

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

Siswi Fililmi Agniny¹, Gunanti Mahasri², Akhmad Taufiq Mukti^{2,3*}, dan
Muhamad Amin⁴

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

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

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

⁴Department of Environmental and Life Sciences, Faculty of Science, Brunei Darussalam University, Jalan Tungku Link, Bandar Seri Begawam, Gadong BE1410, Brunei Darussalam

(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) dapat 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-CellE 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 ($10,66 \text{ U mL}^{-1}$) maupun protein total ($0,85 \text{ mg mL}^{-1}$). 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

*Korespondensi: Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115, East Java, Indonesia
Email: akhmad-t-m@fpk.unair.ac.id

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 (Ser-Lys-Ile-Lys) tag influence enzymatic activity and total protein 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-CellE 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 post-hoc 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^{-1}) and total protein (0.85 mg mL^{-1}). 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 (Murtiyaningsih & Hazmi, 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 genetika mikroorganisme dapat diarahkan untuk menghasilkan enzim dengan aktivitas lebih tinggi, kestabilan yang lebih baik, dan sifat 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 umumnya ditempatkan pada bagian awal (N-terminal) protein untuk meningkatkan proses translasi dan produksi protein rekombinan (Yoshino *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 (Ahmad *et al.*, 2024). Namun, hingga kini masih sedikit penelitian yang secara bersamaan menerapkan mutagenesis dan penambahan tag SKIK untuk mengoptimalkan ekspresi dan aktivitas enzim selulase 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 dilakukan, baik melalui mutasi maupun penambahan sekuens SKIK dalam meningkatkan kinerja enzim selulase rekombinan.

Dalam konteks akuakultur, penelitian ini menawarkan pendekatan baru dalam pemanfaatan enzim selulase untuk pakan ikan melalui penggunaan enzim selulase rekombinan yang menunjukkan aktivitas lebih tinggi serta produksi protein yang lebih besar dibanding enzim selulase konvensional. Enzim selulase konvensional umumnya berasal dari mikroorganisme penghasil selulase secara

alami, seperti *Bacillus* spp. (Sivakumar *et al.*, 2016) dan *Penicillium* (Du *et al.*, 2018). Mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim selulase melalui proses fermentasi, karena enzim selulase disekresikan sebagai enzim ekstraseluler saat memanfaatkan selulosa sebagai sumber karbon dan energi (Nababan *et al.*, 2019). Namun, produksi enzim selulase dari strain alami memiliki sejumlah keterbatasan, termasuk kapasitas produksi yang rendah, ketiadaan strain hiper-produktif, serta kestabilan enzim yang kurang optimal pada kondisi proses yang lebih ekstrem, sehingga membatasi efektivitas enzim selulase dalam mendegradasi serat kasar pada bahan pakan (Mondal *et al.*, 2022).

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

BAHAN DAN METODE

Lokasi dan Waktu Penelitian

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

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 tag SKIK). Bahan lainnya yang digunakan meliputi ampisilin, phosphate buffered saline (PBS), media Luria Bertani (LB), media super broth (SB), gliserol pro analysis (Merck, Jerman), akuades, carboxymethyl cellulose (CMC) (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 (AS ONE, Jepang), ultrasonikator (Hielscher, Jerman), sentrifus, inkubator pengocok orbital (Yihder Technology, Taiwan), water bath (B-One, Indonesia), spektrofotometer (Thermo Scientific, USA), autoclave, dan mikropipet.

Desain Penelitian

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 vektor pET22b, kemudian mengekspresikannya pada *E. coli* tanpa modifikasi tambahan. Perlakuan WT + SKIK dibuat dengan menambahkan peptida 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* BL21 (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 ampisilin ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) dan diinkubasi 16-18 jam pada suhu 37°C , dengan inkubator pengocok orbital (180 rpm). Ampisilin digunakan sebagai agen seleksi untuk memastikan hanya bakteri yang membawa plasmid ber-resistensi ampisilin 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% (b/v), laktosa monohidrat 0,2% (b/v), dan ampisilin $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. 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).

Pemanenan Enzim Selulase Rekombinan pada *E. coli*

Pelet sel bakteri *E. coli* dipanen menggunakan sentrifus dengan kecepatan 9.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C , kemudian pelet sel dibilas tiga kali menggunakan PBS pH 7,4. Pelet sel *E. coli* disuspensi dalam 10 mL PBS (pH 7,4) lalu disonikasi menggunakan sonikator yang pada suhu 4°C . Sonikasi dilakukan dengan meletakkan suspensi sel di atas es untuk

mencegah panas berlebih selama 10 menit untuk satu 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 Anwar *et al.* (2025) dengan beberapa penyesuaian untuk 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 Marma *et al.* (2025). Reaksi terdiri atas 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 *reagent* 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 (Thermo Scientific, USA) dengan panjang gelombang 540 nm. Aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1 μmol glukosa per menit. Perhitungan aktivitas enzim dilakukan menggunakan rumus (1) sebagai berikut (Marma *et al.*, 2025):

$$\text{Aktivitas enzim (U mL}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Glukosa} \times \text{Volume total})}{\text{Volume enzim} \times \text{Waktu inkubasi} \times \text{Volume spektrofotometer}} \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan:

- Glukosa ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 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 *reagent* Bradford terhadap gugus basa pada protein, sehingga menghasilkan perubahan warna yang dapat diukur secara spektrofotometri. Larutan standar ($0\text{--}24 \mu\text{g mL}^{-1}$) direaksikan dengan *reagent* 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 *reagent* 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^{-1} .

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 antarkelompok perlakuan (Steel & Torrie, 1993).

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⁻¹. Penambahan *tag* SKIK pada WT meningkatkan aktivitas menjadi 4,70 U mL⁻¹, sedangkan aktivitas tertinggi diperoleh pada perlakuan mutan + SKIK dengan nilai 10,66 U mL⁻¹. 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.

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 mutasi dapat memperbaiki kinerja enzim selulase, baik dengan meningkatkan jumlah enzim selulase yang dihasilkan maupun efisiensi katalitiknya. Selain itu, Kaur *et al.* (2014), juga melaporkan bahwa mutan enzim selulase mengalami perubahan genetik yang menurunkan nilai *Michaelis constant* (Km),

meningkatkan *maximum velocity* (V_{max}) atau kecepatan maksimum reaksi enzimatik, dan memicu *overexpression* protein, sehingga aktivitasnya jauh lebih tinggi dibanding *strain* asal.

Kombinasi mutasi dan penambahan *tag* SKIK menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, yaitu 10,66 U mL⁻¹, menunjukkan adanya efek sinergis antara kedua modifikasi. Meskipun peningkatan aktivitas pada perlakuan mutan + SKIK tidak terlalu besar dibanding mutan saja, hasil ini tetap menunjukkan bahwa mutasi dan penambahan *tag* SKIK memberikan kontribusi positif terhadap kemampuan katalitik enzim selulase. Penambahan *tag* SKIK pada ujung N-terminal diketahui mampu meningkatkan ekspresi protein. Ojima-Kato *et al.* (2017), melaporkan bahwa SKIK berfungsi sebagai *tag* yang membantu meningkatkan produksi protein dan menjaga proteinnya tetap larut sehingga lebih mudah diperoleh dalam bentuk aktif. Studi lanjutan oleh Ojima-Kato *et al.* (2023), menunjukkan bahwa *nascent peptide* SKIK yang terbentuk pada tahap awal translasi dapat mengubah interaksi antara rantai polipeptida dan *ribosomal exit tunnel*, sehingga proses elongasi berlangsung tanpa hambatan (*ribosome stalling*). Dalam konteks enzim selulase rekombinan, mekanisme ini dapat bersinergi dengan mutasi yang menstabilkan struktur enzim dan meningkatkan efisiensi pelipatan (*folding efficiency*). Mutasi membantu terbentuknya konformasi aktif yang stabil, sedangkan SKIK memperlancar proses translasi

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 ⁻¹)	Protein total enzim (mg mL ⁻¹)
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 = mutant, and P4 = mutant + SKIK.

dan memastikan protein yang dihasilkan terlipat sempurna. Kombinasi keduanya meningkatkan jumlah enzim selulase aktif yang terbentuk dan secara langsung berkontribusi terhadap peningkatan aktivitas katalitik.

Hasil penelitian mengindikasikan adanya variasi protein total enzim selulase rekombinan pada setiap perlakuan (Tabel 1). *Wild type* (WT) memiliki kandungan protein total terendah sebesar $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$, sedangkan perlakuan mutan + SKIK menunjukkan nilai tertinggi sebesar $0,85 \text{ mg mL}^{-1}$. Peningkatan protein total pada perlakuan dengan mutasi maupun penambahan SKIK mengindikasikan bahwa kedua modifikasi tersebut berpengaruh positif terhadap ekspresi protein enzim selulase rekombinan.

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

Di sisi lain, penambahan *tag* SKIK terbukti meningkatkan jumlah protein total, baik pada enzim selulase *wild type* maupun mutan. Hasil ini konsisten dengan temuan Ojima-Kato (2025), yang melaporkan bahwa SKIK berperan sebagai *translation enhancing peptide tag*. Peningkatan produksi protein terjadi karena SKIK memperbaiki efisiensi translasi dengan mengurangi terjadinya *ribosomal stalling*. Dengan demikian, meskipun kadar mRNA tidak meningkat, jumlah protein yang

berhasil diproduksi tetap lebih tinggi. Dengan adanya kedua modifikasi ini protein tidak hanya diproduksi dalam jumlah lebih tinggi akibat mutasi, tetapi juga ditranslasi dengan lebih efisien berkat SKIK. Sinergi keduanya menjelaskan mengapa perlakuan mutan + SKIK menghasilkan protein total tertinggi dibanding perlakuan lainnya.

Implikasi untuk Akuakultur dan Pakan Ikan

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 pencernaan dan pemanfaatan nutrisi oleh ikan. Dalam konteks akuakultur, tantangan utama formulasi pakan berbasis bahan nabati adalah tingginya kandungan serat kasar yang menurunkan pencernaan nutrisi (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 nutrisi esensial (Sun *et al.*, 2019).

Suplementasi enzim eksogen, khususnya enzim selulase telah dilaporkan mampu mengatasi kendala tersebut. Penelitian yang dilakukan oleh Jeffry *et al.* (2021), menunjukkan bahwa penambahan enzim selulase pada tepung daun *Indigofera zollingeriana* mampu menurunkan serat kasar hingga 43,33% serta meningkatkan

kecernaan 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 pencernaan nutrisi pada *seabass* (*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 meningkatkan efisiensi hidrolisis substrat berserat dan memperluas potensi aplikasinya dalam pengolahan bahan pakan. Dengan demikian, aplikasi enzim selulase rekombinan tidak hanya relevan untuk meningkatkan pencernaan 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 pertumbuhan dan efisiensi pakan pada berbagai spesies ikan budidaya.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa mutasi dan penambahan *tag* 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 dibanding perlakuan lain. Temuan ini menguatkan 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.

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.

KONTRIBUSI PENULIS

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

PERNYATAAN KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

DAFTAR ACUAN

- Adebami, G. E., & Adebayo-Tayo, B. C. (2020). Development of cellulolytic strain by genetic engineering approach for enhanced cellulase production. In *Genetic and metabolic engineering for improved biofuel production from lignocellulosic biomass* (pp. 103–136). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817953-6.00008-7>
- Ahmad, W., Zafar, M., & Anwar, Z. (2024). Heterologous expression and characterization of mutant cellulase from indigenous strains of *Aspergillus niger*. *PLOS ONE*, 19(5), 1–24. <https://doi.org/10.1101/2024.01.31.578261>

- Anwar, K., Sukarne, L. U., & Suryadi, M. A. F. F. (2025). Cloning and expression of *Ruminococcus flavefaciens* cellulase-encoding gene in *E. coli* as feed additive for poultry. In *Proceedings of the 5th International Conference on Environmentally Sustainable Animal Industry (ICESAI 2024)* (Vol. 45, p. 323). Springer Nature. https://doi.org/10.2991/978-94-6463-670-3_33
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Du, J., Zhang, X., Li, X., Zhao, J., Liu, G., Gao, B., & Qu, Y. (2018). The cellulose-binding region in *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I has a higher capacity in improving crystalline cellulose degradation than that of *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 266, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.050>
- Garg, R., Srivastava, R., Brahma, V., Verma, L., Karthikeyan, S., & Sahni, G. (2016). Biochemical and structural characterization of a novel halotolerant cellulase from soil metagenome. *Scientific Reports*, 6, 39634. <https://doi.org/10.1038/srep39634>
- Jannathulla, R., Rajaram, V., Kalanjiam, R., Ambasankar, K., Muralidhar, M., & Dayal, J. S. (2019). Fishmeal availability in the scenarios of climate change: Inevitability of fishmeal replacement in aquafeeds and approaches for the utilization of plant protein sources. *Aquaculture Research*, 50(12), 3493–3506. <https://doi.org/10.1111/are.14324>
- Jefry, J., Setiawati, M., Jusadi, D., & Fauzi, I. A. (2021). Cellulase hydrolyzed *Indigofera zollingeriana* leaf utilization as a feed ingredient for gourami fingerling. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 20(2), 139–147. <https://doi.org/10.19027/jai.20.2.139-147>
- Kaur, B., Oberoi, H. S., & Chadha, B. S. (2014). Enhanced cellulase producing mutants developed from heterokaryotic *Aspergillus* strain. *Bioresource Technology*, 156, 100–107.
- Kumar, N., Sudan, S. K., Garg, R., & Sahni, G. (2019). Enhanced production of novel halostable recombinant endoglucanase derived from the metagenomic library using fed-batch fermentation. *Process Biochemistry*, 78, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.033>
- Kunka, A., Marques, S. M., Havlasek, M., Vasina, M., Velatova, N., Cengelova, L., Kovar, D., Damborsky, J., Marek, M., Bednar, D., & Prokop, Z. (2023). Advancing enzyme stability and catalytic efficiency through synergy of force-field calculations, evolutionary analysis, and machine learning. *ACS Catalysis*, 13(19), 12506–12518. <https://doi.org/10.1021/acscatal.3c02575>
- Liang, Q., Yuan, M., Xu, L., Lio, E., Zhang, F., Mou, H., & Secundo, F. (2022). Application of enzymes as a feed additive in aquaculture. *Marine Life Science & Technology*, 4, 208–221. <https://doi.org/10.1007/s42995-022-00128-z>
- Magalhães, R., Díaz-Rosales, P., Diógenes, A. F., Enes, P., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2018). Improved digestibility of plant ingredient-based diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*) with exogenous enzyme supplementation. *Aquaculture Nutrition*, 24(4), 1287–1295. <https://doi.org/10.1111/anu.12666>
- Marma, M., Chakroborty, K., Lee, J. M., Rahman, Z., & Rafiquzzaman, M. (2025). Characterization and enzymatic assay of cellulase-producing probiotic bacteria isolated from traditional fermented bamboo of Bangladesh. *Hayati: Journal of Biosciences*, 32(2), 547–560. <https://doi.org/10.4308/hjb.32.2.547-560>

- Mondal, S., Halder, S. K., & Mondal, K. C. (2022). Tailoring in fungi for next-generation cellulase production with special reference to CRISPR/Cas system. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), 113–129. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00045-9>
- Murtiyaningsih, H., & Hazmi, M. (2017). Isolasi dan uji aktivitas enzim selulase pada bakteri selulolitik asal tanah sampah. *Agritop*, 15(2), 293–308.
- Nababan, M., Gunam, I. B. W., & Wijaya, I. M. M. (2019). Produksi enzim selulase kasar dari bakteri selulolitik. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 7(2), 2503–488X. <https://doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i02.p03>
- Ojima-Kato, T., Nagai, S., & Nakano, H. (2017). N-terminal SKIK peptide tag markedly improves expression of difficult-to-express proteins in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123(5), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.12.004>
- Ojima-Kato, T., Nishikawa, Y., Furukawa, Y., Kojima, T., & Nakano, H. (2023). Nascent MSKIK peptide cancels ribosomal stalling by arrest peptides in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 299(5), 104676. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104676>
- Ojima-Kato, T. (2025). Advances in recombinant protein production in microorganisms and functional peptide tags. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 89(1), 1–10. <https://doi.org/10.1093/bbb/zbae147>
- Pan, Z., Cunningham, D. S., Zhu, T., Ye, K., Koepsel, R. R., Domach, M. M., & Ataai, M. M. (2010). Enhanced recombinant protein production in pyruvate kinase mutant of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1769–1778.
- Ramadhan, B., & Wikandari, P. R. (2021). Review artikel: Aktivitas enzim amilase dari bakteri asam laktat (karakteristik dan aplikasi). *UNESA Journal of Chemistry*, 10(2), 109–120. <https://doi.org/10.26740/ujc.v10n2.p109-120>
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. *Bioengineering*, 3(4), 30. <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>
- Sadhu, S., Ghosh, P. K., Aditya, G., & Maiti, T. K. (2014). Optimization and strain improvement by mutation for enhanced cellulase production by *Bacillus* sp. (MTCC10046) isolated from cow dung. *Journal of King Saud University–Science*, 26, 323–332.
- Singh, A., Patel, A. K., Adsul, M., Mathur, A., & Singhanian, R. R. (2017). Genetic modification: A tool for enhancing cellulase secretion. *Biofuel Research Journal*, 14, 600–610. <https://doi.org/10.18331/brj2017.4.2.5>
- Sivakumar, N., Zadjali, A. A., Bahry, S. A., Elshafie, A., & Eltayeb, E. A. (2016). Isolation and characterization of cellulolytic *Bacillus licheniformis* from compost. *African Journal of Biotechnology*, 15(43), 2434–2446. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15641>
- Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1993). *Prinsip dan prosedur statistika: Suatu pendekatan biometrik* (B. Sumantri, Trans.). Gramedia Utama.
- Sumida, K. H., Núñez-Franco, R., Kalvet, I., Pellock, S. J., Wicky, B. I., Milles, L. F., Dauparas, J., Wang, J., Kipnis, Y., Jameson, N., Kang, A., De La Cruz, J., Sankaran, B., Bera, A. K., Jimenez-Oses, G., & Baker, D. (2024). Improving protein expression, stability, and function with ProteinMPNN. *Journal of the American Chemical Society*, 146(3), 2054–2061. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c10941>
- Sun, Y., Zhao, X., Liu, H., & Yang, Z. (2019). Effect of fiber content in practical diet on feed utilization and antioxidant capacity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Journal of Aquaculture Research & Development*, 10(12), 577.
- Sya'bani, N., Astuti, W., & Pratiwi, D. R. (2017). Isolasi dan karakterisasi lipase dari kecambah biji alpukat (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Atomi*, 2(2), 209–212.

- Tran, D. M., Nguyen, T. H., Huynh, T. U., & Pentekhina, I. (2025). Recombinant expression and characterization of the family 5 cellulase from *Bacillus velezensis* in *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 41, 101898. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101898>
- Yoshino, A., Shimoji, R., Nishikawa, Y., Nakano, H., & Kato, T. O. (2025). Analysis and application of translation-enhancing peptides for improved production of proteins containing polyproline. *SynBio*, 3(4), 14. <https://doi.org/10.3390/synbio3040014>