

VOLUME 7

ISSUE 1

JANUARY – JUNE 2019

Al-Kimia

Pemanfaatan Kompleks Polielektrolit sebagai Matriks untuk Imobilisasi Urease dan Aplikasinya sebagai Membran Biosensor Pemonitoran Hg(II)

Dhony Hermanto, Mudasir, Dwi Siswanta, Bambang Kuswandi

Isolasi dan Karakterisasi Asam Humat dari Tanah Dasar Bendungan Batujai Lombok Tengah NTB

Nurul Ismillayli, Dhony Hermanto

A Natural Dye-Sensitized from Pare (*Bitter Gourd*) Leaves Extracts for Dye-Sensitized Solar Cell (DSSC)

Wahidah Febriya Ramadhani, Aisyah A, Suriani S, Iswadi I

Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol dan N-Heksana Rimpang Temu Kunci (*Kaempferia Pandurata*) dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi Gen *P53* Dan *Bcl-2* Pada Raji *Cell Line*

Peni Lestarini, Endang Astuti, Deni Pranowo

Pengaruh Katalis NiMo Terhadap Kualitas Minyak Batubara Hasil Pencairan Secara Tidak Langsung

Rika Damayanti, Susila Arita R, Fitri Hadiah

Nanokomposit Antibakteri Berbasis Pati dan Nanopartikel Perak (AgNPs)

Ina Ristian

Synthesis of Nitro Ethyl Oleic from Used Cooking Oil

Nasriadi Dali, Arniah Dali

Sifat Fisika Kimia Tanah dan Daya Hambatnya Terhadap Bakteri Air Liur Anjing Liar

Sjamsiah, Arifuddin, Mashuri Masri, Sappewali, Indah Islamiah, Hardiyanti Hamrullah, Elmika Nesti

Aplikasi Mikrosimbiosis Spons Laut Sebagai Biomaterial Pereduksi Toksisitas Logam Berat Kromium

Ismail Marzuki, M. Iksan Ashari, Andi Asdar Marzuki, Anggi Angela

Optimisasi Produksi α -Amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera* R64 dengan Response Surface Method-Central Composite Design (RSM-CCD)

Agus Safari, Ahsanul Chaliqin Gayo, Saadah Diana Rachman, Muhammad Yusuf, Safri Ishmayana

Utilization of Guava Leaves Extract (*Psidium Guajava*) as Ecofriendly Corrosion Inhibitor for Iron

Said Ali Akbar, Rika Ovisa, Muttakin

Jurusan Kimia UIN Alauddin Makassar

p-ISSN: 2302-2736

e-ISSN: 2549-9335



Al-Kimia

EDITOR IN CHIEF

Sjamsiah

MANAGING EDITOR

Ummi Zahra

REVIEWER

Sarifah Fauziah

Suminar Setiati

Irmanida Batubara

Sri Sugiarti

Muharram

Philiphi De Rosari

Desi Harneti Putri Huspa

Ajuk Sapar

Masriany

Asri Saleh

St .Chadijah

Asriyani Ilyas

SECTION EDITOR

Rani Maharani

Iin Novianty

Firnelty

Chusnul Khatimah

Satriani

PUBLISHER

Department of Chemistry

Faculty of Science and Technology

Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

Jl. H. M. Yasin Limpo No. 36 Gowa South Sulawesi Indonesia

E -mail: al-kimia@uin-alauddin.ac.id

Al-Kimia

TABLE OF CONTENT

Pemanfaatan Kompleks Polielektrolit sebagai Matriks untuk Imobilisasi Urease dan Aplikasinya sebagai Membran Biosensor Pemonitoran Hg(II) Dhony Hermanto, Mudasir, Dwi Siswanta, Bambang Kuswandi	1-9
Isolasi dan Karakterisasi Asam Humat dari Tanah Dasar Bendungan Batujai Lombok Tengah NTB Nurul Ismillayli, Dhony Hermanto	10-16
A Natural Dye-Sensitized from Pare (<i>Bitter Gourd</i>) Leaves Extracts for Dye-Sensitized Solar Cell (DSSC) Wahidah Febriya Ramadhani, Aisyah A, Suriani S, Iswadi I	17-24
Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol dan N-Heksana Rimpang Temu Kunci (<i>Kaempferia Pandurata</i>) dan Pengaruhnya Terhadap Ekspresi Gen <i>P53</i> Dan <i>Bcl-2</i> Pada Raji <i>Cell Line</i> Peni Lestari, Endang Astuti, Deni Pranowo	25-32
Pengaruh Katalis NiMo Terhadap Kualitas Minyak Batubara Hasil Pencairan Secara Tidak Langsung Rika Damayanti, Susila Arita R, Fitri Hadiah	33-38
Nanokomposit Antibakteri Berbasis Pati dan Nanopartikel Perak (AgNPs) Ina Ristian	39-45
Synthesis of Nitro Ethyl Oleic from Used Cooking Oil Nasriadi Dali, Arniah Dali	46-55
Sifat Fisika Kimia Tanah dan Daya Hambatnya Terhadap Bakteri Air Liur Anjing Liar Sjamsiah, Arifuddin, Mashuri Masri, Sappewali, Indah Islamiah, Hardiyanti Hamrullah, Elmika Nesti	56-66
Aplikasi Mikrosimbiosis Spons Laut Sebagai Biomaterial Pereduksi Toksisitas Logam Berat Kromium Ismail Marzuki, M. Iksan Ashari, Andi Asdar Marzuki, Anggi Angela	67-75
Optimisasi Produksi α -Amilase dari <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> R64 dengan Response Surface Method-Central Composite Design (RSM-CCD) Agus Safari, Ahsanul Chaliqin Gayo, Saadah Diana Rachman, Muhammad Yusuf, Safri Ishmayana	76-90
Utilization of Guava Leaves Extract (<i>Psidium Guajava</i>) As Ecofriendly Corrosion Inhibitor for Iron Said Ali Akbar, Rika Ovisa, Muttakin	91-99

Optimisasi Produksi α -Amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera* R64 dengan *Response Surface Method-Central Composite Design (RSM-CCD)*

Agus Safari¹, Ahsanul Chaliqin Gayo¹, Saadah Diana Rachman¹, Muhammad Yusuf¹, Safri Ishmayana^{1*}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jln. Raya Bandung-Sumedang km. 21 Jatinangor, Sumedang, Jawa Barat, 45363

Email: ishmayana@unpad.ac.id

Received: May,26,2019/Accepted: June,25,2019

doi: 10.24252/al-kimia.v7i1.8117

Abstract: α -Amilase (EC 3.2.1.1) is an endoamylase that hydrolyze α -1,4 glycosidic bond in amylose and amylopectin molecules yielding simpler carbohydrate. This enzyme is used to replace starch acid hydrolysis in industrial process. α -Amilase is used in many industrial processes including food, paper, bioethanol, and desizing in textile industries. This enzyme can be found in human, plants and microbes. Most industries use microbes due to their flexibility and require less space and time to culture. In the present study we use *Saccharomycopsis fibuligera* R64 since this yeast has high amylolytic activity and known as food borne microorganisms. Extrinsic factors are easy to manipulate in the process of enzyme production. The present study intended to determine the optimum condition for α -amylase production by *S. fibuligera* R64 with agitation speed, pH, and time of incubation as independent variable in the present experiment. The experiment was initiated by rejuvenation of *S. fibuligera* culture, design of experiment using response surface method, analysis of amylase activity, and determination of protein content. The result of the present study showed that optimum condition for amylase production using *S. fibuligera* R64 is at pH, agitation speed and incubation time of 3.82, 156 rpm and 49 hours, respectively. The specific activity achieved was 423.8 U/mg based on Fuwa assay.

Keywords: α -amilase, fermentation, optimization, response surface method, *Saccharomycopsis fibuligera*

1. PENDAHULUAN

Pada aplikasi industri, pati dihidrolisis menggunakan asam untuk mendapatkan produk turunannya. Namun penggunaan asam mulai tergeser dengan penggunaan enzim karena penggunaan asam untuk hidrolisis pati diketahui dapat menyebabkan terbentuknya produk samping yang tidak diharapkan, suhu reaksi yang tinggi dan sifatnya yang non-biodegradable (Wang & Copeland, 2015). Oleh karena itu, industri sudah mulai beralih menggunakan enzim. Enzim bekerja secara spesifik terhadap substrat dan tidak akan mengubah sifat kimia dari pati maupun produk hidrolisis enzim itu sendiri selain itu, enzim bersifat biodegradable sehingga jika digunakan dalam aplikasi industri tidak memakan waktu dan biaya yang besar untuk mengolah limbah yang dihasilkan.

Salah satu enzim yang paling banyak digunakan di industri yaitu enzim α -amilase (EC 3.2.1.1). Menurut van der Maarel et al. (2002), enzim α -amilase adalah enzim endoamilase yang bekerja memecah ikatan α -1,4 glikosidik yang berada didalam rantai amilopektin dan amilosa sehingga produk akhir dari aktivitas hidrolisis ini adalah rantai oligosakarida yang lebih sederhana. Pada tahun 2014, pangsa pasar enzim mencapai US\$ 4,2 miliar dan diperkirakan pada tahun 2020 pangsa pasar enzim mencapai US\$ 6,2 miliar. Enzim α -amilase sendiri mempunyai pangsa pasar sebesar 30%, sehingga dapat diperkirakan pada tahun 2020 enzim ini mempunyai pangsa pasar bernilai US\$ 2 Miliar (Dar et al., 2015; Singh et al., 2016). Tingginya nilai pangsa pasar enzim α -amilase didalam

dunia industri ini karena dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang industri seperti industri bioetanol, industri pangan untuk produksi dekstrin, industri kertas dan proses desizing di industri tekstil. Bahkan menurut data dari Kementerian Perindustrian Republik Indonesia menyebutkan bahwa sepanjang tahun 2017 industri di Indonesia mengimpor enzim dengan jumlah sebesar US\$ 302 Juta. Hal ini sangat disayangkan mengingat Indonesia mempunyai potensi untuk memproduksi enzim α -amilase secara mandiri yang dibuktikan dengan beberapa penelitian yang menggunakan starting material lokal Indonesia seperti ragi *Saccharomycopsis fibuligera* R64. Ragi ini diketahui menghasilkan aktivitas amilolitik yang tinggi. Selain itu diketahui bahwa ragi ini masuk kedalam kategori food-borne (Hasan et al., 2008; Ishmayana et al., 2008)

Penelitian tentang peningkatan aktivitas dan peningkatan produksi enzim α -amilase telah dilakukan tim peneliti Biomolekular Kesehatan dan Pangan, Universitas Padjadjaran. Beberapa penelitian yang sudah dilakukan dengan menggunakan galur ragi *S. fibuligera* R64 yaitu dimulai dari bagaimana potensi enzim α -amilase sebagai pendegradasi pati mentah (Hasan et al., 2008; Ishmayana et al., 2008), modifikasi kimia untuk meningkatkan termostabilitas (Ismaya et al., 2013), penggunaan enzim α -amilase untuk proses hidrolisis ubi sebagai bahan pembuatan roti (Safari et al., 2013; Safari dkk. 2017) dan optimisasi kondisi produksi enzim α -amilase dengan RSM (Sanjivani, 2016). Namun penelitian yang difokuskan untuk meningkatkan produktivitas belum mampu menemukan kondisi produksi enzim α -amilase dengan jumlah dan aktivitas yang tinggi (Sanjivani, 2016). Selain itu, hubungan antar variabel ketika dilakukan fermentasi belum diselidiki. Salah satu cara untuk melakukan optimisasi yaitu dengan menggunakan Response Surface Method (RSM). RSM merupakan teknik statistik untuk mendesain eksperimen, membangun model, mengukur repons, mengevaluasi efek dan hubungan antara faktor variabel dan mencari kondisi optimum untuk bioproses (Dinarvand et al., 2016). Beberapa peneliti telah menggunakan RSM sebagai upaya untuk meningkatkan produktivitas dalam menghasilkan enzim α -amilase. Ahmed et al. (2017) memproduksi enzim α -amilase dari bakteri dan berhasil meningkatkan aktivitas sebesar 10 kali lipat dan didapatkan aktivitas enzim α -amilase sebesar 584,24U/mL. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan RSM sebagai metode statistika untuk melihat bagaimana pengaruh dan interaksi dari ketiga variabel yang diselidiki sehingga kondisi optimum untuk produksi enzim α -amilase oleh ragi *S. fibuligera* R64 dapat diketahui.

2. METODE PENELITIAN

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: autoclave prestige medical series 2100, JEPO TOLEDO shaker, kawat ose, kain kassa, kertas saring, pembakar spiritus, magnetic stirrer, software MINITAB 15, shaking water bath JEPO TOLEDO, spektrofotometer UV-Vis Genesys 10 dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium,

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: agar bacto, amonium sulfat, biakan murni *S. fibuligera* R64, ekstrak ragi, glukosa, bacteriological pepton, kalium dihidrogen fosfat, kuprisulfat pentahidrat, larutan kalium iodida-iodin, magnesium sulfat hepta hidrat, natrium karbonat, natrium hidroksida, natrium-kalium tartrat, asam sitrat, kalium dihidrogen fosfat, dikalium hidrogen fosfat, sagu.

Prosedur Kerja

Preparasi kultur S. fibuligera R64

Kultur ragi *S. fibuligera* ditumbuhkan pada media padat agar miring yang mengandung 3% agar bacto, 1% glukosa, 0,3% kalium dihidrogen fosfat, 0,3% amonium sulfat, 0,5% ekstrak ragi,

0,5% magnesium sulfat hepta hidrat dan 0,5% pepton. Ragi yang telah diremajakan dipindahkan ke dalam media inokulum dengan volume media 50 mL yang berisi 1% pati dan 1% ekstrak ragi. Setelah itu dilakukan fermentasi selama 12 jam dengan kecepatan agitasi 180 rpm pada suhu ruang.

Penentuan konsentrasi substrat dan pelarut terbaik

Untuk menentukan konsentrasi substrat yang digunakan pada proses fermentasi, *S. fibuligera* yang telah ditumbuhkan dalam inokulum, dipindahkan sebanyak 10% (v/v) ke dalam media produksi yang berisi 1% ekstrak ragi dan variasi konsentrasi pati sagu (1; 2; 3%) (b/v). Kemudian media produksi dikocok pada kecepatan 180 rpm dan sampel dari media produksi diambil masing-masing setiap 12 jam dengan waktu inkubasi sampai 96 jam. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya dengan metode Fuwa (1954) dan kadar protein metode Lowry et al. (1951).

Tiga pelarut diuji untuk melihat perubahan pH selama proses fermentasi sehingga dapat ditentukan pelarut mana yang dapat mempertahankan pH selama fermentasi berlangsung. Pelarut yang digunakan adalah air, buffer fosfat 0.1 M pH 4 dan buffer fosfat 0,1 M pH 4. Prosedur yang dilakukan sama dengan penentuan konsentrasi substrat namun dengan konsentrasi substrat yang tetap, yaitu konsentrasi terbaik yang diperoleh dari penentuan konsentrasi substrat terbaik.

Perancangan kondisi produksi enzim α -amilase dengan RSM-CCD

S. fibuligera yang telah diremajakan dipindahkan ke dalam media inokulum yang mengandung 1% pati dan 1% ekstrak ragi. Setelah itu dilakukan fermentasi selama 12 jam dengan kecepatan agitasi 180 rpm pada suhu ruang. Kemudian inokulum *S. fibuligera* dipindahkan ke dalam labu Erlenmeyer 50 mL yang berisi media produksi yang mengandung 1% pati dan 1% ekstrak ragi. Kultivasi dilakukan dengan variasi kecepatan agitasi, pH, dan waktu inkubasi sesuai desain eksperimen RSM pada suhu ruang. Setelah kultivasi, dilakukan uji aktivitas unit enzim. Kisaran dan level variabel percobaan ditunjukkan pada Tabel 1.

Produksi enzim α -amilase

Produksi enzim α -amilase dilakukan pada kondisi kecepatan agitasi x rpm, pH y dan z jam sesuai rancangan Tabel 1. Sebanyak 5 mL media inokulum yang sudah ditumbuhi oleh ragi *S. fibuligera* dimasukkan ke dalam media produksi dalam labu Erlenmenyer yang berisi 50 mL media produksi yang mengandung 1% pati dan 1% ekstrak ragi. Pada proses produksi digunakan penyangga pH sitrat-fosfat 0.1 M pH 4.

Tabel 1. Rancangan eksperimen RSM-CCD untuk produksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan variasi pH, kecepatan agitasi dan waktu fermentasi.

Nomor	Kecepatan Agitasi (rpm)	pH	Waktu (jam)
1	215	5,5	20
2	250	4,5	84
3	215	5,5	60
4	215	5,5	60
5	180	6,5	84
6	250	6,5	84
7	215	3,8	60
8	215	5,5	100
9	180	6,5	36

10	156	5,5	60
11	274	5,5	60
12	215	5,5	60
13	215	5,5	60
14	215	5,5	60
15	250	6,5	36
16	180	4,5	84
17	215	5,5	60
18	250	4,5	36
19	215	7,2	60
20	180	4,5	36

Penentuan aktivitas enzim α -amilase

Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode Fuwa (1954). Sebanyak 0,1 mL enzim ditambah pati terlarut 0,1% (b/v) kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 0,1 mL larutan asam klorida 0,1 N. Kemudian ditambahkan 0,1 mL larutan kalium iodida-iodin (KI 2% dan I₂ 0,2%) dan diencerkan sampai 2 mL. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 600 nm. Untuk kontrol dilakukan pengujian dengan metode yang sama, namun sampel enzim diganti dengan air. Nilai aktivitas dihitung dengan menggunakan persamaan (1).

$$\text{Aktivitas Enzim } \left(\frac{\text{unit}}{\text{mL}}\right) = \frac{(A_k - A_s)}{A_k} \times \frac{100}{10} \times \frac{1}{V_e} \times fp \dots (1)$$

Dengan:

A_k = Serapan kontrol

A_s = Serapan sampel

V_e = Volume enzim yang digunakan (mL)

fp = Faktor pengenceran

100/10 = Berasal dari pengertian 1 unit aktivitas yang menurunkan serapan sebesar 10%

Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim α -amilase yang menyebabkan penurunan intensitas warna biru kompleks iodin-amilosa sebesar 10% pada kondisi uji.

Analisis kadar protein

Pengukuran kadar protein menggunakan metode Lowry *et al.* (1951). Metode ini dibutuhkan pereaksi A, B, C dan D. Pereaksi A dibuat dari larutan natrium karbonat 2% (dalam natrium hidroksida 0,1N), pereaksi B dibuat dari larutan kuprisulfat pentahidrat 0,5% (dalam Natrium-Kalium tartrat 1%), pereaksi C adalah campuran 50 mL pereaksi A dan 1 mL pereaksi B, pereaksi D adalah larutan Follin-Ciocalteu (fosfomolibdat-fosfowolframat).

Sebanyak 0,5 mL larutan standar (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg/mL BSA) ditambahkan 2,5 mL pereaksi C setelah itu dikocok dan didiamkan 10 menit. Kemudian ditambahkan 0,25 mL pereaksi D lalu dikocok dan didiamkan 30 menit. Serapan sampel diukur pada panjang gelombang 750 nm. Selanjutnya dibuat kurva baku protein dengan memplotkan serapan (absorbansi) terhadap

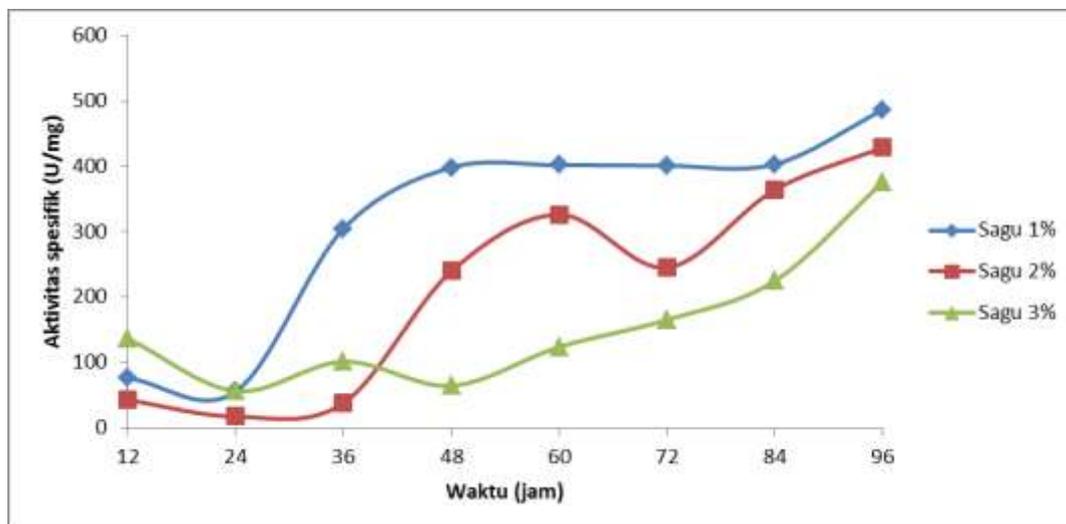
konsentrasi. Sampel diukur dengan prosedur yang sama dan serapan yang diperoleh diplotkan pada persamaan kurva baku untuk mendapatkan nilai konsentrasi sampel.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Konsentrasi Substrat

Proses produksi enzim α -amilase pada penelitian ini menggunakan substrat pati yaitu berupa sagu. Dalam penentuan konsentrasi substrat, variasi yang digunakan yaitu 1; 2 dan 3%. Kemudian dilakukan pengambilan sampel selama 96 jam dengan interval waktu setiap 12 jam pada masing-masing konsentrasi substrat. Setelah itu, sampel dianalisis nilai aktivitasnya α -amilase dengan menggunakan metode Fuwa dan kadar protein dengan metode Lowry. Metode yang dikembangkan oleh Fuwa (1954) merupakan metode untuk menentukan nilai aktivitas unit dari enzim yang berdasarkan pada pengurangan intensitas warna biru sebesar 10% antara kompleks pati-iodium, sedangkan metode yang dikembangkan oleh Lowry et al. (1951) adalah metode analisis kadar protein dari suatu larutan yang dibandingkan dengan protein standar yaitu *Bovine Serume Albumin*.

Pada penelitian ini, hasil analisis aktivitas unit terbaik yang diperoleh pada konsentrasi 1%. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Shandu et al. (1987), Ishmayana et al. (2008) dan Keharom et al. (2016) untuk memproduksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* menggunakan konsentrasi substrat 1%. Pada Gambar 1 ditunjukkan nilai aktivitas spesifik cukup tinggi terdeteksi pada jam ke-96 dengan konsentrasi substrat 1 dan 2% masing-masing dengan nilai aktivitas spesifik sebesar 485,7 U/mg dan 428,5 U/mg. Sedangkan konsentrasi substrat sagu 3% pada jam ke-96 memiliki aktivitas dengan nilai 375,3 U/mg. Penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Ishmayana et al (2008) menghasilkan aktivitas spesifik enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan nilai 305 U/mg.



Gambar 1. Aktivitas spesifik enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan konsentrasi sagu 1, 2 dan 3% sebagai substrat. Pengujian aktivitas enzim dan kadar protein dilakukan pada sampel dengan interval setiap 12 jam.

Perbedaan nilai aktivitas enzim α -amilase dari berbagai konsentrasi substrat dapat disebabkan karena perbedaan banyaknya sumber karbon yang dimetabolisme oleh mikroorganisme yang berujung pada perbedaan kecepatan pembentukan biomassa maupun metabolit primer atau

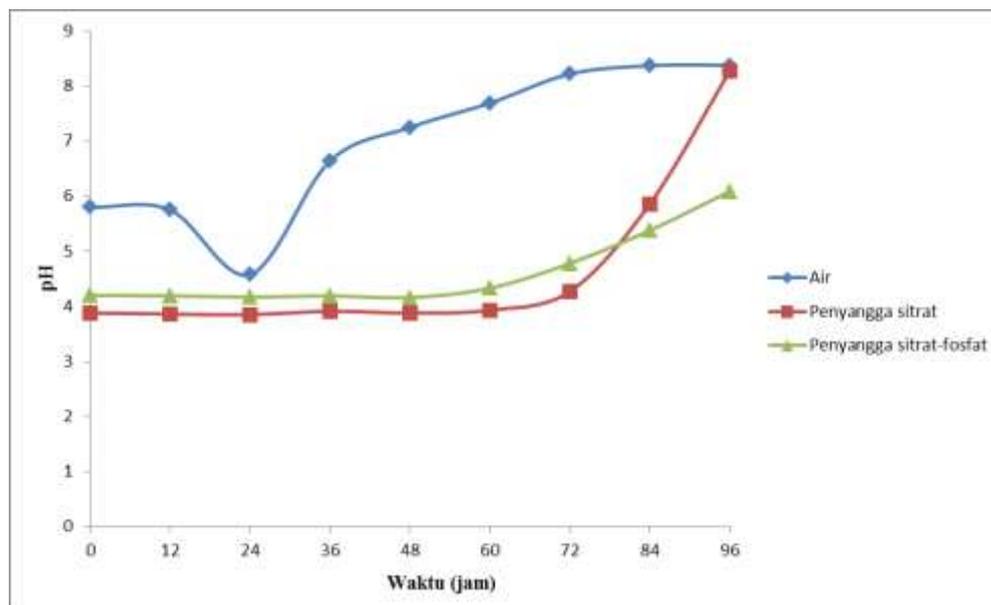
sekunder. Selain itu perbedaan jumlah granul dari pati yang dipecah juga dapat menyebabkan perbedaan nilai aktivitas enzim yang diproduksi (Stanbury et al., 2013).

Dari hasil ini diambil kesimpulan bahwa konsentrasi terbaik yaitu substrat pati sagu 1% karena nilai aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan varian konsentrasi yang lain.

Penentuan larutan untuk media produksi

Pada penelitian pendahuluan ini digunakan air, penyangga sitrat dan fosfat- sitrat. Kedua buffer digunakan karena daerah kerjanya yang mendekati nilai pH yang digunakan pada percobaan sesuai dengan kondisi yang ditunjukkan pada Tabel 1.

Fermentasi dilakukan dengan menggunakan air, penyangga sitrat dan penyangga sitrat-fosfat selama 96 jam yang dicek nilai pHnya dengan interval 12 jam. Hasil yang didapatkan seperti ditunjukkan pada Gambar 2 menunjukkan bahwa pada semua media terdapat penurunan nilai pH menjadi asam pada awal fermentasi. Perubahan nilai pH menjadi asam ini merupakan respon dari *S. fibuligera* yang dapat memproduksi asam organik seperti umumnya mikroorganisme lain yang tumbuh dalam media cair. Hasil ini juga menunjukkan bahwa penyangga pH sitrat tidak dapat mempertahankan pH sebaik larutan penyangga sitrat-fosfat. Penyangga sitrat-fosfat memiliki sistem penyangga yang lebih baik dibandingkan dengan penyangga sitrat.



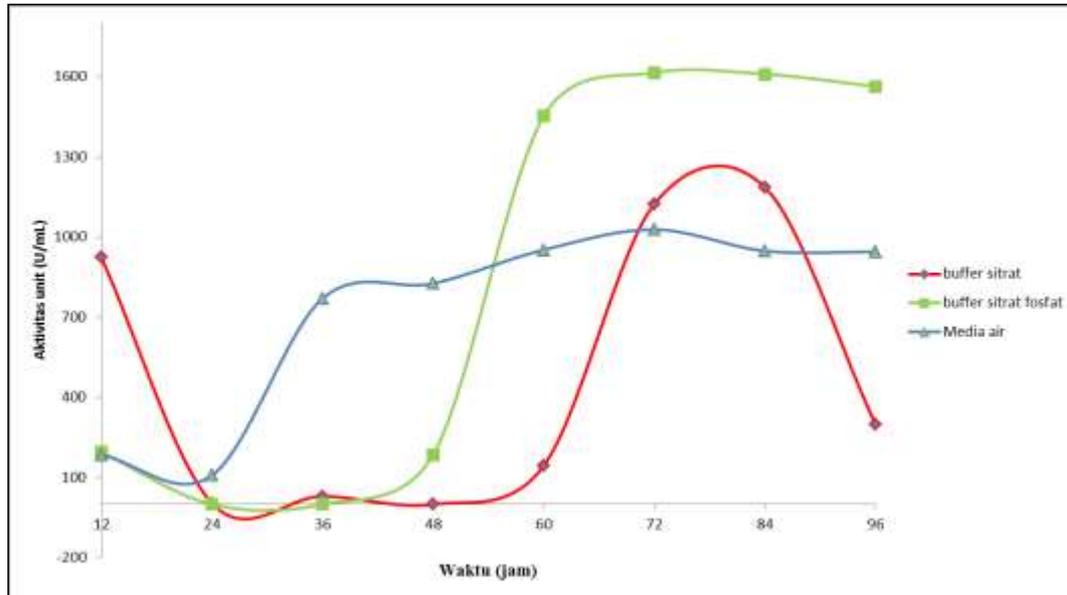
Gambar 2. Perubahan nilai pH media fermentasi dengan pelarut air, penyangga sitrat dan penyangga sitrat-fosfat selama proses fermentasi yang diukur dengan interval waktu setiap 12 jam.

Setelah dilakukan observasi perubahan nilai pH, kemudian dilakukan analisis bagaimana nilai aktivitas yang didapatkan dari media dengan menggunakan larutan penyangga sitrat-fosfat. Hasil analisis ini ditunjukkan pada Gambar 3. Grafik tersebut menunjukkan bahwa penyangga pH sitrat-fosfat dapat menghasilkan enzim α -amilase dengan nilai aktivitas yang lebih baik dibandingkan

dengan penyangga sitrat. Hal ini dapat terjadi karena pada penyangga sitrat-fosfat terdapat gugus fosfat yang dapat dimanfaatkan oleh *S. fibuligera* sebagai sumber nutrisi yang melengkapi nutrisi yang sudah tersedia didalam media fermentasi. Penggunaan penyangga pH sebagai media produksi sebelumnya telah dilakukan oleh Clementi et al. (1980) dengan menggunakan penyangga pH fosfat-hidrogen-ftalat dan penyangga pH fosfat.

Eksperimen RSM-CCD

Penentuan aktivitas spesifik enzim α -amilase dengan menggunakan metode Fuwa (1954) dan Lowry et al. (1951). Hasil analisis aktivitas ditunjukkan pada Tabel 2. Tabel 2 menunjukkan hasil aktivitas tertinggi terdapat pada run order nomor 6 dengan nilai 353,8 U/mg. Pada run order nomor 1 dan 19 tidak menghasilkan aktivitas. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ishmayana *et al.* (2008) menghasilkan aktivitas sebesar 305 U/mg. Running order nomor 6 memiliki pH lingkungan 5,5 hal ini karena ragi ini aktif memproduksi enzim α -amilase pada rentang pH 5-6 (Natalia *et al.*, 2015). Penyebab running order nomor 1 tidak menghasilkan aktivitas adalah karena waktu fermentasi yang singkat yaitu hanya 20 jam sehingga ragi belum menghasilkan enzim α -amilase dengan nilai yang baik. Diketahui bahwa enzim α -amilase dengan nilai aktivitas yang baik dari *S. fibuligera* mulai diproduksi saat fermentasi pada jam ke-36. Sedangkan pada running order nomor 19 penyebab tidak adanya aktivitas enzim adalah karena *S. fibuligera* tidak tumbuh optimum pada fermentasi pH 7,1-7,2 seperti yang dilaporkan oleh Clementi et al. (1980).



Gambar 3. Aktivitas enzim α -amilase yang dihasilkan selama 96 jam fermentasi dengan menggunakan pelarut berbeda yaitu air, penyangga sitrat dan penyangga sitrat-fosfat.

Tabel 2. Nilai aktivitas spesifik enzim α -amilase dari *S. fibuligera* dengan rancangan RSM

Run order	Kecepatan Agitasi (rpm)	pH	Waktu (jam)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
-----------	-------------------------	----	-------------	---------------------------

1	215	5,50	20	0
2	250	4,50	84	344,1
3	215	5,50	60	248,3
4	215	5,50	60	152,2
5	180	6,50	84	212,2
6	250	6,50	84	353,8
7	215	3,82	60	316,9
8	215	5,50	100	17,9
9	180	6,50	36	10,1
10	156	5,50	60	269,3
11	274	5,50	60	17,2
12	215	5,50	60	263,6
13	215	5,50	60	154,4
14	215	5,50	60	195,8
15	250	6,50	36	16,2
16	180	4,50	84	250,7
17	215	5,50	60	193,7
18	250	4,50	36	217,2
19	215	7,18	60	0
20	180	4,50	36	157,1

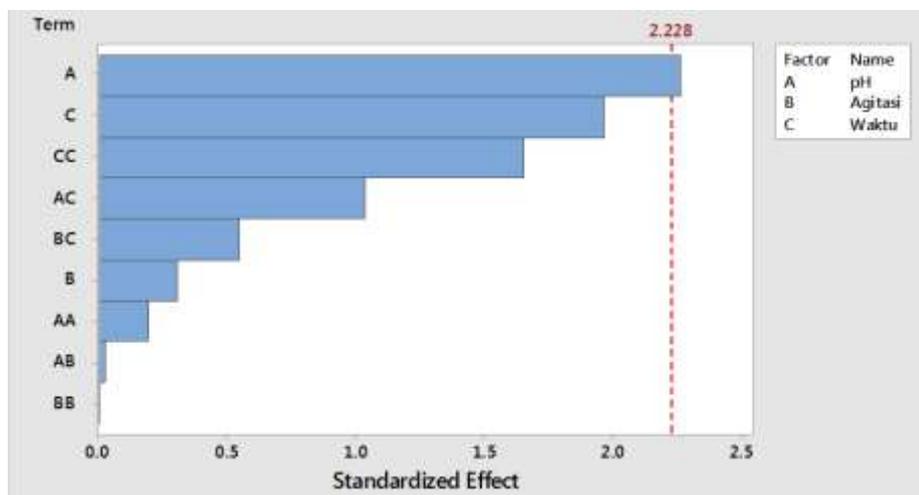
Analisis data hasil RSM

Data yang didapat setelah dilakukan analisis aktivitas kemudian dimasukkan kedalam perangkat lunak MINITAB 15. Setelah itu didapat tabel ANOVA seperti pada Tabel 3. Berdasarkan data tersebut, dapat dilihat bahwa dengan menggunakan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) variabel pH memiliki pengaruh yang paling signifikan terhadap respon (aktivitas enzim yang dihasilkan). Namun variabel waktu fermentasi dan agitasi tidak memiliki signifikansi yang tinggi karena nilai- $p > 0,05$. Data ini didukung dengan adanya Gambar 3 yang menunjukkan grafik pareto. Grafik pareto menyatakan adanya signifikansi yang berarti jika grafik batang dari variabel menembus nilai signifikansi (ditandai dengan garis warna merah) namun jika tidak maka variabel tidak signifikan. Berdasarkan Gambar 4 maka diketahui bahwa hanya variabel pH yang memiliki signifikansi yang tinggi terhadap proses fermentasi, sedangkan interaksi agitasi*agitasi memiliki pengaruh yang sangat rendah bahkan nilainya sangat tidak mempengaruhi hasil fermentasi. Hal ini ditunjukkan pada hasil tabel ANOVA dengan nilai- p sebesar 0,999 dan grafik efek pareto menyentuh nilai nol (Iriawan & Astuti, 2006). Nilai pH mempengaruhi permeabilitas dari membran sel untuk menyerap nutrisi sehingga pH akan sangat berpengaruh terhadap produksi enzim α -amilase (Sánchez et al., 1997).

Tabel 3. Hasil ANOVA variabel dalam fermentasi dengan variabel kecepatan agitasi, pH dan waktu inkubasi

Sumber	DB	Adj SS	Adj MS	Nilai-F	Nilai-P
Model	9	157913	17545,9	1,48	0,274
Linear	3	107491	35830,2	3,02	0,08
pH	1	60630	60629,8	5,12	0,047
Agitasi	1	1103	1103,5	0,09	0,767
Waktu	1	45757	45757,4	3,86	0,078

Kuadratik	3	34127	11375,6	0,96	0,449
pH*pH	1	425	425,4	0,04	0,854
Agitasi*Agitasi	1	0	0	0	0,999
Waktu*Waktu	1	32413	32412,9	2,73	0,129
Interaksi dua arah	3	16295	5431,8	0,46	0,717
pH*Agitasi	1	4	4,2	0	0,985
pH*Waktu	1	12729	12729,5	1,07	0,324
Agitasi*Waktu	1	3562	3561,7	0,3	0,596
Kesalahan	10	118514	11851,4		
<i>Lack-of-Fit</i>	5	107724	21544,8	9,98	0,012
Kesalahan murni	5	10790	2158		
Total	19	276427			



Gambar 4. Grafik pareto yang menyatakan signifikansi variabel terhadap respon aktivitas spesifik menggunakan software MINITAB 15. Variabel pH memiliki nilai lebih besar dari standar (2,228) menunjukkan bahwa variabel pH memiliki signifikansi yang tinggi dibandingkan variabel lain.

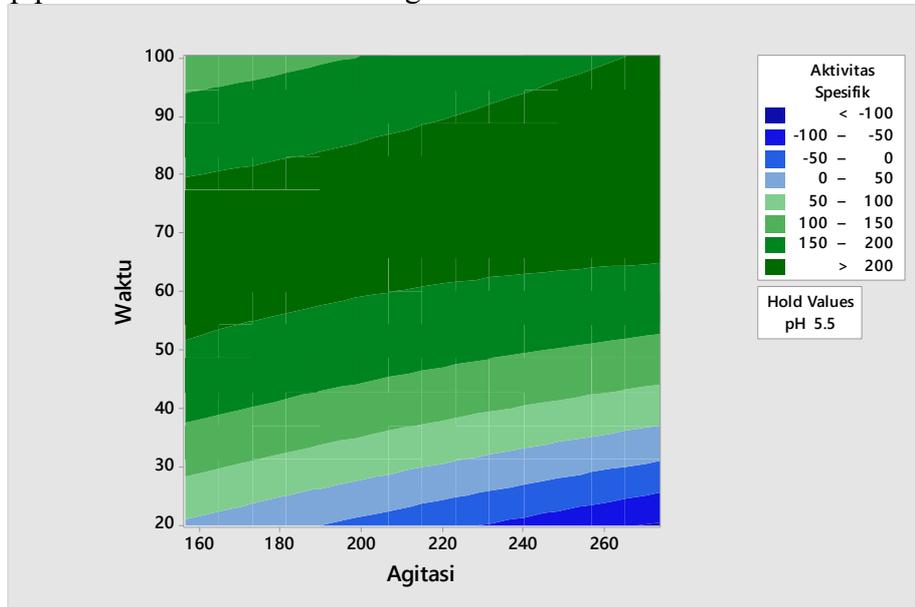
Dari data eksperimen yang ditunjukkan pada Tabel 2 kemudian ditentukan persamaan matematis yang merupakan hubungan antara respon (aktivitas spesifik enzim) dengan variabel bebas pada percobaan ini (kecepatan agitasi, pH dan waktu inkubasi). Persamaan matematis yang ditunjukkan pada persamaan (2).

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas spesifik (unit/mg)} = & 1193 - 222 \text{ pH} - 1,7 \text{ Agitasi} - 2,2 \text{ Waktu} + 5,4 \\ & \text{pH} * \text{pH} + 0,0000 \text{ Agitasi} * \text{Agitasi} - 0,0823 \text{ Waktu} * \text{Waktu} - 0,02 \text{ pH} * \text{Agitasi} + \dots (2) \\ & 1,66 \text{ pH} * \text{Waktu} + 0,0251 \text{ Agitasi} * \text{Waktu} \end{aligned}$$

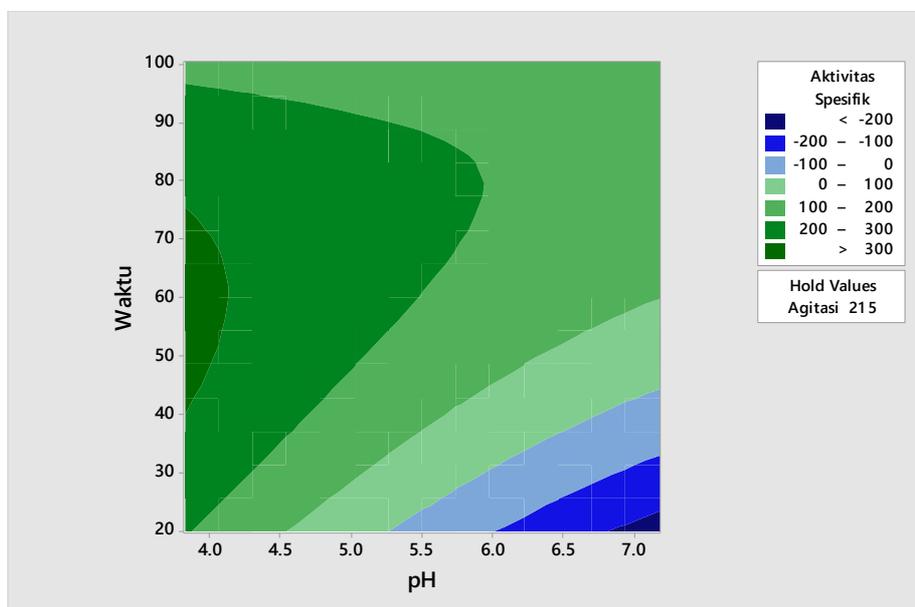
Tabel 3 yang menunjukkan bahwa agitasi dan waktu fermentasi tidak mempunyai peran yang signifikan dalam fermentasi. Berbeda halnya dengan variabel dimana pH akan menghasilkan aktivitas spesifik yang nilainya tinggi jika berada direntang pH 4-6. Hasil interaksi ini diperkuat oleh grafik *contour plot* yang ditunjukkan pada Gambar 5, Gambar 6 dan Gambar 7.

Berdasarkan Gambar 5, interaksi antara waktu fermentasi dengan agitasi tidak dapat menghasilkan aktivitas spesifik yang nilainya tinggi. Nilai maksimal antar interaksi dua variabel tersebut adalah >200 U/mg. Interaksi antar agitasi dengan waktu fermentasi optimum pada kecepatan 160-260 rpm dengan waktu fermentasi 50-100 jam, sedangkan pada Gambar 6, interaksi

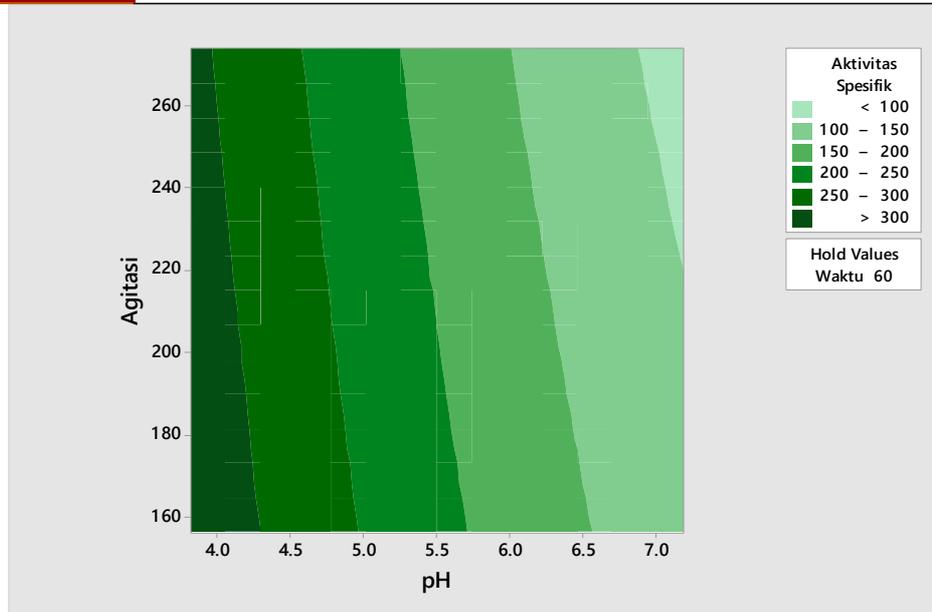
antara pH dengan waktu fermentasi dapat menghasilkan aktivitas dengan nilai >300 U/mg pada kondisi pH 4 dan waktu fermentasi 40-75 jam. Kemudian pada Gambar 7, interaksi antara pH dengan agitasi dapat mencapai aktivitas sebesar >300 U/mg pada pH 4 dan agitasi 160-260. Grafik *contour plot* menguatkan kesimpulan dari Tabel 3 bahwa hanya pH yang memiliki signifikansi yang tinggi terhadap proses fermentasi untuk menghasilkan enzim α -amilase.



Gambar 5. *Contour plot* antara waktu dengan kecepatan agitasi. Hasil analisis menunjukkan interaksi waktu*agitasi mencapai nilai maksimum pada rentang 50-100 jam dan agitasi pada 160-260 rpm.



Gambar 6. *Contour plot* antara pH dengan waktu fermentasi. Hasil interaksi pH*waktu menunjukkan nilai aktivitas maksimum pada jam ke-40 sampai dengan jam ke-75 dengan nilai pH 4



Gambar 7. *Contour plot* antara pH dengan agitasi. Hasil interaksi pH*agitasi mencapai nilai aktivitas maksimum pada pH 4 dan kecepatan agitasi 160-260 rpm.

Penentuan Kondisi Optimum dan Validasinya

Berdasarkan pada persamaan (2), dihasilkan suatu prediksi nilai aktivitas spesifik enzim α -amilase yang ditunjukkan pada Tabel 4. Perbedaan nilai aktivitas spesifik yang dilakukan dengan eksperimen dan dengan prediksi model RSM dapat terjadi karena beberapa faktor seperti perbedaan jumlah sel ragi pada awal fermentasi, perbedaan terbentuknya busa pada saat proses fermentasi kemudian faktor-faktor eksternal lain yang tidak dikontrol.

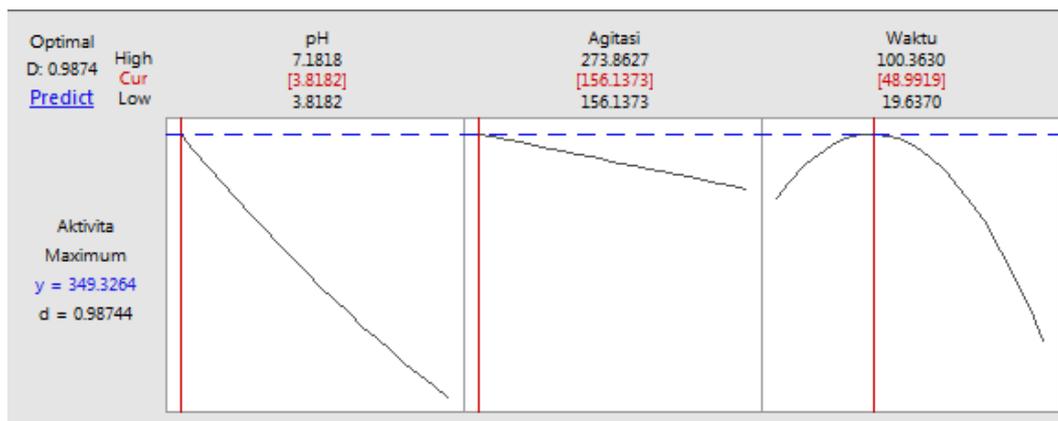
Selanjutnya dilakukan optimisasi kondisi optimum produksi enzim α -amilase sesuai dengan hasil analisis dengan perangkat lunak Minitab 15 seperti ditunjukkan pada Gambar 8 yaitu pada pH 3,82 dengan kecepatan agitasi sebesar 156 rpm selama 49 jam.

Hasil validasi model ketika dilakukan fermentasi dapat dilihat pada Tabel 5. Dari data tersebut aktivitas spesifik dari enzim α -amilase mengalami peningkatan hingga nilainya mencapai 423,8 U/mg. Hasil optimisasi ini menaikkan aktivitas dari center point mencapai 2,23 kali lebih besar.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi optimum produksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 tercapai pada pH 3,82 sesuai dengan yang diungkapkan oleh Clementi et al. (1980) dan Sandhu et al. (1987), dimana kedua peneliti tersebut menyimpulkan pH optimum untuk produksi enzim α -amilase berada pada rentang pH 4-5,5 dan mengalami penurunan ketika memasuki pH 6,5. Selain itu, kecepatan agitasi optimum diperoleh pada kecepatan 156 rpm. Seperti yang dilaporkan oleh Arzita & Agustien (2013) dan Tanyildizi et al. (2005) bahwa amilase dapat diproduksi pada kecepatan 100-200 rpm dimana enzim diproduksi secara maksimal pada kecepatan 150 rpm.

Tabel 4. Hasil prediksi aktivitas spesifik yang dibandingkan dengan aktivitas spesifik hasil eksperimen

Run order	Aktivitas spesifik Hasil eksperimen (U/mg)	Aktivitas spesifik Prediksi RSM (U/mg)
1	0	0
2	344,2	244,9
3	248,3	189,5
4	152,2	189,5
5	212,2	169,1
6	353,8	188,6
7	316,9	317,9
8	17,9	154,3
9	10,1	13,9
10	269,4	207,4
11	17,2	171,6
12	263,6	189,5
13	154,4	189,5
14	195,8	189,5
15	16,2	0
16	250,7	222,6
17	193,7	189,5
18	217,2	164,8
19	0	91,6
20	157,1	226,9

**Gambar 8.** Kondisi optimum untuk produksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan variabel pH, waktu dan agitasi menggunakan software MINITAB 15. Kondisi optimum yang didapat yaitu pada pH 3,82 dengan kecepatan agitasi 156 rpm selama 49 jam.

Tabel 5. Hasil validasi model aktivitas spesifik enzim α -amilase

Kondisi	Variabel Percobaan			Respon
	Agitasi (rpm)	pH	Waktu (jam)	Aktivitas Spesifik (U/mg)
<i>Center point</i>	215	5,50	60	189,5
Prediksi model RSM	156	3,82	49	349,3
Eksperimen	156	3,82	49	462,6
				378,5
				444,1
				410,2
Rata-rata				432,8

4. PENUTUP

Kesimpulan

Pada penelitian ini kesimpulan yang didapat adalah kondisi optimum untuk produksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan metode batch menggunakan RSM-CCD adalah dengan kecepatan agitasi 156 rpm pada pH 3,82 dengan waktu selama 49 jam. Hasil aktivitas spesifik enzim α -amilase yang diperoleh sebesar 432,8 U/mg yang meningkat sebesar 2,3 kali dari *center point*.

Saran

Perlu dilakukan produksi enzim α -amilase dari *S. fibuligera* R64 dengan menggunakan RSM-CCD untuk skala produksi fermentor. Selain itu perlu diselidiki pengaruh faktor-faktor lain seperti suhu dan aerasi terhadap enzim yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, S.A., Mostafa, F.A., Helmy, W.A., & Abdel-Naby, M.A. (2017). Improvement of Bacterial - α -amylase Production and Application Using Two Steps Statistical Factorial Design. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **10**, 224–233.
- Arzita & Agustien, A. (2013). Potensi Bacillus sp. PA-05 Termofilik Obligat Untuk Produksi Amilase. *Prosiding SEMIRATA 2013*. **1**(1), 85–90.
- Clementi, F., Rossi, J., Costamagna, L., & Antonie, E. (1980). Production of Amylase(s) by *Schwanniomyces castellii* and *Endomycopsis fibuligera*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **46**(4), 399–405.
- Dar, G.H., Kamili, A.N., Nazir, R., Bandh, S.A., Jan, T.R., & Chishti, M.Z. (2015). Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis*. **88**, 10–15.
- Dinarvand, M., Malahat, R., & Foroughi, M. (2016). Optimizing culture conditions for production of intra and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 by response surface methodology (RSM). *Brazilian Journal of Microbiology*. **48**, 427–441.
- Fuwa, H. (1954). A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. *Journal of Biochemistry*. **41**(5), 583–603.

- Hasan, K., Tirta Ismaya, W., Kardi, I., Andiyana, Y., Kusumawidjaya, S., Ishmayana, S., Subroto, T., & Soemitro, S. (2008). Proteolysis of α -amylase from *Saccharomycopsis fibuligera*: Characterization of digestion products. *Biologia*. **63**(6), 1044–1050.
- 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. In *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*. pp. 688–691.
- Ismaya, W.T., Hasan, K., Kardi, I., Zainuri, A., Rahmawaty, R.I., Permanahadi, S., El Viera, B.V., Harinanto, G., Gaffar, S., Natalia, D., Subroto, T., & Soemitro, S. (2013). Chemical Modification of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase to Improve Its Stability Against Thermal, Chelator, and Proteolytic Inactivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **170**(1), 44–57.
- Keharom, S., Mahachai, R., & Chanthai, S. (2016). The Optimization Study of α -Amylase Activity Based on Central Composite Design-Response Surface Methodology by Dinitrosalicylic Acid Method. *International Food Research Journal*. **23**(1), 10–17.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Randall, R.J., & Lewis, A. (1951). Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**(1), 265–275.
- Natalia, D., Vidilaseris, K., Ismaya, W.T., Puspasari, F., Prawira, I., Hasan, K., Fibriansah, G., Permentier, H.P., Nurachman, Z., Subroto, T., Dijkstra, B.W., & Soemitro, S. (2015). Effect of introducing a disulphide bond between the A and C domains on the activity and stability of *Saccharomycopsis fibuligera* R64 α -amylase. *Journal of Biotechnology*. **195**, 8–14.
- Safari, A., Kamara, D.S., Silalahi, F., Fadhlillah, M., Kardi, I., & Ishmayana, S. (2013). Partial Hydrolysis of Purple Sweet Potato Flour by Amylase from *Saccharomycopsis fibuligera* and Its Application for Composite Breadmaking. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. **2**(5), 2340–2343.
- Safari, A., Ishmayana, S., Aini, S.Q., Rachman, S.D., Yusuf, M., Fadhlillah, M., Wulandari, E. & Idar. (2017). Penggunaan Enzim α -Amilase dari *Saccharomycopsis fibuligera* R64 untuk Peningkatan Kualitas Roti Komposit Terigu-Ubi Jalar Ungu. *Al-Kimia*. **5**(2), 193-207.
- Sánchez, S., Bravo, V., Castro, E., Moya, A.J., & Camacho, F. (1997). The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**(5), 355–360.
- Sandhu, D.K., Vilku, K.S., & Soni, S.K. (1987). Production of α -Amylase by *Saccharomycopsis fibuligera* (Syn. *Endomycopsis fibuligera*). *Journal of Fermentation Technology*. **65**(4), 387–394.
- Sanjivani, F. (2016). *Optimisasi Produksi Enzim α -Amilase Dari Saccharomycopsis fibuligera dengan Variasi Agitasi dan pH Menggunakan Response Surface Method*. Skripsi. Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P.K. (2016). Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. *3Biotech*. **6**, 174.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., & Hall, S.J. (2013). *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth-Heinemann. New York.

- Tanyildizi, M.S., Özer, D., & Elibol, M. (2005). Optimization of α -amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*. **40**(7), 2291–2296.
- van der Maarel, M.J.E.C., van der Veen, B., Uitdehaag, J.C.M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. **94**(2), 137–155.
- Wang, S. & Copeland, L. (2015). Effect of acid hydrolysis on starch structure and functionality: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **55**(8), 1081–1097.