



## OPTIMASI PROSES UNTUK EKSPRESI GEN ENDOGLUKANASE DARI *Bacillus* sp. RP1 OLEH *Escherichia coli* BL21 (DE3)/*egc*

### Process Optimization for Endoglucanase Gene Expression Derived from *Bacillus* sp. RP1 by *Escherichia coli* BL21 (DE3)/*egc*

Hans Victor, Maelita Ramdani Moeis\*

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB. Jl. Ganesha No.10, Bandung 40123, Indonesia

\*Email: [maelita@sith.itb.ac.id](mailto:maelita@sith.itb.ac.id)

#### ABSTRACT

Cellulases are one of the most used enzymes in industrial processes. In an effort to increase production, industries have developed strategies such as isolating new cellulase producing strains, genetic engineering and process optimization since the last 50 years. One endoglucanase producing strain, *Bacillus* sp. RP1 was isolated from hot springs. The ribosome binding site and coding sequence of the endoglucanase gene (*egc*) from *Bacillus* sp. RP1 was cloned into pGEM-T Easy. The recombinant plasmid was used to transform *E. coli* BL21 (DE3). Cloning was followed by process optimization. Medium composition was selected using Plackett-Burman design. The medium components tested were rice hull, molasses, ammonium chloride, urea and fishmeal. Rice hull and molasses were found to be the factors most influencing enzyme activity and dry cell weight, respectively. The next step involved Box-Behnken method and response surface methodology to optimize the responses against molasses concentration, rice hull concentration and fermentation time. The concentration intervals used to test were 1%, 5.5% and 10% while the fermentation time used were 24, 36 and 48 hours. The conditions which optimized both enzyme activity and dry cell weight were 7.45% molasses, 6.45% rice hull and 39.52 hours of fermentation.

**Keywords:** *Bacillus* sp. RP1, *E. coli* BL21 (DE3), *egc*, Endoglucanase, optimization

#### ABSTRAK

Selulase adalah salah satu enzim yang banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri. Sebagai upaya untuk memenuhi kebutuhan, 50 tahun terakhir dikembangkan beberapa strategi untuk meningkatkan produksi selulase yang mencakup rekayasa genetika dan optimasi proses. Karena itu, dilakukan kloning gen *egc* dan RBS yang berasal dari *Bacillus* sp. RP1 yang diisolasi dari sumber air panas ke dalam vektor pGEM-T Easy. *E. coli* BL21 (DE3) ditransformasikan dengan vektor yang mengandung gen *egc* tersebut. Setelah kloning, optimasi proses berupa desain medium turut dilakukan untuk mengoptimalkan ekspresi gen *egc*. Desain medium diawali dengan seleksi komposisi medium menggunakan metode Plackett-Burman. Komponen medium yang diuji adalah kulit beras, molase, amonium klorida, urea dan tepung ikan. Kulit beras dan molase diperoleh sebagai bahan yang paling berpengaruh terhadap aktivitas enzim dan berat kering sel. Tahap selanjutnya melibatkan metode statistik Box-Behnken dan metodologi respons permukaan yang bertujuan mengoptimalkan respons aktivitas enzim dan berat kering sel terhadap konsentrasi molase, konsentrasi kulit beras dan lama fermentasi. Konsentrasi yang diuji adalah 1%, 5,5% dan 10%, sedangkan lama fermentasi yang diuji adalah 24, 36 dan 48 jam. Konsentrasi optimal molase adalah 7,45% dan konsentrasi optimal kulit beras adalah 6,45% dengan lama fermentasi optimal 39,52 jam.

**Kata Kunci:** *Bacillus* sp. RP1, *E. coli* BL21 (DE3), *egc*, Endoglucanase, optimasi

## PENDAHULUAN

Selulase adalah keluarga enzim yang dapat mendegradasi selulosa. Berdasarkan aktivitas katalitiknya, selulosa terbagi menjadi beberapa keluarga, yaitu endo-1,4- $\beta$ -D-glukan glukanohidrolase (EC 3.2.1.4), (1,4)- $\beta$ -D-glukan selobiohidrolase (EC 3.2.1.91), 1,4- $\beta$ -D-oligoglukan selobiohidrolase (EC 3.2.1.74),  $\beta$ -glukosidase (EC 3.2.1.21) dan selobiosa fosforilase (EC 2.4.1.20) (Sadhu dan Maiti 2013).

Aktivitas tersebut dimanfaatkan dalam berbagai industri. Beberapa industri yang memanfaatkan selulase adalah industri agrikultur, industri biokonversi, industri deterjen, industri kertas, industri pangan, industri fermentasi, industri tekstil, dan lain-lain (Kuhad et al. 2011). Tiap industri menghendaki karakteristik selulase yang berbeda, tergantung pada proses yang berlangsung dalam industri tersebut (Kuhad et al. 2011).

Pada umumnya selulase yang berasal dari fungi tidak bersifat termostabil sehingga sulit diaplikasikan dalam industri (Acharya dan Chaudhary 2012). Maka isolasi selulase dilakukan pada mikroba dari lingkungan yang beragam, untuk memperoleh selulase dengan karakteristik yang berpotensi untuk digunakan dalam industri (Maki et al. 2009). Muñoz et al. (2014) mengisolasi sembilan strain bakteri penghasil selulase dari beberapa spesies kerang. *Bacillus vallismortis* RG-07 diisolasi dari tanah dan diketahui menghasilkan selulase termostabil dan alkalifilik (Gaur dan Tiwari 2015). Sementara itu, Puspitasari dan Moeis (2008) menganalisis selulase dari spesies *Bacillus* sp. RP1 yang diisolasi dari sumber air panas. *Bacillus* sp. RP1 adalah sumber gen *egc* yang digunakan dalam optimasi proses dalam penelitian ini.

Selain isolasi mikroba penghasil selulase, terdapat beberapa strategi lain untuk meningkatkan produksi selulase. Salah satunya adalah meningkatkan produksi melalui optimasi medium atau optimasi proses fermentasi (Parekh et al. 2000). Dalam optimasi medium produksi, kondisi fermentasi (pH, suhu, agitasi, dll.) dan komponen medium (karbon, nitrogen, dll.) diidentifikasi dan dioptimasi (Kuhad et al. 2016; Singh et al. 2017).

## BAHAN DAN METODE

### Bakteri dan primer

Bakteri yang digunakan sebagai sumber gen *egc* adalah *Bacillus* sp. RP1 yang diisolasi dari sumber air panas (Puspitasari dan Moeis 2008) diperoleh dari koleksi Laboratorium Genetika SITH, Institut Teknologi Bandung. Strain *E. coli* BL21 (DE3) digunakan sebagai sel inang untuk mengekspresikan gen *egc* menggunakan promoter dari plasmid dan rbs alami dari *egc*.

Sekuens primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *egc* dan RBSnya adalah primer maju *egcF* 5'-AGGAGGAAA AGATCAGATATGAAA-3' (Lee et al. 2012) dengan modifikasi berupa pengurangan 9 pasang basa pada ujung 3' dan primer mundur *egcR* 5'-TCAGTATTTTCATCCAC AACGCA-3' (Moeis et al. 2014).

### Kloning dan transformasi

*Bacillus* sp. RP1 ditumbuhkan pada media LB agar dan diinkubasi pada 37°C selama 18 jam. Satu koloni *Bacillus* sp. RP1 yang tumbuh digunakan sebagai sumber DNA dalam proses PCR koloni. Proses PCR koloni dilakukan dengan parameter: 94°C, 5 menit; 22 siklus 94°C selama 30 detik, 58,4°C selama 30 detik, dan 72°C selama 2 menit; 72°C selama 7 menit. Produk PCR berukuran 1.568 pasang basa (pb) selanjutnya dipurifikasi menggunakan Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit DF100/DF300 (GeneAid). Gen yang diperoleh diligasikan ke dalam vektor pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega) dan ditransformasikan dengan metode kejut panas ke dalam *E. coli* BL21 (DE3).

Bakteri rekombinan diseleksi dengan pengujian kualitatif aktivitas endoglukanase yang dilakukan dengan metode pewarnaan agar CMC dengan Gram's iodine (Gohel et al. 2014). Medium LB/ampisilin/CMC agar dituang ke dalam cawan Petri yang telah dibagi menjadi beberapa daerah. Setiap daerah digoreskan kultur dari satu koloni *E. coli* BL21 (DE3)/*egc* hasil transformasi yang dipilih secara acak dengan jarum ose. Selanjutnya medium diinkubasi pada 37°C selama 48 jam. Selain diinokulasikan pada medium LB/ampisilin/CMC agar, masing-masing koloni yang dicuplik juga diinokulasikan ke dalam tabung sentrifuga

15 mL berisi 5 mL medium LB cair dengan ampisilin 100 µg/mL. Kultur cair selanjutnya diinkubasi pada 37°C selama 18 jam.

Setelah inkubasi, Gram's iodine dituangkan pada medium LB/ampisilin/CMC agar hingga terendam seluruhnya. Cawan Petri kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah perendaman, dilakukan pembilasan dengan akuades, dan koloni bakteri yang tumbuh turut dibuang dengan pembilasan.

Kultur cair dari *E. coli* BL21 (DE3) transforman yang menunjukkan zona bening disimpan dan digunakan untuk tahap selanjutnya, yaitu konfirmasi dengan isolasi plasmid dan restriksi dengan enzim *EcoRI*. Isolasi plasmid dilakukan dengan ATP™ Plasmid Mini Kit (ATP Biotech Inc.). Selanjutnya reaksi restriksi yang terdiri dari 2,0 µL 10x FastDigest Buffer, 2,0 µL DNA plasmid, 1,0 µL *EcoRI* FastDigest, dan 15,0 µL air bebas nuklease disiapkan. Seluruh komponen dicampurkan dalam tabung mikro 0,2 mL dan diinkubasi selama 15 menit pada 37°C dan kemudian diinaktivasi pada 80°C selama 5 menit. Hasil reaksi restriksi dielektroforesis pada gel agarosa 1% selama 25 menit pada tegangan 100 V. Satu koloni yang menghasilkan hasil positif pada uji aktivitas dan pada konfirmasi menggunakan enzim restriksi digunakan untuk tahap selanjutnya dan disebut *E. coli* BL21 (DE3)/*egc*.

### Seleksi komposisi medium

Seleksi komposisi medium dilakukan dengan desain eksperimen Plackett-Burman dengan respons berupa aktivitas enzim. Sebanyak 20 kombinasi medium yang mengandung satu atau lebih dari kulit beras, molase, tepung ikan, amonium klorida, dan urea, dirancang dengan bantuan perangkat lunak Minitab 17. Medium dibuat sesuai dengan rancangan dari perangkat lunak untuk volume sebesar 10 mL di dalam tabung sentrifuga 50 mL. Selanjutnya medium disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Medium yang telah disterilisasi disuplementasikan dengan ampisilin sebanyak 100 µg/mL dan diinokulasikan dengan 50 µL *E. coli* BL21 (DE3)/*egc* dengan OD<sub>600</sub> prekulturr sebesar 0,5. Selanjutnya medium yang telah diinokulasikan diinkubasi pada 37°C dengan agitasi 250 rpm selama 24 jam.

Setelah inkubasi, sel dipanen dari 5 mL medium dengan sentrifugasi pada 500g selama 5 menit untuk memisahkan komponen padat dari medium. Supernatan kemudian dipisahkan ke dalam tabung sentrifuga kosong dan disentrifugasi pada 14.000g selama 2 menit untuk mengendapkan sel. Pelet sel yang diperoleh dibilas sebanyak tiga kali dengan 500 µL buffer lisis. Selanjutnya sel diresuspensi dalam 500 µL buffer lisis (50 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA) dan dipecahkan dengan bantuan sonikasi. Sonikasi dilakukan menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* FS-150N, 100% output dengan interval 15 detik *on*, 10 detik *off* selama 10 menit.

Sel yang telah dilisis melalui proses sonikasi disentrifugasi untuk memisahkan debris sel pada 14.000g selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk uji aktivitas enzim dengan metode alkali ferisianida. Reaksi untuk pengujian aktivitas enzim dibuat dalam tabung 1,5 mL seperti pada Tabel 1.

Jumlah ekuivalen gula pereduksi yang dilepaskan oleh reaksi antara CMC dengan endoglukanase diperoleh dengan membandingkan absorbansi pada 420 nm dengan kurva standar glukosa. Selanjutnya jumlah ekuivalen gula pereduksi yang diperoleh pada larutan reaksi dikurangi dengan jumlah ekuivalen gula pereduksi yang diperoleh pada blanko substrat dan blanko enzim yang bersesuaian untuk menghilangkan efek gula pereduksi yang mungkin terdapat pada larutan enzim atau larutan substrat. Aktivitas enzim dalam satuan unit didefinisikan sebagai jumlah enzim yang melepaskan satu µmol gula

**Tabel 1.** Komposisi reaksi uji aktivitas enzim dengan metode alkali ferisianida

Jenis reaksi	Buffer (mL)	Substrat (mL)	Enzim (mL)
Blanko total	0,20	0,00	0,00
Blanko enzim*	0,15	0,00	0,05
Blanko substrat	0,05	0,15	0,00
Larutan reaksi*	0,00	0,15	0,05

\*Keterangan: dibuat sebanyak 20 kali, satu kali untuk tiap kombinasi medium. *Buffer* adalah natrium asetat 50 mM pH 5,0. *Substrat* adalah 1 b/v% CMC dalam buffer natrium asetat 50 mM pH 5,0. *Enzim* adalah supernatan yang diperoleh pada tahap lisis sel dan sentrifugasi sebelumnya.

pereduksi (ekuivalen glukosa) per jam pada kondisi assay.

Seleksi komposisi medium juga dilakukan dengan respons berupa berat kering sel. Dengan bantuan perangkat lunak Minitab 17, 20 kombinasi medium dibuat dengan bahan berupa kombinasi dari kulit beras, molase, tepung ikan, amonium klorida dan urea. Medium dibuat dengan cara yang sama dengan tahap sebelumnya. Medium yang telah diinkubasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 500g selama 5 menit dan supernatan yang diperoleh dipisahkan ke dalam tabung sentrifuga kosong. Supernatan tersebut kembali disentrifugasi dengan kecepatan 14.000g selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, sedangkan pelet dalam tabung 1,5 mL dikeringkan. Pelet yang telah kering kemudian ditimbang.

#### Optimasi konsentrasi medium

Dua bahan dengan pengaruh paling tinggi terhadap aktivitas enzim dan berat kering dipilih menjadi dua faktor pada tahap optimasi konsentrasi medium. Faktor ketiga yang dipilih adalah lama inkubasi. Faktor-faktor tersebut dikombinasikan dalam desain eksperimen Box-Behnken dengan bantuan Minitab 17. Medium dibuat sesuai dengan hasil pengacakan dari Minitab 17 untuk volume medium sebesar 15 mL. Medium yang telah dibuat disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Lama inkubasi tiap medium disesuaikan dengan hasil pengacakan dari Minitab 17. Setelah inkubasi, tiap medium diambil sebanyak 5 mL dan disentrifugasi pada 500g selama 5 menit untuk memisahkan padatan dalam medium. Supernatan yang diperoleh disentrifugasi pada 14.000g selama 2 menit untuk memperoleh sel. Sel yang diperoleh dibilas dan diresuspensi dalam 500 µL buffer lisis. Suspensi sel dipecahkan dengan metode sonikasi pada kondisi 100% output dengan interval 15 detik *on*, 10 detik *off* selama 10 menit.

Sel yang telah dipecahkan disentrifugasi pada 14.000g selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari pelet untuk memperoleh ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim digunakan dalam pengujian aktivitas enzim dengan metode alkali ferisianida.

Medium dengan komposisi yang sama

kembali dibuat, diinokulasikan dan diinkubasikan dengan kondisi yang sama. Setelah inkubasi, tiap medium diambil sebanyak 5 mL dan disentrifugasi pada 500g selama 5 menit dan supernatan dipisahkan. Supernatan yang diperoleh disentrifugasi pada 14.000g selama 2 menit untuk memperoleh sel. Sel yang diperoleh dibilas dan diresuspensi dalam 500 µL buffer lisis. Kemudian sel dikeringkan dalam oven dan ditimbang setelah kering.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kloning dan transformasi

Isolasi gen *egc* dilakukan dengan metode PCR koloni *Bacillus* sp. RP1 dengan primer *egcF* dan *egcR*. Hasil PCR gen *egc* menghasilkan pita DNA dengan ukuran ~1,5 kb pada sumur 1 menandakan gen *egc* berhasil diisolasi dari *Bacillus* sp. RP1 melalui metode PCR koloni (Gambar 1).

Pada elektroforesis hasil restriksi dari plasmid rekombinan diperoleh satu pita DNA dengan ukuran ~1,5 kb, sesuai dengan ukuran gen *egc* yang diinsersikan dan satu pita berukuran ~4,6 kb yang merupakan ukuran gabungan antara pGEM-T® Easy dan gen *egc* (Gambar 2). Berdasarkan hasil tersebut, gen *egc* berhasil diinsersikan ke dalam pGEM-T® Easy.

### Seleksi komposisi medium

Seleksi komposisi medium ditentukan berdasarkan efek masing-masing faktor terhadap respons berupa aktivitas enzim dan berat kering sel. Tabel 2 menunjukkan hasil pengujian aktivitas enzim dengan medium yang didesain menurut metode Plackett-Burman, sedangkan Tabel 3 menunjukkan hasil penimbangan berat kering sel dengan medium yang didesain menurut metode Plackett-Burman.

Gambar 3 menunjukkan efek masing-masing faktor terhadap aktivitas enzim dan berat kering sel. Berdasarkan Gambar 3a, dapat dilihat bahwa molase berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim, sedangkan bahan-bahan lainnya tidak berpengaruh signifikan.

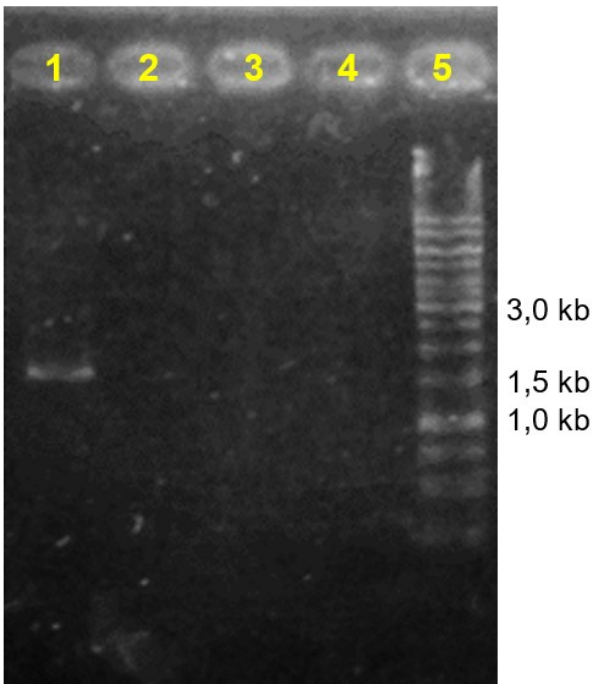
Pengaruh molase disebabkan oleh kandungan galaktosa, salah satu monomer dari rafinosa yang terdapat dalam molase. Keberadaan galaktosa dapat membuat penambahan IPTG tidak diperlukan untuk

menginduksi sistem ekspresi pada *E. coli* BL21 (DE3). Hal ini disebabkan karena galaktosa dapat menyebabkan auto induksi dari produksi protein pada *E. coli* BL21 dengan promoter *lac* (Xu et al. 2012).

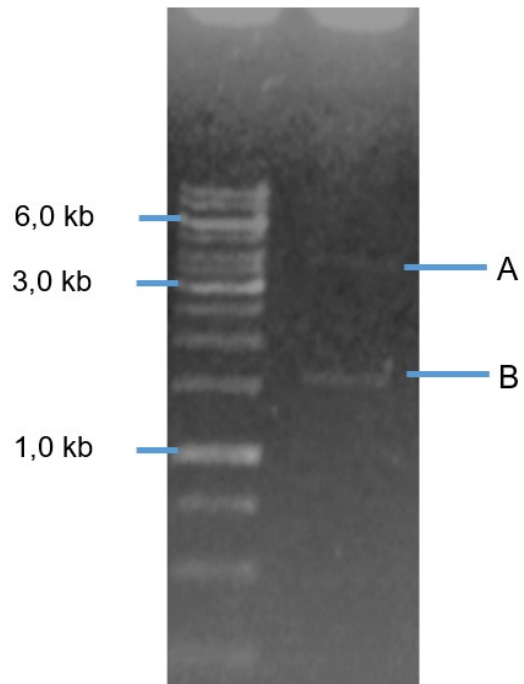
Pada *strain E. coli* dengan mutasi *gal*, induksi oleh galaktosa ekspresi protein dapat mencapai 59-84% dari ekspresi protein yang diinduksi oleh IPTG. Mutasi tersebut menyebabkan *E. coli* tidak dapat memetabolisme galaktosa sehingga konsentrasi galaktosa intraseluler menjadi

tinggi dan dapat menginduksi promoter *lac* (Mattanovich et al. 1998). *E. coli* BL21 (DE3) adalah salah satu *strain* dengan fenotipe *gal* (Studier et al. 2009). Karena itu, ekspresi protein oleh *E. coli* BL21 (DE3) dapat terinduksi oleh keberadaan galaktosa.

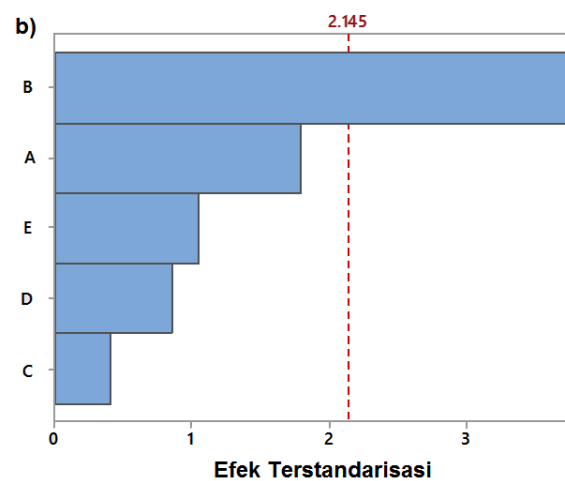
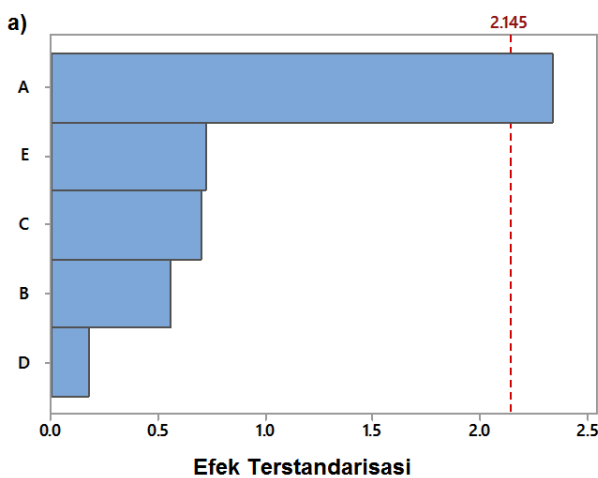
Gambar 3b menunjukkan efek masing-masing faktor terhadap berat kering sel. Jenis bahan yang berpengaruh signifikan terhadap berat kering sel adalah kulit beras. Hasil ini serupa dengan hasil yang diperoleh Lee et al. (2012) menunjukkan bahwa kulit



**Gambar 1.** Hasil elektroforesis produk PCR koloni *Bacillus* sp. RP1 dengan primer *egcF* dan *egcR*. 1-4) PCR dengan template koloni *Bacillus* sp. RP1, 5) GeneRuler 1 kb DNA Ladder



**Gambar 2.** Hasil restriksi plasmid pGEM-T<sup>®</sup> Easy hasil kloning. A) pGEM-T<sup>®</sup> Easy, B) gen *egc*



**Gambar 3.** Grafik Pareto efek komposisi medium terhadap (a). aktivitas enzim endoglukanase dan (b). berat kering sel. (A) Molase, (B) kulit beras, (C) amonium klorida, (D) urea, (E) tepung ikan. Garis merah adalah garis referensi. Faktor yang nilai efek terstandarisasinya melebihi nilai tersebut adalah faktor yang berpengaruh signifikan

**Tabel 2.** Hasil pengujian aktivitas enzim dalam tiap medium yang didesain dengan metode Plackett-Burman

No.	Molase (% v/v)	Kulit beras (% b/v)	Amonium klorida (% b/v)	Urea (% b/v)	Tepung ikan (% b/v)	Aktivitas enzim (U/mL)
1	0	5	1	1	1	0,0466
2	5	5	0	1	1	0,0329
3	5	5	1	0	0	0,1700
4	5	0	1	1	1	0,0446
5	0	5	0	1	1	0,0405
6	5	5	0	0	1	0,0510
7	0	5	1	0	1	0,0911
8	5	5	1	1	0	0,1475
9	5	5	0	0	0	0,1836
10	0	0	1	1	0	0,0467
11	0	0	0	1	0	0,0464
12	5	0	0	0	0	0,0404
13	5	0	1	0	1	0,0523
14	0	0	0	0	0	0,0000
15	0	0	1	0	1	0,0444
16	0	5	0	1	0	0,0117
17	0	5	1	0	0	0,0516
18	5	0	0	1	1	0,1723
19	5	0	1	1	0	0,1490
20	0	0	0	0	1	0,0962

**Tabel 3.** Hasil penimbangan berat kering sel dalam tiap medium yang didesain dengan metode Plackett-Burman

No.	Molase (% v/v)	Kulit beras (% b/v)	Amonium klorida (% b/v)	Urea (% b/v)	Tepung ikan (% b/v)	Berat kering (mg)
1	5	0	0	1	1	3,8
2	5	0	1	0	0	2,7
3	0	0	0	0	1	2,6
4	5	5	1	1	0	5,8
5	5	0	1	0	1	5,1
6	5	0	0	1	0	0,4
7	5	5	1	0	1	7,5
8	0	5	0	0	0	2,5
9	5	0	1	1	1	2,4
10	5	5	0	0	1	6,7
11	0	5	1	1	0	8,2
12	0	0	1	1	0	0,7
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	1	0	0	0
15	0	5	1	1	1	4,0
16	0	5	1	0	1	5,5
17	5	5	0	0	0	3,1
18	5	5	0	1	0	11,3
19	0	5	0	1	1	3,8
20	0	0	0	1	1	3,7

beras adalah sumber karbon yang paling berpengaruh terhadap pertumbuhan dan produksi CMCase oleh *E. coli* JM109/LBH-10.

**Optimasi fermentasi**

Optimasi konsentrasi medium dan lama fermentasi dilakukan terhadap respons aktivitas enzim dan berat kering sel. Gambar 4 menunjukkan model respons permukaan dari aktiivitas enzim. Sedangkan Gambar 5 menunjukkan model respons permukaan dari berat kering sel.

Model respons permukaan dengan respons aktivitas enzim ( $y_1$ ) dan faktor-faktor konsentrasi molase ( $x_1$ ), konsentrasi kulit beras ( $x_2$ ) dan lama fermentasi ( $x_3$ ) dapat dituliskan dalam Persamaan 1 berikut:

$$y = -5,91 + 0,389x_1 + 0,484x_2 + 0,310x_3 - 0,04760x_1^2 - 0,03117x_2^2 - 0,00459x_3^2 + 0,00050x_1x_2 + 0,0052x_1x_3 + 0,00315x_2x_3$$

Berdasarkan persamaan tersebut, aktivitas enzim berada pada titik optimal saat konsentrasi molase dan kulit beras sebanyak 6% dan lama fermentasi 35,15 jam.

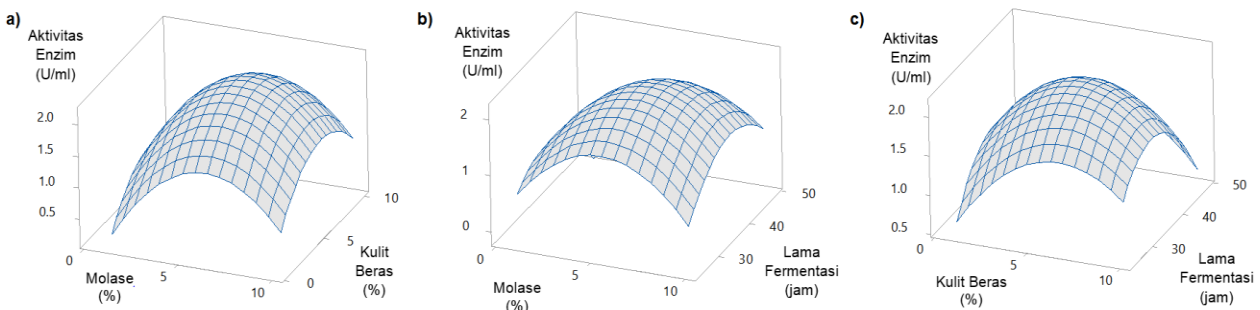
Gambar 4 menunjukkan respons

aktivitas enzim memuncak saat nilai ketiga faktor mendekati nilai tengah yang diuji dan menurun ketika mendekati nilai minimal atau maksimal. Bentuk model menyerupai puncak yang hampir simetris menunjukkan interaksi ketiga faktor terhadap aktivitas enzim minimal.

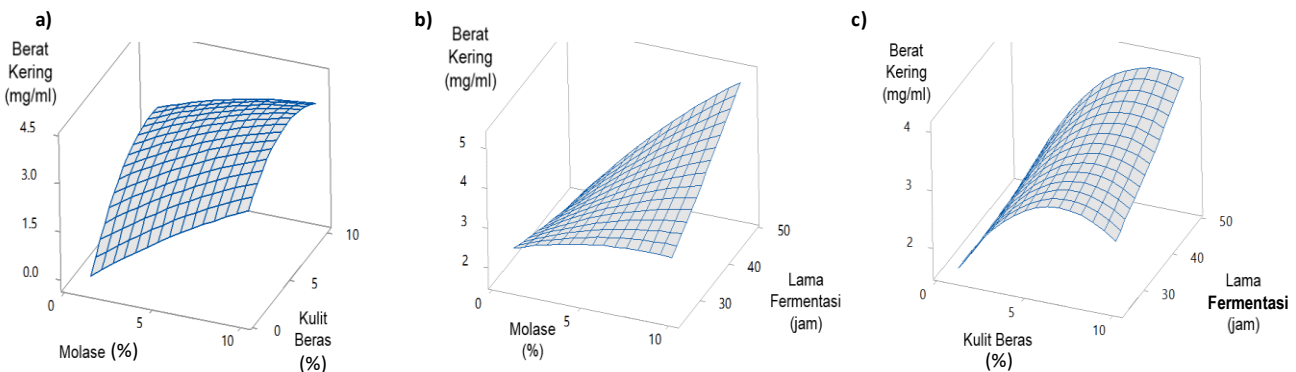
Model respons permukaan berat kering sel ( $y_2$ ) dapat dituliskan dalam Persamaan 2 berikut:

$$y = 2,19 - 0,030x_1 + 0,546x_2 - 0,113x_3 - 0,0101x_1^2 - 0,0397x_2^2 - 0,00049x_3^2 + 0,0235x_1x_2 + 0,01389x_1x_3 + 0,00556x_2x_3$$

Berdasarkan Persamaan 2, titik optimal berat kering sel terletak saat konsentrasi molase mencapai 10% dan konsentrasi kulit beras sebesar 7,3%. Lama fermentasi yang memberikan berat sel paling tinggi adalah 48 jam. Pada Gambar 5a, ketika konsentrasi kulit beras rendah, peningkatan konsentrasi molase memberi peningkatan berat kering yang lebih signifikan dibandingkan ketika konsentrasi kulit beras tinggi. Pada kondisi konsentrasi kulit beras rendah, molase juga digunakan sebagai sumber karbon,



**Gambar 4.** (a). Grafik respons permukaan respons aktivitas enzim terhadap konsentrasi molase dan kulit beras, (b). konsentrasi molase dan lama fermentasi, (c). konsentrasi kulit beras dan lama fermentasi. Faktor yang tidak tercantum dalam grafik berada pada titik optimalnya



**Gambar 5.** (a). Grafik respons permukaan respons berat kering sel terhadap konsentrasi molase dan kulit beras, (b). konsentrasi molase dan lama fermentasi, (c). konsentrasi kulit beras dan lama fermentasi. Faktor yang tidak tercantum dalam grafik berada pada titik optimalnya

sedangkan pada kondisi konsentrasi kulit beras tinggi, karbon dari kulit beras cukup sehingga molase tidak berpengaruh banyak terhadap pertumbuhan.

Titik optimal dari kedua respons jika disatukan dalam satu model adalah pada konsentrasi molase 7,45%, konsentrasi kulit beras 6,45% dan lama fermentasi 39,52 jam. Jika dibandingkan kedua respons terhadap lama fermentasi, dapat dilihat bahwa aktivitas enzim tidak berbanding lurus dengan berat kering sel. Aktivitas enzim telah mengalami penurunan meskipun berat kering sel masih meningkat. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim diproduksi pada awal fase pertumbuhan. Kim et al. (2016) menunjukkan bahwa *E. coli* JM109 mengekspresikan CMCase pada fase pertumbuhan dan fase stasioner.

Penyebab perbedaan adalah komposisi medium. Pada penelitian ini, rasio C:N dalam medium yang tinggi mengakibatkan sangat mungkin dalam rentang konsentrasi medium yang diuji, *E. coli* bertumbuh dalam kondisi nitrogen yang terbatas. Dalam kondisi nitrogen yang terbatas, pertumbuhan *E. coli* dan keluarga *Enterobacteriaceae* akan berhenti dan berfokus pada ekspresi gen yang berfungsi untuk memperoleh nitrogen semaksimal mungkin (Figueira et al. 2015). Selain itu, proteolisis juga terjadi saat terjadi kekurangan nitrogen (Smith 1995). Proteolisis yang terjadi mungkin mendegradasi protein rekombinan yang diekspresikan, sehingga aktivitas endoglukanase menurun meskipun pertumbuhan masih terjadi. Aktivitas enzim masih dapat lebih dioptimalkan jika ada sumber nitrogen yang ditambahkan.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, komposisi medium yang berpengaruh signifikan pada aktivitas endoglukanase dan berat kering sel dari *E. coli* BL21 (DE3)/*egc* adalah dua sumber karbon berupa molase dan kulit beras. Optimasi proses ekspresi endoglukanase oleh *E. coli* BL21 (DE3)/*egc* dipengaruhi oleh komposisi medium berupa molase dan kulit beras dan lama fermentasi. Konsentrasi optimal molase adalah 7,45% dan konsentrasi optimal kulit beras adalah 6,45% dengan lama fermentasi optimal 39,52 jam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acharya S, Chaudhary A (2012) Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Braz Arch Biol Technol* 55: 497-503. doi: 10.1590/S1516-89132012000400003
- Figueira R, Brown DR, Ferreira D, Eldridge MG, Burchell L, Pan Z, Helaine S, Wignesweraraj S (2015) Adaptation to sustained nitrogen starvation by *Escherichia coli* requires the eukaryote-like serine/threonine kinase YeaG. *Sci Rep* 5: 1-14. doi: 10.1038/srep17524
- Gaur R, Tiwari S (2015) Isolation, production, purification and characterization of an organic-solvent-thermostable alkalophilic cellulase from *Bacillus vallismortis* RG-07. *BMC Biotechnol* 15:19. doi: 10.1186/s12896-015-0129-9
- Gohel HR, Contractor CN, Ghosh SK, Braganza VJ (2014) A comparative study of various staining techniques for determination of extra cellular cellulase activity on Carboxy Methyl Cellulose (CMC) agar plates. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3: 261-266
- Kim MH, Kang DU, Lee JW (2016) Construction of a recombinant *Escherichia coli* JM109/A-68 for production of carboxymethylcellulase and comparison of its production with its wild type, *Bacillus velezensis* A-68 in a pilot-scale bioreactor. *Biotechnol Bioprocess Eng* 21: 601-611. doi: 10.1007/s12257-016-0468-y
- Kuhad RC, Deswal D, Sharma S, Bhattacharya A, Jain KK, Kaur A, Pletschke BI, Singh A, Karp M (2016) Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renew Sust Energ Rev* 55: 249-272. doi: 10.1016/j.rser.2015.10.132
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res* 1-10. doi: 10.4061/2011/280696
- Lee YJ, Kim HJ, Gao W, Chung CH, Lee JW



- (2012) Statistical optimization for production of carboxymethylcellulase of *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 by a recombinant *Escherichia coli* JM109/DL-3 from rice bran using response surface method. *Biotechnol Bioproc Eng* 17: 227-235. doi: 10.1007/s12257-011-0258-5
- Maki M, Leung KT, Qin W (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci* 5: 500-516. doi: 10.7150/ijbs.5.500
- Mattanovich D, Kramer W, Luttich C, Weik R, Bayer K, Katinger H (1998) Rational design of an improved induction scheme for recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 58: 296-298. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19980420)58:2/3<296::AID-BIT26>3.0.CO;2-9
- Moeis MR, Natalia D, Ningrum RW, Dwijayanti A (2014) Cloning and expression of endoglucanase gene from thermophilic bacteria *Bacillus sp.* RP1. *Microbiol Indones* 8: 170-176. doi: 10.5454/mi.8.4.4
- Muñoz C, Hidalgo C, Zapata M, Jeison D, Riquelme C, Rivas C (2014) Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. *Appl Environ Microbiol* 80: 4199-4206. doi: 10.1128/AEM.00827-14
- Parekh S, Vinci VA, Strobel RJ (2000). Improvement of microbial strains and fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 287-301. doi: 10.1007/s002530000403
- Puspitasari IN, Moeis MR (2008) Screening of seven cellulase and xylanase producing *Bacillus* species and analysis of the cellulase and xylanase expression pattern of the selected isolate. Pp 194-201. Proceedings of the Second International Conference on Mathematics and Natural Sciences (ICMNS) 28-30 October, Bandung
- Sadhu S, Maiti TK (2013) Cellulase production by bacteria: A review. *Br Microbiol Res J* 3: 235-258. doi: 10.5281/zenodo.8687
- Singh V, Haque S, Niwas R, Srivastava A, Pasupuleti M, Tripathi CKM (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Front Microbiol* 7: 2087. doi: 10.3389/fmicb.2016.02087
- Smith A (1995) Gene Expression in Recombinant Microorganisms. Marcel Dekker Inc, New York
- Studier FW, Daegelen P, Lenski RE, Maslov S, Kim JF (2009) Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the *E. coli* B and K12 genomes. *J Mol Biol* 394: 653-680. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.021
- Xu J, Banerjee A, Pan SH, Li ZJ (2012) Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. *Protein Expr Purif* 83: 30-36. doi: 10.1016/j.pep.2012.02.014