

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan terhadap produk pendukung kehidupan, seperti tekstil, serat, dan kertas meningkat sejalan dengan meningkatnya populasi. Pada proses produksinya, industri menghasilkan banyak bahan kimia di lingkungan yang mencemari udara. Industri di seluruh dunia mencari teknologi yang ramah lingkungan untuk memenuhi permintaan produk tanpa mencemari lingkungan dan juga ekonomis untuk digunakan. Penggunaan proses enzimatik telah diterapkan dalam berbagai industri pada beberapa dekade terakhir. Penggunaan enzim dipilih karena prosesnya spesifik, cepat, dan lebih menghemat bahan baku, energi, serta bahan kimia (Tyagi dan Sharma, 2021). Pasar enzim global pada tahun 2019 bernilai 9,9 miliar USD dan diperkirakan akan meningkat sebesar 7,1% per tahun dari tahun 2020 hingga 2027 (de Souza *et al.*, 2022).

Xilanase memiliki beragam aplikasi mulai dari industri farmasi, makanan dan pakan, toko roti, kertas dan bubur kertas, tekstil, hingga *bio-refinery*. Reaksi enzimatik xilanase dalam industri kertas dapat meningkatkan efisiensi zat pemutih (hidrogen peroksida, ozon, dan klorin). Aplikasi xilanase pada toko roti, yaitu membantu memperbaiki tekstur roti. Penerapan xilanase dalam industri jus serta anggur dapat membantu dalam langkah-langkah penjernihan sehingga meningkatkan kualitas produk. Xilanase juga dilaporkan sebagai bahan tambahan pakan ternak. Penggunaan xilanase dalam pengolahan xilan dapat mengurangi biaya dan ramah lingkungan (Phuyal *et al.*, 2023).

Xilanase merupakan enzim hemiselulolitik yang mampu mendegradasi heteroxilan yang membentuk dinding sel tanaman lignoselulosa (Paës *et al.*, 2012). Xilanase dikenal sebagai kelompok enzim depolimerisasi yang digunakan untuk menghidrolisis xilan yang merupakan komponen utama hemiselulosa. Xilan terdiri dari subunit β -(1,4)-D-xilosa (homopolisakarida) yang memiliki rantai samping yang beragam, terutama unit α -L-arabinosil dan α -D-glukuronosil. Depolimerisasi β -D-xilosidase dan endo-1,4-xilanase mengubah xilan menjadi xilooligosakarida dan xilosa (Tyagi dan Sharma, 2021). Di antara enzim xilanolitik, endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) adalah glikosida hidrolase (GH) yang memotong ikatan 1,4 bagian dalam antara dua monomer xilosa dalam tulang punggung xilan dan xilooligosakarida (XOS). Berdasarkan kesamaan urutan asam amino, endo-1,4- β -xilanase diklasifikasikan ke dalam keluarga GH yang berbeda, dengan sebagian besar termasuk ke dalam keluarga GH10 dan GH11 (Zarafeta *et al.*, 2020). Famili GH11 adalah salah satu famili GH yang paling baik dikarakterisasi dengan anggota bakteri dan jamur yang dianggap sebagai xilanase sejati dibandingkan dengan keluarga lainnya karena spesifisitas substratnya yang tinggi (Paës *et al.*, 2012). Xilanase GH11 mempunyai keunggulan dalam aplikasinya, yaitu aktivitas katalitik dan spektrum suhu/pH yang luas (Kim *et al.*, 2023).

Xilanase diproduksi oleh berbagai organisme hidup, seperti mikroorganisme, protozoa, moluska, dan juga ditemukan di dalam rumen hewan tingkat tinggi. Xilanase untuk skala industri diproduksi oleh mikroorganisme, seperti bakteri, jamur, dan *actinomyces*. Xilanase dalam

industri diperlukan dalam jumlah yang besar dan mampu bertahan dalam proses pengolahan tingkat industri yang keras. Mikroorganisme yang potensial untuk produksi xilanase diperlukan untuk memenuhi kebutuhan industri (Bhardwaj *et al.*, 2019). *Kitasatospora* sp. menghasilkan sistem multienzimatis ketika dikultur pada ampas tebu, yaitu enzim xilanase dan selulase. Endo-xilanase *wild type* dari *Kitasatospora* sp. ID06-480 sangat cocok untuk aplikasi bioteknologi karena kemampuannya menghasilkan XOS dan gula yang dapat difermentasi. *Kitasatospora* sp. merupakan penghasil enzim xilanase yang baik ketika dikultivasi pada tiga biomassa yang berbeda (Rahmani *et al.*, 2020).

Endo-xilanase dari *actinomycetes Kitasatospora* sp. mampu menghidrolisis hemiselulosa khususnya heteroxilan pada biomassa lignoselulosa menjadi xilooligosakarida (XOS) dengan produk utama berupa xilobiosa (Rahmani *et al.*, 2017). Pada penelitian Rahmani *et al.* (2018), *Kitasatospora* sp. ID06-480 yang diperoleh dari sampel tanah Cibinong, Jawa Barat, Indonesia mampu memproduksi xilanase dengan aktivitas sebesar $4,4 \pm 0,03$ U/mL dan mampu menghidrolisis xilan menjadi xilosa serta XOS dengan produk utama berupa xilobiosa dan xilotriosa. Penelitian yang berkelanjutan oleh Rahmani *et al.* (2019) menggunakan dua gen endo-1,4- β -xilanase (GH10 dan GH11) dari xilanase yang sangat aktif yang dimiliki oleh isolat *Kitasatospora* sp. ID06-480 pada penelitian sebelumnya. Dua gen endo-1,4- β -xilanase (GH10 dan GH11) diekspresikan pada *Streptomyces lividans* 1326 sebagai inang untuk ekspresi protein rekombinan. Rekayasa genetika gen pengkode endo-xilanase (GH10 dan GH11) dilakukan untuk meningkatkan

produksi enzim, pengurangan biaya produksi, dan untuk meningkatkan peluang aplikasi *bio-refinery*.

Ekspresi heterolog yang tinggi diperoleh dari dua bentuk endo-1,4- β -xilanase (GH10 dan GH11) selama hidrolisis xilan yang diekstraksi dari ampas tebu dan tiga jenis substrat berbasis xilan. Hidrolisis oleh endo-1,4- β -xilanase GH10 secara efisien menghasilkan xilosa dan XOS sedangkan hidrolisis oleh endo-1,4- β -xilanase GH11 secara efisien menghasilkan XOS tanpa pembentukan xilosa sehingga tidak menghambat produksi XOS. Penelitian Yagi *et al.* (2019) menunjukkan bahwa xilanase GH11 dari *Streptomyces olivaceociridis* E-86 yang diekspresikan dalam sel inang *E. coli* BL21 (DE3) menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi baik dengan ampas tebu giling yang diolah dengan klorit maupun dengan natrium hidroksida daripada GH10. Laju hidrolisis enzimatik xilan dalam ampas tebu yang telah diolah terlebih dahulu dengan klorit pada xilanase GH11 sebesar 53,9% sedangkan pada xilanase GH10 hanya 33,6%, kemudian untuk pengolahan dengan natrium hidroksida pada xilanase GH11 sebesar 63,4% sedangkan xilanase GH10 hanya 54%. Xilanase GH11 memainkan peran utama dalam degradasi biomassa.

Escherichia coli BL21 (DE3) merupakan salah satu strain *Escherichia coli* yang memiliki banyak kelebihan, seperti pertumbuhannya yang cepat, kepadatan sel tinggi yang mudah dicapai, media pertumbuhannya mudah didapat dan terjangkau, serta proses transformasi dapat dilakukan dengan cepat. *E. coli* BL21 (DE3) merupakan galur yang paling banyak digunakan untuk ekspresi protein (Rosano dan Ceccarelli, 2014) karena mengandung

profag DE3 dari bakteriofag λ yang membawa gen T7 RNA polimerase di bawah kendali promotor lacUV5 (Jeong *et al.*, 2015). T7 RNA polimerase ini akan mengenali promotor T7 secara khusus dan dapat melakukan transkripsi delapan kali lebih cepat daripada *E. coli* RNA polimerase sehingga meningkatkan sistem ekspresi serta produksi protein. Promotor lacUV5 merupakan varian kuat dari promotor lac *wild-type* yang memerlukan induksi *isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). Penggunaan promotor lacUV5 mendukung sistem overekspresi protein dimana terjadi peningkatan transkripsi mRNA yang akan menghasilkan peningkatan produksi protein (Du *et al.*, 2021). Ekspresi heterolog endo-1,4- β xilanase GH11 yang berasal dari strain *Kitasatospora* sp. ID06-480 pada bakteri *Escherichia coli* BL21 (DE3) dan optimasi produksinya perlu dilakukan untuk mengetahui ekspresi serta aktivitasnya.

1.2. Permasalahan

- 1.2.1. Apakah gen xilanase GH famili 11 dari *Kitasatospora* sp. dapat diekspresikan pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)?
- 1.2.2. Media produksi apakah yang optimum dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)?
- 1.2.3. Berapakah suhu, konsentrasi IPTG, dan *post induction time* yang optimum secara simultan saat produksi menggunakan metode *Response Surface Methodology-Box-Behnken Design* (RSM-BBD) dalam

meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)?

1.3. Tujuan

- 1.3.1. Mengetahui ekspresi gen xilanase GH famili 11 dari *Kitasatospora* sp. pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- 1.3.2. Mengetahui media produksi yang optimum dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- 1.3.3. Mengetahui suhu, konsentrasi IPTG, dan *post induction time* yang optimum secara simultan saat produksi menggunakan metode *Response Surface Methodology-Box-Behnken Design* (RSM-BBD) dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)

1.4. Manfaat

- 1.4.1. Memberikan informasi mengenai ekspresi gen xilanase GH famili 11 dari *Kitasatospora* sp. pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- 1.4.2. Memberikan referensi mengenai media produksi yang optimum dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)
- 1.4.3. Memberikan referensi mengenai suhu, konsentrasi IPTG, dan *post induction time* yang optimum secara simultan saat produksi

menggunakan metode *Response Surface Methodology-Box-Behnken Design* (RSM-BBD) dalam meningkatkan aktivitas enzim xilanase GH famili 11 pada *Escherichia coli* BL21 (DE3)