tabung reaksi. Campuran dihomogenkan dengan vorteks dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan kurva standar bovine serum albumin (BSA).

## **BAB 4**

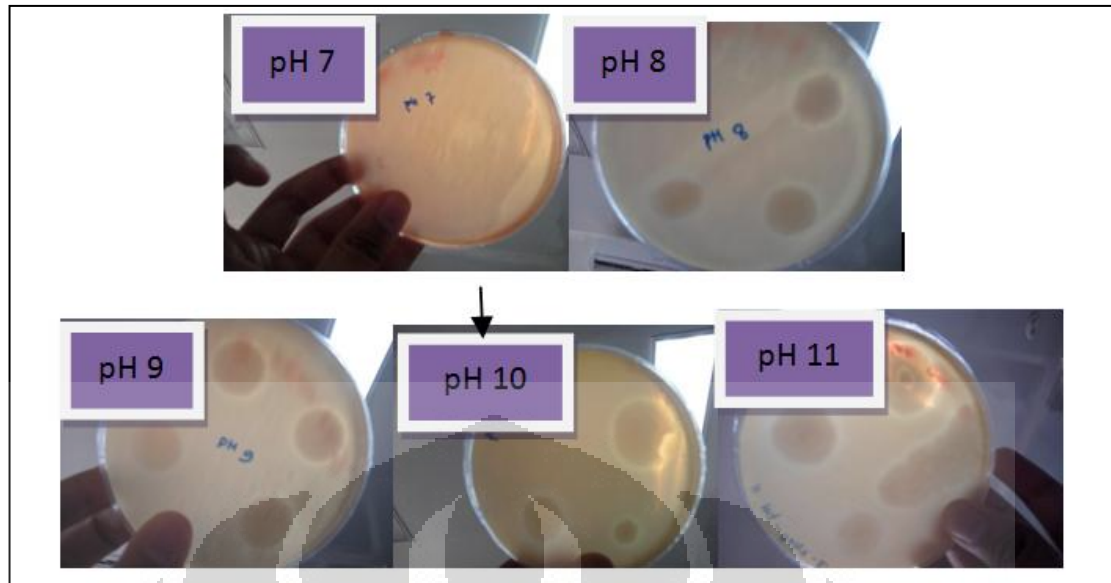
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### 4.1. Konfirmasi Isolat Berdasarkan Zona Bening

Dari hasil *sampling* dan isolasi endapan dari sumber air panas Cimanggu, Jawa Barat telah ditemukan isolat bakteri (diberi kode CMU) yang potensial menghasilkan xilanase. Kultur bakteri tersebut ditetaskan pada media padat LB-xilan untuk mengkonfirmasi zona bening yang dihasilkan. Menurut Gessesse dan Gashe (1997) serta Richana (2006) hasil positif xilanase ditunjukkan dengan adanya zona bening. Zona bening tersebut menunjukkan bahwa substrat (xilan) yang tercampur di dalam media padat telah diurai oleh enzim (xilanase) yang dihasilkan bakteri tersebut (Stauffer, 1998).

Secara kualitatif terlihat bahwa isolat CMU dapat dikatakan tidak optimal tumbuh pada pH 7. Koloni yang terbentuk dan zona bening yang dihasilkan terlihat sangat kecil. Pada pH yang lebih tinggi, terlihat pertumbuhan isolat yang cukup baik dan terbentuk zona bening disekitar koloni yang menandakan bahwa isolat tersebut memanfaatkan xilan yang terkandung dalam media padat untuk pertumbuhannya. Pengamatan secara kualitatif menunjukkan bahwa pada pH alkali (pH 11), zona bening yang dihasilkan lebih besar dari pH yang lebih asam. Hal ini menunjukkan bahwa isolat CMU mempunyai kemampuan dan potensi dalam menghasilkan enzim xilanase alkalofilik.

Zona bening yang terbentuk pada berbagai kondisi pH media padat setelah diinkubasi pada suhu 50°C selama 24 jam adalah seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini :



Gambar 4.1. Zona Bening Isolat CMU pada Berbagai pH

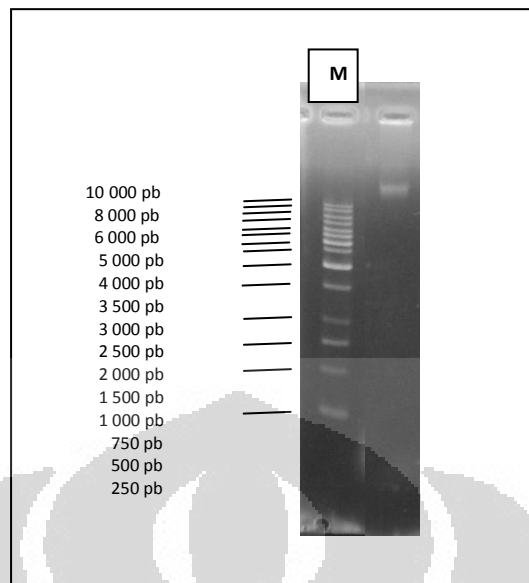
#### 4.2. Ekstraksi genom isolat CMU

Ekstraksi genom dilakukan untuk mengisolasi genom isolat CMU yang nantinya akan digunakan sebagai cetakan pada proses amplifikasi gen.

Untuk melepaskan DNA dari sel, membran sel harus dihancurkan terlebih dahulu. Metode umum yang digunakan pada bakteri adalah dengan menggunakan enzim lysozyme. Enzim ini memotong peptidoglikan yaitu komponen utama dalam dinding sel bakteri. Selanjutnya, penambahan deterjen SDS bertujuan untuk menghancurkan lapisan lemak pada membran sel (Clark dan Pazdernik, 2009).

Protein merupakan pengotor utama dalam ekstraksi DNA dari bakteri dan dapat dirusak dengan menambahkan proteinase K. Fenol yang ditambahkan bertujuan untuk mengekstrak protein sel. Pelarut organik ini dapat mengendapkan protein tetapi membiarkan asam nukleat (DNA dan RNA) tetap dalam larutan (Brown, 1991).

Untuk mengetahui keberhasilan ekstrak genom, dilakukan elektroforesis pada gel agarosa. Hasil dokumentasi gel adalah seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini :



Gambar 4.2. Hasil Elektroforesis Ekstraksi Genom Isolat CMU

Hasil elektroforeis menunjukkan pita DNA genom isolat CMU berukuran di atas 10 000 pb atau di atas marker yang digunakan dalam penelitian ini. Gambar tersebut juga menunjukkan pita tunggal yang bersih yang menandakan bahwa genom yang berhasil di ekstrak tidak terkontaminasi oleh protein dan zat-zat pengotor lainnya.

#### 4.3. Identifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU

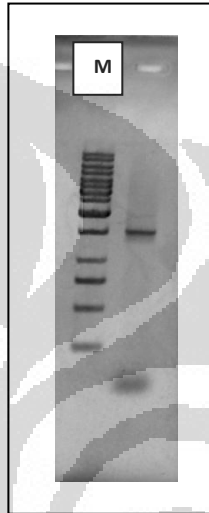
Daerah 16S rRNA isolat CMU diamplifikasi dengan tehnik PCR. Amplifikasi daerah ini dimaksudkan untuk mengidentifikasi isolat CMU berdasarkan kemiripan sekuennya dengan spesies lain.

Daerah 16S rRNA adalah salah satu bagian dari 30S subunit ribosom prokariot. Daerah ini mempunyai panjang 1,542 pb (Case, 2007). Keistimewaan daerah ini adalah karena sifatnya yang spesifik untuk masing-masing spesies bakteri sehingga biasa disebut dengan *conserved region*. Karena sifatnya tersebut, daerah ini umum digunakan sebagai dasar dari studi analisis filogenetik.

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU adalah primer yang didapat dari Weisburg dkk (1991), yaitu : 16S-27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 16S-1525r (5'-

AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Program PCR dikondisikan sebagai berikut : *denaturation* 94°C (1'), *annealing* : 50°C (35''), *extension* : 72°C (2') dan *final extension* : 72°C (10'). Total siklus dilakukan sebanyak 30 siklus.

Dokumentasi hasil elektroforesis produk PCR amplifikasi daerah 16S rRNA isolat CMU adalah seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini :



Gambar 4.3. Hasil Elektroforesis Daerah 16S rRNA Isolat CMU

Dari gambar di atas dapat terlihat daerah 16S rRNA isolat CMU teramplifikasi dengan panjang sekitar 1 500 pb. Produk PCR kemudian dipurifikasi menggunakan *Extraction Kit Geneaid* untuk menghilangkan komponen-komponen sisa PCR yang dapat mengganggu proses sekuensing.

Hasil purifikasi produk PCR kemudian dikirimkan ke Genetika *Science* untuk sekuensing. Terhadap hasil sekuensing kemudian dilakukan pencarian kemiripan sekuen dengan *database* dari *GeneBank*. Teknik yang digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan menggunakan server *on-line* di alamat : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Hasil sekuensing daerah 16S rRNA yang didapat adalah sebagai berikut :

27 F :

```
GCCTACGGCCGCTATACATGCAAGTCGAGCGGACCAAAGGGAGCTTGCTCCTGG
AGGTTAGCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGG
ATAACATCGAGAAATCGGTGCTAATACCGGATAATAAAAAGAACTGCATGGTTC
```

TTTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCCGCGGCATTAGC  
 TAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGG  
 GTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTG  
 ATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTTCG  
 ATAGG

1525R :

CGTTAATGGCAACTTGTTTCGACTTCACCCCAATCATCTGTCCCACCTTAGGCGGC  
 TGGCTCCAAAAGGTTACCCACCGAAACGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGA  
 CGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCG  
 ATTACTAGCAATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGA  
 GAATGGCTTTCTGGGATTGGCTTCACCTCACGGCTTCGCAACCCTTTGTACCATC  
 CATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC  
 CCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGC  
 TGGCAACTAAGGTCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAC  
 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTTGTCCCCGAAGGGGA  
 AAGCCCTATCTCTAGGGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGTTTAAGGTTCTTCTC  
 GTTGCTTCGAATTA

Data hasil sekuensing untuk daerah *forward* dan *reverse* menunjukkan hasil yang kurang bagus (hanya sebagian nukleotida yang bisa terbaca dengan baik). Hal ini terlihat apabila kita melakukan *alignment* pada kedua daerah tersebut, daerah *overlap* yang terjadi tidak beraturan. Menurut Case et.al (2007), penyimpangan yang terjadi pada analisis molekular seperti analisis daerah 16S rRNA dapat terjadi karena beberapa faktor seperti pada saat penanganan sampel, proses ekstraksi DNA, proses PCR (ketidak sesuaian primer atau kondisi PCR) dan juga karena kehadiran *multiple heterogeneous copies* daerah 16S rRNA di dalam genom.

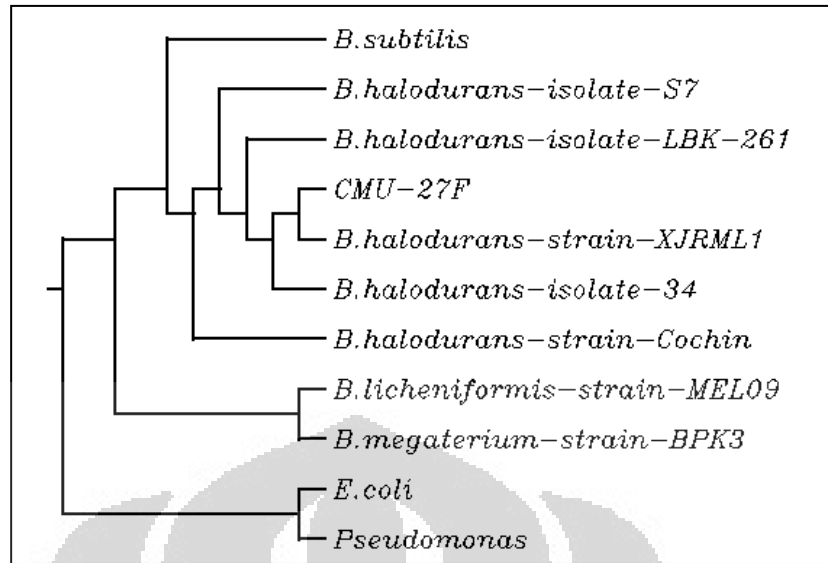
Berdasarkan data yang didapat, dilakukan BLAST parsial dari salah satu daerah yang didapat (daerah 27 F). Hasil pencarian kemiripan sekuens dari *data base* menunjukkan bahwa isolat CMU memiliki kemiripan 99% dengan *Bacillus halodurans* XJRML-1. Sebagian dari daftar kemiripan hasil BLAST dapat dilihat pada tabel di bawah ini :



Tabel 4.1. Hasil BLAST Daerah 27 F Isolat CMU

Nomer <i>Accession</i>	Deskripsi	E- <i>Value</i>	Persen Kemiripan
EF466141.1	<i>Bacillus halodurans</i> strain XJRML-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
GU367604.1	<i>Bacillus halodurans</i> strain Cochin 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	0,0	99 %
FJ763929.1	<i>Bacillus</i> sp. M8-C22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AB359904.1	<i>Bacillus halodurans</i> gene for 16s rRNA, partial sequence	0,0	99 %
AY686594.1	<i>Bacillus halodurans</i> isolate S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AY334098.1	<i>Bacillaceae</i> bacterium LBD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AF542086.1	<i>Bacillus halodurans</i> isolate 34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AY423275.1	<i>Bacillus halodurans</i> isolate LBK 261 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AY144582.1	<i>Bacillus halodurans</i> strain SES4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %
AY291122.1	<i>Bacillus</i> sp. YNUCCTCRQ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0,0	99 %

Dari data tersebut kemudian dibuat pohon filogenetik dengan menggunakan server *on line* [www.genome.jp](http://www.genome.jp) . Pohon filogenetik dibuat untuk memvisualisasikan hubungan evolusi diantara berbagai spesies atau benda-benda lain. Pohon filogenetik yang berupa diagram bercabang-cabang ini dapat dikonstruksi berdasarkan kesamaan atau perbedaan sifat fisik atau genetik seperti sekuen DNA, sekuen asam amino (protein), pola pemotongan enzim restriksi, ukuran alel pada analisa *microsatellite*, dan lain-lain. Gambar pohon filogenetik yang didapat adalah sebagai berikut :



Gambar 4.4. Pohon Filogenetik Isolat CMU

#### 4.4. Amplifikasi gen alkalofilixilanase (alkxyn)

Amplifikasi gen *alkxyn* dilakukan menggunakan tehnik PCR dengan menggunakan dua pasang primer yang dirancang berdasarkan *database* xilanase alkalofilik dari beberapa organisme yang terdapat dalam *GeneBank*.

Dua pasang primer *alkxyn* yang digunakan yaitu :

3f : 5'-ATGAATCAGCAACTTAACATTCTAATC-3'

3r : 5'-GTAGCGATTCTCCAAAAGACTC-3'

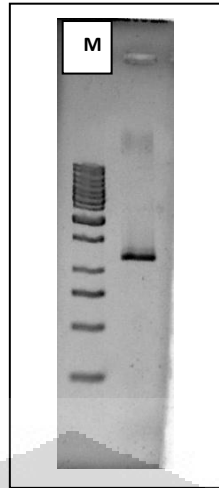
1/2f : 5'-ATG(C/A)T(A/T)A(A/C)A(A/C)(C/T)(G/T)TT(A/T)AGAAA(A/G)CC-3'

1/2 r : 5'-TTAATC(G/A)ATAATTCTCCA(A/G)(A/T)AAGC-3'

Program PCR dikondisikan sebagai berikut : *Hot start* 94°C (3'), *denaturation* 94°C (30''), *annealing* 56°C (45''), *extension* 72°C (3'), dan *final extension* 72°C (10'). Total siklus dilakukan sebanyak 30 siklus.

Cetakan DNA yang digunakan pada tahapan ini adalah genom isolat CMU yang telah diekstrak sebelumnya.

Produk amplifikasi PCR kemudian di elektroforesis menggunakan gel agarosa dan hasil dokumentasi gel nya adalah seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini :



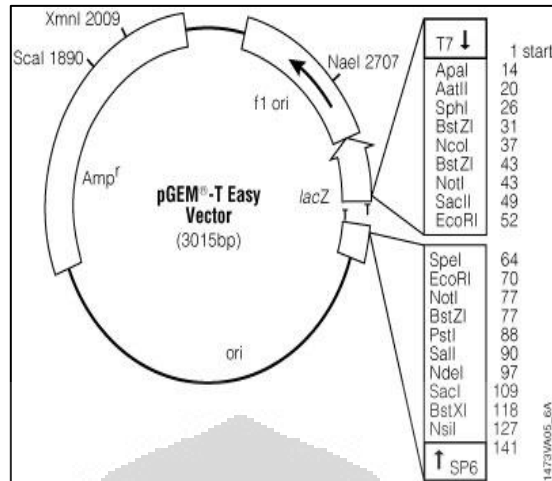
Gambar 4.5. Hasil Elektroforesis Amplifikasi Gen Alkxyn

Dari dua pasang primer yang digunakan, yang berhasil teramplifikasi hanya pasangan primer 1/2 *forward* dan *reverse*, sedangkan pasangan primer 3 *forward* dan *reverse* tidak berhasil mengamplifikasi gen *alkxyn* dalam genom isolat CMU. Hasil elektroferesis menunjukkan bahwa gen *alkxyn* yang teramplifikasi menggunakan pasangan *degenerated* primer 1/2 *forward* dan *reverse* adalah sebesar kurang lebih 1200 pb.

#### 4.5. Ligasi produk PCR *alkxyn* ke vektor pGEM-T Easy

Enzim yang paling umum digunakan untuk menempelkan (meligasikan) fragmen DNA insert ke dalam vektor adalah enzim T4 DNA ligase. Enzim ini berasal dari T4 bakteriofaga dan 400 kali lipat lebih aktif dari enzim ligase yang ditemukan pada *E.coli*. Enzim T4 DNA ligase digunakan sebagai katalis dalam pembentukan ikatan fosfodiester antara gugus hidroksil pada posisi 3' dan gugus fosforil pada posisi 5' (Promega, 2002).

Hasil purifikasi amplifikasi produk PCR *alkxyn* yang telah didapat selanjutnya dijadikan sebagai *insert* dalam proses ligasi ke vektor kloning. Vektor kloning yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid pGEM-T Easy. Peta plasmid tersebut adalah seperti pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.6. Peta Vektor pGEM-T Easy

Penggunaan vektor pGEM-T Easy memiliki beberapa keuntungan, antara lain adalah bahwa plasmid ini merupakan plasmid linear yang mempunyai basa Timin (T) menggantung (*overhangs*) pada kedua ujungnya. Daerah T-*overhangs* pada situs pemasukan *insert* ini meningkatkan efisiensi ligasi untuk produk PCR karena mencegah terjadinya resirkularisasi (melingkar kembali) vektor sebelum penempelan *insert*. *Insert* yang merupakan produk PCR hanya perlu diberi perlakuan sederhana untuk menambahkan basa Adenin (A) pada ujungnya atau biasa disebut dengan A-*tailing* agar bisa menempel pada daerah T-*overhangs* vektor tanpa harus memotongnya terlebih dahulu dengan enzim restriksi.

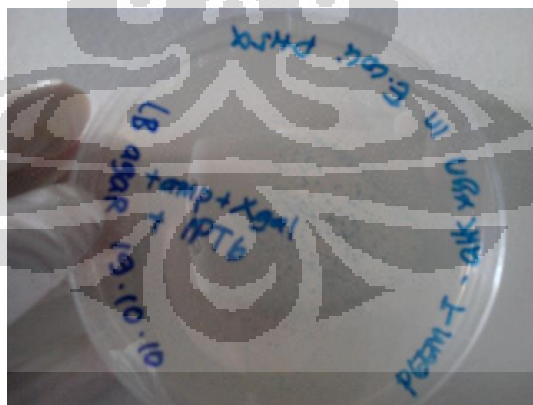
#### 4.6. Transformasi hasil ligasi ke *E. coli* DH5 $\alpha$

Hasil ligasi gen *alkxyn* ke dalam vektor pGEM-T Easy kemudian ditransformasikan ke dalam bakteri inang *E. coli* DH5 $\alpha$  yang sebelumnya telah diberi perlakuan khusus agar memiliki efisiensi yang tinggi dalam menerima DNA dari luar.

Metode transformasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode kejutan panas (*heat shock*). *E. coli* DH5 $\alpha$  diberi kejutan dengan suhu dingin dan suhu panas secara bergantian agar dinding selnya mengembang dan mengempis secara cepat sehingga memungkinkan DNA dari luar masuk ke dalam sel.

Keuntungan yang dimiliki oleh vektor pGEM-T Easy yang digunakan adalah tersedianya promotor T7 dan SP6 yang mengait *Multiple Cloning Site* (MCS). Diantara promotor ini, terdapat gen LacZ yang menyandi enzim  $\beta$ -galaktosidase. *Screening* koloni biru-putih bisa dilakukan untuk mengetahui apakah *insert* yang kita inginkan sudah menempel pada vektor ini setelah ditransformasi ke inang. Dalam media pertumbuhan *E.coli* DH5 $\alpha$  perlu ditambahkan X-GAL dan isopropil- $\beta$ -galacto-pyranoside (IPTG) yang berfungsi untuk menginduksi promotor LacZ. Pemasukan *insert* akan menonaktifkan LacZ sehingga enzim  $\beta$ -galaktosidase tidak diproduksi (X-GAL dalam substrat tidak diuraikan) yang mengakibatkan koloni tetap berwarna putih. Koloni biru menandakan bahwa *insert* tidak menempel pada vektor karena gen LacZ masih aktif menyandi enzim  $\beta$ -galaktosidase yang mengubah X-GAL dalam substrat menjadi senyawa yang berwarna biru (Hansen dkk, 1998).

Transformasi plasmid rekombinan pGEM-T Easy-alkxyn ke *E.coli* DH5 $\alpha$  menghasilkan puluhan koloni biru-putih. Sebanyak 7 koloni putih diambil untuk dilakukan ekstraksi plasmid dan dilakukan konfirmasi restriksi untuk memastikan insert alkxyn yang diinginkan telah terligasikan dengan sempurna ke dalam vektor.



Gambar 4.7. Koloni Biru Putih Hasil Transformasi

#### 4.7. Ekstraksi plasmid rekombinan

Tujuh koloni putih hasil transformasi diambil untuk dilakukan ekstraksi plasmid. Secara umum, ekstraksi plasmid dalam penelitian ini

meliputi tiga bagian yaitu melisis sel, membersihkan protein dan presipitasi DNA.

Penambahan solution I pada tahap pertama ekstraksi plasmid bermaksud untuk membuka permukaan sel. Solution I mengandung EDTA yang berfungsi memperlemah ikatan antar molekul pada membran luar sel dan mengkelat kation  $Mg^{2+}$ . Tahapan selanjutnya adalah penambahan solution II yang mengandung NaOH dan SDS. NaOH berfungsi untuk mendenaturasi plasmid dan kromosomal DNA menjadi untai tunggal. SDS menghancurkan fosfolipid dan komponen protein dalam membran sel.

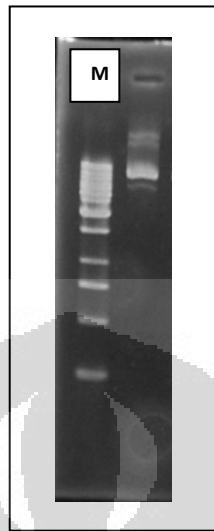
Pada ekstraksi plasmid, pemisahan DNA plasmid dari DNA kromosom bakteri yang juga terdapat dalam sel didasarkan atas perbedaan konformasi antara DNA plasmid dan DNA bakteri. Plasmid tidak selalu terdapat dalam bentuk sirkular, tetapi ada pula yang terdapat dalam bentuk *supercoiled* (sangat berlilitan). Sedangkan DNA kromosom yang berbentuk sirkular, pada waktu preparasi ekstrak sel akan pecah menjadi fragmen-fragmen yang linear (Brown, 1991). Penambahan NaOH akan menaikkan pH larutan sehingga memutuskan ikatan hidrogen pada molekul DNA tidak berlilitan, yang menyebabkan untai ganda terurai dan kedua rantai terdenaturasi.

Jika pada DNA yang terdenaturasi ditambahkan asam (terkandung dalam solution III), maka untai DNA bakteri yang terdenaturasi ini akan mengelompok kembali menjadi benang-benang kusut, yang dapat dipisahkan dengan cara sentrifugasi sehingga DNA plasmid tertinggal pada supernatan (Brown, 1991). Kalium asetat yang terkandung dalam solution III seringkali digunakan untuk preparasi plasmid DNA karena membantu proses alkalin lisis (Mulhardt, 2007).

Isopropanol digunakan untuk presipitasi asam nukleat. Untuk menghilangkan sisa-sisa pengotor organik, endapan dicuci dengan etanol 70%. PEG dan NaCl digunakan untuk purifikasi hasil presipitasi DNA (Mulhardt, 2007). RNase ditambahkan untuk menghilangkan RNA.

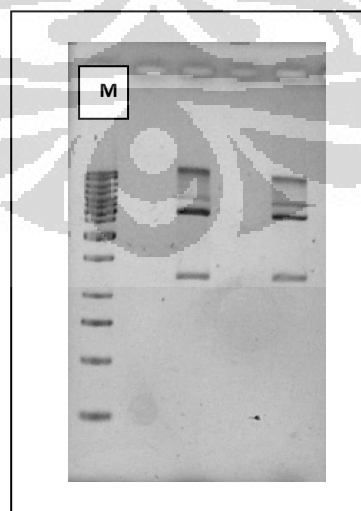
Hasil ekstraksi plasmid kemudian dilihat dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa. Pita plasmid yang terbentuk sebesar lebih kurang

4200 pb (plamid ditambah *insert*) seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini :



Gambar 4.8. Hasil Elektroforesis Ekstraksi Plasmid yang Belum Direstriksi

Untuk memastikan apakah benar *insert* telah berhasil masuk dengan sempurna, dilakukan konfirmasi. Enzim restriksi yang digunakan adalah Eco-RI. Enzim ini mengagip daerah MCS plasmid sehingga kita hanya perlu menggunakan enzim ini secara tunggal untuk memotong *insert* yang telah dimasukkan ke dalam plasmid. Gambar gel dokumentasinya setelah di elektroferesis adalah :



Gambar 4.9. Hasil Elektroforesis Konfirmasi Restriksi

Hasil konfirmasi menggunakan enzim restriksi ini menunjukkan hasil potongan terdiri dari 2 pita. Pita yang pertama sebesar sekitar 3000 pb merupakan plasmid pGEM-T Easy dan pita yang kedua sebesar sekitar 1200 pb merupakan *insert* alkxyn. Hal ini menunjukkan bahwa *insert* telah dengan sempurna terligasi pada plasmid dan tertransformasikan ke dalam *E.coli* DH5 $\alpha$ . Dari 6 klon yang diuji, hasil potongan paling baik adalah pada klon 2 dan 3 sehingga kedua klon ini dipilih untuk di lakukan penelitian lebih lanjut.

#### 4.8. Analisa hasil sekuensing gen alkxyn

Hasil ekstrak plasmid dari isolat *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan klon 2 dan klon 3 yang berisi *insert* alkxyn kemudian di kirim ke Genetika *Science* untuk dilakukan sekuensing gen. Hasil sekuensing diterima dalam bentuk kromatogram. Hasil tersebut kemudian diubah ke bentuk FASTA dengan menggunakan *software* Chromas. Sekuen dalam bentuk FASTA hasil sekuensing gen alkxyn klon 2 adalah sebagai berikut :

```
>pGEM_Alk_xyn_klon_2_M13F_20_sequence exported from 1stBASE_35
4625_pGEM_Alk_xyn_klon_2_M13F_20_.ab1
GGTAGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATG
GCGGCCGCGGGAATTCGATTCTGCAGAACCAATGATTACACTGTTTAGAAAACCT
TTTGTTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGAGGGGGGATCGGCAATGTAG
CTGCTGCTCAAGGAGGACCACAAAATCCGGAGTCTTTGGAGAAAATGAAAAAA
GAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGATATCAAGA
GCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAGC
CCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCT
GAATCACCCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGGAAGTGGGAAGGCGCTGACAAAAT
TGTGGAGTTTGGCCGAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGG
CACAGCCAAGTACCAGAATGGTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTG
GATGAAACAGACCCAGATAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGC
ATGGAAAACCATATTTAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCAT
GGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAAT
GGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTCGAAACCGCAAGAA
AATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAAGTTC
CTTCAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAAGACTTATTAGAGCAAGGAG
TGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCAT
TGAAGATAAAGAGCTTCTTTTGAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAA
GTAAGTGAAGTACATGAGTCTCTATGGCTGGCCACCGACAGGGGCATACAG
TCATATGACGACATT
```



>pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_2\_M13R\_\_20\_ sequence exported from 1st\_BASE\_3  
 54626\_pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_2\_M13R\_\_20\_.ab1  
 AACTTGACATGATTACGCCAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTAT  
 GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAA  
 TTCACTAGTGATTTAATCGATAATTCTCCAGTAAGCAGGTTTCACTCGATAGTTA  
 TGATCAAAAACAAATGGTGCATCGATCCCTACTCCATTATTGTA CTCTCTAGCGC  
 GGCCATCAAGCCATGTATGGTTATCAGCAATTCCCCAGAAAAGTTACACTGCTAAT  
 ATCAGCAGCTAATTCTTCGTATAACTCAAAAAGCTGATCGTAACGGTCTGCCTGG  
 GCTTGAAGGAGTTCTGCTGGAATGTCGTCATATGACGTGTATGCCCTGTCCGGTG  
 GCCAGCCATAGAGACTCATGTCTAGCTCAGTTACTTGATTGTCTAATCCTAAACT  
 CGTAAACTTTTTCAAAGAAGCTCTTGTATCTTCAATGGAAGGCCAGCCGATTTGG  
 ATATGCGACTGATGTCCTACCCCGTCAATTGGCACTCCTTGCTCTAATAAGTCTTT  
 CACCAGTTGTAAAGGTCATCTCTTTTTGAAGGAACTTCGGTGTGTGAATCATTAA  
 ATGTACAACCTTTCCTCTTACCACCATATTTCTTGCGGTTTCGAAAGCTACCTT  
 AATGTAGTCAGTGCCTGTTATTTGATACCATTCGGATTCACGCAGGCCCCCGCCA  
 TCGTCAATAA ACTTCATTGACCACGTCCCATGAAGTCACATCATCTTTATAACGTTT  
 AACAAACCGTTTTAATATGGTTTTCCATGCGCTCTAATAACAGCTGTTTATTCGCTT  
 CACGTTTATCTGGGCTGTTTCATCCACCATCCGATTGCCGTCTTCATCGATGAAA  
 AACCATCTGGTACTTGGCTGTGCCAAACGAGCGTGTGGAAGCGAAGCTCCATGT  
 TATGTTTGCGGGCAA ACTCCACAATTTTGTGTCAGCGCTTCCCAGTCCACTCACCT  
 TCTCTTGGCTGGGGTGATT CAGGCTTCATTGCAT

Sedangkan hasil sekuensing gen alkxyn klon 3 adalah sebagai berikut :

>354627\_pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_3\_M13F-20\_ sequence exported from 1st\_BASE\_354627\_  
 pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_3\_M13F\_\_20\_.ab1  
 GGTAGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATG  
 GCGGCCGCGGGAATTCGATTATGATAACACTGTTTAGAAAACCTTTTGTGCTGG  
 GCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGAGGGGGGATCGGCAATGCAGCTGCTGCTCAA  
 GGAGGACCACAAAATCCGGAGTCTTTGGAGAAAATGAAAAAAGAAATGATCA  
 GCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTCTGAGCGATATCAAGAGCAGTTTGAT  
 ATTTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAGCCCAAATTTTA  
 AAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACTC  
 CAGCCAAGAGAAGGTGAGTGGA ACTGGAAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTT  
 GCCCGCAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGFTTGGCACAGCCAA  
 GTACCAGAATGGTTTTTCATCAATGAAGACGGCAATTGGATGGTGGATGAAACA  
 GACCCAGATAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAAC  
 CATATTTAAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGACGATGTGACTTCATGGGACGTGG  
 TCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCAAA  
 TAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTGAAACCGCAAGAAAATATGGTG  
 GTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAAGTTCCCTTCAAAAA  
 GAGATGACCTTTACAACCTGATGAAAGACTTATTAGAGCAAGGAGTGCCAATTG  
 ACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATTGAAGATA  
 CAAGAGCTTCTTTGAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGA  
 GCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCCCGACAGGGGCATACACGTCATTTGAC  
 GAC

>pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_3\_M13R\_20\_ sequence exported from 1st\_BASE\_35 4628\_pGEM\_Alk\_xyn\_klon\_3\_M13R\_20\_.ab1  
 AACTTGACATGATTACGCCAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGCTAT  
 GCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAA  
 TTCACTAGTGATTTAATCGATAATTCTCCAGTAAGCAGGTTTCACTCGATAGTTA  
 TGATCAAAAACAAATGGTGCATCGATCCCTACTCCATTACTGTACTCTCTAGCGC  
 GGCCATCAAGCCATGTATGGTTATCAGCAATTCCCCAGAAAAGTTACACTGCTAAT  
 ATCAGCAGCTAATTCTTCGTATAACTCGAAAAGCTGATCGTAACGGTCTGCCTGG  
 GCTTGAAGGAGTCTGCTGGAATGTCGTCATATGACGTGTATGCCCTGTCCGGTG  
 GCCAGCCATAGAGACTCATGTCTAGCTCAGTTACTTGATTGTCTAATCCTAAACT  
 CGTAAACTTTTTCAAAGAAGCTCTTGATCTTCAATGGAAGGCCAGCCGATTTGG  
 ATATGCGACTGATGTCCTACCCCGTCAATTGGCACTCCTTGCTCTAATAAGTCTTT  
 CATCAGTTGTAAAGGTCATCTTTTTGAAGGAACTTCGGTGTGTGAATCATTAA  
 ATGTACAACCTTTCCTCTTACCACCATATTTTCTTGCGGTTTCAAAGCTACCTT  
 AATGTAGTCAGTGCCTGTTATTTGATACCATTCGATTCACGCAGGCCCCCGCCA  
 TCGTCAATAACTTCATTGACCACGTCCCATGAAGTCACATCGTCTTTATAACGTTT  
 AACACCCTTTAATATGGTTTTCCATGCGCTCTAATAACAGCTGTTTATTCGCTT  
 CACGTTTATCTGGGCTGTTTCATCCACCATCCAATTGCCGTCTTCATTGATGAAA  
 AACCATCTGGTACTTGGCTGTGCCAAACGAGCGTGTGGAAGCGAAGCTCCATGT  
 TATGTTTGCGGGCAAACCTCCACAATTTTGTGAGCGCTTTCAGTTCCACTCACCT  
 TCTCTTGGCTGGAGTGATTAGGCTTCATT

Tanda yang digaris bawah pada sekuen adalah daerah primer yang sesuai setelah dicocokkan dengan *degenerated* primer yang digunakan pada saat amplifikasi gen alkxyn. Untuk menganalisa homologi sekuen antara daerah *forward* dan *reverse*, dilakukan *alignment* menggunakan *software* ClustalW yang tersedia secara *on-line* pada web [www.genome.jp](http://www.genome.jp). Sebelum data hasil sekuensing *forward* dan *reverse* dimasukkan, data sekuen *reverse* diubah dulu menjadi bentuk *complement* nya dengan bantuan *software* Chromas. Hasil *alignment* dari daerah *forward* dan *reverse* gen alkxyn klon 2 dan klon 3 dapat dilihat pada lampiran 5 dan 6.

Hasil analisa homologi sekuen tersebut kemudian diambil dari daerah *start codon* (ATG) sampai daerah *stop codon* (TAA). Daerah tersebut adalah sebagai berikut :

Klon 2 :

ATGATTACACTGTTTAGAAAACCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTA  
 GTTGGAGGGGGGATCGGCAATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAAAT  
 CCGGAGTCTTTGGAGAAAATGAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCA  
 AGTTGCTTCTTTCTGAGCGATATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGG  
 TTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAGCCCAAATTTTAAAGCATCATTAA  
 TAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACCCAGCCAAGA  
 GAAGGTGAGTGGAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTTGCCCGCA

AACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCA  
 GAATGGTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACC  
 CAGATAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCA  
 TATTAACCGTTGTTGAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTGG  
 TCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCA  
 AATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTCGAAACCGCAAGAAAATAT  
 GGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAAGTTCCTT  
 CAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAAGACTTATTAGAGCAAGGAGT  
 GCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCC  
 ATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAA  
 TCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCACCGACAGGGGCA  
 TACACGTCATATGACGACATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGACC  
 GTTACGATCAGCTTTTTGAGTTATACGAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCAGT  
 GTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACATGGCTTGATGGCCGCGCTAG  
 AGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTTGTTTTGATCATAACT  
 ATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATCGATTAA

Klon 3 :

ATGATAACACTGTTTAGAAAACCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATT  
 AGTTGGAGGGGGGATCGGCAATGCAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAA  
 ATCCGGAGTCTTTGGAGAAAATGAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGG  
 CAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGATATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGC  
 GGTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAAGCCCAAATTTTAAAGCATCAT  
 TATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACTCCAGCCAA  
 GAGAAGGTGAGTGGAAGCTGAAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTTGCCCG  
 CAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTAC  
 CAGAATGGTTTTTCATCAATGAAGACGGCAATTGGATGGTGGATGAAACAGA  
 CCCAGATAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAAC  
 CATATTAACCGTTGTTGAACGTTATAAAGACGATGTGACTTCATGGGACGT  
 GGTCATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTAT  
 CAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTCAAACCGCAAGAAAAT  
 ATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAAGTTC  
 TTCAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGATGAAAGACTTATTAGAGCAAGGA  
 GTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTT  
 CCATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGAC  
 AATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCCCGACAGGGG  
 CATAACGTCATTTGACGACATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGA  
 CCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATACGAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCA  
 GTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACATGGCTTGATGGCCGCGCT  
 AGAGAGTACAGTAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTTGTTTTGATCATA  
 ACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATCGATTAA

Terhadap daerah tersebut kemudian dilakukan pencarian kemiripan sekuen dengan *database* yang tersedia. Tehnik yang digunakan adalah *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan menggunakan server *on-line* [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil BLAST untuk gel alkxyn kedua klon menunjukkan hasil yang sama yaitu memiliki kemiripan 99% dengan gen endo-1,4-beta-xylanohydrolase (xyn10A) *Bacillus halodurans*. Daftar kemiripan hasil BLAST dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 4.2. Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 2 dan Klon 3

Nomer <i>Accession</i>	Deskripsi	<i>E- Value</i>	Persen Kemiripan	
			Klon 2	Klon 3
AF534180.1	<i>Bacillus halodurans endo-1,4-beta-xylanohydrolase (xyn10A) gene, complete cds</i>	0,0	99 %	98 %
BA000004.3	<i>Bacillus halodurans C-125 DNA, complete genome</i>	0,0	99 %	98 %
D00087.1	<i>Bacillus sp. gene for xylanase A, complete cds</i>	0,0	99 %	98 %
AY687345.1	<i>Bacillus halodurans isolate S7 alkaline active endoxylanase precursor, gene, complete cds</i>	0,0	94 %	93 %
AY376353.1	<i>Bacillus firmus BH2133-like protein gene, partial cds; and xylanase 10A and BH2119-like protein genes, complete cds</i>	0,0	94 %	93 %

Menggunakan *software* Genetix, sekuen basa nukleotida tersebut kemudian di ubah menjadi sekuen asam amino. Hasil yang didapat adalah sebagai berikut :

Klon 2 :

MITLFRKPFVAGLAISLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRN  
DQPFAWQVASLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSL  
VAENAMKPESPQPREGEWNWEGADKIVEFARKHNMELRFHTLWV  
HSQVPEWFFIDEDGNRMVDETDPKREANKQLLLERMENHIKTVV  
ERYKDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETAR  
KYGGEEAKLYINDYNTEVPSKRDDLNLVKDLLEQGVPIIDGVGHQ  
SHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVTELDMSLYGWPPTGAYT  
SYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHTWL  
DGRAREYNNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID\*

Klon 3 :

MITLFRKPFVAGLAISLLVGGGIGNAAAQGGPPKSGVFGENEKRN  
DQPFAWQVASLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSL  
VAENAMKPESLQPREGEWNWKGADKIVEFARKHNMELRFHTLW  
HSQVPEWFFINEDGNWMVDETDPKREANKQLLLERMENHIKTV  
VERYKDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETA  
RKYGGEEAKLYINDYNTEVPSKRDDLNLMKDLLEQGVPIIDGVG  
HQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVTELDMSLYGWPPTGA

YTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHT  
WLDGRAREYSNGVGDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID\*

Asam amino dari kedua klon tersebut kemudian dianalisa lebih lanjut menggunakan *Server ExPASy Proteomics* dengan alamat web [www.expasy.org/cgi-bin/protparam](http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam). Perkiraan menggunakan perangkat bioinformatik ini menunjukkan bahwa jumlah asam amino kedua klon sama, yaitu sebanyak 396. Sedangkan perkiraan terhadap *molecular weight* kedua Klon memiliki hanya sedikit perbedaan, yaitu 45,278 kDa untuk Klon 2, dan 45,283 kDa untuk Klon 3. Parameter lain yang tersedia dalam server ini adalah perkiraan titik isoelektrik. Titik isoelektrik untuk klon 2 diperkirakan 4,66 sedangkan untuk Klon 3 yaitu 4,71.

Jika dibandingkan dengan *data base* dari *Gene Bank* untuk enzim xilanase yang berasal dari *Bacillus halodurans* lain (yang telah diketahui mempunyai sifat alkalin) dan *Bacillus sp.* NG-27 (yang telah diketahui mempunyai sifat alkalotermofilik), terdapat beberapa perbedaan dengan xilanase dari Klon 2 dan Klon 3. Beberapa perbedaan tersebut dapat dilihat dalam tabel di bawah ini :

Tabel 4.3. Perbandingan Parameter Protein Beberapa Xilanase

Xilanase / <i>Accession Number</i> / Asal Bakteri	Jumlah Asam Amino	Molecular Weight (kDa)	pI
Alkxyn Klon 2 / -/ Isolat CMU	396	45,278	4,66
Alkxyn Klon 3/-/ Isolat CMU	396	45,283	4,71
<i>Crystal Structure Of Family 10 Xylanase/ 2UWF_A/ Bacillus halodurans</i>	356	41,671	4,8
Endo-1,4-beta-xylanohydrolase / AAN03480/ <i>Bacillus halodurans</i>	396	45,294	4,66
<i>Alkaline thermostable endoxylanase / AAB70918.1/ Bacillus sp. NG-27</i>	405	46,021	4,73

Untuk melihat perbedaan dan persamaan sekuens asam amino dilakukan *alignment* menggunakan *software* ClustalW yang tersedia secara *on-line* pada web [www.genome.jp](http://www.genome.jp). Hasil *alignment* perbandingan sekuens alkxyn Klon 2 dan Klon 3 dengan xilanase dari *Bacillus halodurans* lain (AAN03480 dan 2UWF\_A) serta *Bacillus sp.* NG-27 (AAB70918.1) menggunakan ClustalW adalah sebagai berikut :

```

Klon2      MITLFRKPFVAGLAISLLVGG---GIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRND--QFFAWQVA
AAN03480   MITLFRKPFVAGLAISLLVGG---GIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRND--QFFAWQVA
Klon3      MITLFRKPFVAGLAISLLVGG---GIGNAAAQGGPPKSGVFGENEKRND--QFFAWQVA
2UWF_A     -----N--QFFAWQVA
AAB70918.1 MLKTLRKPFIAGLALSLLLTGGASSVFAQNGQAGPPKGGIFKEGEKGNVQFFAWQVA
                .          *****

Klon2      SLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESQPREGAWNWEGAD
AAN03480   SLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESLQPREGEWNWEGAD
Klon3      SLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESLQPREGEWNWKGAD
2UWF_A     SLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPVSLQPREGEWNWEGAD
AAB70918.1 SLADRYEESFDIGAAVEPHQLNGRQCKVLKHHYNSIVAENAMKPI SLQPEEGVFTWDGAD
**.:**.*.*****:*.**.*.::*****:***** * **.* .:.*.**

Klon2      KIVEFARKHNMELRFHTLVVHVSQVPEWFFIDEDGNRMVDETDPKREANKQLLLERMENH
AAN03480   KIVEFARKHNMELRFHTLVVHVSQVPEWFFIDEDGNRMVDETDPKREANKQLLLERMENH
Klon3      KIVEFARKHNMELRFH-TLVHVSQVPEWFFINEDGNMVDDETDPKREANKQLLLERMENH
2UWF_A     KIVEFARKHNMELRFHTLVVHVSQVPEWFFIDENGNRMVDETDPEKRKANKQLLLERMENH
AAB70918.1 AIVEFARKNNMNLRFHTLVVHNVQVPDWFVFLDEEGNPMVEETNEAKRQANKELLLERLETH
                *****:*.**.*. :*.**.*.***:*.**.*.***: **.*.***:*.**.*

Klon2      IKTVVERYKDDVTSWDVVNEVIDDGG---GLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGEE
AAN03480   IKTVVERYKDDVTSWDVVNEVIDDGG---GLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGEE
Klon3      IKTVVERYKDDVTSWDVVNEVIDDGG---GLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGEE
2UWF_A     IKTVVERYKDDVTSWDVVNEVIDDGG---GLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGEE
AAB70918.1 IKTVVERYKDDVTAWDVVNEVDDGT PNERGLRESVWYQITGDEYIRVAFETARKYAGED
                *****:*****:*.**.*. ***** ***** :**.*.*****.**:

Klon2      AKLYINDYNTTEVPSKRDDLNLVLDLLEQGVPI DGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFT
AAN03480   AKLYINDYNTTEVPSKRDDLNLVLDLLEQGVPI DGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFT
Klon3      AKLYINDYNTTEVPSKRDDLNLVLDLLEQGVPI DGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFT
2UWF_A     AKLYINDYNTTEVPSKRDDLNLVLDLLEQGVPI DGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFT
AAB70918.1 AKLFINDYNTTEVTPKRDLNLVLDLLEQGVPI DGVGHQAHIQIDWPTIDEIRTSMEMF
                ***:*****.***.***:*** :*****:*****.***:*.**.*

Klon2      SLGLDNQVTELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVT
AAN03480   SLGLDNQVTELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVT
Klon3      SLGLDNQVTELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVT
2UWF_A     SLGLDNQVTELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPEELFQAQADRYDQLFELYEELSATISSVT
AAB70918.1 GLGLDNQVTELDVSLYGWPPRPAFPTYDAIPQERFQAQADRYDQLFELYEELDADLSV
                .*****:***** *.:**.* * :*****:***** * :***

Klon2      FWGIADNHTWLDGRAREYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID-----
AAN03480   FWGIADNHTWLDGRAREYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID-----
Klon3      FWGIADNHTWLDGRAREYSNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID-----
2UWF_A     FWGIADNHTWLDGRAREYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIIDHHHHHH
AAB70918.1 FWGIADNHTWLDGRAREYNDGVGKIDAPFVFDPNYRVKPAFWRIID-----
                *****.*.***.*** ***** ***** :*****

```

Untuk menganalisa homologi sekuen dan melihat perbedaan antara asam amino Klon 2 dan Klon 3, dilakukan *alignment* menggunakan ClustalW. Hasil *alignment* seperti yang terlihat dalam gambar di bawah ini. Tanda berwarna kuning menunjukkan perbedaan sekuen asam amino Klon 2 dan Klon 3.

```

AA_k12      MITLFRKPFVAGLAI SLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRNDQFFAWQVASLSER
AA_kl_3     MITLFRKPFVAGLAI SLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRNDQFFAWQVASLSER
*****

AA_k12      YQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESLPQPREGEWNWEGADKIVEF
AA_kl_3     YQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPESLQPREGEWNWEGADKIVEF
*****

AA_k12      ARKHNMELRFHTLVVHWSQVPEWFFIIDEEDGNIMVDETDPPDKREANKQLLLERMENHIKTVV
AA_kl_3     ARKHNMELRFHTLVVHWSQVPEWFFIINEEDGNIMVDETDPPDKREANKQLLLERMENHIKTVV
*****

AA_k12      ERYKDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYN
AA_kl_3     ERYKDDVTSWDVVNEVIDDGGGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYN
*****

AA_k12      TEVPSKRDDLNLVKDILLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVT
AA_kl_3     TEVPSKRDDLNLVMDILLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVT
*****

AA_k12      ELDMSLYGWPTGAYTSYDDI PAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHT
AA_kl_3     ELDMSLYGWPTGAYTSYDDI PAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSVTFWGIADNHT
*****

AA_k12      WLDGRAREYNNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID
AA_kl_3     WLDGRAREYSNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID
*****

```

Gambar 4.10. Perbedaan Asam Amino Antara Klon 2 dan Klon 3

Dalam gambar di atas, terlihat ada 7 titik perbedaan asam amino antara Klon 2 dan Klon 3. Perbedaan pertama yaitu Valin (V) pada Klon 2 dan Alanin (A) pada Klon 3. Perbedaan kedua yaitu Prolin (P) pada Klon 2 dan Leusin (L) pada Klon 3. Perbedaan ketiga yaitu Asam Glutamat (E) pada Klon 2 dan Lisin (K) pada Klon 3. Perbedaan keempat yaitu Asam Aspartat (D) pada Klon 2 dan Asparagin (N) pada Klon 3. Perbedaan kelima yaitu Arginin (R) pada Klon 2 dan Triptofan (W) pada klon 3. Perbedaan keenam yaitu Valin (V) pada Klon 2 dan Metionin (M) pada klon 3. Perbedaan ketujuh yaitu Asparagin (N) pada Klon 2 dan Serin (S) pada Klon 3.

Untuk memperkirakan posisi *signal peptide* pada xilanase Klon 2 dan 3, digunakan server SignalP 3.0 yang tersedia secara *on-line* di

www.cbs.dtu.dk. Hasil prediksi *signal peptide* pada Klon 2 dan Klon 3 menunjukkan *C-score* atau nilai *cleavage site* yang sama, yaitu berada pada posisi 28-29. Posisi tersebut berada diantara asam amino VAA-AQ pada Klon 2 dan AAA-AQ pada Klon 3. Dari prediksi *signal peptide* ini, dapat dikatakan bahwa *mature protein* pada kedua enzim rekombinan dimulai pada posisi 29.

#### 4.9. Hasil pengukuran aktivitas xilanase pada *E.coli* DH5 $\alpha$

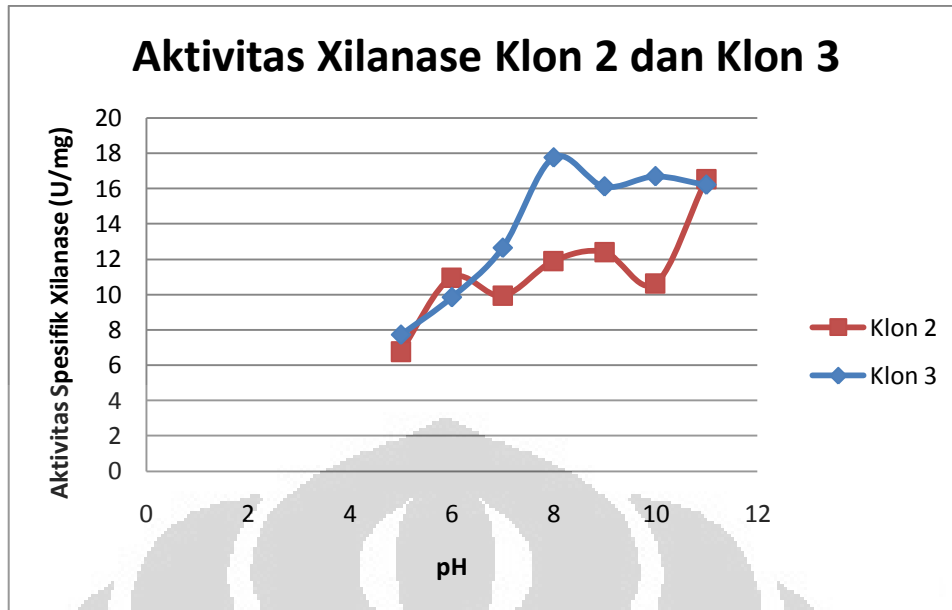
Pengukuran aktivitas xilanase pada *E.coli* DH5 $\alpha$  dilakukan untuk mengetahui apakah gen *alkxyn* yang ditransformasi berfungsi atau tidak di dalam bakteri inangnya. Ekspresi gen dilakukan dengan menguji aktivitas enzim xilanase pada *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan.

*E.coli* DH5 $\alpha$  klon 2 dan 3 ditumbuhkan dalam media yang mengandung xilan, kemudian sel dipanen dengan cara sentrifugasi. *E.coli* DH5 $\alpha$  merupakan bakteri yang memproduksi enzim secara intraseluler. Hal ini berarti bahwa untuk mengambil enzim dari bakteri ini, sebelumnya diperlukan pemecahan sel. Pemecahan sel dalam penelitian ini dilakukan menggunakan tehnik sonikasi, yaitu menggunakan gelombang ultrasonik dengan kekuatan tinggi sehingga mengakibatkan lisisnya sel bakteri.

Sebagai kontrol negatif digunakan *E.coli* DH5 $\alpha$  yang mengandung vektor pGEM-T Easy tanpa insert. Kontrol negatif ini ditumbuhkan dan diberi perlakuan yang sama terhadap sampel.

Pelet sel yang telah disonikasi kemudian disentrifuse untuk mengendapkan sel-sel lisis. Supernatan diambil sebagai enzim kasar untuk diuji aktivitasnya. Kontrol negatif tidak menunjukkan adanya aktivitas xilanase. Pengujian aktivitas xilanase pada Klon 2 dan Klon 3 dilakukan pada pH 5 sampai dengan pH 11. Hasil aktivitas dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



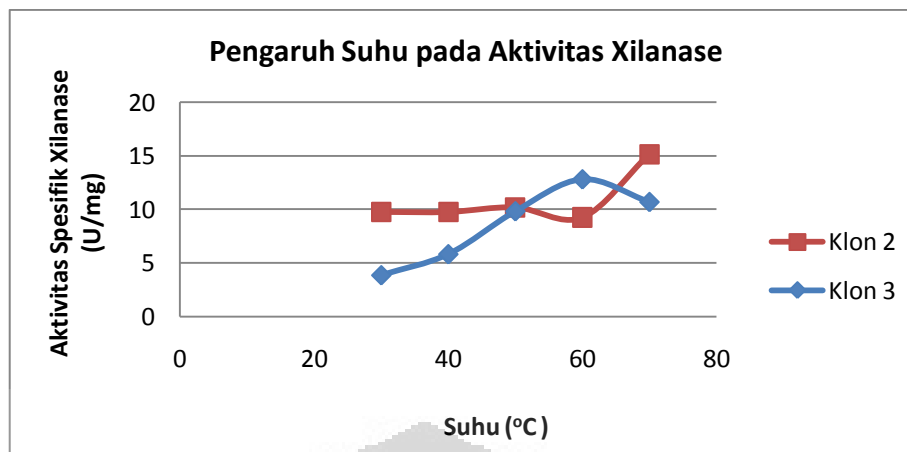


Gambar 4.11. Grafik Pengukuran Aktivitas Spesifik Xilanase Klon 2 dan Klon 3

Dari grafik di atas, dapat dilihat bahwa kedua klon *E.coli* DH5 $\alpha$  rekombinan telah menunjukkan aktivitas xilanase. Baik klon 2 maupun klon 3 menunjukkan aktivitas terkecil pada pH terendah (pH 5) yaitu 6,76 U/mg untuk klon 2, dan 7,71 U/mg untuk klon 3. Aktivitas tertinggi pada klon 2 terjadi di pH 11 yaitu sebesar 16,52 U/mg, sedangkan pada klon 3 di pH 8 yaitu sebesar 17,74 U/mg.

Dari data tersebut, secara garis besar dapat dikatakan bahwa enzim xilanase klon 2 dan klon 3 mempunyai aktivitas yang optimal pada pH alkali. Hasil aktivitas pada penelitian ini relatif kecil. Hal ini disebabkan karena vektor yang digunakan dalam penelitian ini bukan merupakan vektor ekspresi, sehingga ekspresi dari gel alkxyn yang dimasukkan ke dalam vektor belum maksimal.

Untuk melihat apakah enzim tersebut tahan pada suhu tinggi (bersifat termofilik), dilakukan karakterisasi aktivitas enzim pada kisaran suhu 30°C sampai dengan 70°C dalam pH optimalnya (pH 11 untuk Klon 2 dan pH 8 untuk Klon 3). Hasil karakterisasi suhu untuk kedua klon dapat dilihat pada gambar di bawah ini :



Gambar 4.12. Pengaruh Suhu pada Aktivitas Xilanase dari Klon 2 dan Klon 3

Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa enzim xilanase klon 2 optimum pada suhu 70°C, sedangkan enzim xilanase klon 3 optimum pada suhu 60°C. Hal tersebut menunjukkan bahwa enzim xilanase dari kedua klon memiliki sifat termofil. Perbedaan karakteristik enzim xilanase yang berasal dari klon 2 dan klon 3 kemungkinan terjadi akibat perbedaan susunan asam amino pada gen *alkxyn* kedua klon.

#### 4.10. Analisa perbandingan dengan xilanase alkalotermofilik lain

Jika dibandingkan dengan penelitian-penelitian lain yang berhubungan dengan xilanase rekombinan, hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang cukup baik untuk sifat alkalo sekaligus termofilik xilanase. Pada tahun 1998, Morris dkk telah berhasil mengkloning dan mengekspresikan gen *xynB* yang berasal dari bakteri *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B1 ke dalam *E.coli* JM101. Xilanase rekombinan dalam penelitian ini mempunyai temperatur optimal antara 70°C-85°C, namun mempunyai pH optimal yang rendah, yaitu 6,5. Meng dkk (2009) melaporkan bahwa telah berhasil mengkloning dan mengekspresikan gen *Mxyn10* yang berasal dari *Demequina* sp. JK4 ke dalam *E.coli* DH5α. pH dan temperatur optimum enzim rekombinan ini adalah 5,5 dan 55°C.

Gen *Xyn11A* yang berasal dari *Bacillus halodurans* C-125 setelah diekspresikan ke dalam *Kluyveromyces lactis* CBS 1065 menunjukkan enzim rekombinannya optimal pada pH netral (Wamalwa dkk, 2007).

*Aspergillus niger* AB41 yang mengekspresikan gen xlnD dari *Aspergillus niger* GS1 mempunyai aktivitas xilanase rekombinan yang optimal pada pH 3,6 dan suhu 70°C (Reyes dkk, 2010).

Gen xilanase (diberi kode ASW2X) yang berhasil diisolasi dari DNA genomik dari limbah lumpur alkali telah diekspresikan ke dalam *E.coli* BL21. Enzim rekombinan menunjukkan aktivitas maksimal pada pH 7,5 dan suhu 55°C (Zha dkk, 2011). Gen xynA yang telah berhasil diklon dari *Bacillus pumilus* ARA dan diekspresikan dalam *E.coli* menunjukkan aktivitas rekombinan xilanase terbesar yaitu pada pH 6,6 dan suhu 50°C (Qu dan Shao, 2011). Zhang dkk (2011) melaporkan telah berhasil mengklon gen xyn10G5 yang berasal dari *Phialophora sp.* G5 dan diekspresikan ke dalam *Pichia pastoris*. Aktivitas optimal pada xilanase rekombinan terjadi pada pH 4 dan suhu 70°C.

Untuk membandingkan xilanase klon 2 dan klon 3 dengan xilanase lainnya yang telah dipublikasikan, digunakan server *Swiss-Model Workspace* yang tersedia secara *online* dengan alamat server : <http://swissmodel.expasy.org/workspace/>. Pencocokan asam amino klon 2 dan klon 3 menunjukkan bahwa model protein terdekat dengan kedua klon tersebut adalah xilanase famili 10 yang berasal dari *Bacillus halodurans* S7 dan merupakan xilanase yang aktivitasnya optimum pada kondisi alkalotermofilik . Xilanase ini telah terdaftar dalam *Protein Data Bank* dengan nomer identitas 2UWF.

Xilanase 2UWF tersebut kemudian dibandingkan dengan xilanase famili 10 lainnya. Hasil perbandingan dari beberapa literatur dapat dilihat seperti dalam tabel di bawah ini :

Tabel 4.4. pH dan Suhu Optimum Beberapa Xilanase Famili 10

Kode Enzim	Sumber	Suhu Optimum (°C)	pH Optimum	Literatur
2UWF	<i>B.halodurans</i>	70	9-9,5	Mamo dkk (2006)
2F8Q	<i>Bacillus</i> sp. NG-27	70	8,4	Manikandan dkk (2008)
1HIZ	<i>G.stearothermophilus</i>	65	6-7	Khasin dkk (1993)
1EXP	<i>C.fimi</i>	-	7	Notenboom dkk (1998)
1XYZ	<i>C.thermocellum</i>	-	6,5-7	Tang dkk (1983)
1N82	<i>G.stearothermophilus</i>	60	7	Nanmori dkk (1990)
1NQ6	<i>S.halstedii</i>	60	6,3	Arribas dkk (1995)
1VBR	<i>T.maritima</i>	90	6,1	Zhengqiang dkk (2001)
1EOV	<i>S.lividans</i>	60	6	Morosoli dkk (1986)
1ISV	<i>S.olivaceoviridis</i>	60	5,7	Sun dkk (2002)
1B30	<i>P.simplicissimum</i>	65	5,6	Schmidt dkk (1998)
1K6A	<i>T.aurantiacus</i>	63	5,2	Khandke dkk (1989)

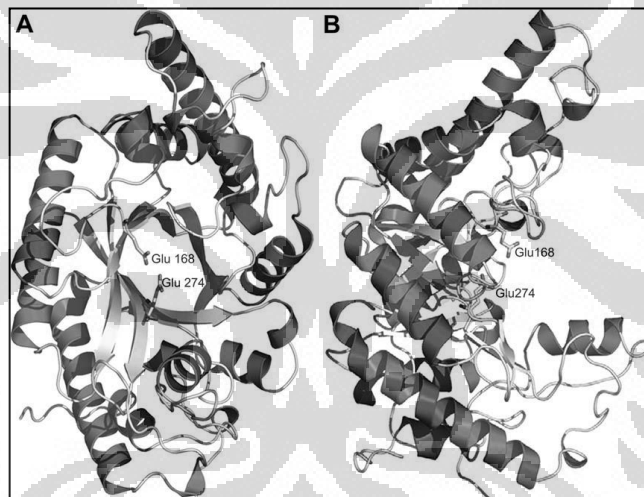
Berbagai penelitian telah dilakukan di berbagai negara untuk memahami karakteristik atau ciri-ciri unik dari enzim yang aktif dan stabil pada kondisi ekstrim. Kondisi yang dimaksud meliputi kondisi tinggi garam, suhu yang sangat tinggi, dan kondisi pH rendah (asam). Namun, studi mengenai karakteristik pada enzim yang aktif dan stabil pada pH tinggi (alkali) masih sedikit dilakukan (Mamo dkk, 2009). Memahami karakteristik unik yang dimiliki oleh enzim dalam kondisi ekstrim dapat berguna dalam rekayasa protein yang nantinya bisa digunakan sebagai alternatif dalam industri.

Walaupun peranan masing-masing residu asam amino dalam protein sulit untuk dijelaskan dan dimengerti secara utuh, namun perbandingan dari protein homologus dapat menunjukkan kecenderungan frekuensi asam amino tertentu yang dapat dikorelasikan dengan adaptasinya pada kondisi ekstrim. Beberapa penelitian telah melaporkan hubungan antara kandungan asam amino dengan adaptasi pH dari enzim. Penelitian tersebut menganalisa kehadiran beberapa asam amino yaitu Lys, Arg, Asn, His, Glu, dan Asp (Dubnovitsky dkk, 2005). Dalam studi ini, enzim yang aktif pada kondisi alkali memiliki kecenderungan mempunyai residu Arg dan His yang lebih banyak dalam struktur proteinnya (Shirai dkk, 2001). Sejalan dengan pernyataan ini, xilanase 2UWF dan 2F8Q yang aktif pada kondisi alkali, mempunyai presentasi komposisi Arg dan His yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan 1B30, 1K6A dan 1ISV (Mamo, 2009).

Selain itu, sifat alkalofilik dari 2UWF dan 2F8Q juga dapat dilihat dari tingginya persentase komposisi residu yang bermuatan negatif (Asp dan Glu) pada kedua enzim tersebut (di atas 17 %). Penelitian menunjukkan bahwa adanya korelasi yang signifikan antara persentase residu bermuatan negatif dengan sifat alkalofilik enzim. Semakin tinggi persentase residu bermuatan negatif suatu enzim, maka semakin tinggi pH optimumnya (Mamo, 2009). Pada xilanase klon 2 dan klon 3, dapat terlihat bahwa komposisi residu asam amino yang bermuatan negatif juga lebih tinggi dibandingkan residu asam amino yang bermuatan positif

berdasarkan hasil prediksi menggunakan ExPASy *Proteomics Server* (lampiran 12 dan 13).

Struktur xilanase 2UWF memiliki 8 lipatan  $\alpha/\beta$ - *barrel* dimana 8 major  $\beta$ -*strands* ( $\beta$ 1- $\beta$ 8) dikelilingi oleh 8 major  $\alpha$ -heliks ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 8) pada motif *right-handed*  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  (gambar 4.13). Bentuk *barrel* tersebut memperlihatkan radius yang lebih besar pada permukaan dimana terletak sisi aktif, yang membuat bentuk *cross-section elliptical*, dengan axis major dan minor sekitar 60 dan 40 Å. Tinggi *barrel* adalah sekitar 30 Å. Tidak seperti xilanase lain, namun mirip dengan xilanase 2F8Q dan 1HIZ, xilanase 2UWF memiliki gulungan yang lebih besar pada titik akhir axis *ellipse* nya (Mamo, 2009).



Gambar 4.13. Struktur *Barrel* Xilanase 2UWF dengan Katalitik Residu Glutamat

[Mamo, 2009]

Sisi aktif xilanase 2UWF mempunyai celah yang lebih dalam jika dibandingkan dengan sisi aktif 1B30 dan 1K6A (Lampiran 14). Analisa sekuens menyatakan bahwa Glu168 adalah residu yang bersifat asam/basa sementara Glu274 berperan sebagai nukleofil untuk xilanase 2UWF. Struktur aromatik dari Trp108, Trp326 dan Trp334 mengelilingi kantong katalitik. Dua residu aromatik tambahan (Trp250 dan Trp282) juga terletak dekat dengan sisi terendah gulungan pada celah katalitik 2UWF dan hal

yang sama juga terjadi pada residu aromatik yang ditemukan pada 2F8Q dan 1HIZ (Mamo dkk, 2009).

Residu asam amino yang termasuk ke dalam radius 6 Å dari dua asam amino katalitik untuk xilanase 2UWF telah dianalisis oleh Mamo dkk (2009) untuk mengidentifikasi kemungkinan residu yang berperan dalam sifat katalisis di pH alkalin. Ditemukan 19 residu yang *conserved* melingkupi Glu168 pada semua xilanase yang dianalisis kecuali 3 residu (Val169, Ile170, dan Asp171). Ketiga residu inilah yang diduga mempunyai peranan dalam menghidrolisis xilan pada pH tinggi. Residu yang berhubungan dengan ketidaktahanan terhadap kondisi alkali pada xilanase 1K6A dan 1B30 diperankan oleh Ala-Phe-Asn dan Ile-Phe-Asn. Sampai saat ini belum dilakukan lebih lanjut mutasi terhadap residu Val169, Ile170, dan Asp171 untuk membuktikan bahwa peranannya dalam sifat katalisis di pH tinggi.

Hasil *alignment* perbandingan sekuens alkxyn Klon 2 dan Klon 3 dengan xilanase 2UWF menggunakan ClustalW adalah sebagai berikut. Ketiga residu (Val169, Ile170, dan Asp171) yang diduga mempunyai peranan dalam menghidrolisis xilan pada pH tinggi diberi tanda garis bawah.

```

Klon2      MITLFRKPFVAGLAI SLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRNDQPF
Klon3      MITLFRKPFVAGLAI SLLVGGGIGNVAAAQGGPPKSGVFGENEKRNDQPF
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  -----NQPF
                                           : ***

Klon2      AWQVASLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPE
Klon3      AWQVASLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPE
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  AWQVASLSERYQEQFDIGAAVEPYQLEGRQAQILKHHYNSLVAENAMKPV
                                           *****

Klon2      SPQPREGEWNWEGADKIVEFARKHNMELRFHTLVWHSQVPEWFFI DEDGN
Klon3      SLQPREGEWNWKGADKIVEFARKHNMELRFH-TLWHSQVPEWFFI NEDGN
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  SLQPREGEWNWEGADKIVEFARKHNMELRFHTLVWHSQVPEWFFI DENGNT
                                           * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Klon2      RMVDETDPKREANKQLLLERMENHIKTVERYKDDVTSWDVVNEVIDDG
Klon3      WMVDETDPKREANKQLLLERMENHIKTVERYKDDVTSWDVVNEVIDDG
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  RMVDETDPEKRKANKQLLLERMENHIKTVERYKDDVTSWDVVNEVIDDD
                                           *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Klon2      GGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYNTEVPSKRDDL
Klon3      GGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYNTEVPSKRDDL
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  GGLRESEWYQITGTDYIKVAFETARKYGGEEAKLYINDYNTEVPSKRDDL
                                           *****

Klon2      YNLVKDLLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVT
Klon3      YNLVKDLLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVT
2UWF_A | PDBID | CHAIN | SEQUENCE  YNLVKDLLEQGVPIDGVGHQSHIQIGWPSIEDTRASFEKFTSLGLDNQVT
                                           ***:*****:*****:*****:*****:*****:*****

Klon2      ELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSV
Klon3      ELDMSLYGWPPPTGAYTSYDDIPAELLQAQADRYDQLFELYEELAADISSV

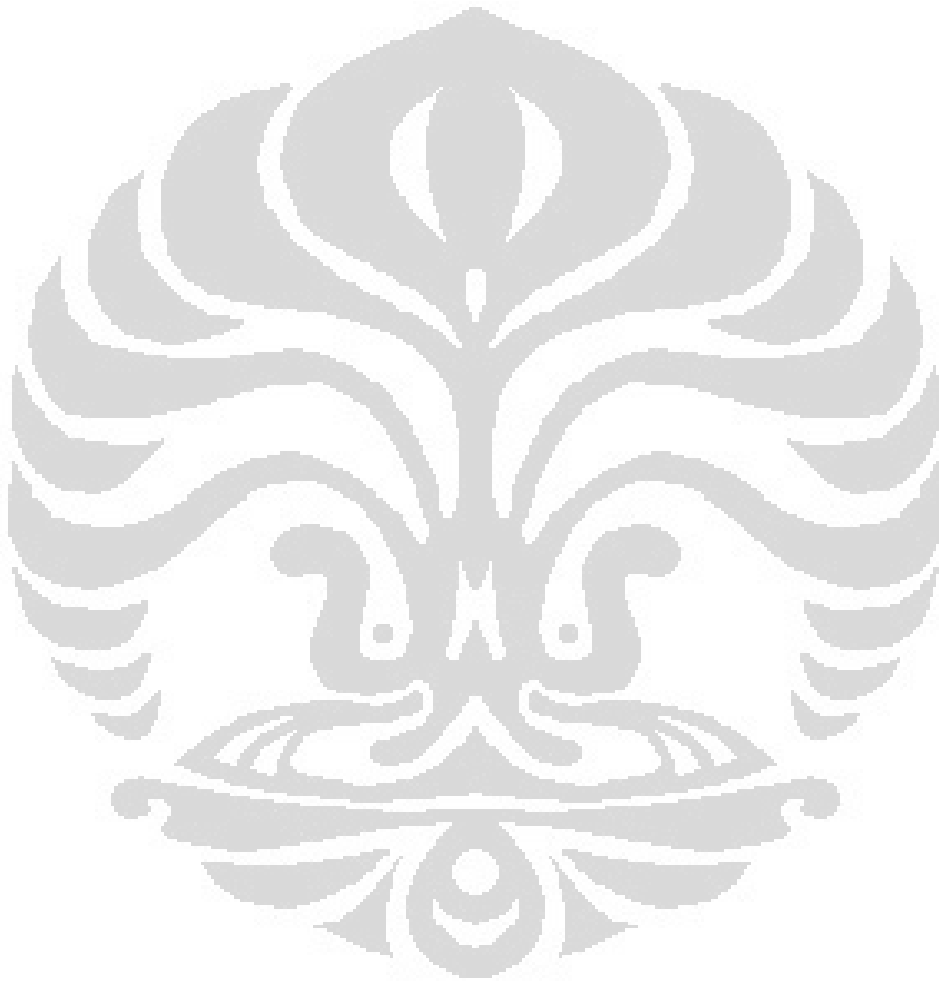
```

```

2UWF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ELDMSLYGWPTGAYTSYDDIPEELFQAQADRYDQLFELYEELSATISSV
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****
Klon2                             TFWGIADNHTWLDGRAREYNNVGVIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID----
Klon3                             TFWGIADNHTWLDGRAREYSNGVGIDAPFVFDHNYRVKPAYWRIID----
2UWF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      TFWGIADNHTWLDGRAREYNNVGVDAPFVFDHNYRVKPAYWRIIDHHHH
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Klon2                             --
Klon3                             --
2UWF_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HH

```





## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### 5.1 Kesimpulan

1. Isolat CMU menghasilkan enzim xilanase yang aktif pada kondisi alkali.
2. Berdasarkan hasil sekuensing daerah 16S rRNA secara parsial, isolat CMU diduga sangat dekat dengan spesies *Bacillus halodurans*, dengan tingkat kemiripan 99%.
3. Gen *alkxyn* (endo-1,4-beta-xylanohidrolase (*xyn10A*)) dari genom isolat CMU telah berhasil dikloning dan diinsersikan ke dalam vektor pGEM-T Easy untuk diekspresikan pada *E. coli* DH5 $\alpha$ .
4. Karakterisasi enzim rekombinan pada *Escherichia coli* menunjukkan kedua klon mempunyai xilanase yang bersifat alkalotermofilik.

#### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi secara lebih detail (dengan sifat-sifat biokimia, morfologi dan lainnya) terhadap isolat CMU.
2. Perlunya dilakukan sub kloning gen *alkxyn* ke dalam vektor ekspresi yang potensial atau ke dalam vektor yang mengandung promoter yang lebih kuat agar gen xilanase alkalotermofilik dapat diekspresikan dengan lebih baik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arribas, A.R., Fernandez-Abalos, J.M., Sanchez, P., Garda, A.L., Santamaria, R.I. (1995). Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase (Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2414-2419.
- Bailey, M.J. , P. Biely dan Poutanen. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology.*
- Batubara, Ridwanti. (2006). *Teknologi Bleaching Ramah Lingkungan.* USU Repository.
- Bedford, M.R. dan H.L. Classen. (1992). The influence of dietary xylanase on intestinal viscosity and molecular weight distribution of carbohydrates in re-y-fed broiler chick. Elsevier, Amsterdam. p. 361-370
- Biely, P. (1985). Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.* 3:286.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation on microgram quantities of protein in utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248—254
- Brown, T.A. (1991). *Pengantar Kloning Gen* (Muhammad, S.A & Praseno, Penerjemah). Yogyakarta : Yayasan Essentia Medica.
- Case, R.J., Boucher, Y., Dahlo, I., Holmstrom, C., Doolittle W.F., dan Kjelleberg, S. (2007). "Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies". *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1): 278–88.
- Chen, C.C., Westpheling, J. (1998). Partial Characterization of the *Streptomyces lividans* xlnB Promoter and Its Use for Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermotoga maritima*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4217-4225.
- Christopher, L. (2007). *Biotechnological Approach to the Management of Effluents from the Pulp and Paper Industry.* Water Research Commission.
- Clark, D.P., dan Pazdernik, N.J. (2009). *Biotechnology applying the genetic revolution.* Elsevier Academic Press.
- Davis. L.G., Kuehl, M., Battey, J.F. (1994). *Basic Methods: Molecular Biology* Jilid 2. Norwola: Appletn&Lange. Page 68.
- Dekker, R.F.H. (1985). Biodegradation of hemicelluloses. *T. Higuchi*, 505-533.

- Dubnovitsky, A.P., Kapetaniou, E.G., Papageorgiou, A.C. (2005). Enzyme adaptation to alkaline pH : atomic resolution (1.08 Å) structure of phosphoserine amino-transferase from *Bacillus alcalophilus*. *Protein Sci* 14, 97-110.
- Gessesse A, & Gashe BA. (1997). Production of alkaline xylanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from an alkaline soda lake. *Journal of Applied Microbiology*.
- Gong C.S., dan Tsao G.T.(1979). Cellulase and biosynthesis regulation.
- Gupta,N., Reddy, V.S., Maiti, S., dan Ghosh, A.(2000). Cloning, expression, and sequence analysis of the gene encoding the alkali-stable, thermostable endoxylanase from alkalophilic, mesophilic *Bacillus* sp. strain NG-27. *Applied and Environmental Microbiology Journal* , 2631-2635.
- Hansen, L.H., Knudsen, S., Sorensen, S.J. (1998). The effect of the lacY gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*" .*Curr. Microbiol*, 36 (6): 341–7.
- Helianti,I., Nurhayati,N. , dan Wahyuntari,W. (2007). Cloning, sequencing, and expression of a b-1,4-endoxylanase gene from Indonesian *Bacillus licheniformis* strain I5 in *Escherichia coli*. *World Journal Microbiol Biotechnol*, 10.1007/s11274-007-9601-6.
- Helianti, I. (2010). Materi workshop biologi molekuler kloning dan transformasi pada *Bacillus*. Tangerang : Laptiab BPPT.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem Journal*, 280:309-316.
- Ihsanawati, Kumasaka, T., Kanek, T., Morokuma, C., Yatsunami, R., Sato, T., Nakamura, S., dan Tanaka, N. (2005). Structural basis of the substrate subsite and the highly thermal stability of xylanase 10B *Thermotoga maritima* MSB8. Tokyo: Department of Life Science, Tokyo Institute of Technology.
- Inoue, H., Nojima, H., dan Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Karp. G. (2008). Cell and molecular biology concepts and experiments. Hoboken : John Wiley & Sons.
- Kartikasari, Y. (2005).Skripsi : Penggunaan limbah pertanian dan perkebunan (jerami, dedak, sekam, pelepah pisang, akar kelapa sawit, cangkang kelapa sawit) untuk produksi xilanase dari *Bacillus stearothersophilus* DSM 22 dan *Bacillus* sp. (1-5). Depok : Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

- Khandke, K.M., Vithayathil, P.J., Murthy, S.K.(1989). Purification of xylanase, bglucosidase, endocellulase, and exocellulase from a thermophilic fungus. Arch. Biochem. Biophys, 274 : 491-500.
- Khasin, A., Alchanati, I., Shoham, Y. (1993). Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus*. Appl. Environ. Microbiol, 59:1725-1730.
- Kulkarni N, Shendye A, dan Raom. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol Journal, Rev 23.
- Kusdriana, H.D.(2010). Penawaran studi : Progres pasar industri pulp dan kertas Indonesia (setelah menghadapi krisis global). Jakarta : Media Data Riset.
- Manikandan, K., Bhardwaj, A., Gupta, N. (2008). Crystal structure of native and xylosaccharide-bound alkali thermostable xylanase from an alkalophilic *Bacillus* sp. NG-27 : structural insights into alkalophilicity and implications for adaptation to polyextreme conditions. Protein Sci, 15:1951-1960.
- Mamo, G., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (2006). A thermostable alkaline endo  $\beta$ -1-4-xylanase from *Bacillus halodurans* S7 : purification and characterization. Enzym Microb. Technol, 39:1492-1498.
- Mamo, G., Thunnissen, M., Hatti-Kaul, R., Mattiasson, B. (2009). An alkaline active xylanase: Insights into mechanisms of high pH catalytic adaptation. Biochimie, 91:1187-1196.
- Meng, X. Zongze, S., Yuzhi, H., Ling, L., Chanjuan, L., dan Ziduo, L. (2009). A novel pH-stable, bifunctional xylanase isolated from a deep-sea microorganism, *Demequina* sp. JK4. J. Microbiol Biotechnol, 19(10) : 1077-1084.
- McKane & J.Kandel. (1996). Microbiology : essentials and applications 2<sup>nd</sup> ed. New York : McGraw-Hill Inc.
- Moat, A.G. Microbial Physiology. (1979). New York: John Wiley and Son Inc.
- Morosoli, R., Bertrand, J.L., Mondou, F., Shareck, F., Kluepfel, D. (1986). Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J, 239 : 587-592.
- Muladno. (2002). Seputar teknologi rekayasa genetika. Bogor : Pustaka Wirausaha Muda.
- Mulhardt, C. (2007). Molecular biology and genomics. Elsevier Academic Press.

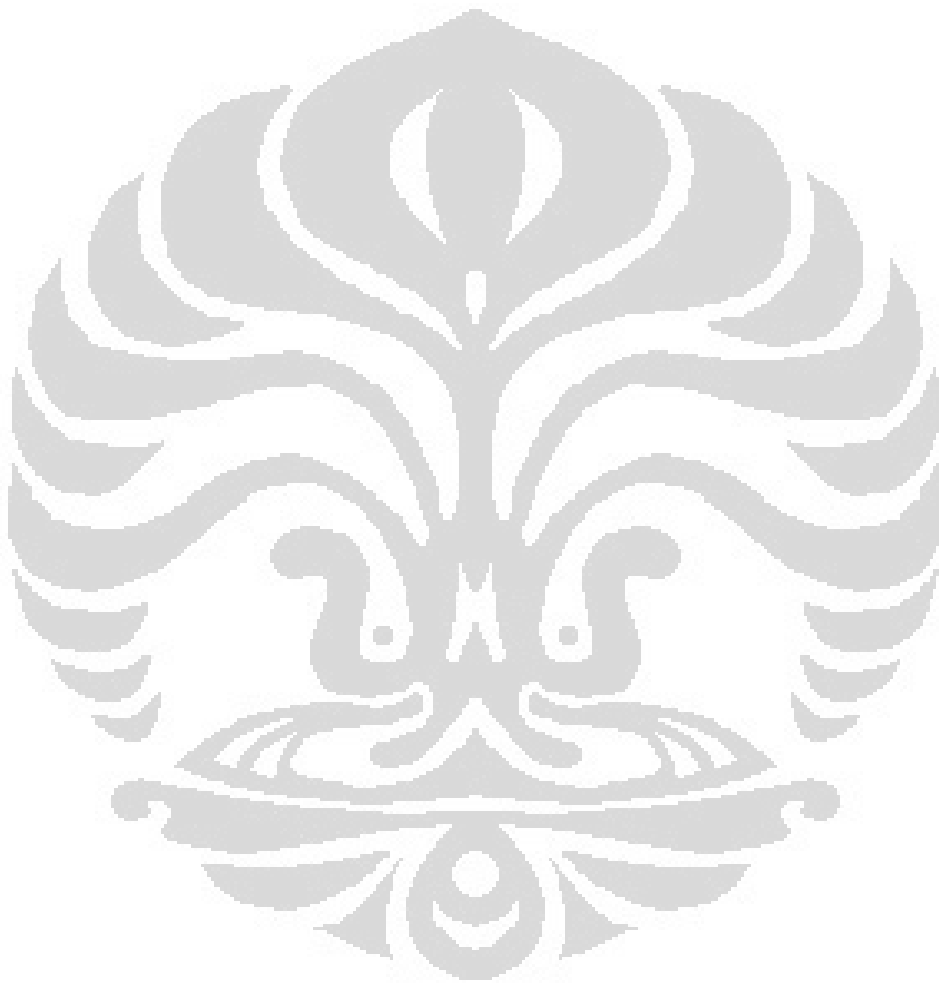
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (2003). Biokimia Harper (Andry Hartono, Penerjemah). Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Morris, D.D., Gibbs, M.D., Chin, C.W.J., Koh, M.H., Wong, K.K.Y., Allison, R.W., Nelson, P.J., Bergquist, P.L. (1998). Cloning of the xynB gene from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1 and action of the gene product on kraft pulp. Applied and Environmental Microbiology Journal , 1759-1765.
- Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., Kawamura, Y. (1990). Purification and properties of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearrowthermophilus* strain. J.Bacteriol, 172:6669-6672.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> , 2008.
- Notenboom, V., Birsan, C., Nitz, M., Rose, D.R., Warren, R.A.J., Withers, S.G. (1998). Insight into transition state stabilization of the  $\beta$ -1,4-glycosidase cex by covalent intermediate accumulation in active site mutants. Nat.Struct.Biol, 5: 812-818.
- Oakley, A.J., Heinrinch, T., Thompson, C.A., Wilce, M.C.(2003). Characterisation of a family 11 xylanase from *Bacillus subtilis* B230 used for paper bleaching. Acta Crystallogr, 4:627-636.
- Polizeli, M., A.C.S. Rizzatti, R. Monti, H. Fterenzi, J.A. Jorge & D.S. Amorim.(2005). Xylanases from fungi : properties and industrial applications. Journal Applied Microbiol Biotechnol, 67(10): 577-591.
- Promega. (2002).Promega life science catalog. Promega corp.
- Qu,W. dan Shao, W. (2011). Cloning, expression and characterization of glycoside hydrolase family 11 endoxylanase from *Bacillus pumilus* ARA. Biotechnol Lett.
- Rahman, T. (2005). Skripsi : Karakterisasi xilanase dari bakteri termofilik isolat lokal dan *Bacillus stearrowthermophilus* DSM 22. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

- Reyes, A.A., Almendarez, B.E., Mandujano, D.G., Llano, S.A., Tostado, E.C., Gonzalez, R.G.G., Loera, O., Regalado, C. (2010). Homologue expression of a  $\beta$ -xylosidase from native *Aspergillus niger*. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
- Richana, N. (2006). Disertasi : Kajian proses produksi xilanase dari isolat bakteri alkalofilik menggunakan media xilan tongkol jagung. Bogor : Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Richana, N dan Lestina, P. (2003). Produksi xilanase untuk biokonversi limbah biji kedelai. [Http:// indobiogen. or.id/terbitan/prosiding\\_2003.php](http://indobiogen.or.id/terbitan/prosiding_2003.php).
- Rifaat, H.M., Z.A. Nagieb dan Y.M. Ahmed. (2005). Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp. *Applied Ecol. Environ* (4): 151-160.
- Sadikin,M. (2002). Biokimia enzim. Jakarta : Widya Medika.
- Sambrook,J., dan D.W.Russel.(2001). Molecular cloning a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satria, H. (2008). Tesis Magister Sains : Kloning gen xilanase termozim dari *Streptomyces costaricanus* 45I-3. Bogor : Sekolah Pascasarjana IPB.
- Setiawati, M. (2005). Tesis Magister Sains : Kloning dan ekspresi gen penyandi N-Asetilneuraminat liase *Lactobacillus plantarum* ke dalam *Ecsherchia coli*. Depok : Universitas Indonesia.
- Schmidt, A., Schlacher, A., Steiner, W., Schwab, H., Kratky, C. (1998). Structure of the xylanase from *Penicillium simplicissimum*. *Protein Sci*, 7:2081-2088.
- Shirai,T., Ishida, H., Noda, J. (2001). Crystal structure of alkaline cellulase K : insight into the alkaline adaptation of an industrial enzyme. *J.Mol. Biol*, 310 : 1079-1087.
- Stauffer, C.E. (1998). Enzyme assay for food scientists. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Suhartono, M.T. (1989). Enzim dan bioteknologi. Bogor : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi IPB.
- Sun, H.J., Yoshida, S., Kawabata, Y., Park, N.H., Kusakabe, I. (2002). Separation of two functional domains of the familyF/10 b-xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 limited proteolysis with papain and some of their properties. *Biotechnol. Lett*, 24 : 595-601.

- Susanto, A.H.(2002). Bahan ajar genetika dasar. Purwokerto: Fakultas Biologi UNSOED.
- Tang, J.C.T., McGray, P., Chen, P., Ferguson, B., Carson, G., Kelley, W.S. (1983). Properties of xylanase from *C.thermocellum* using a trinitrophenyl-xylan assay in wood and agricultural residues. Academic.NY.
- Tull, D., S. G. Withers, N.R. Gilkes, D. G. Kilburn, R.A.J. Warren, dan R. Aebersold. (1991). Glutamic acid 274 is the nucleophile in the active site of a exoglucanase from *Cellulomonas fimi*. Journal Biol.Chem, 266:15621-15625.
- Tuncer, M. dan Ball, A.S. (1999). Purification and partial characterization of  $\alpha$ -l arabinofuranosidase produced by *Thermomonospora fusca*. Folia Microbiologica, 48(2) : 168-172.
- Van Paridon, P.A., J.C.P. Boonman, G.C.M. Selen, C. Geerse, D. Barug, P.H.M. de Bot, dan G. Hemke. (1992). The application of fungal endoxylanase in poultry diets. In Visser et al. (Eds.). Elsevier, Amsterdam. p. 371-378.
- Wamalwa, B.M. Zhao, G., Sakka, M., Shiundu, P.M., Kimura, T., Sakka, K.(2007). High-level heterologous expression of *Bacillus halodurans* putative xylanase xyn11a (BH0899) in *Kluyveromyces lactis*. Biosci Biotechnol Biochem ., 71(3):688-93.
- Wang,J. (2009). An alkali-tolerant xylanase produced by the newly isolated alkaliphilic *Bacillus pumilus* from paper mill effluent. Mol Biol Rep Journal, 37, 3297–3302.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol, 173(2):697-703.
- Yuwono,T. (2006). Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Zhao, Y., Luo, H., Meng, K., Shi, P., Wang, G., Yang, P., Yuan, T., dan Yao, B. (2011). A xylanase gene directly cloned from the genomic DNA of alkaline wastewater sludge showing application potential in the paper industry. Appl Biochem Biotechnol.
- Zhang, F., Shi, P., Bai, Y., Luo, H., Yuan, T., Huang, H., Yang, P., Miao, L., dan Yao, B. (2011). An acid and highly thermostable xylanase from *Phialophora sp.* G5. Appl Microbiol Biotechnol.,89(6):1851-8.
- Zhengqiang, J., Kobayashi, A., Ahsan, M.M., Lite, L., Kitaoka, M., Hayashi, K. (2001). Characterization of a thermostable family 10 endo-xylanase (XynB)

from *Thermotoga maritima* that cleaves p-nitrophenyl-beta-D-xyloside. *J.Bioschi.Bioeng*, 92:423-428.

Zul, M. dan Martina, A. (2003). Laporan Penelitian : Isolasi dan seleksi fungi endofit termostabil penghasil xilanase di kawasan Taman Nasional Bukit Tiga Puluh Indragiri Hulu Riau. Riau : Fakultas MIPA Universitas Riau.



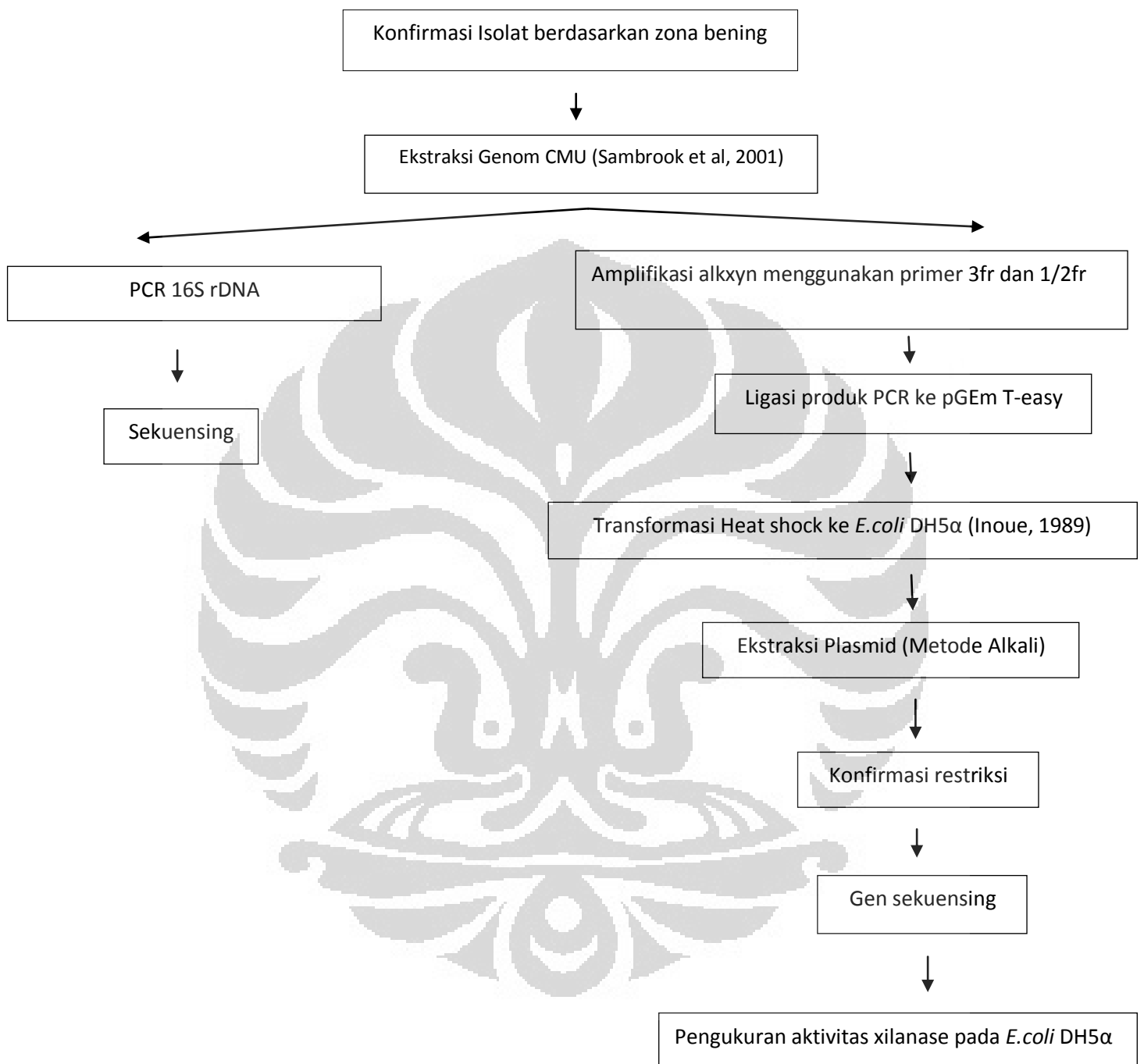


**Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Medium, Larutan dan Buffer yang digunakan**

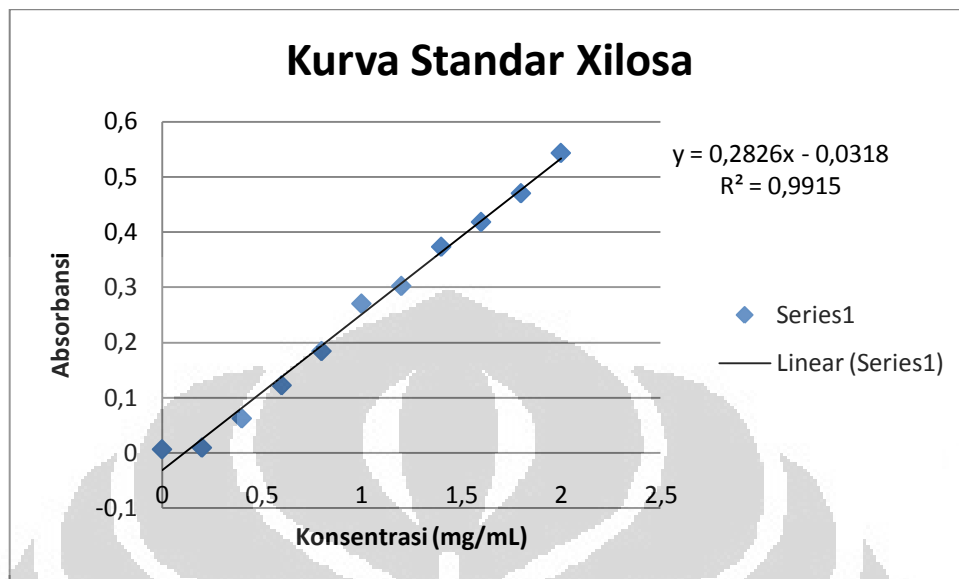
<b>Medium Cair LB</b>	Trypton 1%, <i>Yeast</i> Ekstrak 2,5 % , dan NaCl 1 % dilarutkan dalam dH <sub>2</sub> O. pH di <i>adjust</i> sampai dengan 7,2 lalu distrerilkan menggunakan <i>autoclave</i> (121°C, 15 menit).
<b>Medium Agar LB Xilan</b>	Trypton 1%, <i>Yeast</i> Ekstrak 2,5 % , NaCl 1 % , <i>oat spelt xylan</i> 1 % dan agar 2 % dilarutkan dalam dH <sub>2</sub> O. pH di <i>adjust</i> sampai dengan 7,2 lalu distrerilkan menggunakan <i>autoclave</i> (121°C, 15 menit).
<b>Medium Super Optimal Broth (SOB)</b>	Trypton 20 g, <i>Yeast</i> Ekstrak 5 g, NaCl 0,585 g, KCl 0,186 g dilarutkan dalam 1L dH <sub>2</sub> O lalu distrerilkan menggunakan <i>autoclave</i> . Setelah steril ditambahkan 10 mL larutan magnesium 2 M (steril).
<b>Medium Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)</b>	Komposisi dan cara pembuatan sama dengan medium SOB namun dilakukan penambahan 10 mL glukosa 2M (steril) setelah penambahan larutan magnesium.
<b>Larutan magnesium 2M</b>	1 M MgCl <sub>2</sub> dan 1 M MgSO <sub>4</sub> disterilkan dengan filtrasi.
<b>Glukosa 2M</b>	Ditimbang 36 g glukosa lalu dilarutkan dalam 100 mL dH <sub>2</sub> O. Sterilisasi dilakukan dengan filtrasi.
<b>Larutan lysozyme</b>	Ditimbang 10 mg <i>lysozyme</i> lalu dilarutkan dalam 1 mL Tris HCl 0,25 M pH 8.
<b>Solution I</b>	2 mL Etilendiamintetraasetat (EDTA) 10 mM, 2,5 mL Tris-HCl pH 8 25 mM – tambahkan dH <sub>2</sub> O sampai 48,75 mL, lalu distrerilkan menggunakan <i>autoclave</i> (121°C, 15 menit). Setelah steril, tambahkan 1,25 mL glukosa 50 mM (yg sebelumnya telah disterilkan menggunakan filter).
<b>Solution II</b>	150 µL NaOH 0,2 M ditambahkan dengan 150 µL SDS 1% lalu ditambahkan dH <sub>2</sub> O 1,2 mL (dibuat segar setiap akan digunakan).
<b>Solution III</b>	30 mL Potasium asetat 5 M; 5,75 mL asam asetat glasial, 14,25 mL dH <sub>2</sub> O, lalu distrerilkan menggunakan <i>autoclave</i> (121°C, 15 menit).

<b>Gel agarosa</b>	Gel agarosa dibuat dengan cara melarutkan 0,25 gram agarosa ke dalam 25 mL buffer TAE 1x, kemudian dipanaskan dengan <i>microwave</i> . Larutan gel dituang ke dalam cetakan gel horizontal yang telah dipasang sisir pembuat sumur tempat meletakkan sampel.
<b>Larutan STEP</b>	0,5% SDS; 50 mM Tris HCl pH 7,5; 0,4 M EDTA
<b>TB buffer</b>	Sebanyak 1,5 g PIPES; 1,1 g CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O; dan 9,3 g KCl, dilarutkan dalam 450 mL ddH <sub>2</sub> O . <i>Diadjust</i> dengan HCl sampai pH 6,7. Sebanyak 5,45 g MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O dilarutkan dengan 50 mL ddH <sub>2</sub> O, lalu dicampurkan dengan larutan tadi. Sterilisasi dilakukan menggunakan filter.
<b>Buffer TAE (50x)</b>	Sebanyak 121 g Tris Base dilarutkan dalam 250 mL ddH <sub>2</sub> O . Sebanyak 7,32 g EDTA dilarutkan dalam 50 mL ddH <sub>2</sub> O dan <i>diadjust</i> pHnya menggunakan NaOH padat sampai pH mencapai 8. Kedua komponen tersebut dicampur, lalu ditambahkan juga asam asetat glasial sebanyak 28,55 mL. Lalu di tera dengan ddH <sub>2</sub> O sampai dengan 500 mL.

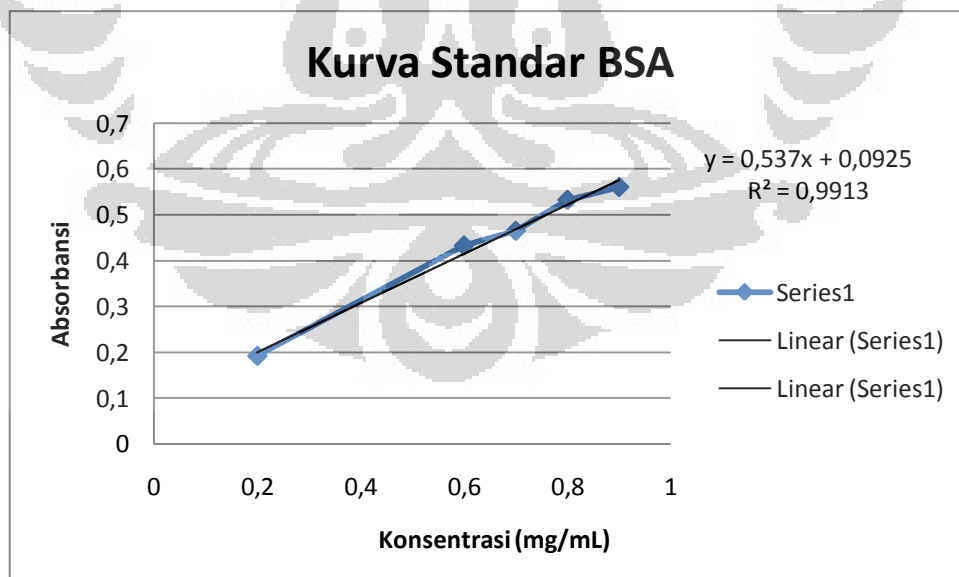
## Lampiran 2. Skema Alur Penelitian



### Lampiran 3. Kurva Standar Xilosa



### Lampiran 4. Kurva Standar Protein



## Lampiran 5. Hasil *Alignment* Daerah *Forward* dan *Reverse* Gen *Alkxyn* Klon 2

```

kl_2_forward      GGTAGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGC
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      CATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGATTACACTGTTTAGAAAACCTTT
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      TGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGAGGGGGGATCGGCAATG
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      TAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAATCCGGAGTCTTTGGAGAAAAT
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      GAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGA
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      GCGATATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAAT
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      TAGAAGGGAGACAAGCCCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTG TG
kl_2_reverse_complement -----

kl_2_forward      GCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTG
kl_2_reverse_complement -----ATGCAATGAAGCCTGAATCACCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTG
*****

kl_2_forward      GAACTGGGAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTTGCCCGCAAACATAACA
kl_2_reverse_complement GAACTGGGAAGGCGCTGACAAAATTGTGGAGTTTGCCCGCAAACATAACA
*****

kl_2_forward      TGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAAATGG
kl_2_reverse_complement TGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAAATGG
*****

kl_2_forward      TTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGA
kl_2_reverse_complement TTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGA
*****

kl_2_forward      TAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTATTAGAGCGCATGAAAAACCATA
kl_2_reverse_complement TAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTATTAGAGCGCATGAAAAACCATA
*****

kl_2_forward      TTAAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTG
kl_2_reverse_complement TTAAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTG
*****

kl_2_forward      GTCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTA
kl_2_reverse_complement GTCAATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTA
*****

kl_2_forward      TCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTCGAAACCGCAAGAA
kl_2_reverse_complement TCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTCGAAACCGCAAGAA
*****

kl_2_forward      AATATGGTGGTGAAGAGGCCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAA
kl_2_reverse_complement AATATGGTGGTGAAGAGGCCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAA
*****

kl_2_forward      GTTCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAAGACTTATTAGA
kl_2_reverse_complement GTTCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACAACCTGGTGAAAGACTTATTAGA
*****

```

```

kl_2_forward      GCAAGGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCG
kl_2_reverse_complement GCAAGGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCG
*****

kl_2_forward      GCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAAGTTTACGAGT
kl_2_reverse_complement GCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAAGTTTACGAGT
*****

kl_2_forward      TTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTG
kl_2_reverse_complement TTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTG
*****

kl_2_forward      GCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGACATT-----
kl_2_reverse_complement GCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGACATTCCAGCAGAACTCC
*****

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement TTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTTTGGATTATACGAGAA

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement TTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCA

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement TACATGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCG

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement ATGCACCATTTGTTTTTGGATCATAACTATCGAGTGAACCTGCTTACTGG

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement AGAATTATCGATTAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCTGCAGGTCGA

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement CCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT

kl_2_forward      -----
kl_2_reverse_complement AGTGTACCTAAATAGCTGGCGTAATCATGTCAAGTT

```

## Lampiran 6. Hasil *Alignment* Daerah *Forward* dan *Reverse* Gen *Alkxyn* Klon 3

```

Klon_3_forward      GGTAGACTCCTATAGGGCGATTGGGCCCGACGTGCGATGCTCCCGGCCGC
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      CATGGCGGCCGCGGAATTCGATTATGATAAACTGTTTAGAAAACCTTT
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      TGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGAGGGGGATCGGCAATG
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      CAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAATCCGGAGTCTTTGGAGAAAAT
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      GAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTCATGGCAAGTTGCTTCTCTTCTGA
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      GCGATATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAAT
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      TAGAAGGGAGACAAGCCCAAATTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTG
Klon_3_reverse_complement -----

Klon_3_forward      GCGAAAATGCAATGAAGCCTGAATCACTCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTG
Klon_3_reverse_complement -----AATGAAGCCTGATCACTCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTG
*****

Klon_3_forward      GAACTGGAAGGGCGCTGACAAAATGTGGAGTTTGCCTGCAACATAACA
Klon_3_reverse_complement GAACTGGAAGGGCGCTGACAAAATGTGGAGTTTGCCTGCAACATAACA
*****

Klon_3_forward      TGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAATGG
Klon_3_reverse_complement TGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCAGAATGG
*****

Klon_3_forward      TTTTTCATCAATGAAGACGGCAATGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGA
Klon_3_reverse_complement TTTTTCATCAATGAAGACGGCAATGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGA
*****

Klon_3_forward      TAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTATTAGAGCGCATGAAAAACCATA
Klon_3_reverse_complement TAAACGTGAAGCGAATAAACAGCTGTATTAGAGCGCATGAAAAACCATA
*****

Klon_3_forward      TTTAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGACGATGTGACTTCATGGGACGTG
Klon_3_reverse_complement TTTAAACGGTTGTTGAACGTTATAAAGACGATGTGACTTCATGGGACGTG
*****

Klon_3_forward      GTCATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGCGCTGCGTGAATCGGAATGGTA
Klon_3_reverse_complement GTCATGAAGTTATTGACGATGGCGGGGCGCTGCGTGAATCGGAATGGTA
*****

Klon_3_forward      TCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTGAACCGCAAGAA
Klon_3_reverse_complement TCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCTTTTGAACCGCAAGAA
*****

Klon_3_forward      AATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAA
Klon_3_reverse_complement AATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAACACCGAA
*****

Klon_3_forward      GTTCCCTCAAAGAGATGACCTTTACAACCTGATGAAAGACTTATTAGA
Klon_3_reverse_complement GTTCCCTCAAAGAGATGACCTTTACAACCTGATGAAAGACTTATTAGA
*****

```

```

Klon_3_forward      GCAAGGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCG
Klon_3_reverse_complement GCAAGGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCG
*****

Klon_3_forward      GCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTGAAAAGTTTACGAGT
Klon_3_reverse_complement GCTGGCCTTCCATTGAAGATACAAGAGCTTCTTTTGAAAAGTTTACGAGT
*****

Klon_3_forward      TTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTG
Klon_3_reverse_complement TTAGGATTAGACAATCAAGTAACTGAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTG
*****

Klon_3_forward      GCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGAC-----
Klon_3_reverse_complement GCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGACATTCAGCAGAAGTCC
*****

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement TTCAAGCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATACGAAGAA

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement TTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACTTCTGGGAATTGCTGATAACCA

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement TACATGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAGTAATGGAGTAGGGATCG

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement ATGCACCATTTGTTTTTGGATCATAACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGG

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement AGAATTATCGATTAAAATCACTAGTGAATTCGCGCCGCTGCAGGTCGA

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement CCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTAT

Klon_3_forward      -----
Klon_3_reverse_complement AGTGTACCTAAATAGCTGGCGTAATCATGTCAAGTT

```



## Lampiran 7. Alignment Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 2

```

> gb|AF534180.1| Bacillus halodurans endo-1,4-beta-xylohydrolase (xyn10A) gene,
complete cds
Length=1470

Score = 2165 bits (1172), Expect = 0.0
Identities = 1184/1190 (99%), Gaps = 0/1190 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      ATGATTACACTGTTTAGAAAACCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGA 60
            |||
Sbjct 280     ATGATTACACTTTTAGAAAAGCCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGA 339

Query 61     GGGGGGATCGGCAATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAATCCGGAGTCTTTGGA 120
            |||
Sbjct 340     GGGGGGATCGGCAATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAATCCGGAGTCTTTGGA 399

Query 121    GAAAATGAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTTTCTGAGCGA 180
            |||
Sbjct 400     GAAAATGAAAAAGAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTTTCTGAGCGA 459

Query 181    TATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAA 240
            |||
Sbjct 460     TATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAA 519

Query 241    GCCCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAA 300
            |||
Sbjct 520     GCCCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAA 579

Query 301    TCACCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGGAACTGGGAAGGCCTGACAAAATGTGGAGTTT 360
            |||
Sbjct 580     TCACTCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGGAACTGGGAAGGCCTGACAAAATGTGGAGTTT 639

Query 361    GCCCCAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTGGCACAGCCAAGTACCA 420
            |||
Sbjct 640     GCCCCAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTGGCACAGCCAAGTACCA 699

Query 421    GAATGGTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGATAAA 480
            |||
Sbjct 700     GAATGGTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGATAAA 759

Query 481    CGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTAACCGTTGTT 540
            |||
Sbjct 760     CGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTAACCGTTGTT 819

Query 541    GAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGC 600
            |||
Sbjct 820     GAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGC 879

Query 601    GGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCT 660
            |||
Sbjct 880     GGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCT 939

Query 661    TTCGAAACCGCAAGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAAC 720
            ||
Sbjct 940     TTTGAAACCGCAAGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAAC 999

Query 721    ACCGAAGTTCCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACACCTGGTGAAGACTTATTAGAGCAA 780
            |||
Sbjct 1000    ACCGAAGTTCCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACACCTGGTGAAGACTTATTAGAGCAA 1059

Query 781    GGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATT 840
            |||
Sbjct 1060    GGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATT 1119

Query 841    GAAGATACAAGAGCTTCTTTGAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACT 900
            |||
Sbjct 1120    GAAGATACAAGAGCTTCTTTGAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACT 1179

Query 901    GAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGAC 960
            |||
Sbjct 1180    GAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCACCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGAC 1239

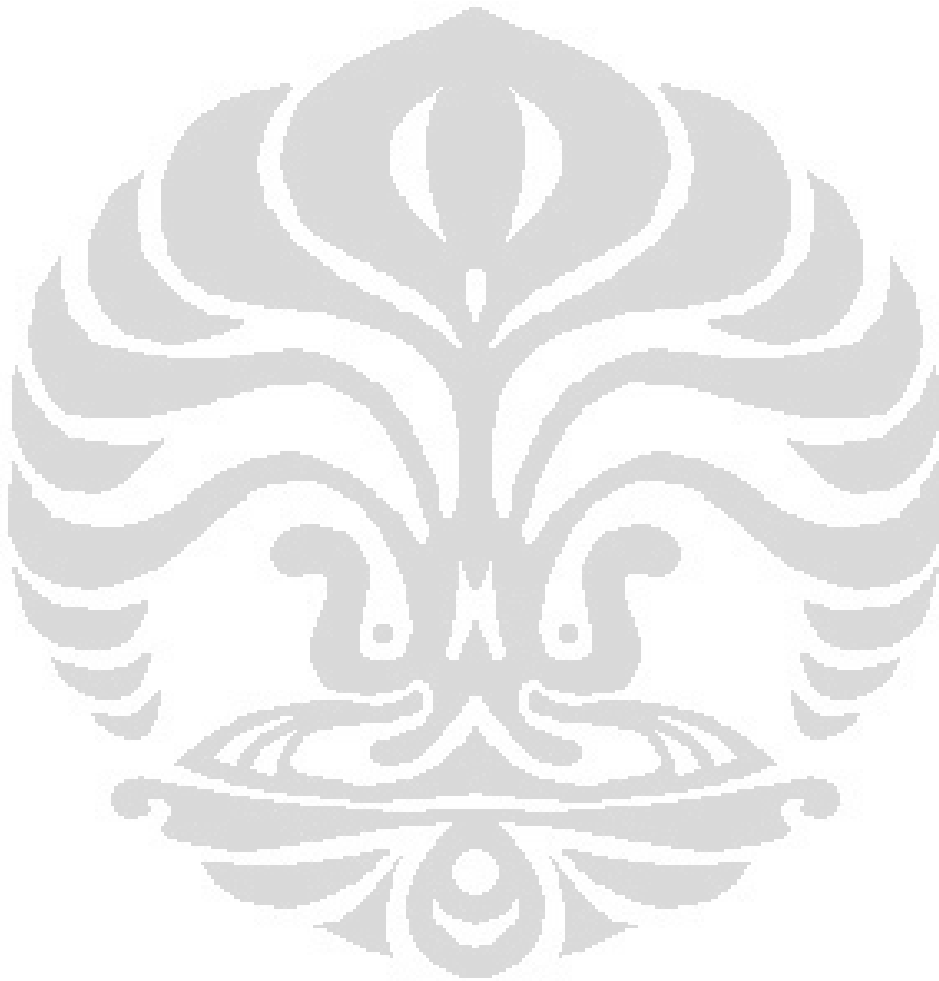
Query 961    ATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTGGAGTTATAC 1020

```

```


Sbjct 1240  |||
ATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATAC 1299
Query 1021  GAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACA 1080
|||
Sbjct 1300  GAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACA 1359
Query 1081  TGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTGTT 1140
|||
Sbjct 1360  TGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTGTT 1419
Query 1141  TTTGATCATAACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATCGATTA 1190
|||
Sbjct 1420  TTTGATCATAACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATTGATTA 1469

```



### Lampiran 8. Alignment Hasil BLAST Gen Alkxyn Klon 3

```

>  gb|AF534180.1| Bacillus halodurans endo-1,4-beta-xylanohydrolase (xyn10A) gene,
complete cds
Length=1470

Score = 2126 bits (1151), Expect = 0.0
Identities = 1177/1190 (99%), Gaps = 0/1190 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      ATGATAACACTGTTTAGAAAACCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGA 60
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 280     ATGATTACACTTTTTAGAAAGCCTTTTGTGCTGGGCTAGCGATCTCTTTATTAGTTGGA 339

Query 61     GGGGGGATCGGCAATGCAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAAATCCGGAGTCTTTGGA 120
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 340     GGGGGGATCGGCAATGTAGCTGCTGCTCAAGGAGGACCACCAAAATCCGGAGTCTTTGGA 399

Query 121    GAAAATGAAAAAGAAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGA 180
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 400     GAAAATGAAAAAGAAAATGATCAGCCTTTTGCATGGCAAGTTGCTTCTCTTTCTGAGCGA 459

Query 181    TATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAA 240
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 460     TATCAAGAGCAGTTTGATATTGGAGCAGCGGTTGAGCCCTATCAATTAGAAGGGAGACAA 519

Query 241    GCCCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAA 300
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 520     GCCCAAATTTTAAAGCATCATTATAACAGCCTTGTGGCGGAAAATGCAATGAAGCCTGAA 579

Query 301    TCACTCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGAACCTGAAAGGCGCTGACAAAATGTGGAGTTT 360
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 580     TCACTCCAGCCAAGAGAAGGTGAGTGAACCTGGAAGGCGCTGACAAAATGTGGAGTTT 639

Query 361    GCCCCAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCA 420
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 640     GCCCCAAACATAACATGGAGCTTCGCTTCCACACGCTCGTTTGGCACAGCCAAGTACCA 699

Query 421    GAATGGTTTTTCATCAATGAAGACGGCAATTGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGATAAA 480
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 700     GAATGGTTTTTCATCGATGAAGACGGCAATCGGATGGTGGATGAAACAGACCCAGATAAA 759

Query 481    CGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTTAAACGGTTGTT 540
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 760     CGTGAAGCGAATAAACAGCTGTTATTAGAGCGCATGGAAAACCATATTTAAACGGTTGTT 819

Query 541    GAACGTTATAAAGACGATGTGACTTCATGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGC 600
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 820     GAACGTTATAAAGATGATGTGACTTCATGGGACGTGGTCAATGAAGTTATTGACGATGGC 879

Query 601    GGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCT 660
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 880     GGGGGCCTGCGTGAATCGGAATGGTATCAAATAACAGGCACTGACTACATTAAGGTAGCT 939

Query 661    TTTGAAACCGCAAGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAAC 720
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 940     TTTGAAACCGCAAGAAAATATGGTGGTGAAGAGGCAAAGTTGTACATTAATGATTACAAC 999

Query 721    ACCGAAGTTCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACACCTGATGAAAGACTTATTAGAGCAA 780
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1000    ACCGAAGTTCCTTCAAAAAGAGATGACCTTTACACCTGGTGAAGACTTATTAGAGCAA 1059

Query 781    GGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATT 840
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1060    GGAGTGCCAATTGACGGGGTAGGACATCAGTCGCATATCCAAATCGGCTGGCCTTCCATT 1119

Query 841    GAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACT 900
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1120    GAAGATACAAGAGCTTCTTTTAAAAAGTTTACGAGTTTAGGATTAGACAATCAAGTAACT 1179

Query 901    GAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCCCGACAGGGGCATACACGTCATTTGACGAC 960
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 1180    GAGCTAGACATGAGTCTCTATGGCTGGCCCCGACAGGGGCATACACGTCATATGACGAC 1239

```

```

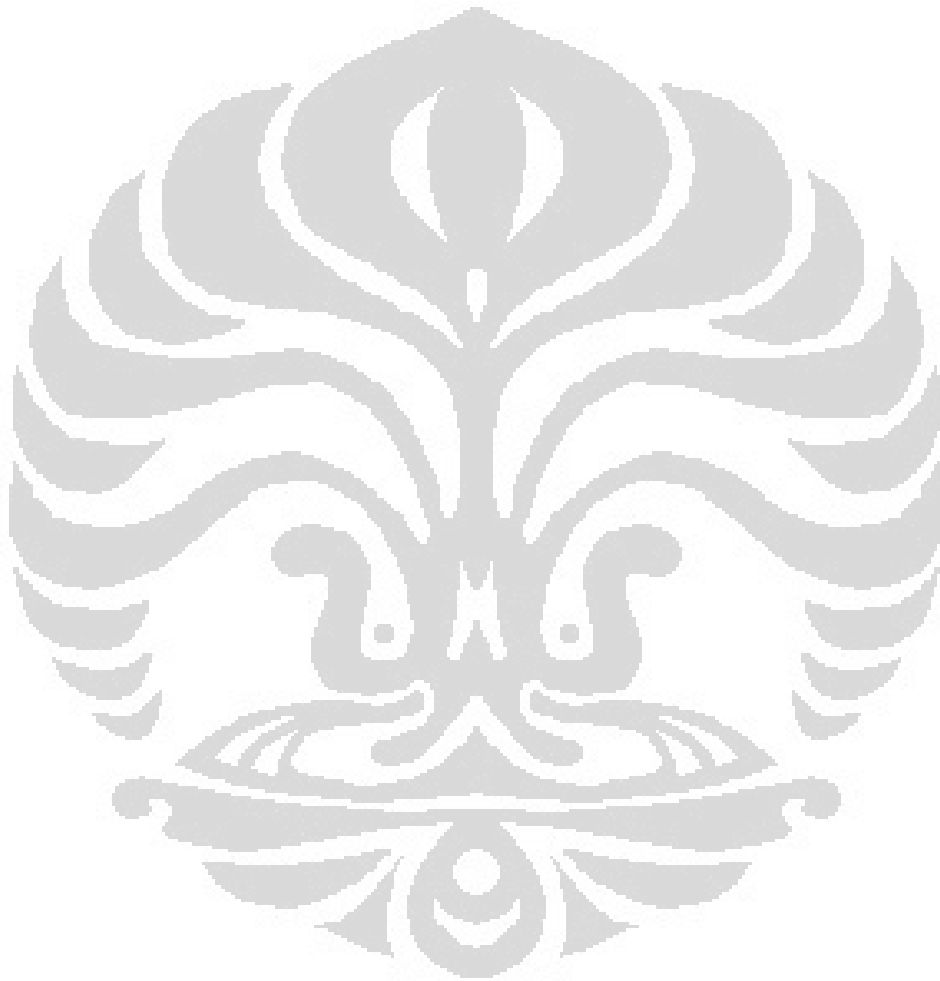
Query 961  ATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATAC 1020
          |||
Sbjct 1240  ATTCCAGCAGAACTCCTTCAAGCCCAGGCAGACCGTTACGATCAGCTTTTCGAGTTATAC 1299

Query 1021  GAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACA 1080
          |||
Sbjct 1300  GAAGAATTAGCTGCTGATATTAGCAGTGTAACCTTCTGGGGAATTGCTGATAACCATACA 1359

Query 1081  TGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAGTAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTGTT 1140
          |||
Sbjct 1360  TGGCTTGATGGCCGCGCTAGAGAGTACAATAATGGAGTAGGGATCGATGCACCATTGTT 1419

Query 1141  TTTGATCATAACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATCGATTA 1190
          |||
Sbjct 1420  TTTGATCATAACTATCGAGTGAAACCTGCTTACTGGAGAATTATTGATTA 1469

```



## Lampiran 9. Singkatan dan Struktur Asam Amino

$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ (\text{CH}_2)_3 \\   \\ \text{NH} \\   \\ \text{C}=\text{NH}_2 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginine (Arg / R)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamine (Gln / Q)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phenylalanine (Phe / F)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\   \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tyrosine (Tyr / Y)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ <p>Tryptophan (Trp. W)</p>
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ (\text{CH}_2)_4 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Lysine (Lys / K)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine (Gly / G)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine (Ala / A)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 \end{array}$ <p>Histidine (His / H)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Serine (Ser / S)</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\   \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \backslash \quad / \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \end{array}$ <p>Proline (Pro / P)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>Glutamic Acid (Glu / E)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>Aspartic Acid (Asp / D)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Threonine (Thr / T)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cysteine (Cys / C)</p>
$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{S} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Methionine (Met / M)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine (Leu / L)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagine (Asn / N)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{HC} - \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine (Ile / I)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O} \end{array} \\   \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine (Val / V)</p>

## Lampiran 10. Hasil Prediksi *Signal Peptide* Xilanase Klon 2 Menggunakan SignalP Server



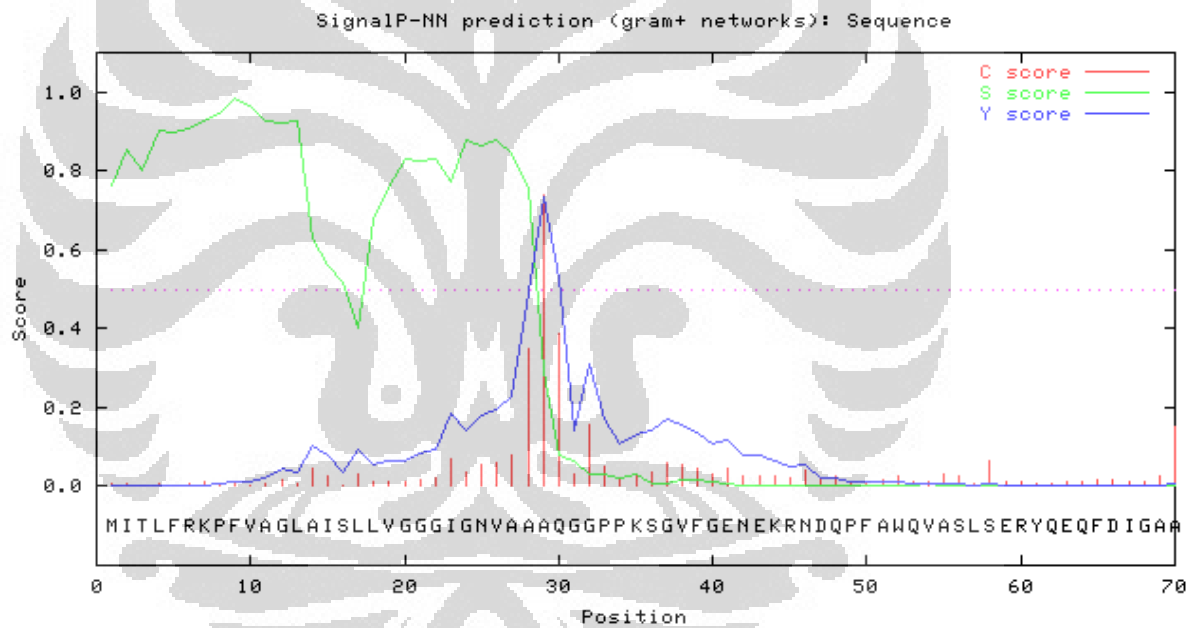
### SignalP 3.0 Server - prediction

Technical University of Denmark

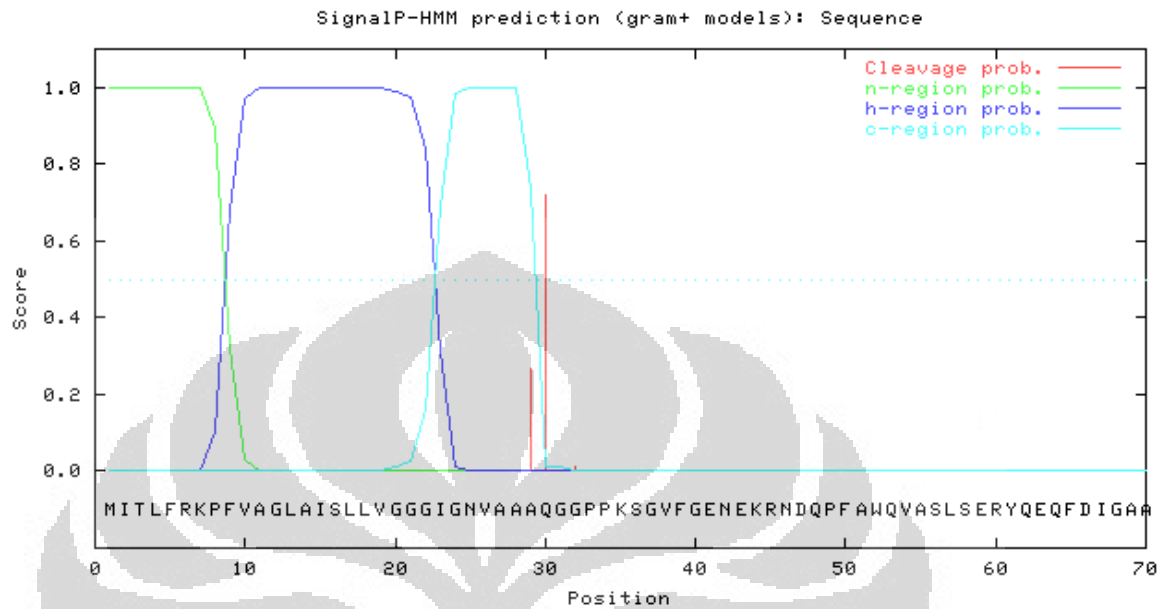
Using neural networks (NN) and hidden Markov models (HMM) trained on Gram-positive bacteria

>Sequence

SignalP-NN result:



```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 29 0.740 0.52 YES
max. Y 29 0.736 0.32 YES
max. S 9 0.986 0.97 YES
mean S 1-28 0.812 0.51 YES
D 1-28 0.774 0.45 YES
# Most likely cleavage site between pos. 28 and 29: VAA-AQ
```

**SignalP-HMM result:**

>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Max cleavage site probability: 0.721 between pos. 29 and 30

## Lampiran 11. Hasil Prediksi *Signal Peptide* Xilanase Klon 3 Menggunakan SignalP Server



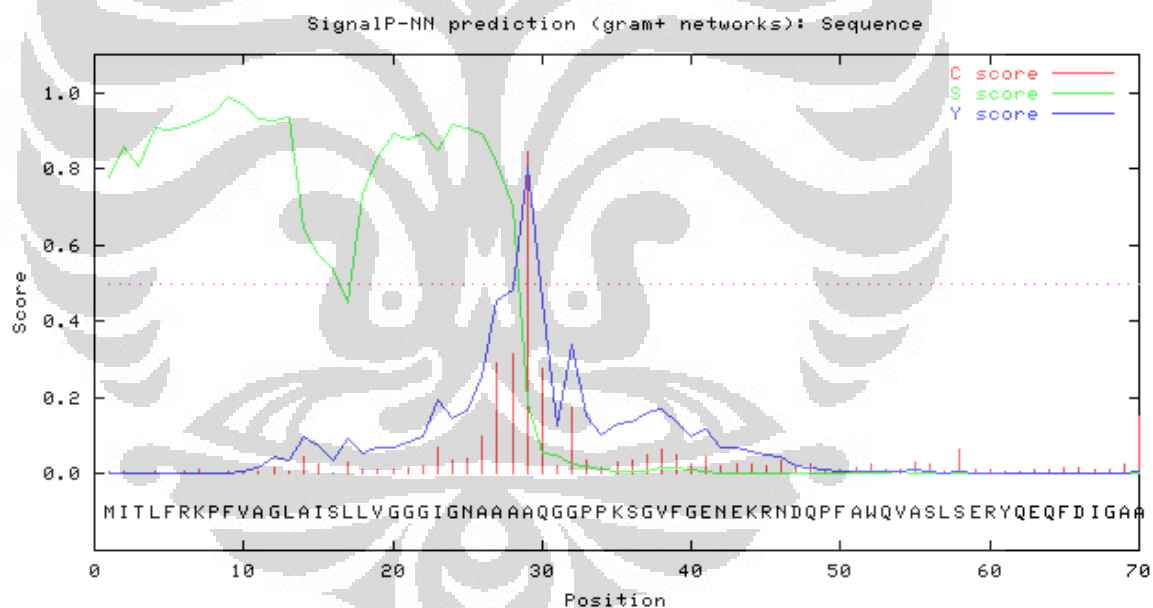
### SignalP 3.0 Server - prediction results

Technical University of Denmark

Using neural networks (NN) and hidden Markov models (HMM) trained on Gram-positive bacteria

>Sequence

SignalP-NN result:

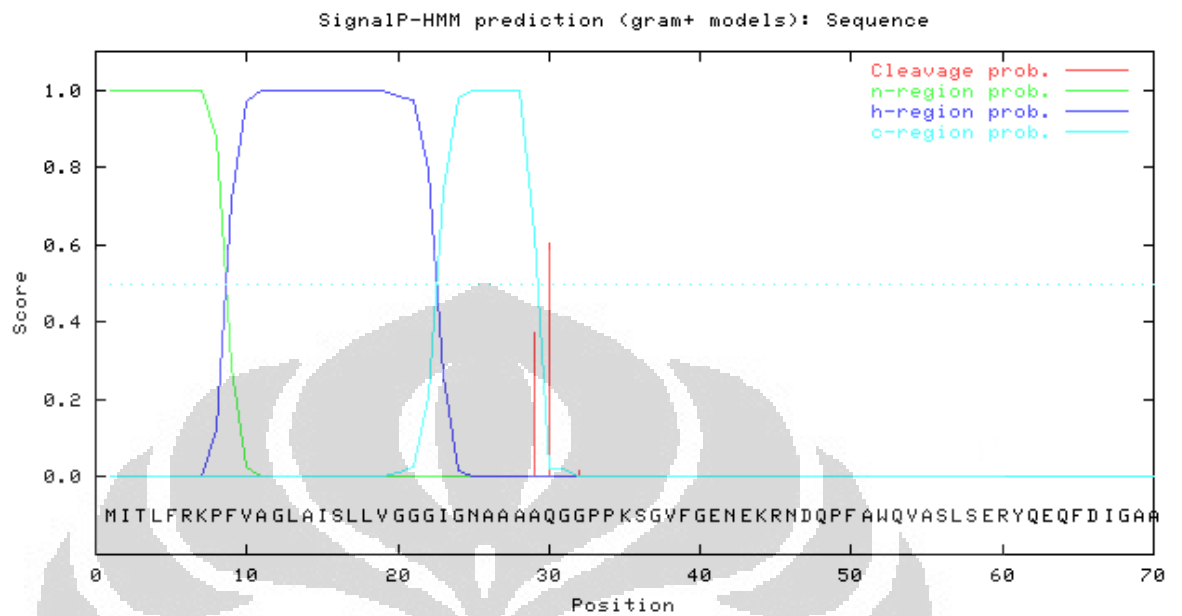


```

>Sequence          length = 70
# Measure  Position  Value  Cutoff  signal peptide?
max. C     29         0.845  0.52   YES
max. Y     29         0.807  0.32   YES
max. S     9          0.987  0.97   YES
mean S     1-28       0.832  0.51   YES
D         1-28       0.820  0.45   YES
# Most likely cleavage site between pos. 28 and 29: AAA-AQ

```



**SignalP-HMM result:**

>Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Max cleavage site probability: 0.605 between pos. 29 and 30

## Lampiran 12. Hasil Prediksi Beberapa Parameter Protein Klon 2 Menggunakan ExPASy Proteomics Server

# ExPASy Proteomics Server

**ProtParam**

**User-provided sequence:**

```

10      20      30      40      50      60
MITLFRKPFV AGLAISLLVG GGIGNVAAAQ GGPPKSGVFG ENEKRNDQPF AWQVASLSER
70      80      90      100     110     120
YQEQFDIGAA VEPYQLEGRQ AQILKHHYNS LVAENAMKPE SPQPREGEWN WEGADKIVEF
130     140     150     160     170     180
ARKHNMELRF HTLVVHVSQVP EWWFIDEDGN RMVDETDPAK REANKQLLLE RMENHIKTVV
190     200     210     220     230     240
ERYKDDVTSW DVVNEVIDDG GGLRESEWYQ ITGTDYIKVA FETARKYGGE EAKLYINDYN
250     260     270     280     290     300
TEVPSKRDDL YNLVKDLEEQ GVPIDGVGHQ SHIQIGWPSI EDTRASFEKF TSLGLDNQVT
310     320     330     340     350     360
ELDMSLYGWP PTGAYTSYDD IPAELLQAQA DRYDQLFELY EELAADISSV TFWGTADNHT
370     380     390
WLDGRAREYN NGVGIDAPFV FDHNYRVKPA YWRIID

```

---

**Number of amino acids:** 396

**Molecular weight:** 45278.2

**Theoretical pI:** 4.66

CSV format

**Amino acid composition:**

Ala (A)	29	7.3%
Arg (R)	20	5.1%
Asn (N)	19	4.8%
Asp (D)	32	8.1%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	19	4.8%
Glu (E)	36	9.1%
Gly (G)	31	7.8%
His (H)	10	2.5%
Ile (I)	22	5.6%
Leu (L)	29	7.3%
Lys (K)	18	4.5%
Met (M)	6	1.5%
Phe (F)	16	4.0%
Pro (P)	18	4.5%
Ser (S)	18	4.5%
Thr (T)	16	4.0%
Trp (W)	12	3.0%
Tyr (Y)	18	4.5%
Val (V)	27	6.8%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B) 0 0.0%  
(Z) 0 0.0%  
(X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 68  
Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 38

**Atomic composition:**

Carbon	C	2033
Hydrogen	H	3056
Nitrogen	N	544
Oxygen	O	623
Sulfur	S	6

**Formula:** C<sub>2033</sub>H<sub>3056</sub>N<sub>544</sub>O<sub>623</sub>S<sub>6</sub>  
**Total number of atoms:** 6262

**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1} cm^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 92820  
Abs 0.1% (=1 g/l) 2.050

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
>20 hours (yeast, in vivo).  
>10 hours (Escherichia coli, in vivo).

**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 33.46  
This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 77.32

**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.589

### Lampiran 13. Hasil Prediksi Beberapa Parameter Protein Klon 3 Menggunakan ExPASy Proteomics Server

## ExPASy Proteomics Server

### ProtParam

#### User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MITLFRKPFV AGLAISLLVG GGIGNAAAQ  GGPPKSGVFG  ENEKRNDQPF  AWQVASLSER
      70      80      90     100     110     120
YQEQFDIGAA VEPYQLEGRQ AQILKHHYNS  LVAENAMKPE  SLQPREGEWN  WKGADKIVEF
     130     140     150     160     170     180
ARKHNMELRF HTLWHSQVPE WFFINEDGNW  MVDETDPKR  EANKQLLER  MENHIKTVVE
     190     200     210     220     230     240
RYKDDVTSWD VVNEVIDDGG GLRESEWYQI  TGTDYIKVAF  ETARKYGGEE  AKLYINDYNT
     250     260     270     280     290     300
EVFSKRDDLY NLMKDLLEQG VPIDGVGHQS  HIQIGWPSIE  DTRASFEKFT  SLGLDNQVTE
     310     320     330     340     350     360
LDMSLYGWPF TGAYTSYDDI PAELLQAQAD  RYDQLFELYE  ELAADISSVT  FWGIADNHTW
     370     380     390
LDGRAREYSN GVGIDAPFVF DHNYRVKPAY  WRIID

```

Number of amino acids: 395

Molecular weight: 45200.2

Theoretical pI: 4.71

CSV format

#### Amino acid composition:

Ala (A)	30	7.6%
Arg (R)	19	4.8%
Asn (N)	19	4.8%
Asp (D)	31	7.8%
Cys (C)	0	0.0%
Gln (Q)	19	4.8%
Glu (E)	35	8.9%
Gly (G)	31	7.8%
His (H)	10	2.5%
Ile (I)	22	5.6%
Leu (L)	30	7.6%
Lys (K)	19	4.8%
Met (M)	7	1.8%
Phe (F)	16	4.1%
Pro (P)	17	4.3%
Ser (S)	19	4.8%
Thr (T)	16	4.1%
Trp (W)	13	3.3%
Tyr (Y)	18	4.6%
Val (V)	24	6.1%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B) 0 0.0%  
 (Z) 0 0.0%  
 (X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 66  
 Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 38

**Atomic composition:**

Carbon	C	2032
Hydrogen	H	3050
Nitrogen	N	542
Oxygen	O	619
Sulfur	S	7

**Formula:** C<sub>2032</sub>H<sub>3050</sub>N<sub>542</sub>O<sub>619</sub>S<sub>7</sub>  
**Total number of atoms:** 6250

**Extinction coefficients:**

Extinction coefficients are in units of  $M^{-1}cm^{-1}$ , at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient	98320
Abs 0.1% (=1 g/l)	2.175

**Estimated half-life:**

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).  
 >20 hours (yeast, in vivo).  
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

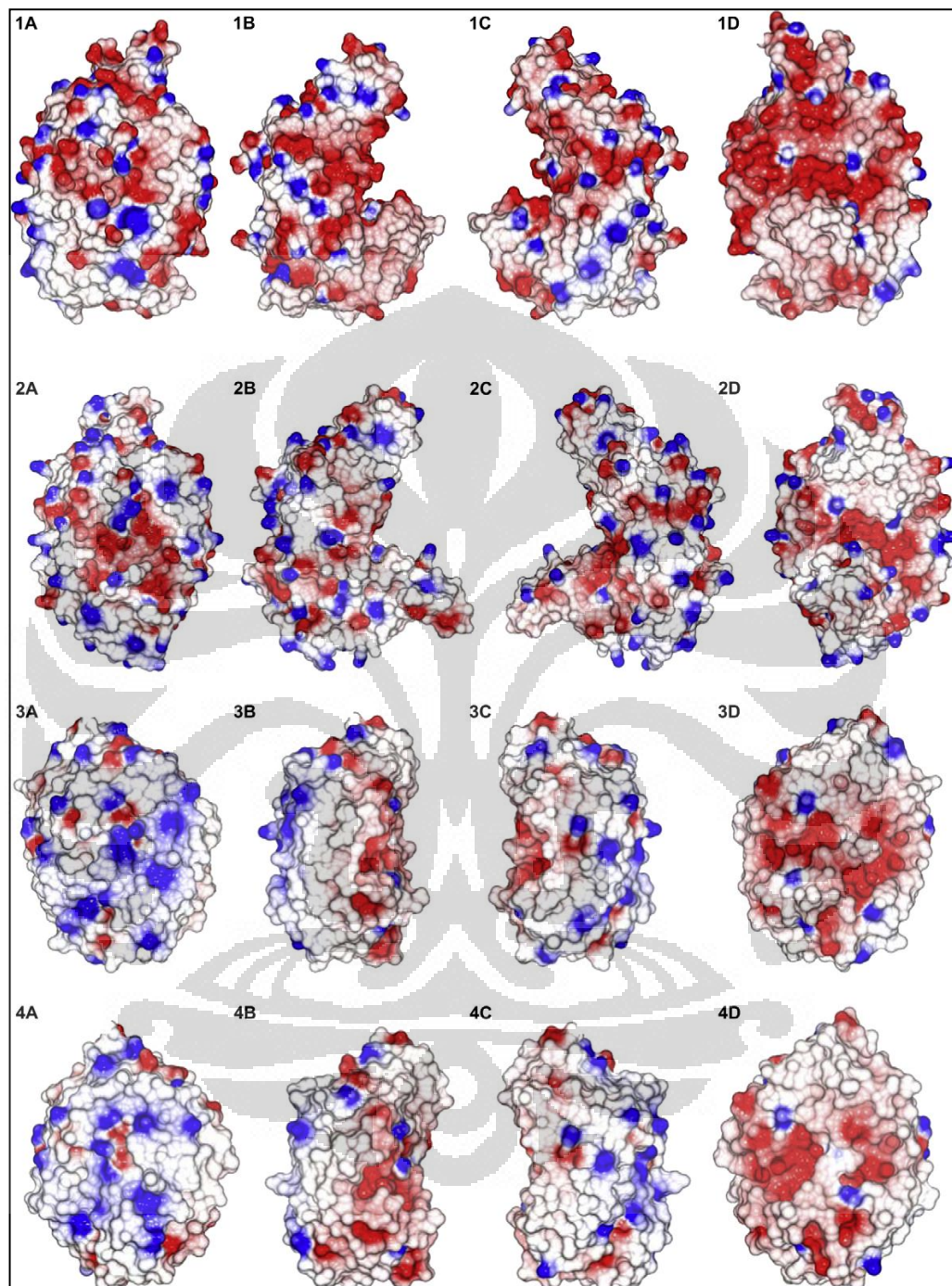
**Instability index:**

The instability index (II) is computed to be 33.54  
 This classifies the protein as stable.

**Aliphatic index:** 76.56

**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** -0.584

**Lampiran 14. Penampakan Permukaan Sisi Aktif Beberapa Xilanase  
Famili 10**

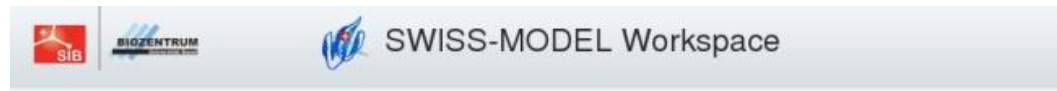


[Mamo, 2009]

Keterangan :

(1)2UWF , (2)1HIZ, (3) 1B30, (4) 1K6A. (A) Penampakan bawah, (B) dan (C) Penampakan sisi, (D) Penampakan atas. Warna merah menunjukkan muatan negatif, warna biru menunjukkan muatan positif.

## Lampiran 15. Pencarian Kemiripan Xilanase Klon 2 dan 3 Menggunakan Server *Swiss-Model Workspace*



Workunit: P000020  
Title: shafa



### Model Details: Batch.1



Target:  
modelled residue range:

47 to  
395

based on template

2uwfA  
(2.1 Å)

Sequence Identity [%]:  
Evaluate: 0

94.857

### Alignment

TARGET	47	DQPFAMQV	ASLSERYQEQ	FDIGAAVEPY	QLEGRQAQIL	KHHYNSLVAE
2uwfA	11	nqpfawqv	aslseryqeq	fdigaavepy	qlegrqaqil	khhymslvae
TARGET		sss	hhh	sssss	hhhhh	hh sssss
2uwfA		sss	hhh	sssss	hhhhh	hh sssss
TARGET	95	NAMKPESLQP	REGAWNWKGA	DKIVEPARKH	NMELRFHT-L	WHSQVPEWFF
2uwfA	59	namkpvslqp	regawnwega	dkivefarkh	nmelrfhtlv	whsqvpewff
TARGET		hhh	hhh	hhhhhhhh	sssss	s
2uwfA		hhh	hhh	hhhhhhhh	sss	s
TARGET	144	INEDGNMVD	ETDPDKREAN	KQLLLERME	HIKTVVERYK	DDVTSWDVFN
2uwfA	109	idengnrmvd	etdeprkan	kqlllermen	hiktvveryk	ddvtswdvfn
TARGET		ss	sss	hhhhhh	hhhhhhhh	hhhhhh
2uwfA		ss	sss	hhhhhh	hhhhhhhh	hhhhhh
TARGET	194	EVIDDGGGLR	ESEWYQITGT	DYIKVAFETA	RKYGGEAKL	YINDYNTEVP
2uwfA	159	eviddggglr	esewyqitgt	dyikvafeta	rkyggeeakl	yindyntevp
TARGET		sss	sss	hhhhh	hhhhhhhh	hhhh
2uwfA		sss	sss	hhhhh	hhhhhhhh	hhhh

```

TARGET 244 SKRDDLYNLM KDLLEQGVPI DGVGHQSHIQ IGWFSIEDTR ASFEKFTSLG
2uwfA 209 skrddlynlv kdllleggvpv dgvghqshiq igwpsiedtr asfekftslg

TARGET          hhhhhhhhhh hhhhhh      ssssss      hhhh  hhhhhhhh
2uwfA          hhhhhhhhhh hhhhhh      ssssss      hhhh  hhhhhhhh

TARGET 294 LDNQVTELDM SLYGWPPTGA YTSYDDIPAE LLQAQADRYD QLFELYEELA
2uwfA 259 ldnqvteldm slygwpptga ytsyddipee lfqaqadryd qlfelyeels

TARGET          sssss          h hhhhhhhhhh hhhhhhhh
2uwfA          sssss          h hhhhhhhhhh hhhhhhhh

TARGET 344 ADISSVTFWG IADNHTWLDG RAREYSNGVG IDAPFVFDHN YRVKPAYWRI
2uwfA 309 atissvtfwg iadnhtwldg rareynngvg vdapfvfdhn yrvkpaywri

TARGET          sssss      hhh hhhhh      sss  sss hhhhh
2uwfA          sssss      hhh hhhhh      sss  sss hhhhh

TARGET 394 ID ----
2uwfA 359 idhhhhhh

TARGET          h
2uwfA          h

```

## Model Quality Estimation

### Modelling log

3.70 (SP3)

Loading Template: 2uwfA.pdb

Loading Raw Sequence

Renumber target sequence starting from (47)

Loading Alignment: ./NXXX.align.submit.fasta

Removing HET groups from template structure

Refining Raw Sequence Alignment

ProModII: doing simple assignment of backbone

ProModII: adding blocking groups

Adding Missing Sidechains

AddPolar H

BuildDeletedLoopsModel

Trying Ligating with anchor residues HIS 131 and TRP 134

Number of Ligations found: 10

all loops are bad; continuing CSP with larger segment

Trying Ligating with anchor residues PHE 130 and TRP 134

Number of Ligations found: 50

ACCEPTING loop 8: clash= 0 FF= 23.3 PP= -1.00

Optimizing Sidechains

Adding Hydrogens

Optimizing loops and OXT (nb = 5)

Final Total Energy: -20393.602 KJ/mol

Dumping Sequence Alignment



Workunit: P000020

Title: shafa



Model Details: Batch.1



Target:  
 modelled residue range: 47 to 395  
 based on template 2uwfA (2.1 Å)  
 Sequence Identity [%]: 94.857  
 Evalue: 0

Alignment

TARGET	47	DQPF	AWQV	ASLS	ERYQEQ	FDIGA	AVEPY	QLEGR	QAQIL	KHHY	NSLVAE		
2uwfA	11	nqpf	awqv	asls	eryqeq	fdiga	avepy	qlegr	qaqil	khhy	nslvae		
TARGET		sss		hhhh		ssssss		hhhhh	hh	ssssss			
2uwfA		sss		hhhh		ssssss		hhhhh	hh	ssssss			
TARGET	95	NAMK	PESLQP	REG	EWNW	KGAD	KIVE	FARKH	NMEL	RFHT-L	WHSQ	VEWFF	
2uwfA	59	namk	pvs	lqp	reg	ewn	wega	dkive	farkh	nmel	rfhtlv	whsq	vpewff
TARGET		hhhh		hhh	hhhh	hhhhh		ssssss		s			
2uwfA		hhhh		hhh	hhhh	hhhhh		sss		s			
TARGET	144	INED	GNW	MVD	ETDP	DKREAN	KQLL	ERMEN	HIKT	VVERYK	DDVT	SWD	
2uwfA	109	ideng	nr	mvd	etd	pekrkan	kqll	lrm	hikt	vveryk	ddvt	swd	
TARGET		ss	sss		hhhhh	hhhhh	hhhhh	hhhhh	ssss				
2uwfA		ss	sss		hhhhh	hhhhh	hhhhh	hhhhh	sss				
TARGET	194	EVID	DGG	GLR	ESEW	YQITGT	DYIK	VAFETA	RKYG	GEEAKL	YIND	YNTEVP	
2uwfA	159	evid	ddg	glr	esew	yqitgt	dyik	vafeta	rkyg	geeakl	yindy	ntevp	
TARGET		sss	sss	hhhhh	hhhhh	hhhhh	hhhh	ss	ssss	h			
2uwfA		sss	sss	hhhhh	hhhhh	hhhhh	hhhh	ss	ssss	h			

```

TARGET   244   SKRDDLYNLM KDLLEQGVPI DGVGHQSHIQ IGWPSIEDTR ASFEKFTSLG
2uwfA    209   skrddlynlv kdlleqgvpi dgvghqshiq igwpsiedtr asfekftslg

TARGET           hhhhhhhhhh hhhhhh      ssssss           hhhh hhhhhhhh
2uwfA           hhhhhhhhhh hhhhhh      ssssss           hhhh hhhhhhhh

TARGET   294   LDNQVTELDM SLYGWPPTGA YTSYDDIPAE LLQAQADRYD QLFELYEELA
2uwfA    259   ldnqvteldm slygwpptga ytsyddipee lfqaqadryd qlfelyeels

TARGET           sssss           h hhhhhhhhhh hhhhhhhh
2uwfA           sssss           h hhhhhhhhhh hhhhhhhh

TARGET   344   ADISSVTFWG IADNHTWLDG RAREYSNGVG IDAPFVFDHN YRVKPAYWRI
2uwfA    309   atissvtfwg iadnhtwldd rareynngvg vdapfvfdhn yrvkpaywri

TARGET           sssss           hhh hhhhh      sss  ssss hhhhh
2uwfA           sssss           hhh hhhhh      sss  ssss hhhhh

TARGET   394   ID -----
2uwfA    359   idhhhhhh

TARGET           h
2uwfA           h

```

## Model Quality Estimation

### Modelling log

```

3.70 (SP3)
Loading Template: 2uwfA.pdb
Loading Raw Sequence
Renumber target sequence starting from (47)
Loading Alignment: ./NXXX.align.submit.fasta
Removing HET groups from template structure
Refining Raw Sequence Alignment
ProModII: doing simple assignment of backbone
ProModII: adding blocking groups
Adding Missing Sidechains
AddPolar H
BuildDeletetedLoopsModel
Trying Ligating with anchor residues HIS 131 and TRP 134
Number of Ligations found: 10
all loops are bad; continuing CSP with larger segment
Trying Ligating with anchor residues PHE 130 and TRP 134
Number of Ligations found: 50
ACCEPTING loop      8: clash=   0 FF=           23.3 PP= -1.00
Optimizing Sidechains
Adding Hydrogens
Optimizing loops and OXT (nb = 5)
Final Total Energy:      -20393.602 KJ/mol
Dumping Sequence Alignment

```

## Template Selection Log:

```
- Start SMR-Pipeline in automated mode on BC2-cluster at Mon Jun 27 08:27:03 2011

- Start BLAST for highly similar template structure identification
- Blast template search was successfull, number of templates selected for modeling: 1; entering modeling mo

- Send 1 target-template alignments for modeling

- @@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@@
- *****
- building model based on 2uwfA (47-395) was successfull
- Workspace Pipeline parameter

Cut-off parameters to model the target based on a BLAST target-template alignment
  Evalue : 0.0001
  Minimum Template size (aa) for ranking : 25
  Minimum Sequence identity : 60

Cut-off parameters to model the target based on a HHSearch target-template alignment
  Evalue : 0.0001
  Probability : 50
  MAC : 0.3

Parameters for model selection
  Minimal number of uncovered target
  residues after BLAST to run HHSEARCH : 50
  Minimal number of uncovered target
  residues to model an additional template : 25

- Finish SMR-Pipeline in automated mode on BC2-cluster at Mon Jun 27 08:27:37 2011
```

If you publish results using SWISS-MODEL, please cite the following papers:

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. [Bioinformatics, 22,195-201.](#)
- Schwede T, Kopp J, Guex N, and Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. [Nucleic Acids Research 31: 3381-3385.](#)
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. [Electrophoresis 18: 2714-2723.](#)

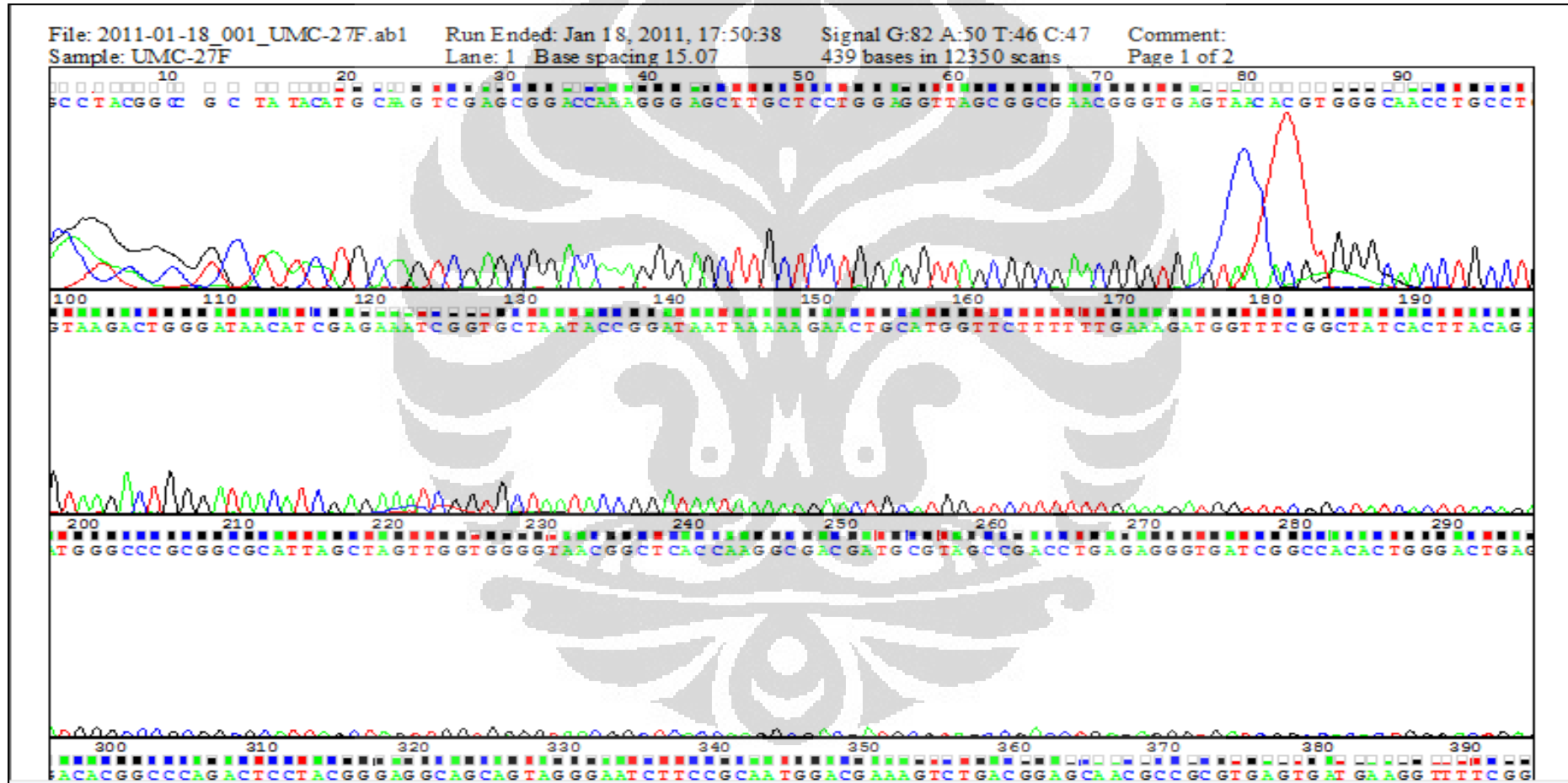
**Lampiran 16. Tabel Karakterisasi pH Aktivitas Xilanase**

	pH	s1	s2	s	b1	b2	b	s-b	Nilai X	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas (x 1.5 U/mL)	x faktor pengenceran	Aktivitas spesifik (U/mg)
klon 2	5	0,617	0,591	0,604	0,596	0,595	0,596	0,009	0,140	3,750	5,625	16,876	6,764
	6	0,689	0,686	0,688	0,654	0,655	0,655	0,033	0,227	6,076	9,114	27,343	10,959
	7	0,543	0,569	0,556	0,521	0,537	0,529	0,027	0,206	5,507	8,260	24,780	9,932
	8	0,625	0,635	0,630	0,596	0,587	0,592	0,039	0,246	6,598	9,898	29,693	11,901
	9	0,671	0,666	0,669	0,627	0,627	0,627	0,042	0,257	6,883	10,325	30,975	12,415
	10	0,617	0,621	0,619	0,588	0,588	0,588	0,031	0,220	5,886	8,830	26,489	10,617
	11	0,629	0,658	0,644	0,578	0,578	0,578	0,066	0,342	9,162	13,743	41,229	16,525
klon 3	5	0,665	0,665	0,665	0,649	0,663	0,656	0,009	0,142	3,798	5,697	17,090	7,715
	6	0,666	0,664	0,665	0,657	0,633	0,645	0,020	0,181	4,842	7,263	21,789	9,837
	7	0,609	0,604	0,607	0,564	0,580	0,572	0,035	0,232	6,219	9,328	27,984	12,634
	8	0,672	0,677	0,675	0,617	0,610	0,614	0,061	0,326	8,735	13,102	39,306	17,745
	9	0,677	0,676	0,677	0,624	0,624	0,624	0,053	0,296	7,928	11,892	35,675	16,106
	10	0,678	0,673	0,676	0,620	0,620	0,620	0,056	0,307	8,213	12,319	36,956	16,685
	11	0,759	0,758	0,759	0,707	0,704	0,706	0,053	0,298	7,975	11,963	35,888	16,202

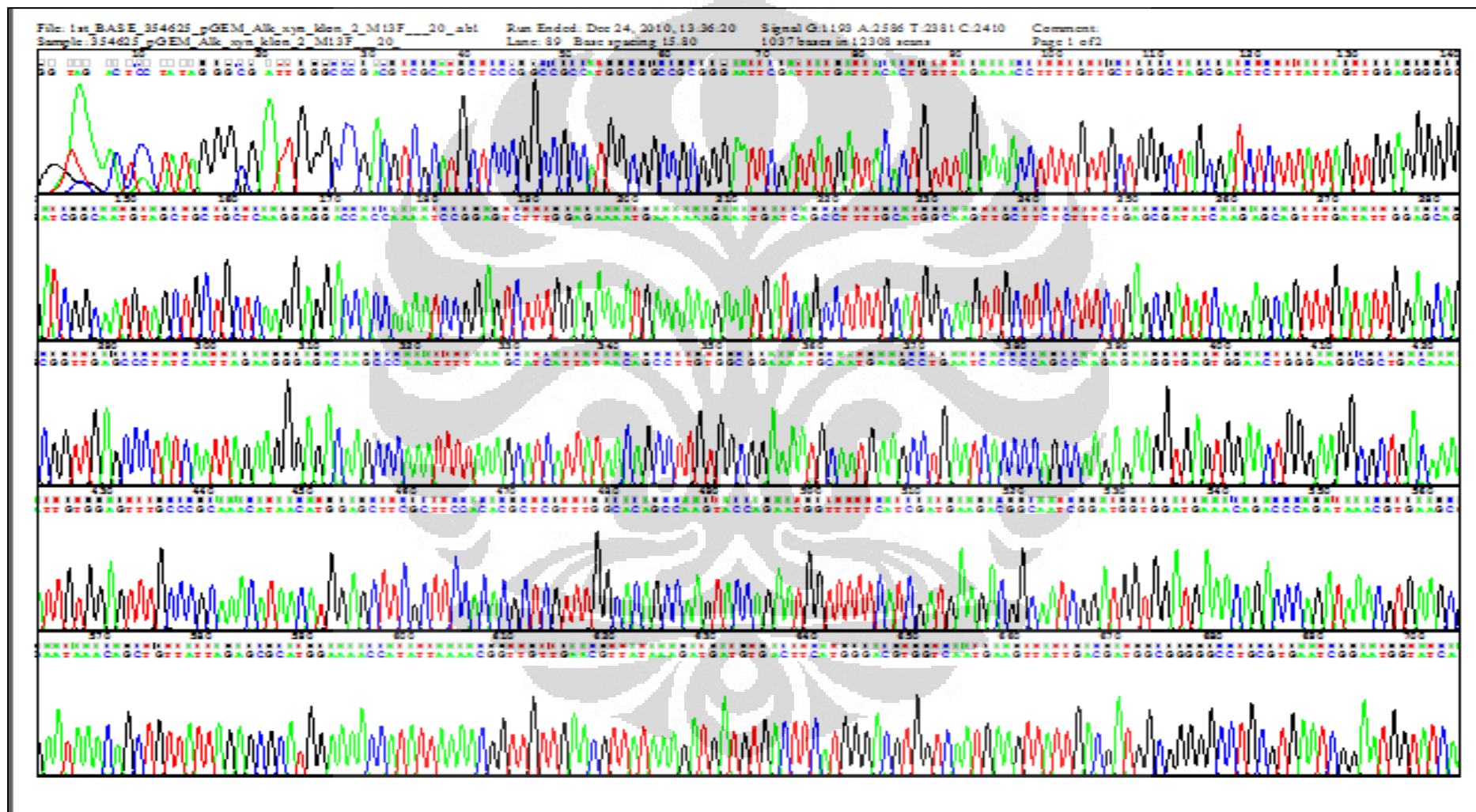
**Lampiran 17. Tabel Karakterisasi Suhu Aktivitas Xilanase**

	pH	s1	s2	s	b1	b2	b	s-b	Nilai X	Aktivitas (U/mL)	Aktivitas (x 1.5 U/mL)	kali faktor pengenceran	Aktivitas spesifik (U/mg)
klon 2	30	0,621	0,626	0,624	0,589	0,606	0,598	0,026	0,202	5,412	8,118	24,353	9,761
	40	0,595	0,608	0,602	0,568	0,583	0,576	0,026	0,202	5,412	8,118	24,353	9,761
	50	0,614	0,591	0,603	0,574	0,574	0,574	0,029	0,211	5,649	8,474	25,421	10,189
	60	0,588	0,606	0,597	0,574	0,574	0,574	0,023	0,191	5,127	7,690	23,071	9,247
	70	0,642	0,634	0,638	0,581	0,580	0,581	0,058	0,314	8,402	12,604	37,811	15,155
klon 3	30	0,565	0,626	0,596	0,604	0,604	0,604	0,009	0,080	2,136	3,204	9,613	3,853
	40	0,632	0,632	0,632	0,629	0,629	0,629	0,003	0,121	3,228	4,842	14,526	5,822
	50	0,625	0,625	0,625	0,604	0,606	0,605	0,020	0,181	4,842	7,263	21,789	9,837
	60	0,637	0,634	0,636	0,600	0,600	0,600	0,036	0,236	6,314	9,471	28,412	12,827
	70	0,656	0,680	0,668	0,645	0,642	0,644	0,025	0,197	5,269	7,904	23,712	10,705

Lampiran 18. Kromatogram Hasil Sekuensing 16S rRNA 27F Isolat CMU



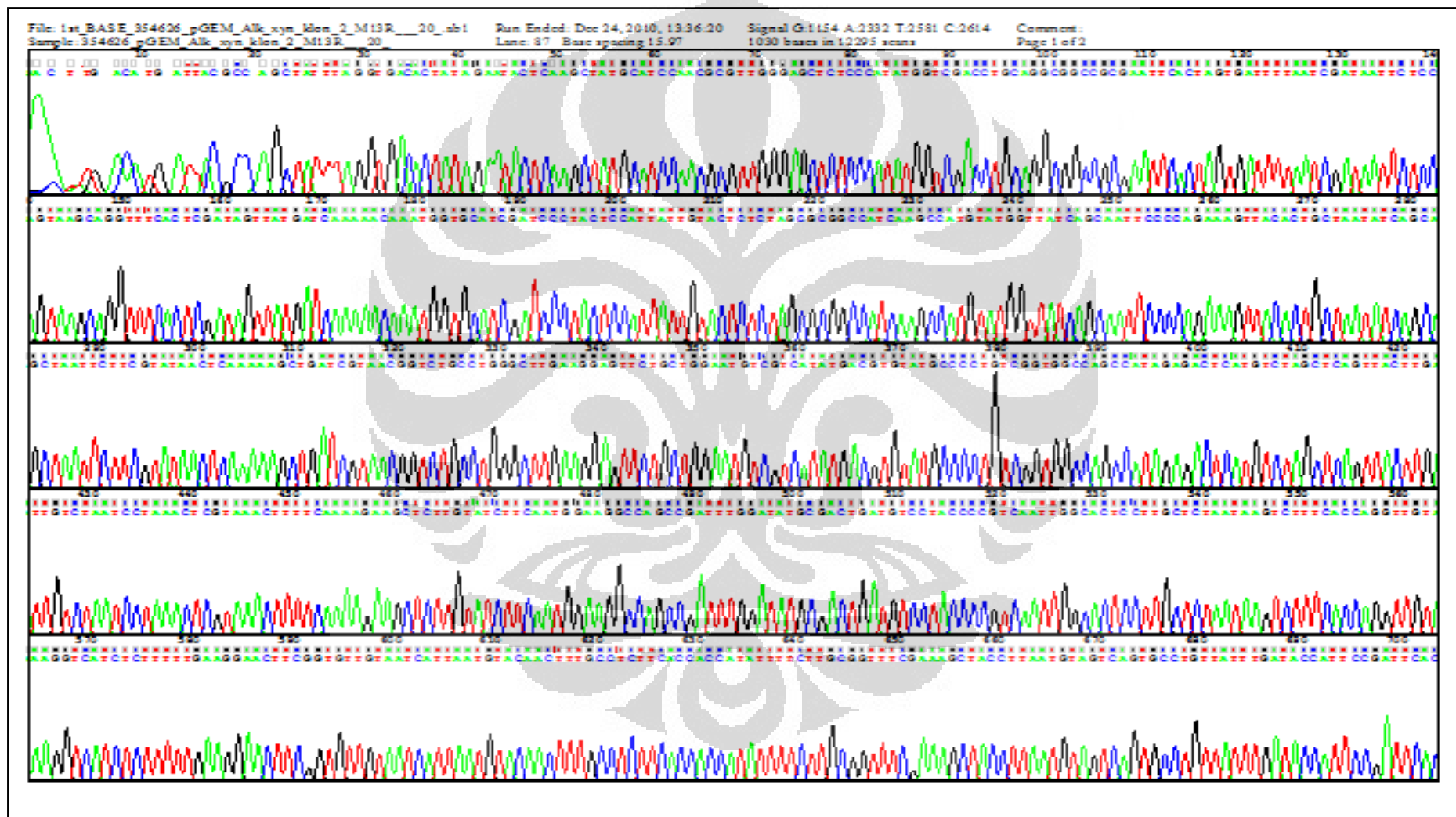
## Lampiran 19. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 2 – M13F

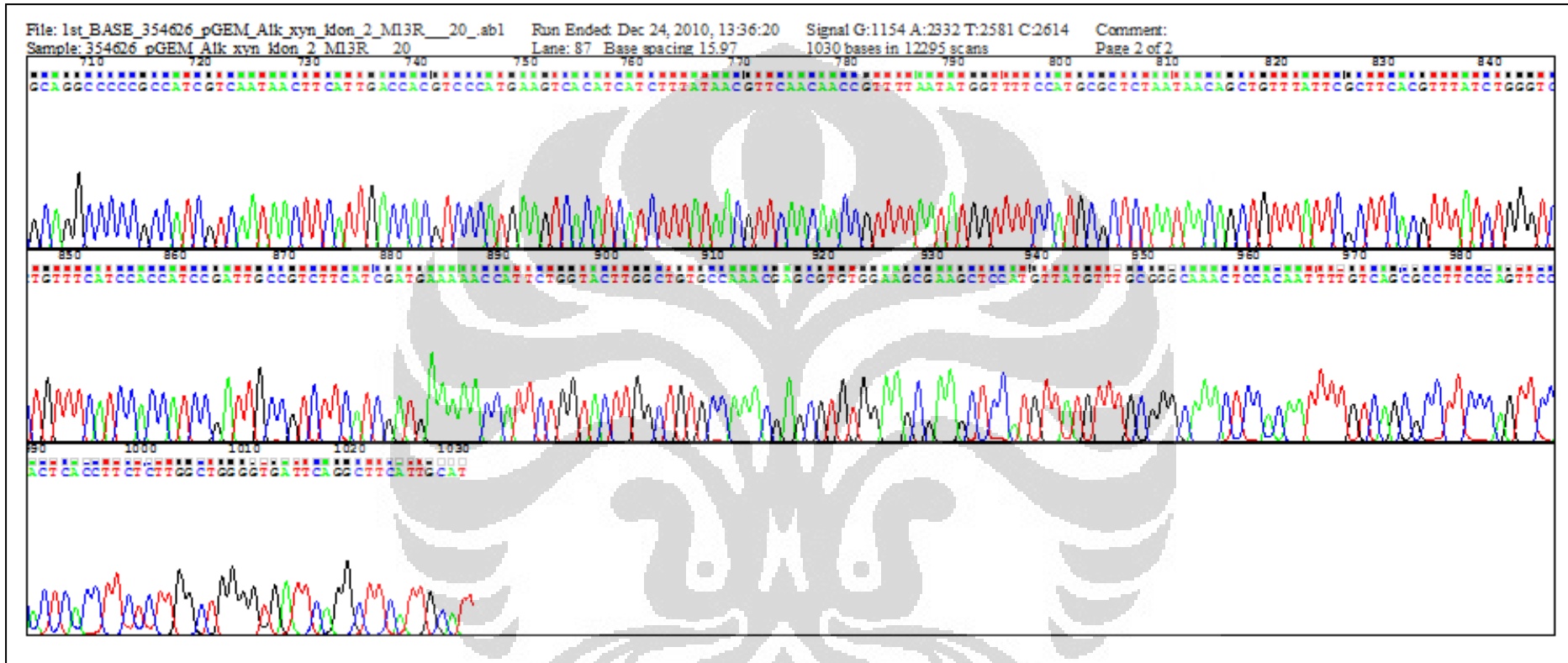






## Lampiran 20. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 2 – M13R









## Lampiran 22. Kromatogram Hasil Sekuensing Gen Alkxyn Klon 3 – M13R

