

17635-70771-1-CE 2

Turnitin Siswi Fililmi

Agniny.docx

by Juwita Ayu Nirmalasari

Submission date: 26-Nov-2025 07:44PM (UTC+0800)

Submission ID: 2716329211

File name: 17635-70771-1-CE_2_Turnitin.docx (55.26K)

Word count: 3606

Character count: 23486

PENINGKATAN AKTIVITAS DAN EKSPRESI PROTEIN TOTAL
ENZIM SELULASE REKOMBINAN SERTA POTENSI
APLIKASINYA PADA PAKAN IKAN

Siswi Filiani Agniy¹, Gunanti Mahasri², Akhmad Taufiq Mukti^{2,3*}, dan
Muhamad Amin⁴

¹Program Studi Magister Ilmu Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan
Muljorejo, Surabaya 60115, Jawa Timur, Indonesia

²Departemen Akuakultur, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan Muljorejo, Surabaya
60115, Jawa Timur, Indonesia

³Kelompok Penelitian Bioteknologi Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga, Jalan
Muljorejo, Surabaya 60115, Jawa Timur, Indonesia

⁴Department of Environmental and Life Sciences, Faculty of Science, Brunel Darussalam University, Jalan
Tungku Link, Bandar Seri Begawan, Gadong BE14 0, Brunei Darussalam

*Penulis korespondensi, akhmad-t-m@brunel.ac.id

(Naskah diterima: 03 Oktober 2025; Revisi final: 06 November 2025; Disetujui publikasi: 06 November 2025)

ABSTRAK

Meskipun enzim selulase rekombinan banyak dikembangkan untuk meningkatkan efisiensi pemecahan serat, informasi mengenai bagaimana modifikasi seperti mutasi dan penambahan tag SKIK (Ser-Lys-Ile-Lys) memengaruhi aktivitas enzim dan produksi protein total masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengevaluasi pengaruh mutasi dan penambahan tag SKIK terhadap aktivitas dan protein total enzim selulase rekombinan yang diproduksi oleh *Escherichia coli* BL21 (DE3). Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan, yaitu P1= wild type (WT), P2 = WT + SKIK, P3 = mutan, dan P4 = mutan + SKIK, masing-masing dengan empat ulangan. Produksi enzim dilakukan melalui kultur *E. coli* rekombinan yang membawa plasmid pET-22b-CelE dengan induksi laktosa monohidrat, kemudian dianalisis menggunakan uji aktivitas selulase metode 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dan pengukuran protein total dengan metode Bradford. Data dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dan uji lanjut Duncan pada tingkat signifikansi 5% ($P < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan mutan + SKIK menghasilkan nilai tertinggi baik pada aktivitas enzim (10,66 U/mL) maupun protein total (0,85 mg/mL). Penambahan SKIK meningkatkan ekspresi dan kelarutan protein, sedangkan mutasi memperbaiki efisiensi katalitik enzim. Kombinasi keduanya memberikan efek sinergis dalam meningkatkan performa enzim selulase rekombinan. Penelitian ini merupakan yang pertama mengombinasikan penambahan tag SKIK dengan mutagenesis untuk meningkatkan ekspresi dan aktivitas katalitik enzim selulase pada *E. coli*. Temuan ini tidak hanya relevan untuk peningkatan produksi enzim pada industri bioteknologi, tetapi juga berpotensi diaplikasikan dalam formulasi pakan ikan.

KATA KUNCI: aktivitas enzim; mutasi; protein total; selulase rekombinan; SKIK

ABSTRACT: Increased Activity and Total Protein Expression of Recombinant Cellulase Enzymes and Their Potential Application in Fish Feed

Although recombinant cellulase enzymes have been widely developed to enhance fiber-degradation efficiency, information regarding how modifications such as mutagenesis and the addition of the SKIK tag (Ser-Lys-Ile-Lys) influence enzymatic activity and total protein

Formatted: Superscript, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Not Bold, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font color: Text 1, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Not Bold, Italic, Shadow

Formatted: Centered

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font color: Text 1, Shadow

Formatted: Font color: Text 1, Shadow

Formatted: Font color: Text 1, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

31
production remains limited. therefore, this study aimed to evaluate the effects of mutagenesis and SKIK tagging on the activity and total protein yield of recombinant cellulase expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The research was conducted experimentally using a completely randomized design (CRD), with four treatments: P1 = wild type (WT), P2 = WT + SKIK, P3 = mutant, and P4 = mutant + SKIK, each consisting of four replications. Enzyme production was carried out using recombinant *E. coli* harboring the pET-22b-CelE plasmid induced with lactose monohydrate, and the resulting enzyme was analyzed for cellulase activity using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method and total protein concentration using the Bradford assay. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test at a 5% significance level ($P < 0.05$). The results showed that the mutant + SKIK treatment produced the highest values for both enzymatic activity (10.66 U/mL) and total protein (0.85 mg/mL). The addition of the SKIK tag enhanced protein expression and solubility, whereas mutagenesis improved catalytic efficiency. The combination of both modifications produced a synergistic effect, resulting in superior performance of the recombinant cellulase enzyme. This study is the first to combine SKIK tagging with mutagenesis to enhance the expression and catalytic activity of cellulase in *E. coli*. These findings are not only relevant for improving enzyme production in biotechnology industries but also hold potential applications in fish feed formulation.

KEYWORDS: enzyme activity; mutation; recombinant cellulase; SKIK; total protein

PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis selulosa, yaitu komponen utama penyusun dinding sel pada biomassa tumbuhan (Garg *et al.*, 2016). Enzim ini terdiri atas tiga komponen utama, yaitu endo- β -1,4-glukanase, ekso- β -1,4-glukanase, dan β -glukosidase yang bekerja sinergis untuk memecah selulosa menjadi glukosa (Murtiyarningsih & Hazni, 2017). Selulase memiliki potensi aplikasi luas, mulai dari pengolahan pakan ternak, ikan, dan industri tekstil, hingga produksi bioenergi. Namun, produksi enzim selulase dalam skala besar dengan aktivitas stabil masih menjadi tantangan. *Strain* tipe liar umumnya menghasilkan enzim dengan aktivitas rendah karena sistem ekspresinya secara alami tidak dirancang untuk produksi massal, sehingga rekayasa ekspresi diperlukan untuk meningkatkan yield (Ravindran & Jaiswal, 2016).

Perkembangan teknologi rekayasa genetika membuka peluang besar untuk memproduksi enzim selulase secara lebih efisien, terkontrol, dan berkelanjutan. Karena enzim merupakan hasil langsung dari ekspresi gen, modifikasi materi genetik mikroorganisme dapat diarahkan untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas lebih tinggi, kestabilan yang lebih baik, dan sifat

Formatted: Space After: 0 pt

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

yang sesuai dengan kebutuhan industri (Singh *et al.*, 2017). Salah satu mikroorganisme yang umum digunakan sebagai inang ekspresi adalah *Escherichia coli* karena struktur genetik yang sederhana, laju pertumbuhannya cepat, kemampuan beradaptasi dengan substrat beragam, serta kemudahan dalam manipulasi genetik dan ekspresi protein sehingga proses modifikasi dan analisis lebih mudah dilakukan (Adebami & Adebayo, 2020).

Strategi yang terbukti efektif adalah penambahan sekuens peptida SKIK pada bagian N-terminal protein serta penerapan mutasi pada domain aktif enzim. SKIK merupakan peptida pendek yang terdiri dari empat asam amino (Ser-Lys-Ile-Lys) yang biasanya ditempatkan pada bagian awal (N-terminal) protein untuk meningkatkan proses translasi dan produksi protein rekombinan (Yoshiro *et al.*, 2025). Penambahan SKIK telah dilaporkan mampu meningkatkan efisiensi ekspresi dan kelarutan protein target pada sistem *E. coli* (Ojima-Kato *et al.*, 2023).

Pendekatan mutasi pada domain aktif enzim telah terbukti meningkatkan aktivitas spesifik, kestabilan, dan afinitas terhadap substrat melalui pembentukan ikatan hidrogen baru yang memperkuat interaksi enzim-substrat (Ahmed *et al.*, 2024). Namun, hingga kini masih sedikit penelitian yang secara bersamaan menerapkan mutagenesis dan penambahan *tag* SKIK untuk mengoptimalkan ekspresi dan aktivitas enzim melalui rekombinan pada *E. coli*, sehingga aspek ini layak untuk diteliti lebih lanjut.

Dalam menilai kinerja enzim hasil produksi, parameter yang umum digunakan adalah aktivitas enzim dan protein total. Aktivitas enzim merupakan kemampuan enzim dalam mengubah sejumlah mol substrat menjadi produk per satuan waktu (Ramadhan & Wikandari, 2021). Lebih lanjut lagi, protein total menggambarkan jumlah keseluruhan protein yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yang umumnya diukur menggunakan metode Bradford (1976). Metode yang sering digunakan untuk menentukan konsentrasi protein dalam larutan enzim. Evaluasi kedua parameter ini penting untuk menilai efektivitas modifikasi genetik yang

20

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

24

113 dilakukan, baik melalui mutasi maupun penambahan sekuens SKIK dalam meningkatkan
114 kinerja enzim selulase rekombinan.

115 Dalam konteks akuakultur, penelitian ini menawarkan pendekatan baru dalam
116 pemanfaatan enzim selulase untuk pakan ikan melalui penggunaan enzim selulase rekombinan
117 yang menunjukkan aktivitas lebih tinggi serta produksi protein yang lebih besar dibanding enzim
118 selulase konvensional. Enzim selulase konvensional umumnya berasal dari mikroorganisme
119 penghasil selulase secara alami, seperti *Bacillus* spp (Sivakumar *et al.*, 2016) dan *Penicillium*
120 (Du *et al.*, 2018). Mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim selulase melalui proses
121 fermentasi, karena enzim selulase disekresikan sebagai enzim ekstraseluler saat memanfaatkan
122 selulosa sebagai sumber karbon dan energi (Nababan *et al.*, 2019). Namun, produksi enzim
123 selulase dari strain alami memiliki sejumlah keterbatasan, termasuk kapasitas produksi yang
124 rendah, ketiadaan strain hiper-produktif, serta kestabilan enzim yang kurang optimal pada
125 kondisi proses yang lebih ekstrem, sehingga membatasi efektivitas enzim selulase dalam
126 mendegradasi serat kasar pada bahan pakan (Mondal *et al.*, 2022).

127 Hasil penelitian ini memberikan dasar ilmiah bahwa enzim selulase rekombinan
128 berpotensi mendukung peningkatan pemanfaatan nutrisi dari bahan berserat dalam pakan ikan.
129 Tran *et al.* (2025) melaporkan bahwa enzim selulase rekombinan dari *Bacillus velezensis*
130 bekerja cukup efektif dalam memecah bahan berserat. Ketika enzim ini dicampurkan ke pakan
131 broiler, pertumbuhan ayam meningkatkan dan jumlah pakan yang dibutuhkan menjadi lebih
132 rendah dibanding perlakuan tanpa enzim. Pendekatan ini masih jarang diterapkan dalam bidang
133 akuakultur, terutama dalam konteks pengembangan enzim rekombinan untuk mendukung
134 penggunaan bahan baku nabati yang lebih berkelanjutan.

135 136 **BAHAN DAN METODE**

137 **2.2 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Formatted: Indent: First line: 0.39"

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Juni 2025, di Laboratorium Mikrobiologi,
Bioteknologi, dan Analisis Kimia, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Airlangga.

42 Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah *E. coli* BL21 (DE3) yang mengandung plasmid
pET-22b yang membawa gen selulase (celE) dari *Ruminococcus flavefaciens* (wild type, mutan,
dan varian dengan *tzg* SKIK). Bahan lainnya yang digunakan meliputi ampisilin, phosphate
buffered saline (PBS), media Luria Bertani (LB), media super broth (SB), glycerol pro analysis
dari Merck (Jerman), akuades, carboxymethyl cellulose (CMC) dari Sigma (USA), reagent 3,5-
dinitrosalisilat (DNS), alkohol 70%, dan reagent Bradford, dan laktosa monohidrat.

Alat yang digunakan berupa Erlenmeyer 250 ml., laminar flow, timbangan analitik merk
AS ONE (Jepang), ultrasonikator merk Hielscher (Jerman), sentrifugasi, inkubator pengocok
orbital merk Yihder Technology (Taiwan), water bath merk B-One (Indonesia),
spektrofotometer, autoclave, dan mikropipet.

Desain Penelitian

21
Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan
empat ulangan yang terdiri atas.

P1 = wild type (WT)

P2 = WT + SKIK

P3 = mutan

P4 = mutan + SKIK

Perlakuan WT diperoleh dengan mengkloning gen selulase *Ruminococcus flavefaciens*
yang telah dioptimalkan kodonnya ke vector pET22b, kemudian mengekspreskannya pada *E.*
coli tanpa modifikasi tambahan. Perlakuan WT + SKIK dibuat dengan menambahkan peptide

Formatted: Indent: First line: 0.39"

S
Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Indent: First line: 0.39"

SKIK pada N-terminal gen WT melalui PCR modifikasi sebelum diklonkan dan diekspresikan. Perlakuan Mutan dihasilkan melalui site-directed mutagenesis terhadap gen WT untuk menghasilkan substitusi asam amino tertentu. Perlakuan Mutan + SKIK disiapkan dengan menambahkan SKIK pada N-terminal konstruk mutan menggunakan metode PCR yang sama seperti WT + SKIK. Semua konstruk diverifikasi dengan sequencing, diekspresikan dalam *E. coli*, dimurnikan, dan digunakan setelah disetarakan berdasarkan aktivitas enzimnya.

Produksi dan Ekstraksi Enzim Selulase

Persiapan Pra-kultur

Satu koloni *E. coli* BL 21 (DE3) yang membawa plasmid rekombinan diinokulasikan ke 4 mL media Luria Bertani (10 g tryptone, 5 g yeast extract, dan 10 g NaCl dalam akuades hingga mencapai 1000 mL) dengan ampicilin (100 µg/mL) dan diinkubasi 16-18 jam pada suhu 37°C, dengan inkubator pengocok orbital (180 rpm). Ampicilin digunakan sebagai agen seleksi untuk memastikan hanya bakteri yang membawa plasmid ber resistensi ampicilin yang dapat tumbuh, sehingga kultur tetap stabil dan mempertahankan plasmid rekombinan. Prosedur *preculture* ini mengacu pada metode yang dilaporkan oleh Anwar *et al.* (2025) dengan beberapa penyesuaian kebutuhan penelitian ini.

Kultur Utama dan Induksi Ekspresi Enzim Selulase Rekombinan pada *E. coli*

Kultur awal (*preculture*) sebanyak 1 mL ditumbuhkan dalam 100 mL media *SB* autoinduksi yang mengandung gliserol 0,4% (v/v), glukosa 0,05% (v), laktosa monohidrat 0,2% (v), dan ampicilin 100 µg/mL. Kultur diinkubasi menggunakan inkubator pengocok orbital dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 37°C selama 3-4 jam. Setelah itu, suhu diturunkan menjadi 20°C dan inkubasi dilanjutkan selama 72 jam. Proses induksi ekspresi merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Anwar *et al.* (2025).

Formatted: Indent: First line: 0.39"

Formatted: Indent: First line: 0.39"

Pemanenan Enzim Selulase Rekombinan Pada *E. coli*

Pellet sel bakteri *E. coli* dipanen menggunakan sentrifus dengan kecepatan 9.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C, kemudian pellet sel dibilas tiga kali menggunakan PBS pH 7,4. Pellet sel *E. coli* disuspensi dalam 10 mL PBS (pH 7,4) lalu disonikasi menggunakan sonikator yang dengan suhu 4°C. Sonikasi dilakukan dengan meletakkan suspensi sel di atas es untuk mencegah panas berlebih selama 10 menit untuk 1 kali siklus. Sonikasi dihentikan ketika larutan tampak bening karena sel telah terpecah. Hasil sonikasi disentrifugasi ulang dengan kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan (fraksi larut) digunakan untuk analisis protein total dan aktivitas enzim. Prosedur pemanenan enzim selulase rekombinan ini mengacu pada metode yang dilaporkan oleh Arwar *et al.* (2025) dengan beberapa penyesuaian dengan kebutuhan penelitian ini.

Uji Aktivitas Enzim Selulase

Aktivitas enzim selulase rekombinan yang diekspresikan dalam *E. coli* diukur menggunakan metode CMC berdasarkan metode yang dilakukan oleh Marna *et al.* (2025). Reaksi terdiri dari 0,5 mL enzim selulase rekombinan dan 0,5 mL CMC 1% dalam buffer sitrat 0,1 M pH 5,0, diinkubasi menggunakan inkubator pengocok orbital pada suhu 50°C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan pemberian 3 mL reagen DNS pada larutan reaksi (enzim selulase rekombinan + CMC 1% dalam buffer sitrat), kemudian dipanaskan menggunakan water bath dengan suhu 100°C selama 5 menit. Setelah itu absorbansi diukur menggunakan UV-Vis spektrofotometer merk Thermo Scientific (USA) dengan panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 µmol glukosa per menit. Rumus perhitungan aktivitas enzim adalah sebagai berikut (Marna *et al.*, 2025):

$$\text{Aktivitas enzim (U/mL)} = \frac{(\text{Glukosa} \times \text{Volume total})}{\text{Volume enzim} \times \text{Waktu inkubasi} \times \text{Volume spektrofotometer}}$$

Keterangan :

- Glukosa ($\mu\text{g/mL}$) diperoleh dari hasil uji DNS dan kurva standar glukosa
- Volume total reaksi diperoleh dari total campuran substrat dan enzim (1 mL)
- Waktu inkubasi = 30 menit
- Volume enzim = 0,5 mL

Uji Konsentrasi Protein Total

Analisis konsentrasi protein total dilakukan dengan beberapa modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Sya'bani *et al.* (2017). Konsentrasi protein total ditentukan dengan metode Bradford, menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Prinsip kerja metode ini yaitu terikatnya pewarna *Coomassie brilliant blue G 25* dalam *reagen* Bradford terhadap gugus basa pada protein, sehingga menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur secara spektrofotometri. Larutan standar (0-24 $\mu\text{g/mL}$) direaksikan dengan *reagen* Bradford (1:1 v/v) dan diukur pada 595 nm untuk memperoleh persamaan regresi. Sampel ekstrak enzim diencerkan 50 kali dengan PBS, kemudian 1,5 mL sampel dicampur dengan 1,5 mL *reagen* Bradford (1:1 v/v), diinkubasi 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu, absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein dalam sampel dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan regresi kurva standar BSA yang telah dibuat. Hasil pengukuran, konsentrasi protein dinyatakan dalam satuan mg/mL .

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA dengan bantuan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Apabila hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), maka analisis dilanjutkan dengan uji lanjut *Duncan's multiple range test* (DMRT) pada tingkat signifikansi 5% ($\alpha = 0,05$) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok perlakuan (Steel & Torrie, 1993).

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: 10 pt, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Italic, First line: 0.36"

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

II. HASIL DAN BAHASAN

Aktivitas Total Enzim dan Protein Total Enzim Selulase Rekombinan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas total enzim selulase rekombinan bervariasi di setiap perlakuan (Tabel 1). *Wild type* (WT) memiliki aktivitas terendah sebesar 1,60 U/mL. Penambahan *lag* SKIK pada WT meningkatkan aktivitas menjadi 4,70 U/mL, sedangkan aktivitas tertinggi diperoleh pada perlakuan *mutan* + SKIK dengan nilai 10,66 U/mL. Peningkatan aktivitas pada perlakuan dengan mutasi dan penambahan SKIK mengindikasikan bahwa modifikasi tersebut berpengaruh positif terhadap kemampuan katalitik enzim selulase. Nilai standar deviasi yang relatif kecil pada setiap perlakuan mengindikasikan adanya konsistensi hasil pengukuran.

Tabel 1. Aktivitas enzim dan total protein enzim selulase rekombinan.

Table 1. Enzyme activity and total protein of recombinant cellulase enzyme.

Perlakuan	Aktivitas total enzim (U/mL)	Protein total enzim (mg/mL)
P1	1,60 ± 0,28 ^a	0,20 ± 0,03 ^a
P2	4,70 ± 0,70 ^b	0,46 ± 0,03 ^b
P3	9,56 ± 0,86 ^c	0,69 ± 0,09 ^c
P4	10,66 ± 0,74 ^d	0,85 ± 0,06 ^d

Keterangan: Nilai dengan huruf *superscript* yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$). P1 = *wild type* (WT), P2 = WT + SKIK, P3 = *mutan*, dan P4 = *mutan* + SKIK.

Note: Values with different superscript letters in the same column indicate significantly different results ($P < 0,05$). P1 = *wild type* (WT), P2 = WT + SKIK, P3 = *mutan*, and P4 = *mutan* + SKIK.

Mutan menunjukkan peningkatan aktivitas enzim yang signifikan dibandingkan WT, yaitu 9,56 U/mL⁻¹. Hal ini mengindikasikan bahwa modifikasi genetik melalui mutasi dapat meningkatkan efisiensi enzim selulase, melalui perubahan konformasi protein yang mempermudah interaksi dengan substrat. Hasil ini sejalan dengan temuan Sadhu *et al.* (2014), yang melaporkan bahwa *Bacillus* sp. hasil mutasi menghasilkan enzim selulase lebih tinggi dibandingkan *strain wild type*, karena perubahan sifat fisiologis dan biokimia yang meningkatkan sintesis dan sekresi enzim. Pola serupa ini memperkuat pemahaman bahwa

Formatted: Font: Italic, Shadow

47 Formatted: Justified, Indent: Left: 0", Hanging: 0.69"

19 Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Space After: 0 pt

Formatted: Superscript, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

267 mutasi dapat memperbaiki kinerja enzim selulase, baik dengan meningkatkan jumlah enzim
268 selulase yang dihasilkan maupun efisiensi katalitiknya. Selain itu, Kaur *et al.* (2014), juga
269 melaporkan bahwa mutasi enzim selulase mengalami perubahan genetik yang menurunkan nilai
270 *Michaelis constant* (K_m), meningkatkan *maximum velocity* (V_{max}) atau kecepatan maksimum
271 reaksi enzimatis, dan memicu *overexpression* protein, sehingga aktivitasnya jauh lebih tinggi
272 dibanding *strain* asal.

273 Kombinasi mutasi dan penambahan *tag* SKIK menghasilkan aktivitas enzim tertinggi,
274 yaitu 10,66 U/mL, menunjukkan adanya efek sinergis antara kedua modifikasi. Meskipun
275 peningkatan aktivitas pada perlakuan mutasi + SKIK tidak terlalu besar dibanding mutasi saja,
276 hasil ini tetap menunjukkan bahwa mutasi dan penambahan *tag* SKIK memberikan kontribusi
277 positif terhadap kemampuan katalitik enzim selulase. Penambahan *tag* SKIK pada ujung N-
278 terminal diketahui mampu meningkatkan ekspresi protein. Ojima-Kato *et al.* (2017),
279 melaporkan bahwa SKIK berfungsi sebagai *tag* yang membantu meningkatkan produksi
280 protein dan menjaga proteinnya tetap larut sehingga lebih mudah diperoleh dalam bentuk aktif.
281 Studi lanjutan oleh Ojima-Kato *et al.* (2023), menunjukkan bahwa *nascent peptide* SKIK yang
282 terbentuk pada tahap awal translasi dapat mengubah interaksi antara rantai polipeptida dan
283 *ribosomal exit tunnel*, sehingga proses elongasi berlangsung tanpa hambatan (*ribosome*
284 *stalling*). Dalam konteks enzim selulase rekombinan, mekanisme ini dapat bersinergi dengan
285 mutasi yang menstabilkan struktur enzim dan meningkatkan efisiensi pelipatan (*folding*
286 *efficiency*). Mutasi membantu terbentuknya konformasi aktif yang stabil, sedangkan SKIK
287 memperlancar proses translasi dan memastikan protein yang dihasilkan terlipat sempurna.
288 Kombinasi keduanya meningkatkan jumlah enzim selulase aktif yang terbentuk dan secara
289 langsung berkontribusi terhadap peningkatan aktivitas katalitik.

290 Hasil penelitian mengindikasikan adanya variasi protein total enzim selulase rekombinan
291 pada setiap perlakuan (Tabel 1). *Wild type* (WT) memiliki kandungan protein total terendah

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Indent: First line: 0.39"

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

292 sebesar 0,20 mg/mL, sedangkan perlakuan **mutan** + SKIK menunjukkan nilai tertinggi sebesar
293 0,85 mg/mL. Peningkatan protein total pada perlakuan dengan mutasi maupun penambahan
294 SKIK mengindikasikan bahwa kedua modifikasi tersebut berpengaruh positif terhadap ekspresi
295 protein enzim selulase rekombinan.

296 Perlakuan **mutan** + SKIK menunjukkan jumlah protein total tertinggi. Peningkatan ini
297 dapat dijelaskan sebagai kombinasi efek mutasi dan penambahan *tag* SKIK. Menurut Pan *et al.*
298 *al.* (2010), mutasi mampu meningkatkan produksi protein rekombinan melalui optimalisasi
299 aliran metabolit, bukan perubahan jumlah gen atau tingkat mRNA. Sumida *et al.* (2024)
300 menunjukkan bahwa modifikasi sekuens melalui desain protein dapat meningkatkan ekspresi,
301 kelarutan, stabilitas lipatan, serta fungsi enzim, sehingga menghasilkan protein yang lebih
302 stabil dan aktif. Mutasi yang efektif umumnya memperbaiki kerapatan pengepakan lokal,
303 menstabilkan konformasi situs aktif, mengatur fleksibilitas, serta meningkatkan interaksi non-
304 kovalen yang penting bagi pelipatan protein yang stabil (Kunka *et al.*, 2023).

305 Di sisi lain, penambahan *tag* SKIK terbukti meningkatkan jumlah protein total, baik pada
306 enzim selulase *wild type* maupun **mutan**. Hasil ini konsisten dengan temuan Ojime-Keto
307 (2025), yang melaporkan bahwa SKIK berperan sebagai *translation enhancing peptide tag*.
308 Peningkatan produksi protein terjadi karena SKIK memperbaiki efisiensi translasi dengan
309 mengurangi terjadinya *ribosomal stalling*. Dengan demikian, meskipun kadar mRNA tidak
310 meningkat, jumlah protein yang berhasil diproduksi tetap lebih tinggi. Dengan adanya kedua
311 modifikasi ini protein tidak hanya diproduksi dalam jumlah lebih tinggi akibat mutasi, tetapi
312 juga ditranslasi dengan lebih efisien berkat SKIK. Sinergi keduanya menjelaskan mengapa
313 perlakuan **mutan** + SKIK menghasilkan protein total tertinggi **dibanding** perlakuan lainnya.

314

315 **Implikasi untuk Akuakultur dan Pakan Ikan**

25
Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow
Formatted: Space After: 0 pt

46

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi mutasi dengan penambahan sekuens

SKIK (mutan SKIK) menghasilkan aktivitas total enzim dan protein total tertinggi dibanding

perlakuan lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa strategi rekayasa ganda tersebut tidak hanya

meningkatkan jumlah protein yang terekspresi, tetapi juga berdampak pada peningkatan

aktivitas enzim selulase yang dihasilkan. Kedua aspek ini penting untuk mendukung

ketersediaan enzim selulase yang aktif dan dalam jumlah yang memadai, sehingga aplikasinya

pada pakan ikan menjadi lebih efektif, sebagaimana dilaporkan oleh Liang *et al.* (2022) bahwa

aktivitas dan stabilitas enzim berperan besar dalam meningkatkan kecemasan dan pemanfaatan

nutrien oleh ikan. Dalam konteks akuakultur, tantangan utama formulasi pakan berbasis bahan

nabati adalah tingginya kandungan serat kasar yang menurunkan kecemasan nutrien

(Jannathulla *et al.*, 2019). Hal ini karena serat kasar yang tinggi terutama selulosa tidak dapat

dicerna oleh ikan sehingga dapat mempercepat laju transit pakan di saluran pencernaan dan

mengurangi penyerapan nutrien esensial (Sun *et al.*, 2019).

Suplementasi enzim eksogen, khususnya enzim selulase telah dilaporkan mampu

mengatasi kendala tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Jefry *et al.* (2021), menunjukkan

bahwa penambahan enzim selulase pada tepung daun *Indigofera zollingeriana* mampu

menurunkan serat kasar hingga 43,33% serta meningkatkan kecemasan protein, lemak, serta

energi pada benih ikan gurami. Demikian pula, Magalhães *et al.* (2018) melaporkan bahwa

suplementasi enzim pencernaan pada pakan berbasis bahan nabati memperbaiki koefisien

kecemasan nutrien pada *Leabass (Dicentrarchus labrax)*.

Temuan ini memperkuat bahwa enzim selulase rekombinan dengan aktivitas lebih tinggi

dan produksi protein total lebih besar, sebagaimana dihasilkan dalam penelitian ini, berpotensi

digunakan untuk meningkatkan nilai nutrisi bahan pakan berserat yang tersedia secara lokal.

Hasil serupa dilaporkan oleh Kumar *et al.* (2019) yang menunjukkan bahwa peningkatan

aktivitas enzim selulase dan produksi endoglukanase rekombinan secara signifikan

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Not Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Font: Italic, Shadow

meningkatkan efisiensi hidrolisis substrat berserat dan memperluas potensi aplikasinya dalam pengolahan bahan pakan. Dengan demikian, aplikasi enzim selulase rekombinan tidak hanya relevan untuk meningkatkan kecernaan bahan pakan ikan, tetapi juga memiliki implikasi penting terhadap efisiensi pemanfaatan bahan baku lokal dan pengembangan praktik akuakultur yang berkelanjutan. Penelitian lanjutan disarankan untuk menguji efektivitas enzim ini dalam formulasi pakan pada skala lapangan, serta mengevaluasi pengaruhnya terhadap performa ⁴¹ pertumbuhan dan efisiensi pakan pada berbagai spesies ikan budidaya.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi dan penambahan *lag* SKIK memberikan peningkatan nyata terhadap aktivitas dan produksi protein enzim selulase rekombinan. Mutasi berperan dalam meningkatkan efisiensi katalitik, sedangkan SKIK membantu meningkatkan ekspresi dan kelarutan protein. Kombinasi keduanya memberikan efek sinergis, menghasilkan performa enzim selulase yang lebih tinggi ⁴² dibanding perlakuan lain. Temuan ini menguakn potensi enzim selulase rekombinan sebagai kandidat enzim untuk mendukung pemanfaatan bahan pakan berserat dalam akuakultur. Studi lanjutan diperlukan untuk menilai stabilitas enzim selulase dalam sistem pencernaan ikan dan menguji penerapannya pada formulasi pakan berbahan baku lokal dengan variasi kadar serat.

⁴³ UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing atas arahan, bimbingan, dan dukungan yang telah diberikan selama proses penelitian hingga penyusunan naskah ini.

PEMBLAYAAN PENELITIAN

⁴⁴ Penelitian ini tidak menerima pendanaan khusus dari lembaga pendanaan.

Formatted: Font: Italic, Shadow

Formatted: Indent: First line: 0.39"

366

367 **KONTRIBUSI PENULIS**

368 **SFA**: konseptualisasi, metodologi, investigasi, pengelolaan data, analisis formal, dan
369 penulisan draf awal; **GM**: supervisi, validasi, peninjauan, dan penyuntingan naskah; **ATM**
370 supervisi, metodologi, peninjauan, dan penyuntingan naskah; **MA**: konseptualisasi,
371 metodologi, supervisi, validasi, peninjauan, dan penyuntingan naskah.

372

373 **PERNYATAAN KONFLIK KEPENTINGAN DAN PENGGUNAAN KECERDASAN**

374 **BUATAN**

375 Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

376

377

Formatted: Indent: First line: 0.39"

Formatted: Indent: First line: 0.39"

ORIGINALITY REPORT

20%

SIMILARITY INDEX

18%

INTERNET SOURCES

12%

PUBLICATIONS

11%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR_MOODLE Student Paper	2%
2	ejournal-balitbang.kkp.go.id Internet Source	2%
3	eprints.uad.ac.id Internet Source	2%
4	Submitted to Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE Student Paper	1%
5	Submitted to Hogeschool Rotterdam Student Paper	1%
6	123dok.com Internet Source	1%
7	repo.itera.ac.id Internet Source	1%
8	repository.its.ac.id Internet Source	1%
9	elib.pnc.ac.id Internet Source	< 1%
10	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	< 1%
11	Submitted to Universitas PGRI Semarang Student Paper	< 1%
12	Submitted to LSPR Communication & Business Institute Student Paper	< 1%

13	idoc.pub Internet Source	< 1 %
14	ppjp.ulm.ac.id Internet Source	< 1 %
15	repository.lppm.unila.ac.id Internet Source	< 1 %
16	text-id.123dok.com Internet Source	< 1 %
17	Submitted to Universitas Trisakti FTKE-FTSP-FTI-FALTL-FH-FSRD Student Paper	< 1 %
18	Submitted to Universidade do Porto Student Paper	< 1 %
19	Submitted to Liberty University Student Paper	< 1 %
20	Submitted to St. Mary's University Student Paper	< 1 %
21	anzdoc.com Internet Source	< 1 %
22	bali.litbang.pertanian.go.id Internet Source	< 1 %
23	media.neliti.com Internet Source	< 1 %
24	www.grafiati.com Internet Source	< 1 %
25	Submitted to California Southern University Student Paper	< 1 %
26	Submitted to Whitsunday Anglican School Student Paper	< 1 %
27	ejournal.upnjatim.ac.id Internet Source	< 1 %

28	1library.net Internet Source	< 1 %
29	Submitted to Universitas Mataram Student Paper	< 1 %
30	es.scribd.com Internet Source	< 1 %
31	researcher.yokohama-cu.ac.jp Internet Source	< 1 %
32	scholarbank.nus.edu.sg Internet Source	< 1 %
33	Fitrianingrum Kurniawati, Gede Suastika, Giyanto .. "EKSPRESI GEN PROTEIN SELUBUNG TOMATO INFECTIOUS CHLOROSIS VIRUS PADA ESCHERICHIA COLI", JURNAL HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN TROPIKA, 2016 Publication	< 1 %
34	Ganjar Adhywirawan Sutarjo, Riza Rahman Hakim, Nindya Suryadewi. "EFEKTIVITAS PENAMBAHAN SUPLEMEN PAKAN YANG BERBEDA TERHADAP PIGMENTASI WARNA MERAH IKAN KOI KOHAKU (Cyprinus carpio)", Jurnal Riset Akuakultur, 2024 Publication	< 1 %
35	info.animalproduction.net Internet Source	< 1 %
36	istina.ipmnet.ru Internet Source	< 1 %
37	jurnal.utu.ac.id Internet Source	< 1 %
38	ml.scribd.com Internet Source	< 1 %
39	www.medchemexpress.cn Internet Source	< 1 %

< 1 %

40

Dedi Arianto, Aziiz Sutrisno. "Kajian Antisipasi Pelayanan Kapal dan Barang di Pelabuhan Pada Masa Pandemi Covid-19", Jurnal Penelitian Transportasi Laut, 2021

Publication

< 1 %

41

Rahmat Firdaus, Hafrijal Syandri, Azrita Azrita. "PENGARUH TINGKAT DAN FREKUENSI PEMBERIAN PAKAN TERHADAP KINERJA PERTUMBUHAN DAN PEMANFAATAN PAKAN PADA PEMELIHARAAN BENIH IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)", Jurnal Riset Akuakultur, 2025

Publication

< 1 %

42

docplayer.info

Internet Source

< 1 %

43

repository.ipb.ac.id

Internet Source

< 1 %

44

journal.ipb.ac.id

Internet Source

< 1 %

45

jurnal.unej.ac.id

Internet Source

< 1 %

46

zombiedoc.com

Internet Source

< 1 %

47

www.scribd.com

Internet Source

< 1 %

Exclude quotes On

Exclude matches Off

Exclude bibliography On