

## Optimisasi pH dan Agitasi pada Produksi Glukoamilase dari *Saccharomycopsis fibuligera* R64 Menggunakan *Response Surface Method*

Agus Safari, Rudi Hartono, Shabarni Gaffar, Muhammad Yusuf, Saadah D. Rachman, Safri Ishmayana\*

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21, Jatinangor, Sumedang 45363, Jawa Barat

\*Penulis korespondensi: [ishmayana@unpad.ac.id](mailto:ishmayana@unpad.ac.id)

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n1.17898>

**Abstrak:** Glukoamilase adalah salah satu enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh ragi *Saccharomycopsis fibuligera*. Enzim ini mampu memecah ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6 glikosidik pada molekul amilosa dan amilopektin. Pada penelitian ini telah dilakukan produksi enzim glukoamilase dalam media fermentasi yang mengandung sumber karbon yang berbeda, yaitu tepung beras, dedak dan pati. Fermentasi dilakukan dengan sistem lumpok pada suhu kamar dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 3 hari. Nilai OD dan aktivitas glukoamilase ditentukan setiap 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tepung beras menghasilkan aktivitas glukoamilase tertinggi. Aktivitas glukoamilase tertinggi pada tepung beras terdeteksi pada jam ke-48 dengan nilai 28,48 unit/mL. Dengan kondisi waktu yang sama nilai aktivitas enzim glukoamilase pada media dedak dan pati berturut-turut yaitu 18,08 dan 18,67 unit/mL. Selanjutnya media tepung beras digunakan untuk mengoptimisasi produksi enzim glukoamilase dengan variasi agitasi dan pH menggunakan desain *Response Surface Method*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pH berpengaruh signifikan terhadap produksi enzim glukoamilase. Kondisi optimum produksi glukoamilase diperoleh pada agitasi dan pH berturut-turut yaitu 250 rpm dan 5. Nilai aktivitas enzim glukoamilase pada kondisi optimum yaitu 56,22 unit/mL.

**Kata kunci:** *Saccharomycopsis fibuligera*, glukoamilase, optimisasi, *response surface method*

**Abstract:** *Glucosylase is one of extracellular enzymes secreted by the yeast Saccharomycopsis fibuligera. The enzyme hydrolyze  $\alpha$ -1,4 and  $\alpha$ -1,6 glycosidic bond in amylose and amylopectin molecules. The present study was directed to produce glucosylase in fermentation media with different carbon source, namely rice flour, rice bran and soluble starch. Fermentation was conducted in batch system at room temperature with agitation speed of 150 rpm for 3 days. Optical density and glucosylase activity was monitored every 24 hours. The result of the present study indicates that rice flour produce the highest glucosylase activity. The highest glucosylase activity was detected at 48 hours with activity unit value of 28.48 unit/mL, while rice bran and soluble starch, only resulted 18.08 and 18.67 unit/mL, respectively. Furthermore, rice flour was used in media for optimization of glucosylase production, with agitation speed and pH as independent variable using response surface method. The result of the present study indicate that pH is significantly affecting glucosylase production. The optimum condition was found at agitation speed and pH of 250 rpm and 5, respectively. The activity of glucosylase at optimum condition was found to be 56.22 unit/mL.*

**Keywords:** *Saccharomycopsis fibuligera*, glucosylase, optimization, *response surface method*

### PENDAHULUAN

Aplikasi enzim dalam bidang industri terus meningkat terutama dalam bidang industri makanan, minuman, tekstil, kulit dan kertas. Salah satu enzim yang banyak digunakan dalam bidang industri yaitu enzim glukoamilase (Hidayat *et al.* 2006). Glukoamilase diaplikasikan secara luas di industri seperti industri makanan, industri fermentasi, tekstil dan industri kertas. Enzim ini telah menjadi produk kedua yang banyak dipasarkan dalam sektor industri

enzim (Kumar *et al.* 2009). Sampai sekarang Indonesia masih mengimpor enzim ini dari negara lain, hal ini menyebabkan ketergantungan dalam kelangsungan produksi gula dari pati. Untuk mengatasi hal tersebut perlu dilakukan studi produksi enzim glukoamilase.

*Saccharomycopsis fibuligera* adalah ragi yang telah dilaporkan menghasilkan glukoamilase (Wiseman 1979; Natalia *et al.* 2011). *S. fibuligera* adalah ragi yang aman untuk aplikasi pangan dan dikenal sebagai penghasil enzim-enzim amilolitik.

Kemampuan *S. fibuligera* untuk memecah pati berhubungan dengan kemampuannya untuk menghasilkan dua jenis amilase,  $\alpha$ -amilase, yang bekerja pada bagian dalam pati (Hasan *et al.* 2008; Hostinová *et al.* 2010; Ismaya *et al.* 2013) dan glukoamilase, yang bekerja pada bagian luar pati (Hostinová 2002; Natalia *et al.* 2011).

Dalam penelitian produksi enzim skala laboratorium, nutrisi yang biasa digunakan adalah senyawa kimia yang murni, sedangkan dalam skala industri, untuk mengurangi biaya produksi dicari sumber lain yang lebih murah sebagai sumber karbon atau nitrogen seperti ampas tapioka, jerami padat, dedak, ampas kedelai, kulit nenas, tongkol jagung dan sebagainya (Suhartono 1989).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa konsentrasi nutrisi optimum untuk produksi enzim amilase oleh *S. fibuligera* adalah 1% dari pati dan 1% dari ekstrak ragi (Soemitro *et al.* 1996). Perbandingan dedak beras dengan ekstrak ragi sebesar 2:1 merupakan perbandingan komposisi media optimum untuk produksi enzim  $\alpha$ -amilase dari *S. fibuligera* (Safari *et al.* 1996) dan media produksi enzim  $\alpha$ -amilase dari *S. fibuligera* dengan sumber karbon tepung beras menunjukkan aktivitas tertinggi kedua setelah media produksi dengan komposisi sagu (Ishmayana *et al.* 2008).

Luo *et al.* (2015) telah memproduksi enzim glukoamilase dari *Aspergillus niger* dengan berbagai sumber karbon seperti maltosa, glukosa, hidrolisat singkong dan hidrolisat pati jagung dengan menggunakan alat fermentor dengan skala 5 L. Hasil penelitiannya menunjukkan produksi enzim glukoamilase tertinggi dihasilkan pada sumber karbon hidrolisat pati jagung dengan nilai aktivitas sebesar 14.500 unit/mL.

Penelitian sebelumnya memberikan informasi bahwa enzim glukoamilase telah banyak di produksi dengan berbagai variabel penelitian yang diujikan (Luo *et al.* 2015; Wang *et al.* 2008). Namun variabel penelitian yang digunakan masih bersifat tunggal dan tidak diketahui pengaruh interaksi antar variabel pada produksi glukoamilase. Variabel penelitian yang bersifat tunggal memiliki kelemahan yaitu tidak adanya interaksi antar variabel yang memungkinkan kesalahan dalam menafsirkan hasil. Kelemahan tersebut dapat dihilangkan salah satunya dengan menggunakan *Response Surface Method* (RSM). Metode ini lebih realistis dan tidak membutuhkan percobaan yang banyak (Montgomery 2001). Cara ini sangat efisien untuk optimisasi variabel yang berbeda dan digunakan dalam produksi berbagai enzim.

Kumar & Satyanarayana (2007) melakukan optimasi variabel kultur untuk peningkatan produksi enzim glukoamilase dari *Thermomucor indicae-seudaticae* menggunakan metode RSM. Pada penelitiannya ada 4 variabel yang diuji interaksinya terhadap produksi enzim glukoamilase yaitu konsentrasi sukrosa, ekstrak ragi, garam kalium dihidrogen fosfat dan asparagin. Hasil yang didapat

kondisi optimum untuk masing-masing variabel yaitu sukrosa 3%, yeast ekstrak 0,2%, garam kalium dihidrogen fosfat 0,1 % dan asparagin 0,35 %. Untuk aktivitas enzim glukoamilase yang dihasilkan sebesar 26,3 unit/mL. Nilai aktivitas tersebut tidak jauh dari nilai aktivitas yang sebelumnya diprediksikan melalui model kuadrat sebesar 26,7 unit/mL.

## BAHAN DAN METODE

### Penanam Biakan Murni

Media agar miring yang mengandung 1,5% agar bacto, 10% ekstrak tauge dan 6% sukrosa disiapkan dan *S. fibuligera* ditanam pada media padat agar miring yang telah steril menggunakan kawat ose kemudian dibiarkan selama dua hari.

### Pembuatan Inokulum

Media inokulum yang mengandung 1% glukosa, 2% kalium dihidrogen fosfat, 2% amonium sulfat, 1% ekstrak ragi dan 0,5% magnesium sulfat heptahidrat dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL dan dilarutkan dengan air suling sebanyak 100 mL. *S. fibuligera* dari media padat agar miring ditanam dalam media inokulum sebanyak 2-3 kawat ose lalu dikocok dengan menggunakan incubator shaker pada kecepatan 150 rpm dan suhu kamar selama 24 jam.

### Penentuan Media Fermentasi Terbaik

Media fermentasi mengandung 1% sumber karbon, 1% ekstrak ragi, 2% kalium dihidrogen fosfat, 0,5% magnesium sulfat heptahidrat, 2% amonium sulfat yang dilarutkan dalam air suling. Sumber karbon yang digunakan adalah tepung beras, dedak dan pati larut.

Sebanyak 100 mL media fermentasi steril disiapkan dalam 3 labu erlenmeyer 250 mL untuk masing-masing sumber karbon. Kemudian ditambahkan 0,3 mL inokulum aktif ke dalam masing-masing media fermentasi tersebut. Dilakukan pengocokkan pada kecepatan 150 rpm dan suhu kamar selama 72 jam. Nilai OD diukur pada  $\lambda$  600 nm dan aktivitas enzim ditentukan setiap 24 jam.

### Penentuan kondisi optimum produksi enzim glukoamilase menggunakan RSM

Disiapkan sebanyak 200 mL media fermentasi yang mengandung 1% tepung beras, 1% ekstrak ragi, 2% kalium dihidrogen fosfat, 0,5 % magnesium sulfat heptahidrat, dan 2% amonium sulfat dalam labu erlenmeyer 500 mL. Fermentasi dilakukan selama 48 jam dengan variasi kecepatan pengocokkan menggunakan incubator shaker dan pH pada suhu ruang sesuai dengan desain eksperimen RSM. Kisaran dan level variabel percobaan ditunjukkan pada Tabel 1. Setelah fermentasi selesai aktivitas enzimnya ditentukan dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson.

**Tabel 1.** Level faktor yang digunakan untuk desain eksperimen

Unit Kode	Variabel Eksperimen	
	Agitasi ( rpm )	pH
-1,4	109	3,6
-1,0	150	4
0	250	5
+1,0	350	6
+1,4	391	6,4

Level optimum untuk agitasi dan pH ditentukan dengan desain eksperimen RSM central composite design (CCD). Untuk dua faktor (pH dan kecepatan agitasi) yang dipelajari pada eksperimen ini, ada 13 percobaan yang dilakukan seperti ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Central composite design untuk eksperimen penentuan kondisi optimum pH dan kecepatan agitasi

Percobaan	Tipe poin	pH	Agitasi (rpm)
1	1	6	350
2	1	6	150
3	1	4	150
4	1	4	350
5	-1	6,4	250
6	-1	3,6	250
7	-1	5	109
8	-1	5	390
9	0	5	250
10	0	5	250
11	0	5	250
12	0	5	250
13	0	5	250

#### Penentuan Aktivitas Enzim Glukoamilase

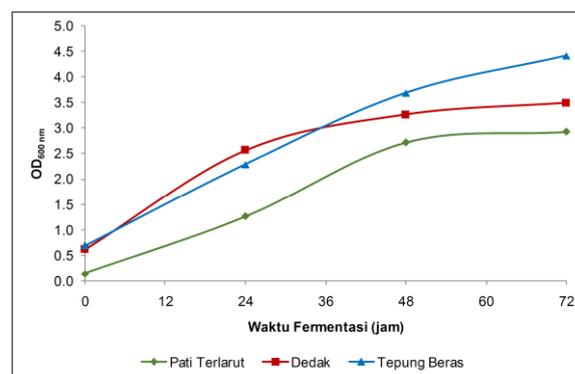
Aktivitas enzim glukoamilase ditentukan dengan metode Somogyi (1952). Sebanyak 0,1 mL enzim ditambahkan ke dalam 0,9 mL substrat pati 1% dalam tabung reaksi, diinkubasi selama 10 menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan cara dipanaskan pada air mendidih selama 10 menit, lalu didinginkan dalam air es selama 5 menit. Larutan Somogyi-Nelson ditambahkan sebanyak 2 mL lalu dikocok dan dipanaskan kembali pada air mendidih selama 10 menit lalu didinginkan dalam air es selama 5 menit. Sebanyak 2 mL pereaksi arsenomolibdat dan 5 mL air suling ditambahkan ke dalam campuran tersebut. Serapannya diukur pada panjang gelombang 520 nm. Untuk blanko cara yang sama tetapi enzim diganti dengan air suling.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Sumber Karbon Terbaik untuk Produksi Enzim Glukoamilase

Penentuan media fermentasi terbaik dilakukan untuk mengetahui media fermentasi yang tepat dalam memproduksi enzim glukoamilase dengan aktivitas yang tinggi. Sumber karbon dalam media fermentasi yang digunakan yaitu dedak beras, pati dan tepung beras. Ketiga jenis media fermentasi ini sudah dilakukan penelitiannya dalam memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase oleh Soemitro dkk. (1996), Ishmayana *et al.* (2008) dan Safari dkk. (1996).

Nilai OD pada tiap variasi sumber karbon diperoleh dengan mengukur kekeruhan media setiap 24 jam sekali menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 600nm. Data hasil penelitian penentuan nilai OD pada berbagai variasi sumber karbon ditunjukkan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Kurva pertumbuhan *S. fibuligera* pada berbagai sumber karbon

Pertumbuhan *S. fibuligera* pada jam ke 0 – 48 fermentasi berada dalam fase eksponensial pada media fermentasi dedak, pati terlarut dan tepung beras. Pada ketiga variasi media fermentasi tersebut tidak terjadi fase adaptasi seperti pada kurva pertumbuhan secara umum. Ini dikarenakan fase adaptasi terjadi pada rentang waktu yang lebih rendah (jam ke 0 – 18). Selain itu, inokulum juga dimaksudkan untuk mempersingkat waktu adaptasi pada proses produksi.

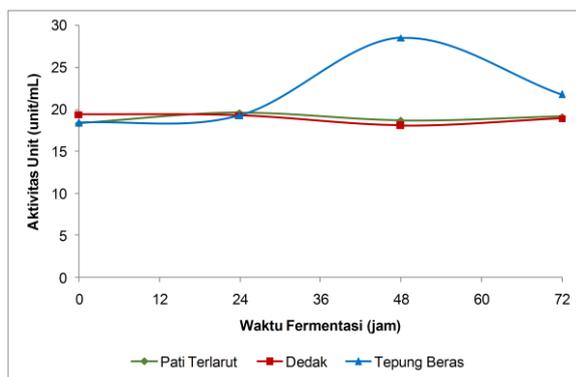
Pada jam ke-48 sampai jam ke-72 *S. fibuligera* mengalami fase stasioner untuk media fermentasi dedak beras dan pati. Akan tetapi, pada media tepung beras tetap mengalami fase eksponensial. Ini menandakan bahwa pada media tepung beras kapang *S. fibuligera* masih terus tumbuh. Pola pertumbuhan *S. fibuligera* yang ditunjukkan pada Gambar 1, pertumbuhan dan produksi enzimnya berbeda untuk setiap media dan galur. Aktivitas enzim maksimal umumnya dicapai pada akhir fase logaritmik (Priest 1977).

### Aktivitas Enzim Glukoamilase

Aktivitas enzim glukoamilase diukur dengan metode Somogyi. Metode Somogyi merupakan metode untuk menentukan kadar gula pereduksi. Kadar gula pereduksi yang terukur diasumsikan sebagai glukosa dan sebanding dengan nilai aktivitas enzim glukoamilase. Hasil yang diperoleh untuk aktivitas glukoamilase pada berbagai sumber karbon ditunjukkan pada Gambar 2.

Berbagai sumber karbon seperti pati terlarut, tepung beras dan dedak ditambahkan dalam media produksi enzim glukoamilase. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tepung beras menghasilkan produksi enzim glukoamilase tertinggi dibandingkan dengan sumber karbon lainnya (Gambar 2).

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa aktivitas enzim glukoamilase tertinggi terdeteksi pada media fermentasi tepung beras dengan waktu fermentasi 48 jam. Nilai aktivitas enzim glukoamilase yang didapat yaitu 28,48 unit/mL. Sementara itu pada media dedak dan pati pada jam yang sama memiliki aktivitas enzim glukoamilase yang hampir sama berturut-turut yaitu 18,08 unit/mL dan 18,67 unit/mL.



**Gambar 2.** Aktivitas unit enzim glukoamilase yang dihasilkan *S. fibuligera* dengan berbagai sumber karbon selama 72 jam proses produksi

### Penentuan Kondisi Optimum Produksi Enzim Glukoamilase Menggunakan Tepung Beras Berdasarkan Desain RSM

Penentuan kondisi optimum produksi enzim glukoamilase yang dihasilkan *S. fibuligera* yaitu dengan mempelajari pengaruh interaksi pH dan kecepatan agitasi berdasarkan desain RSM.

Optimisasi proses produksi dengan variabel tunggal membutuhkan waktu yang lama terutama untuk variabel dalam jumlah banyak dan tidak menjamin kondisi yang diinginkan sesuai. Bahkan, kecil kemungkinan variabel tunggal untuk mencapai kondisi optimum dengan jumlah eksperimen yang terbatas. Variabel tunggal dapat menyebabkan salah penafsiran hasil karena interaksi antara variabel yang berbeda diabaikan. Optimisasi dengan RSM membutuhkan jumlah eksperimen yang lebih sedikit,

menghemat waktu eksperimen dan bahan eksperimen.

*Central composite design* (CCD) merupakan salah satu rancangan statistika RSM yang dapat digunakan untuk optimisasi dan evaluasi efek linier, efek kuadrat dan efek interaksi dari variabel-variabel bebas dalam suatu proses (Montgomery 2001). Rancangan CCD faktorial  $2^2$  dapat digunakan untuk eksplorasi kuadrat RSM dan membangun model polinomial orde kedua. Rancangan CCD sangat berguna dalam penentuan kondisi optimum proses produksi enzim glukoamilase. Berdasarkan rancangan CCD tersebut diperoleh hasil aktivitas enzim glukoamilase seperti ditunjukkan pada Tabel 3. Selanjutnya hasil aktivitas enzim glukoamilase diolah menggunakan software MINITAB 17 dan didapatkan model persamaan regresi orde kedua. Persamaan regresi orde kedua dari hasil tersebut ditunjukkan pada persamaan (1). Persamaan yang diperoleh berdasarkan data pada Tabel 3 kemudian digunakan untuk memprediksi respon dari kondisi yang diinginkan.

**Tabel 3.** Aktivitas unit enzim glukoamilase dengan variasi kondisi agitasi dan pH

Percobaan	Tipe poin	pH	Agitasi (rpm)	Akt. GA (unit/mL)
1	1	6	350	22,290
2	1	6	150	23,724
3	1	4	150	13,296
4	1	4	350	21,899
5	-1	6,4	250	20,204
6	-1	3,6	250	17,076
7	-1	5	109	25,549
8	-1	5	390	25,549
9	0	5	250	53,574
10	0	5	250	58,528
11	0	5	250	52,792
12	0	5	250	47,969
13	0	5	250	68,174

$$Y = -566,248 + 200,469 X_1 + 0,923 X_2 - 19,229 X_1^2 - 0,002 X_2^2 - 0,025 X_1 * X_2 \dots (1)$$

dengan

$$Y = \text{Aktivitas glukoamilase (unit/mL)}$$

$$X_1 = \text{pH}$$

$$X_2 = \text{kecepatan agitasi}$$

Berdasarkan persamaan (1), model matematis yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai konstanta bernilai negatif, sedangkan koefisien untuk pH ( $X_1$ ) memiliki tanda positif menunjukkan bahwa dengan semakin tinggi pH pada proses fermentasi dapat meningkatkan aktivitas enzim glukoamilase yang

dihasilkan. Koefisien variabel agitasi ( $X_2$ ) juga memiliki tanda positif menunjukkan semakin tinggi nilai agitasi maka dapat meningkatkan enzim glukosamilase yang dihasilkan.

Pengujian ketepatan model persamaan tersebut dilakukan pengujian yang meliputi pengujian *lack of fit*, pengujian koefisien regresi secara serentak, pengujian koefisien regresi secara individu, uji koefisien determinasi dan uji kenormalan.

#### Uji Lack of Fit

Pengujian *lack of fit* digunakan untuk menguji kesesuaian model yang didapatkan. Hipotesis untuk uji *lack of fit* adalah sebagai berikut:

- $H_0$ : Tidak ada lack of fit pada model apabila nilai  $p \geq 5\%$   
 $H_1$ : Ada lack of fit pada model apabila nilai  $p < 5\%$

Tabel 4 menunjukkan nilai  $p$  *lack of fit* sebesar 0,955 menunjukkan nilai tersebut lebih besar dari  $\alpha = 0,05$ , yang menandakan hipotesis  $H_0$  diterima. Hal ini menandakan bahwa model penelitian dibuat sesuai dengan data.

Pada penelitian ini ditetapkan nilai  $\alpha$  sebesar 5% atau 0,05 yang berarti nilai kepercayaan yang digunakan sebesar 95%. Artinya hasil riset mempunyai nilai confidence level untuk benar 95% serta peluang memperoleh kesalahan maksimal 5% (toleransi kesalahan). Nilai  $\alpha$  (tingkat signifikansi)

menunjukkan error diizinkan dimana nilainya sebesar  $1 - \text{tingkat kepercayaan}$ .

#### Uji Koefisien Regresi Secara Serentak

Pengujian koefisien regresi secara serentak digunakan untuk menguji signifikansi model secara keseluruhan. Hipotesis yang digunakan untuk uji koefisien regresi secara serentak adalah sebagai berikut :

- $H_0$ : Model tidak memberikan pengaruh secara signifikan terhadap respon apabila nilai  $p \geq 5\%$   
 $H_1$ : Model memberikan pengaruh secara signifikan terhadap respon apabila nilai  $p < 5\%$

Hasil uji koefisien regresi secara serentak menunjukkan bahwa model secara keseluruhan dinyatakan signifikan. Hal ini ditunjukkan pada Tabel 4 bahwa model regresi secara keseluruhan memiliki nilai  $p < 0,001$  kurang dari nilai  $\alpha = 0,05$ .

Hasil pada Tabel 4 menunjukkan model yang tepat untuk penelitian ini adalah model linier dan model kuadrat karena memiliki nilai  $p < 0,05$ . Kedua model tersebut menunjukkan model yang signifikan. Sebaliknya, model non-linier yang mengikutsertakan interaksi antar variabel tidak signifikan karena memiliki nilai  $p$  sebesar 0,431 lebih besar dari  $\alpha = 0,05$ . Artinya, model yang tepat untuk penelitian ini adalah model linier dan kuadrat.

**Tabel 4.** Hasil uji ANAVA

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	p
Regression	5	3878,40	3878,40	775,68	0,000
Linear	2	35,47	2695,63	1347,82	0,000
Square	2	3817,75	3817,75	1908,87	0,000
Interaction	1	25,19	25,19	25,19	0,431
Residual Error	7	252,37	252,37	36,05	
<i>Lack-of-fit</i>	3	17,96	17,96	5,99	0,955

**Tabel 5.** Pengaruh koefisien regresi terhadap model

Term	Coef	SE Coef	T	p
Constant	-566,248	70,5965	-8,021	0,000
Agitasi	0,923	0,1896	4,869	0,002
pH	200,469	24,0645	8,330	0,000
Agitasi*Agitasi	-0,002	-0,0002	-6,929	0,000
pH*pH	-19,229	2,2765	-8,447	0,000
Agitasi*pH	-0,025	0,0300	-0,836	0,431

### Uji koefisien regresi secara individu

Data pada Tabel 5 menunjukkan variabel yang terdiri dari satu variabel menunjukkan efek linier sedangkan variabel yang terdiri dari dua variabel menunjukkan efek interaksi antara dua variabel. Variabel yang berpangkat dua menunjukkan efek kuadrat terhadap hasil. Nilai p digunakan untuk mengetahui signifikan atau tidaknya masing-masing variabel. Semakin kecil nilai p, semakin signifikan harga koefisiennya dan semakin berperan terhadap hasil yang diperoleh.

Hipotesis yang digunakan untuk uji koefisien regresi secara individu adalah sebagai berikut:

- H<sub>0</sub>: Variabel bebas tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap respon apabila nilai  $p \geq 5\%$   
 H<sub>1</sub>: Variabel bebas memberikan pengaruh signifikan terhadap respon apabila nilai  $p < 5\%$

Pada Tabel 5 variabel agitasi, pH, agitasi\*agitasi dan pH\*pH memiliki nilai p lebih kecil dari  $\alpha = 0,05$  menunjukkan variabel-variabel tersebut memiliki pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim glukoamilase. Sedangkan, variabel agitasi\*pH memiliki nilai p lebih besar dari  $\alpha = 0,05$  menunjukkan variabel tersebut tidak memiliki pengaruh yang terlalu signifikan terhadap aktivitas enzim glukoamilase.

Variabel pH merupakan variabel yang memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap aktivitas enzim glukoamilase yang ditandai memiliki nilai koefisien yang lebih besar dibandingkan dengan variabel agitasi\*agitasi dan pH\*pH yang memiliki nilai koefisien yang lebih rendah. Selain itu, meskipun koefisien agitasi relative kecil, namun skala perubahan agitasi cukup besar sehingga perubahan agitasi yang sedikit dapat berpengaruh besar terhadap respon.

### Uji Koefisien Determinasi (R<sup>2</sup>)

R square (R<sup>2</sup>) atau kuadrat R menunjukkan koefisien determinasi, nilainya berkisar 0 - 1 (0 - 100%). Semakin kecil nilai R<sup>2</sup> berarti hubungan antara variabel bebas semakin lemah sebaliknya jika R<sup>2</sup> semakin mendekati 1, maka hubungan antara variabel bebas semakin kuat. Atau dengan kata lain variabel-variabel bebas memberikan semua informasi yang dibutuhkan untuk memprediksi variabel-variabel tidak bebas.

**Tabel 6.** Uji koefisien determinasi terhadap model

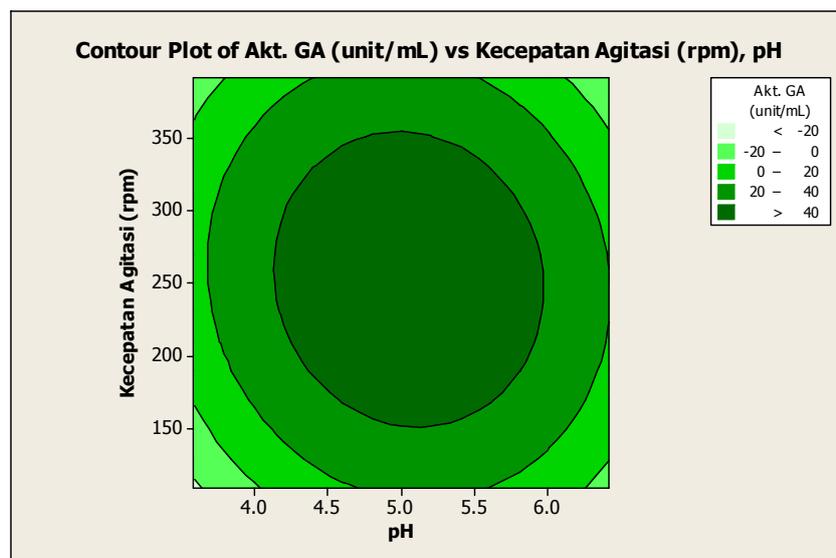
R-Sq	R-sq (pred)	R-Sq (adj)
93,89%	88,04%	89,53%

Dari nilai R<sup>2</sup> dapat disimpulkan bahwa nilai yang diperkirakan dengan model mendekati nilai yang diperoleh dari hasil percobaan. Dengan nilai R<sup>2</sup> dapat diketahui keakuratan model.

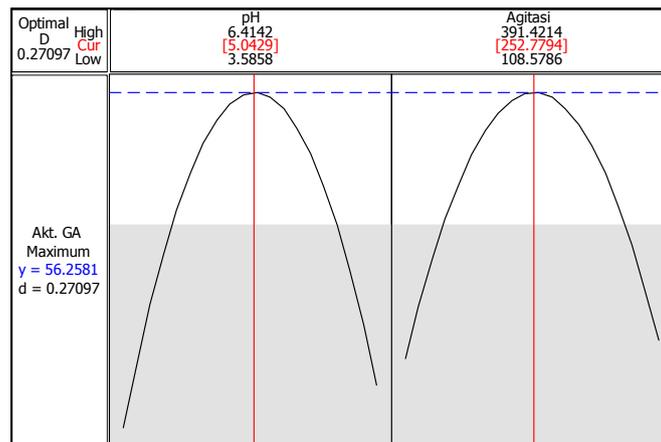
Pada Tabel 6 Nilai model (R<sup>2</sup>) yang didapat dari uji koefisien determinasi yaitu 93,89% atau 0,9389. Nilai tersebut menunjukkan model polinomial orde kedua memenuhi persamaan. Nilai tersebut juga menunjukkan pengaruh variabel bebas agitasi dan pH terhadap produksi enzim glukoamilase sebesar 93,89% atau terdapat 6,11 % pengaruh variabel bebas lainnya yang tidak dimasukkan dalam model atau variabel tidak bebas.

### Kondisi Optimum Produksi Enzim Glukoamilase

Optimisasi dilakukan untuk mendapatkan nilai optimum dari model yang telah dibuat. Respon dari model regresi yang diperoleh dapat ditampilkan pada contour plot (Gambar 4) untuk melihat lebih jelas bentuk response surface method dari titik-titik unit percobaan.



**Gambar 4.** Contour Plot dan aktivitas enzim glukoamilase terhadap variasi agitasi dan pH



**Gambar 5.** Prediksi kondisi optimum agitasi dan pH terhadap aktivitas glucoamilase

Gambar 4 menunjukkan bahwa aktivitas enzim glucoamilase makin tinggi apabila pH berada diantara level 4,5 dan 5,0 dan agitasi mendekati level 250 rpm. Penelitian Ueda & Saha (1983) menunjukkan aktivitas amilolitik tertinggi pada pH 6,0 sedangkan Arzita & Agustien (2013) melaporkan bahwa amilase dapat diproduksi mulai dari agitasi 100 sampai 200 rpm dengan aktivitas tertinggi dihasilkan pada 150 rpm. Hal ini serupa dengan hasil penelitian ini bahwa produksi enzim sangat rendah pada agitasi tinggi dikarenakan pada agitasi ini kecepatan pengocokan sangat cepat sehingga terbentuk buih yang sangat banyak pada medium. Banyak buih yang terbentuk memberikan efek terhadap sel mikroorganisme sehingga produksi enzim menjadi rendah, sedangkan perbedaan kondisi pH produksi enzim glucoamilase diduga disebabkan perbedaan suhu fermentasi dan komposisi nutrisi yang ada dalam media sehingga berpengaruh terhadap pertumbuhan ragi.

Gambar 5 menunjukkan prediksi agitasi dan pH optimum terhadap aktivitas enzim glucoamilase berada pada nilai 250 rpm dan 5. Aktivitas glucoamilase yang diprediksi yaitu 56,26 unit/mL. Kondisi tersebut menandakan bahwa aktivitas enzim glucoamilase tertinggi dicapai ketika nilai agitasi dan pH berturut-turut yaitu 250 rpm dan 5. Jika kedua nilai tersebut lebih tinggi maka tidak dapat menghasilkan aktivitas enzim glucoamilase lebih besar dari aktivitas enzim glucoamilase pada kondisi agitasi dan pH optimum yang diprediksi.

**Tabel 7.** Pengujian eksperimental model pada titik optimum

Kondisi	Variabel Percobaan		Respon
	Agitasi (rpm)	pH	Aktivitas Unit (U/mL)
Center point	250	5,0	56,20
Optimum	250	5,0	56,26
Eksperimen	250	5,0	67,65
			67,13
			64,26

Kesesuaian model dengan hasil penelitian diuji untuk mengetahui kebenaran model. Uji verifikasi model dilakukan pada kondisi optimum dengan tiga kali replikasi. Tabel 7 menunjukkan perbedaan aktivitas enzim glucoamilase berdasarkan hasil eksperimen dengan prediksi model RSM Hasil uji verifikasi.

Persamaan model (1) terhadap aktivitas enzim glucoamilase sebagai fungsi dua variabel yaitu agitasi dan pH digunakan untuk mencari titik optimum dari produksi enzim glucoamilase. Pada Tabel 7 perhitungan nilai aktivitas enzim glucoamilase pada center point yaitu sebesar 56,26 unit/mL pada kondisi agitasi 250 rpm dan pH 5,0. Nilai maksimum aktivitas enzim glucoamilase pada persamaan model (1) dicapai pada agitasi 250 rpm dan pH 5. Kondisi optimum yang didapat diverifikasi dengan pengulangan percobaan sebanyak tiga kali untuk mengetahui model yang sudah dibuat tepat atau belum. Hasil pengulangan percobaan didapat aktivitas enzim glucoamilase sebesar 67,65; 67,13; 64,26 unit/mL dengan rata-rata sebesar 63,34 unit/mL. Nilai aktivitas enzim glucoamilase optimum dengan nilai aktivitas enzim glucoamilase yang diuji kembali dengan tiga kali pengulangan jauh berbeda. Ini menandakan model yang dibuat memiliki kesalahan sebesar ~20% berdasarkan selisih nilai aktivitas glucoamilase rata-rata dari percobaan dengan nilai aktivitas glucoamilase dari kondisi optimum.

## KESIMPULAN

Sumber karbon terbaik untuk menghasilkan aktivitas glucoamilase yang tinggi pada media produksi dengan menggunakan ragi *S. fibuligera* R64 adalah tepung beras.

Berdasarkan hasil RSM, kondisi optimum untuk produksi glucoamilase adalah pada agitasi dan pH optimum berturut-turut yaitu 250 rpm dan 5, dengan aktivitas glucoamilase yang dapat dihasilkan sebesar 63,34 unit/mL.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arzita, A. & Agustien, A. (2013). Potensi *Bacillus* sp. PA-05 termofilik obligat untuk produksi amilase. Prosiding SEMIRATA 2013. pp. 85-89.
- Hasan, K., Ismaya, W.T., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Subroto, T. & Soemitro, S. (2008). Proteolysis of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: characterization of digestion products. *Biologia*. 63(6): 1044-1050.
- Hidayat, N., Padaga, M.C. & Suhartini, S. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Andi Publisher. Yogyakarta.
- Hostinová, E. (2002). Amylolytic enzymes produced by the yeast *Saccharomycopsis fibuligera*. *Biologia Bratislava*. 57(Sup/2): 247-252.
- Hostinová, E., Janeček, Š. & Gašperík, J. (2010). Gene sequence, bioinformatics and enzymatic characterization of  $\alpha$ -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* KZ. *The Protein Journal*. 29(5): 355-364.
- Ishmayana, S., Kamara, D.S., Rachman, S.D., Kardi, I. & Fadhlillah, M. (2008) Amylase production from the yeast *Saccharomycopsis fibuligera* and its potency for glucose production from raw starch. Proceeding of The International Seminar on Chemistry 2008. pp. 688-691.
- Ismaya, W.T., Hasan, K., Kardi, I., Zainuri, A., Rahmawaty, R.I., Permahadi, S., El Viera, B.V., Harinanto, G., Gaffar, S., Natalia, D. & Subroto, T. (2013). Chemical modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64  $\alpha$ -amylase to improve its stability against thermal, chelator, and proteolytic inactivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 170(1): 44-57.
- Kumar, P. & Satyanarayana, T. (2007). Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginat-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresource Technology*. 98(6): 1252-1259.
- Kumar, P. & Satyanarayana, T. (2009). Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29(3): 225-255.
- Luo, H., Liu, H., He, Z., Zhou, C. & Shi, Z. (2015). Efficient and cost-reduced glucoamylase fed-batch production with alternative carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25(2): 185-195.
- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons. New York.
- Natalia, D., Vidilaseris, K., Satrimafitrah, P., Ismaya, W., Permentier, H., Fibriansah, G., Puspasari, F., Nurachman, Z., Dijkstra, B. & Soemitro, S. (2011). Biochemical characterization of a glucoamylase from *Saccharomycopsis fibuligera* R64. *Biologia*. 66(1): 27-32.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*. 41(3), 711-753.
- Safari, A., Rahayu, I. & Supratman, U. 1996. Produksi enzim  $\alpha$ -amilase dari *Aspergillus oryzae*. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Soemitro, S., Bahti, H.H., Adi, T.P., Thaurhesia, S., Hardjito, L., Niloperbowo, W. & Wenten I.G. (1996). Produksi enzim pemecah pati. Laporan RUT I. Kementrian Riset dan Teknologi.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*. 195: 19-23.
- Suhartono, M.T. (1989). *Enzim dan Bioteknologi*. PAU Bioteknologi IPB. Bogor.
- Ueda, S. & Saha, B.C. (1983). Behaviour of *Endomycopsis fibuligera* glucoamylase towards raw starch. *Enzyme and Microbial Technology*. 5(3): 196-198.
- Wang, Q., Wang, X., Wang, X. & Ma, H. (2008). Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 43(3): 280-286.
- Wiseman, A. (1985). *Handbook of Enzyme Biotechnology*. Ellis Horwood. London.