PENENTUAN SISI AKTIF SELULASE *ASPERGILLUS NIGER* DENGAN DOCKING LIGAN

IDENTIFICATION OF THE ACTIVE SITE OF CELLULASE FROM *ASPERGILLUS NIGER* BY LIGAN DOCKING

Tigor Nauli

Pusat Penelitian Informatika – Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Jl. Cisit - Sangkuriang, Bandung 40135, Telp. 022-2504711
E-mail: tigor@informatika.lipi.go.id

Diterima : 13 Juni 2014, Revisi : 30 Agustus 2014, Disetujui : 05 September 2014

ABSTRAK

Letak dari sisi aktif selulase *Aspergillus niger*, yang akan menentukan aktivitas katalitiknya, dapat diketahui melalui komputasi. Sebuah ligan selobiosa dimodelkan untuk dapat melakukan simulasi *docking* pada molekul selulase yang telah diketahui struktur kristalnya. Melalui kalkulasi energi ikatan dan pendekatan optimasi memakai algoritma genetik Lamarckian, dapat dipilih konformasi molekul yang menunjukkan adanya daerah tertentu dengan energi terendah. Struktur yang memiliki daerah semacam ini dianggap mewakili konfigurasi terbaik terikatnya ligan pada sisi aktif yang dicari. Hasil perhitungan memperlihatkan bahwa tekukan protein yang membentuk celah konfak diantara dua kelompok struktur β -sheet yang saling berlawanan arah pada molekul selulase merupakan sisi aktif dari enzim tersebut. Ligan dapat terikat disana melalui interaksi hidrofilik dengan residu asparagin (Asn20), serin (Ser111), dan glutamin (Gln158). Di salah satu ujung sisi aktif selulase terdapat residu aspartat (Asp99) dan glutamat (Glu116, Glu204) yang akan mempengaruhi aksi katalitik dari enzim selulase apabila residu-residu ini terikat oleh ion-ion divalen. Sisi aktif selulase ini merupakan gabungan dari domain pengikat substrat dan domain katalitik. Penambahan ion logam yang tepat pada sisi aktif enzim selulase *Aspergillus niger* dapat meningkatkan aktivitas spesifiknya.

Kata kunci : *docking*, ligan, selulase, sisi ikatan, substrat

ABSTRACT

The active site of cellulase from *Aspergillus niger* that affects the enzyme activity can be searched by computational methods. A ligand of cellobiose is modelled to perform docking simulation to cellulase with known crystal structure. By calculating the binding free energy and optimization approach using Lamarckian's genetic algorithm, a molecular conformation that has a region with the lowest energy value can be selected. The molecule structure with such region

represents the best configuration of ligand bound to the active site. The calculation results that the concave cleft formed by protein folding of two anti-parallel β -sheet structures is the active site of the enzyme. A ligand would bind to the site through hydrophilic interactions with asparagine (Asn20), serine (Ser111), and glutamine (Gln158) residues. The aspartic acid (Asp99) and glutamic acid (Glu116, Glu204) residues that reside in one end of the active site determine the catalytic actions of the enzyme when they are binding with some metal ions. It is shown that the active site of this cellulase has substrate-binding domain and catalytic domain together. The introduction of specific metal ions to the active site of *Aspergillus niger* cellulase will increase its specific activity.

Keywords : binding site, cellulase, docking, ligand, substrate

PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim penting bagi perindustrian dan diproduksi secara komersial untuk berbagai aplikasi, seperti misalnya pada pengolahan tepung, produksi makanan ternak, fermentasi alkohol, pembuatan bir, ekstraksi dan klarifikasi jus buah dan sayuran, pabrik kertas, dan industri tekstil⁽¹⁾.

Selulase adalah sebuah enzim kompleks yang merupakan campuran dari endoglukanase, eksoselulase (atau selobiohidrolase), dan β -glukosidase, yang seluruhnya berkerja sinergis untuk mengubah dengan efisien kompleks karbohidrat yang terdapat di dalam biomassa lignoselulotik menjadi glukosa⁽²⁾. Endoglukanase berperan menentukan pada proses degradasi selulosa dengan mengkatalisis pemotongan awal dari polimer polisakarida, yaitu menghidrolisis ikatan β -1,4 glukosida secara acak pada daerah amorf dari rantai selulosa untuk menghasilkan rantai panjang

oligosakarida. Eksoselulase melepaskan selobiosa dari ujung pereduksi atau non-pereduksi pada rantai, yang umumnya terjadi pada bagian kristal dari selulosa. Sedangkan glukosidase melepas glukosa dari selobiosa dan rantai-pendek selooligosakarida⁽³⁾.

Kebanyakan dari enzim selulolitik, seperti selulase pada Gambar 1, memiliki sebuah susunan molekul yang serupa dimana sebuah *catalytic domain* (CD) yang besar tersambung dengan sebuah *cellulose-binding domain* (CBD) yang kecil melalui sebuah penghubung fleksibel dari peptida yang kaya-glikosat (Pro/Ser/Thr)⁽⁴⁾. CD adalah bagian dari selulase tempat terjadinya hidrolisis selulosa. CBD akan menempel pada selulosa, dan bertindak sebagai penuntun bagi enzim agar tetap teradsorpsi dengan kuat pada permukaan selulosa⁽⁵⁾.

Gambar 1. Arsitektur dari kedua domain selulase.

Selulase memiliki aktivitas enzim spesifik yang rendah apabila bereaksi dengan substrat yang tak larut. Hal ini dijumpai pula pada selulase dari jamur *Aspergillus niger* yang tidak memiliki CBD dan peptida penghubung⁽⁴⁾. Komponen utama selulase *Aspergillus niger* adalah *catalytic domain* yang merupakan sebuah endoglukanase.

Sisi Aktif Enzim

Sisi aktif (active site/binding site) enzim adalah daerah spesifik pada makromolekul itu dimana substrat akan terikat dan mengalami reaksi kimia⁽⁶⁾. Sisi aktif enzim dapat ditemukan pada celah (cleft), parit (groove), atau kantong (pocket) yang tersusun dari sejumlah residu asam amino yang terlibat dalam pengenalan substrat.

Substrat terikat pada sisi aktif enzim melalui ikatan hidrogen, interaksi hidrofob, interaksi kovalen temporer (van der Waals) atau kombinasi ketiganya untuk membentuk kompleks enzim-substrat. Residu-residu pada sisi aktif enzim akan bertindak sebagai donor atau aseptor proton atau gugus lain terhadap substrat agar terjadi reaksi. Sisi aktif mengubah mekanisme reaksi agar terjadi perubahan energi aktivasi dari reaksi tersebut. Produk biasanya tidak stabil pada sisi aktif karena adanya halangan ruang yang memaksanya untuk lepas dan mengembalikan enzim

kekeadaan bebas seperti sedia kala.

Docking Otomatis

Docking adalah sebuah metode yang dapat memprediksi orientasi terbaik satu molekul terhadap molekul lainnya ketika keduanya saling terkait untuk membentuk sebuah kompleks yang stabil. *Docking* secara otomatis dapat dilakukan dengan menggunakan program AutoDock, yaitu sebuah aplikasi komputer yang mampu mensimulasi interaksi antara ligan kecil dan makromolekul yang telah diketahui strukturnya⁽⁷⁾. *Docking* dapat terjadi melalui pencarian sejumlah konformasi molekul menggunakan algoritma genetik Lamarckian dan perhitungan energi menggunakan metoda yang berdasarkan pada AMBER *force field*. Kombinasi dari kedua fungsi ini menghasilkan sejumlah koordinat molekul yang menggambarkan konformasi paling mungkin dari sebuah ligan. Signifikan dari konformasi yang diperoleh, dinyatakan dalam nilai energi bebas Gibbs (ΔG) yang dihitung dari model kuantum dan mekanika molekuler terhadap kekuatan atom.

Energi bebas Gibbs ini terdiri dari enam suku persamaan yang mewakili model dispersi/repulsi, ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, deviasi terhadap geometri kovalen, batasan terhadap torsi dari ligan, dan pengaruh desolvasi,

$$\Delta G = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{conform} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Algoritma genetik Lamarckian mewakili fungsi matematis yang diturunkan berdasarkan pengertian dari molekuler genetik. Dengan menggunakan konsep matematis yang dirancang untuk mensimulasi kondisi-kondisi yang mempengaruhi evolusi biologi, maka algoritma genetik mampu mencari konformasi molekul dengan cara melakukan "mutasi" terhadap sebuah ligan agar diperoleh sebuah konformasi dengan energi terendah pada suatu "lingkungan" protein yang tetap. Pencarian konformasi melalui perhitungan energi seperti ini telah dibuktikan oleh Hetenyi⁽⁸⁾, dapat memberikan suatu indikasi yang baik terhadap interaksi optimum dari protein-ligan, sehingga sangat mungkin interaksi tersebut dapat ditemukan dalam keadaan yang sebenarnya (*in vivo*).

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mencari sisi aktif selulase pada *catalytic domain* melalui pendekatan *docking ligan*. Apabila dapat ditemukan sebuah konformasi molekul tertentu dimana sebuah ligan dapat berikatan kuat dengan protein pada lokasi tertentu, maka lokasi tersebut adalah sisi aktif enzim yang dicari. Dengan pengetahuan tentang sisi aktif selulase, maka dimungkinkan untuk merancang atau menemukan suatu

senyawa kimia yang dapat meningkatkan aktivitas katalitik enzim selulase.

BAHAN DAN METODA

Bahan

Struktur Kristal Selulase

Struktur kristal selulase dari *Aspergillus niger* dengan *accession number* 1KS5 diperoleh dari Protein Data Bank (PDB: www.rcsb.org/pdb) yang dikelola oleh Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB).

Dilakukan pemeriksaan terhadap ikatan pada gugus heterogen/HET (yaitu residu-residu yang tidak standar, seperti gugus prostetik, inhibitor, molekul pelarut, dan ion) dan diadakan perbaikan. Air dihilangkan dari struktur dan atom-atom hidrogen ditambahkan pada struktur.

Struktur Selobiosa

Disakarida selobiosa dengan rumus kimia $C_{12}H_{22}O_{11}$ dipilih sebagai ligan. Selobiosa terdiri dari dua molekul glukosa yang bergabung melalui ikatan $\beta(1 \rightarrow 4)$.

Struktur selobiosa (CBI) model direkonstruksikan dari koordinat ligan pada struktur kristal protein lain yang telah diketahui.

Kandidat Sisi Aktif

Sisi aktif adalah daerah dengan energi terendah pada struktur protein dimana terdapat residu-residu katalitik yang akan berinteraksi dengan ligan. Lokasi kandidat sisi aktif dipelajari melalui pengamatan terhadap permukaan protein dimana terdapat daerah dengan hidrofobisitas dan hidrofilitas tertentu, atau terlihat adanya celah yang khas. Permukaan semacam ini berpeluang untuk terjadinya ikatan.

Peralatan

Perangkat Komputasi

Perhitungan interaksi ligan-enzim dan penentuan konformasi molekul dilakukan dengan menggunakan piranti lunak AutoDockTools4 pada workstation Intel dual core dengan platform open source (Linux).

Metoda

Proses Docking

Proses *docking* dilakukan dengan mengikuti algoritma genetika Lamarckian. Didefinisikan dimensi sisi aktif adalah berupa kubus berukuran $40\text{\AA}$, untuk menjamin ketersediaan ruang yang cukup bagi ligan untuk melakukan *docking*.

Ligan model ditempatkan pada kandidat sisi aktif, kemudian dilakukan *docking* otomatis dengan parameter mutasi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Parameter yang Digunakan pada *Docking* Otomatis.

Parameter	Nilai
Population Size	50
Maximum Number of Generation	27000
Rate of Gene Mutation	0.02
Rate of Crossover	0.8

Docking akan selalu diubah oleh algoritma hingga diperolehnya posisi yang paling sesuai dengan struktur enzim. Posisi tersebut ditentukan oleh total energi minimum yang didapat dari perhitungan. Apabila posisi yang dimaksud tidak dapat ditemukan, maka ligan harus ditempatkan ulang pada daerah kandidat lain dan proses *docking* diulangi kembali.

Signifikansi Hasil Docking

Besarnya penyimpangan koordinat atom-atom C_α pada konformasi molekul yang ditemukan dan konformasi model, dinyatakan dalam RMSD (root mean square deviation). RMSD adalah akar kuadrat dari rata-rata kuadrat penyimpangan antara atom-atom yang berkecocokan⁽⁹⁾:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum d_i^2}{n}}$$

dimana d adalah penyimpangan (distance) dari setiap n pasangan atom-atom ekuivalen yang terdapat di kedua struktur yang dibandingkan. Idealnya RMSD bernilai 0 untuk struktur-struktur yang sama, namun kesalahan pengukuran dapat mengakibatkan deviasi dari nilai tersebut. Konformasi molekul dengan nilai RMSD yang sangat kecil menunjukkan keberadaan posisi optimal ligan pada sisi aktif enzim.

Perangkat komputasi yang digunakan akan memberikan signifikasi hasil *docking* dalam dua nilai, yaitu batas atas RMSD (u.b.): yang menyatakan kecocokan (match) antara suatu atom pada salah satu konformasi dengan atom yang sama pada konformasi lainnya, dan batas bawah RMSD (l.b.): yang menyatakan kecocokan antara suatu atom pada salah satu konformasi dengan atom dari unsur sejenis pada konformasi lainnya.

Mutasi

Mutasi satu tempat (single point mutation) dilakukan terhadap residu asam amino pada kandidat sisi aktif dan residu lainnya dari enzim dengan

mensubstitusi secara acak asam-asam amino disekitar 5Å dari ligan. Ini dilakukan untuk memastikan keterlibatan setiap residu tersebut pada perubahan afinitas ikatan.

Validasi

Validasi dilakukan dengan mengamati nilai dari hasil *docking* dan jumlah ikatan hidrogen. Afinitas ikatan yang terbaik ditentukan oleh nilai negatif dari *docking score* dan kenaikan jumlah ikatan hidrogen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Struktur Kristal dan Model Ligan

Dalam tahap persiapan, struktur kristal selulase dari *Aspergillus niger* disempurnakan dengan menambahkan sejumlah atom hidrogen. Posisi atom hidrogen dioptimalkan dengan perhitungan mekanika molekuler untuk menjamin penempatannya berada pada konfigurasi dengan potensial energi yang mencukupi. Hibridisasi keseluruhan struktur disetimbangkan dengan perhitungan mekanika molekuler.

Sebagai model ligan untuk selulase, tentu saja dapat dipilih berbagai macam molekul selooligo sakarida, yang merupakan fragmen-fragmen hasil pemotongan acak oleh endoglukanase pada bagian amorf dari selulosa. Namun pemilihan terhadap rantai panjang akan menambah kerumitan dalam proses *docking*, karena mutasi genetik semakin beragam dan algoritma akan semakin sulit mencapai konvergensi hasil. Sementara itu, selobiosa adalah senyawa antara yang selalu ada pada degradasi selulosa. Dan selobiosa tidak terurai oleh glukukanase pada tahap kedua dari proses hidrolisis selulosa⁽³⁾.

Molekul selobiosa yang dipersiapkan sebagai model ligan, telah diberi keleluasaan untuk memiliki 12 torsi agar dapat melakukan manuver dengan baik di dalam *grid* yang telah didefinisikan.

Hasil Docking

Proses *docking* otomatis memberikan sembilan konformasi dengan energi afinitas terendah (dalam kkal/mol), seperti yang terlihat pada luaran aplikasi di Tabel 2. Selain konfigurasi *mode 1* yang memperlihatkan konformasi ligan-enzim terbaik, dapat pula dipertimbangkan dua konfigurasi lainnya, yaitu: *mode 3*, dan *mode 4*. Konformasi molekul pada *mode 4* memiliki batas bawah RMSD terkecil setelah *mode 1*, sedangkan konformasi molekul pada *mode 3* memiliki batas atas RMSD terkecil setelah *mode 1*. Sehingga

dapat dipastikan bahwa konformasi *mode 3* lebih signifikan dibandingkan dengan konformasi *mode 4*.

Tabel 2. Sembilan Konformasi Ligan-Enzim dengan Energi Terendah.

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b. rmsd u.b.
1	-6.6	0.000 0.000
2	-6.3	1.568 3.283
3	-6.2	1.669 2.517
4	-6.1	1.253 2.833
5	-6.1	3.219 7.440
6	-6.1	1.337 6.106
7	-6.0	1.694 6.065
8	-5.8	3.487 7.895
9	-5.5	1.256 3.499

Koordinat selobiosa pada masing-masing konformasi, apabila dialurkan bersama dengan koordinat struktur kristal selulase, akan menghasilkan gambaran tiga dimensi dari letak ligan pada sisi aktif enzim, seperti pada Gambar 2. Pandangan yang diambil dari arah utara enzim ini memperlihatkan sisi aktif enzim selulase yang berawal dari ujung kiri celah dan memanjang hingga ke arah ujung kanan celah.

Konformasi *mode 1*, *mode 3*, dan *mode 4* memperlihatkan terjadinya ikatan ligan selobiosa di tempat yang sama, yaitu pada sekitar ujung sisi aktif enzim selulase. Perbedaan yang nampak jelas dari ketiga konformasi ini adalah pada orientasi kedua cincin piranosanya, dalam upaya mencapai energi afinitas yang terendah.

Gambar 2. Empat macam konformasi ligan selobiosa pada sisi aktif enzim selulase.

Keadaan sebaliknya terlihat pada konformasi *mode 8* yang memiliki nilai terbesar pada kedua batas RMSD, atau yang konformasinya sangat kurang signifikan. Ligan selobiosa terikat pada posisi yang berbeda dibandingkan dengan ketiga konformasi sebelumnya, dimana letak kini berada di tengah sisi aktif enzim selulase dan memiliki energi afinitas yang lebih besar 12% dari energi afinitas konformasi *mode 1*.

Dengan memperhatikan koordinat ligan selobiosa pada konformasi-konformasi yang telah ditemukan dan membandingkan energi afinitas setiap konformasi, maka *mode 1* dapat dipastikan sebagai konformasi paling tepat yang dapat menunjukkan terjadinya ikatan antara ligan dan enzim pada daerah (atau sisi aktif) yang dicari. Terlihat dengan jelas bagaimana selobiosa terbenam di celah sempit molekul selulase, dan berada disana dalam keadaan stabil dengan cincin piranosanya yang saling berputar sekitar 45° (Gambar 3).

Gambar 3. Ligan selobiosa terikat pada sisi aktif enzim selulase.

Konformasi Ligan-Enzim

Rantai selulase *Aspergillus niger* yang tersusun dari 223 residu asam amino menekuk (fold) dan membentuk 15 struktur β -sheet yang berlawanan arah (anti-paralel) dan empat struktur α -helix. Pada sisi kiri Gambar 4 (yang dibuat dengan PyMol⁽¹⁰⁾), terlihat dengan jelas letak salah satu dari struktur α -helix dengan panjang sepuluh residu asam amino.

Gambar 4. Selubiosa berada diantara tekukan β -sheet selulase.

Sedangkan dari ketiga struktur α -helix lainnya yang memiliki panjang masing-masing tiga residu, hanya dua yang nampak pada Gambar 4.

Tekukan pada molekul selulase sangat dominan membentuk struktur β -sheet/ β -strand dengan panjang antara dua hingga 26 asam amino, dengan rata-rata panjang adalah sembilan residu per tekukan. Lengkung konkaf dari tekukan β -sheet anti-paralel telah membentuk celah dimana selobiosa terikat disana.

Celah pada molekul selulase *Aspergillus niger* merupakan struktur khas dari *catalytic domain* selulase, karena teramati juga keberadaan struktur serupa pada selulase yang berasal dari sumber lain (jamur dan bakteri)⁽⁹⁾. Sebagian dari celah ini memiliki medan polar yang memungkinkan ligan terikat disana. Pada selulase yang memiliki *cellulose binding domain*, terdapat tiga residu aromatik (Tyr) yang membentuk medan hidrofilik di permukaan luar protein yang berbentuk hampir cembung, yang akan 'memegang' selulosa tetap disana selama terjadinya hidrolisis.

Sisi Aktif Selulase

Di salah satu tepi dari sisi aktif enzim terjadi interaksi hidrofilik antara ligan dengan gugus amino polar dari protein. Residu glutamin (Gln158), serin (Ser111), dan asparagin (Asn20), pada Gambar 5, berinteraksi dengan tiga dari delapan gugus -OH selobiosa. Interaksi ini sekaligus menunjukkan spesifitas dari enzim terhadap substrat yang hidrofilik.

Gambar 5. Residu-residu asam amino yang terlibat dalam ikatan dengan selobiosa pada sisi aktif enzim selulase.

Tetapi perlu diteliti lebih lanjut, misalnya dengan menggunakan ligan yang lebih panjang dari selobiosa, berapa bagian dari celah yang berdimensi sekitar panjang 35 Å, lebar 8 Å, dan tinggi 15 Å, yang masih bersifat sebagai pengikat-substrat (substrate-binding). Konfigurasi *mode 8* (pada Gambar 2) telah memperlihatkan bahwa sakarida masih dapat berikatan hingga ke tengah dari panjang celah. Sandgren⁽¹¹⁾ memperkirakan ukuran celah tersebut (atau panjang sisi aktif) adalah sekurangnya enam unit glukosa.

Pada hidrolisis glikosil, hidrolisis enzimatis terhadap ikatan glikosidik biasanya terjadi melalui katalisis asam/basa biasa, yang memerlukan dua residu penting, yaitu sebuah donor proton (HA) dan sebuah nukleofil/basa (B). Aktivitas katalitik ini diperkirakan disediakan oleh residu asam amino bermuatan negatif, yaitu aspartat (Asp99) dan residu glutamat (Glu116, Glu204), seperti pada Gambar 6.

Gambar 6. Hidrolisis terhadap ikatan glikosidik.

Meskipun demikian, residu mana yang menjadi donor proton atau nukleofil, belumlah dapat dipastikan dari hasil penelitian ini. Okada⁽¹²⁾ mengemukakan bahwa selulase menghidrolisis ikatan glukosidik pada selulosa menggunakan mekanisme pertukaran ganda (double-displacement) dengan Glu116 sebagai nukleofil dan Glu200 (bukan Glu204) sebagai donor proton.

Fungsi dari Sisi Aktif Selulase

Konfigurasi ikatan ligan pada sisi aktif enzim, seperti pada Gambar 5, menjelaskan bahwa *catalytic domain* pada selulase *Aspergillus niger* berfungsi ganda, sebagai pengikat substrat dan melakukan aktivitas katalitik.

Fungsi ini dikonfirmasi oleh penelitian Sandgren⁽¹³⁾ yang menemukan bahwa selulase dari jamur serupa (*Trichoderma reesei*) juga memiliki sisi aktif sebagai pengikat substrat. Ikatan hidrogen dengan Asp99 dan nukleofil Glu116 memberikan aktivitas katalitik.

Residu Glu116 pada sisi aktif selulase *Aspergillus niger* sangat menentukan aktivitas katalitik enzim tersebut. Khademi⁽¹⁴⁾ menemukan bahwa ion Pd(2+) dapat membentuk sebuah ikatan kovalen koordinat dengan Met118 dan nukleofil Glu116 pada sisi aktif enzim, yang akan menyebabkan enzim menjadi tidak aktif.

Tetapi sebaliknya, dari penelitian yang lebih mutakhir oleh Chinedu⁽¹⁵⁾ ditemukan bahwa ion Mn(2+) dapat meningkatkan aktivitas selulase *Aspergillus niger* hingga tiga kali lipat. Meskipun mereka tidak mengamati residu mana yang terpengaruh oleh ion logam divalen, namun dapat diperkirakan bahwa fakta ini sangat berkaitan dengan residu bermuatan negatif pada sisi aktif enzim.

Keterbatasan Penelitian

Secara teoritis maupun bukti eksperimen menunjukkan bahwa tekukan protein dapat membentuk berbagai konformasi molekul yang memiliki energi yang sama⁽¹⁶⁾. Setiap molekul ini dapat memperlihatkan keadaan optimal untuk ligan tertentu. Keadaan yang dicirikan dengan letak dan orientasi ligan pada sisi aktif, tentu saja dapat terpengaruh oleh fakta tersebut.

Dengan pemahaman ini, maka sisi aktif selulase dari *Aspergillus niger* masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut dengan memakai metode lainnya. *Docking* otomatis memang dapat memprediksi geometri yang tepat dari sisi aktif protein, namun ia masih belum cukup untuk menghitung afinitas ikatan yang sebenarnya dan menentukan spesifitas substrat⁽¹⁷⁾.

KESIMPULAN

Sisi aktif enzim selulase *Aspergillus niger* terletak pada celah konkaf dari tekukan dua kelompok struktur β -sheet anti-paralel. Sisi aktif selulase ini merupakan gabungan dari domain pengikat substrat dan domain katalitik. Penambahan ion logam yang tepat pada sisi aktif enzim selulase *Aspergillus niger* dapat meningkatkan aktivitas spesifiknya.

DAFTAR PUSTAKA

1. M.A.M. Abo-State, A.I. Hammad, M. Swelim, R.B. Gannam. Enhanced production of cellulase(s) by *Aspergillus spp.* isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *J. Agric. & Environ. Sci.* 8(4):402-410 (2010).
2. U. Hölker, M. Höfer, J. Lenz. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175-186 (2004).
3. T.H. Pham, D.T. Quyen, N.M. Nghiem. Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021, *Turk J. Biol.* 36: 694-701 (2012).
4. A.A. Hasper, E. Dekkers, M. van Mil, P.J.L van de Vondervoort, L.H. de Graaff. EglC, a new endoglucanase from *Aspergillus niger* with major activity towards Xyloglucan, *Appl. & Environ. Microb.* 68(4): 1556-1560 (2002).
5. J. Liu, H. Hu. Adsorption of binding domains. *Bio Resources* 7(1): 878-892 (2012).
6. M.D. Toscano, K.J. Woycechowsky, D. Hilvert. Minimalist active-site redesign: teaching old enzymes new tricks. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 3212-3236 (2007).
7. G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry* 16: 2785-91 (2009).
8. C. Hetenyi, D. van der Spoel. Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Protein Science* 11(7), 1729-1737 (2002).
9. O. Carugo, S. Pongor. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Science* 10: 1470-1473 (2001).
10. L.L.C. Schrödinger. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3*, 2010.
11. M. Sandgren, J. Ståhlberg, C. Mitchinson. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 89: 246-291 (2005).
12. H. Okada, K. Mori, K. Tada, M. Nogawa, Y. Morikawa. Identification of active site carboxylic residues in *Trichoderma reesei* endoglucanase Cel12A by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Catalysis* 10: 249-255 (2000).
13. M. Sandgren, A. Shaw, T.H. Ropp, S. Wu, R. Bott, A.D. Cameron, J. Stahlberg, C. Mitchinson, T.A. Jones. The X-ray crystal structure of the *Trichoderma reesei* family 12 endoglucanase 3, Cel12A, at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 308(2): 295-310 (2001).
14. S. Khademi, D. Zhang, S.M. Swanson, A. Wartenberg, K. Witte, E.F. Meyer. Determination of the structure of an endoglucanase from *Aspergillus niger* and its mode of inhibition by palladium chloride. *Acta Crystallogr., Sect. D* 58: 660-667 (2002).
15. S.N. Chinedu, O.C. Nwinyi, U.A. Okafor, U.A. V.I. Okochi. Kinetic study and characterization of 1,4- β -endoglucanase of *Aspergillus niger* ANL301. *Dynamic Biochemistry* 5: 41-46 (2011).
16. H. Frauenfelder. Complexity in proteins. *Nature Struct. Biol.* 2, 821-823 (2005).
17. S.A. Hassan, L. Gracia, G. Vasudevan, P.J. Steinbach in: *Methods in Molecular Biology*, vol. 305: *Protein-Ligand Interactions: Methods and Applications*, (Nienhaus, G.U., eds.), Humana Press, Totowa, 2005, pp 451-492.