



## **OPTIMASI PERMUKAAN RESPON MEDIUM FERMENTASI *Streptomyces prasinopilosus* SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP PATOGEN *Ganoderma boninense***

### **Response Surface Optimization of Medium Fermentation for *Streptomyces prasinopilosus* as An Antifungal against *Ganoderma boninense***

**Rofiq Sunaryanto\*, Diana Nurani**

Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Gd. 611 Laptiab BPPT  
PUSPIPTEK Setu, Tangerang Selatan, Banten 15314

\*Email: [rofiqsn@gmail.com](mailto:rofiqsn@gmail.com)

#### **ABSTRACT**

*Ganoderma boninense* is one of the pathogenic fungi that cause basal stem rot (BPB) on oil palm plants. This research aims to study the effect of carbon sources, nitrogen sources, and minerals on the production of *Streptomyces prasinopilosus* active compounds. Lactose, yeast extract, and minerals are medium components that show a real influence on the production of *S. prasinopilosus* active compounds. Optimization of the factors that have significant influence was predicted by the second-order model, statistically through a central composite design (CCD). The highest *S. prasinopilosus* active compound production, with a medium composition of 44.77 g L<sup>-1</sup> lactose, 13.02 g L<sup>-1</sup> yeast extract, and 15.95 mL L<sup>-1</sup> mineral solution, was predicted by the quadratic model to reach 32269366.338 peak area unit (PAU) on high-performance liquid chromatography (HPLC). The verification of the mathematical model of the production of the active compounds through experiments in the laboratory was 27,203,907.310 PAU. This result was 15.7% lower compared to the result of the quadratic model. Optimization increased *S. prasinopilosus* active compound 9-fold compared to that before optimization.

**Keywords:** active compound, *G. boninense*, optimization, RSM, *S. prasinopilosus*

#### **ABSTRAK**

*Ganoderma boninense* merupakan salah satu jamur patogen yang menyebabkan penyakit busuk pangkal batang atau biasa disebut BPB pada tanaman kelapa sawit. Penelitian bertujuan mempelajari pengaruh sumber karbon, sumber nitrogen, dan mineral terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Laktosa, yeast extract, dan mineral adalah komponen medium yang menunjukkan pengaruh nyata terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Optimasi terhadap faktor yang berpengaruh nyata diprediksi dengan model orde dua melalui rancangan statistis *central composite design* (CCD). Produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* tertinggi diprediksi oleh model kuadratik mencapai 32.269.366,338 satuan luasan puncak (PAU) kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan komposisi medium laktosa 44,77 g L<sup>-1</sup>, yeast extract 13,02 g L<sup>-1</sup>, dan larutan mineral 15,95 mL L<sup>-1</sup>. Verifikasi model matematis produksi senyawa aktif yang dihasilkan melalui percobaan di laboratorium adalah sebesar 27203907,310 PAU. Hasil ini lebih rendah 15,7% dibandingkan dengan model kuadratik hasil optimasi. Optimasi meningkatkan senyawa aktif *S. prasinopilosus* 9 kali lipat dibandingkan sebelum optimasi.

**Kata Kunci:** *G. boninense*, optimasi, RSM, senyawa aktif, *S. prasinopilosus*

## PENDAHULUAN

*Ganoderma boninense* merupakan penyebab utama penyakit busuk pangkal batang (BPB) pada tanaman kelapa sawit yang mengakibatkan menurunnya produktivitas kelapa sawit (Lisnawati et al. 2016). Indonesia dan Malaysia pada saat ini mendominasi hingga 85-90% dari total pasar minyak sawit dunia (Munthe dan Dahang 2018). Gabungan Pengusaha Kelapa Sawit Indonesia (GAPKI) mencatat bahwa total produksi minyak kelapa sawit Indonesia pada tahun 2016 mengalami penurunan produksi *Crude Palm Oil* (CPO) sebesar 3% dibandingkan tahun 2015, yaitu dari 43,5 ton menjadi 31,5 ton CPO. Penurunan produksi CPO ini selain disebabkan oleh moratorium pemerintah Indonesia juga disebabkan oleh serangan penyakit BPB (Munthe dan Dahang 2018). Permasalahan penurunan produksi sawit yang diakibatkan oleh serangan *Ganoderma* menjadi masalah yang serius bagi petani di Indonesia. Sanitasi dan pemeliharaan kebun yang belum menjadi perhatian petani sawit mengakibatkan cepatnya sebaran infeksi *G. boninense* (Priwiratama et al. 2014).

Penanggulangan penyakit tanaman yang lambat dan infeksi patogen yang tidak diketahui sejak awal menyebabkan pemberantasan penyakit BPB menjadi sulit dilakukan (Izzati dan Abdullah 2008; Naher et al. 2012; Ahmadi et al. 2017). Metode penanggulangan BPB yang saat ini digunakan adalah dengan cara membongkar dan membakar tanaman yang terserang penyakit atau dengan penambahan 100-600 g belerang pada lubang yang terinfeksi jamur patogen. Setahun berikutnya lahan baru dapat digunakan kembali untuk menanam kelapa sawit (Randa 2016). Pengendalian penyakit dapat dilakukan dengan teknik pengendalian hayati, dengan memanfaatkan mikroba lokal yang berasal dari kebun kelapa sawit yang terinfeksi oleh penyakit tanaman (Khunaw et al. 2017; Rifai et al. 2019). Beberapa mikroba lokal setempat seperti actinobacteria, bakteri, dan fungi mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antifungi, antivirus (Selim et al. 2012; Elbendary et al. 2017; Jakubiec-Krzesniak et al. 2018). Senyawa aktif yang dihasilkan

dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan jamur patogen tanaman tersebut. Namun demikian untuk mendapatkan senyawa aktif dalam konsentrasi yang tinggi maka perlu dilakukan modifikasi media kultivasi untuk produksi senyawa aktif.

*Response surface methodology* (RSM) atau metodologi permukaan respon merupakan teknik yang sangat bermanfaat untuk menentukan konsentrasi masing-masing komponen penyusun medium fermentasi yang dilakukan dalam sekali percobaan secara simultan. Dengan RSM, ada tidaknya interaksi antar variabel dapat diketahui. Disamping itu optimasi secara konvensional hanya dapat dilakukan dengan membuat variasi salah satu variabel, dimana variabel lainnya dibuat tetap. Metode konvensional ini dapat menyebabkan salah interpretasi terhadap hasil optimasi, terutama ketika pengaruh interaksi antara faktor yang berbeda diabaikan (Bradley 2007). Dengan metode biasa tersebut, maka ada tidaknya interaksi antar variabel menjadi sulit diketahui (Khuri Al dan Mukhopadhyay 2010; Behera et al. 2018; Wang et al. 2018). RSM merupakan model optimasi untuk mempelajari pengaruh beberapa faktor terhadap respon yang akan diamati dengan cara meminimalisir sejumlah percobaan sehingga dapat menghemat biaya dan waktu (Panda et al. 2015; Aydar 2018).

Dalam penelitian sebelumnya (tidak dipublikasi), *S. prasinopilosus* mampu menghasilkan senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan *G. boninense*. Senyawa aktif telah dipurifikasi sampai diperoleh senyawa murni (tunggal) dan dianalisis bobot molekulnya menggunakan *liquid chromatography and mass spectrometry* (LCMS). Senyawa aktif yang diperoleh memiliki bobot molekul  $m/z$  254,1131. Dalam penelitian ini optimasi produksi senyawa aktif yang dihasilkan oleh *S. prasinopilosus* telah dilakukan. Variabel yang dioptimasi adalah komponen medium fermentasi yang terdiri dari beberapa sumber karbon dan sumber nitrogen terpilih serta larutan mineral. Adapun tujuan percobaan ini adalah menentukan medium optimum untuk produksi senyawa aktif menggunakan isolat *S. prasinopilosus*.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium mikologi dan bakteriologi Pusat Teknologi Bioindustri BPPT pada bulan Maret 2018 sampai dengan Desember 2018.

### Mikroorganisme

Isolat *Streptomyces prasinopilosus* dan *Ganoderma boninense* diperoleh dari kultur koleksi Pusat Teknologi Bioindustri BPPT, PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan. Isolat diregenerasi di medium agar YEME (*yeast extract + malt extract*) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari.

### Persiapan inokulum

*S. prasinopilosus* pada medium agar HV (*humic acid vitamin*) (Gambar 1) ditambahkan 6 mL larutan NaCl fisiologis, dan sebanyak 1 mL ditransfer ke 50 mL media vegetatif steril dalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi *glass bead*. Medium vegetatif mengandung 10 g L<sup>-1</sup> glukosa, 5 g L<sup>-1</sup> *yeast extract*, 1 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, dan 0,5 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Kultur vegetatif diinkubasi pada suhu 28°C, 150 rpm selama 48 jam.

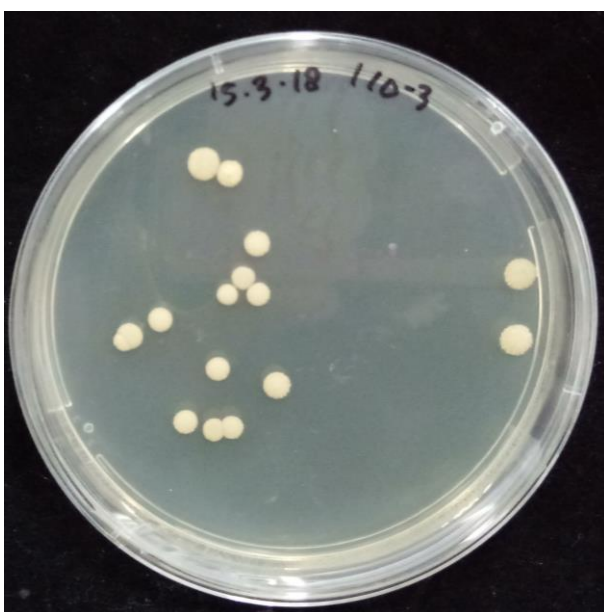
### Pemilihan sumber karbon dan nitrogen

Media kultivasi untuk pemilihan sumber karbon terdiri dari 10 g L<sup>-1</sup> sumber karbon, 1 g L<sup>-1</sup> *yeast extract*, 5 g L<sup>-1</sup> pepton dan *Ferric citrate*·H<sub>2</sub>O 0,3 g L<sup>-1</sup>, pH 7,5. Adapun sumber

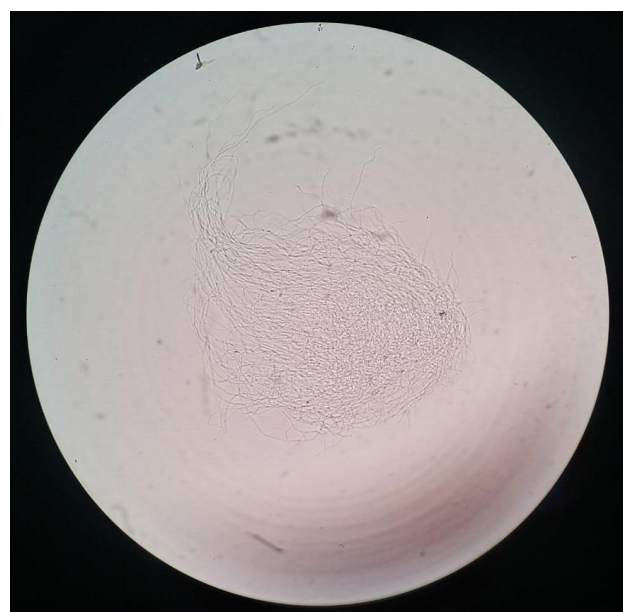
karbon yang akan digunakan sebagai perlakuan adalah laktosa, galaktosa, maltosa, dan glukosa. Media kultivasi untuk pemilihan sumber nitrogen terdiri dari 10 g L<sup>-1</sup> sumber karbon terpilih, *Ferric citrate*·H<sub>2</sub>O 0,3 g L<sup>-1</sup>, dan  $x$  g L<sup>-1</sup> sumber nitrogen (dimana nilai  $x$  ditentukan dalam variasi optimasi RSM). Adapun sumber nitrogen yang digunakan sebagai perlakuan adalah *yeast extract*, *malt extract*, tripton, dan NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> dengan konsentrasi disamakan menjadi total nitrogen sebesar 0,72 g L<sup>-1</sup> (Kanoh et al. 2005). Adapun dari hasil perhitungan mengacu total nitrogen 0,72 g L<sup>-1</sup> maka konsentrasi masing-masing sumber nitrogen adalah sebagai berikut: *yeast extract* 7,16 g L<sup>-1</sup>, *malt extract* 6,68 g L<sup>-1</sup>, tripton 5,77 g L<sup>-1</sup>, dan NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3,59 g L<sup>-1</sup>. Kultivasi dilakukan dengan menggunakan kultur kocok pada Erlenmeyer 250 mL dengan volume kerja 25 mL pada suhu 28°C, 150 rpm selama 5 hari. Senyawa aktif dari masing-masing media diekstrak kemudian dianalisa dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Luas *peak area* kromatogram dihitung sebagai konsentrasi senyawa aktif.

### Pemilihan konsentrasi larutan mineral

Menurut Ghatora et al. (2006) larutan mineral untuk media kultivasi *S. prasinopilosus* terdiri dari 0,02 g L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·SO<sub>4</sub>, 0,05 g L<sup>-1</sup> KCl, 0,01 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0,05 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 0,001 g L<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub>, dan 0,0005 g L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>. Larutan mineral



A



B

**Gambar 1.** Isolat *Streptomyces prasinopilosus* pada agar HV: penampakan koloni (A) dan perbesaran 40x (B)

**Tabel 1.** Faktor dan level yang digunakan pada *central composite design*

Faktor	Level				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Sumber karbon terbaik (g L <sup>-1</sup> )	25,99	33,61	44,81	56,01	63,63
Sumber nitrogen terbaik (g L <sup>-1</sup> )	3,76	7,16	12,16	17,16	20,56
Larutan mineral (mL L <sup>-1</sup> )	0	4,05	10	15,95	20

ditambahkan ke media kultivasi *S. prasinopilosus* masing-masing 0, 20, 40, 60, dan 80 mL L<sup>-1</sup>. Kultivasi *S. prasinopilosus* dilakukan dengan menggunakan kultur kocok pada Erlenmeyer 250 mL dengan volume kerja 25 mL pada suhu 28°C, 150 rpm selama 5 hari. Penambahan larutan mineral yang menghasilkan senyawa aktif dengan konsentrasi tertinggi digunakan untuk optimasi media.

### Ekstraksi senyawa aktif

Senyawa aktif yang dihasilkan dalam fermentasi ini merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan secara ekstraseluler. Media kultivasi di-sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 15 menit. Supernatan diekstrak menggunakan etil asetat dengan rasio 1:1 (v/v) dan dikocok selama 30 menit. Fase etil asetat dikeringkan dengan *centrifugal concentrator*. Berat ekstrak ekstraseluler ditimbang dan dibuat konsentrasinya menjadi 5000 ppm kemudian dianalisa menggunakan KCKT.

### Analisa senyawa aktif

Dari hasil penelitian sebelumnya, senyawa aktif dipurifikasi menggunakan kolom kromatografi. Masing-masing fraksi diuji aktivitasnya, dan fraksi aktif dipilih dan dimurnikan secara bertahap menggunakan KCKT preparatif. Fraksi aktif murni dianalisa menggunakan KCKT dan LCMS. Dari hasil analisa KCKT menggunakan kolom C18, fasa gerak asetonitril:air (40:60) menunjukkan bahwa senyawa aktif murni memiliki waktu retensi 1,74 menit. *Peak* dengan waktu retensi 1,74 menit yang menunjukkan aktivitas terhadap *G. boninense* tersebut dijadikan acuan untuk optimasi selanjutnya. Konsentrasi senyawa aktif dengan waktu retensi 1,74 menit ditunjukkan dengan luas area *peak* KCKT pada waktu retensi 1,74 menit. Hasil analisa

bobot molekul senyawa aktif menggunakan LCMS menunjukkan bahwa bobot molekul senyawa aktif tersebut adalah sebesar m/z 254,1131.

### Optimasi komposisi media kultivasi

Rancangan optimasi media menggunakan rancangan *central composite design* (CCD). Rancangan yang digunakan mengandung tiga taraf faktor, yaitu rancangan faktorial 2<sup>3</sup>, *starting point* (titik awal), dan *center point* (titik tengah). Rancangan faktorial dan *starting point* dilakukan dengan dua kali ulangan sedangkan *center point* dilakukan dengan enam kali ulangan sehingga total unit percobaan menjadi 34. Faktor dan level yang digunakan pada *central composite design* disajikan pada Tabel 1. Kultivasi *S. prasinopilosus* dilakukan dengan menggunakan kultur kocok pada Erlenmeyer 250 mL dengan volume kerja 25 mL pada suhu 28°C, 150 rpm selama 5 hari.

Data optimasi media diolah menggunakan perangkat lunak *Design Expert* versi 7 untuk mendapatkan model matematika sebagai berikut:

$$y = b_0 + b_1x_{1i} + b_2x_{2i} + b_3x_{3i} + b_{11}x_{1^2} + b_{22}x_{2^2} + b_{33}x_{3^2} + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

$b_0, b_1, b_{ij}$  = koefisien regresi

$y$  = luas area *peak* KCKT waktu retensi 1,74 menit (berkaitan langsung dengan konsentrasi senyawa aktif)

$x_1$  = konsentrasi sumber karbon (g L<sup>-1</sup>)

$x_2$  = konsentrasi sumber nitrogen (g L<sup>-1</sup>)

$x_3$  = volume penambahan larutan mineral (mL L<sup>-1</sup>)

Model yang diperoleh diujikan kembali di laboratorium sebanyak lima ulangan untuk pengujian kesesuaian model.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

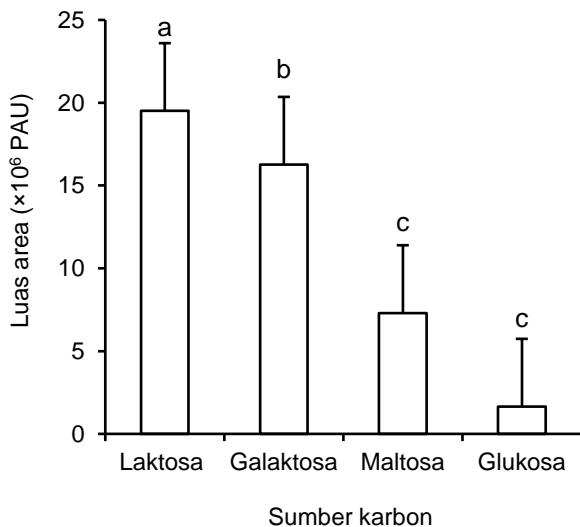
Mikroorganisme membutuhkan air, karbon, nitrogen, mineral, dan oksigen apabila aerob dalam proses kultivasi. Bahan-bahan dengan konsentrasi yang sesuai dalam media kultivasi dapat menghasilkan produk yang diinginkan secara optimal. Luas area *peak* laktosa paling tinggi dibandingkan galaktosa, maltosa, dan glukosa. Hasil uji lanjut dengan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa antara laktosa, galaktosa, dan maltosa berbeda nyata sedangkan maltosa dan glukosa tidak berbeda nyata (Gambar 2). Laktosa dipilih sebagai sumber karbon terbaik. Pada KCKT, luas area *peak* sama dengan konsentrasi senyawa yang diuji. Karbon dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk biosintesis dan sebagai sumber energi (Ruiz et al. 2010; Papagianni 2012).

Adapun untuk penentuan sumber nitrogen terbaik, luas area *peak yeast extract* menunjukkan paling tinggi dibandingkan *malt extract*, tripton, dan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Hasil uji lanjut dengan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa luas area *peak yeast extract* berbeda nyata dengan tripton dan  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  namun tidak berbeda nyata dengan *malt extract*. *Malt extract* dan tripton juga tidak berbeda nyata

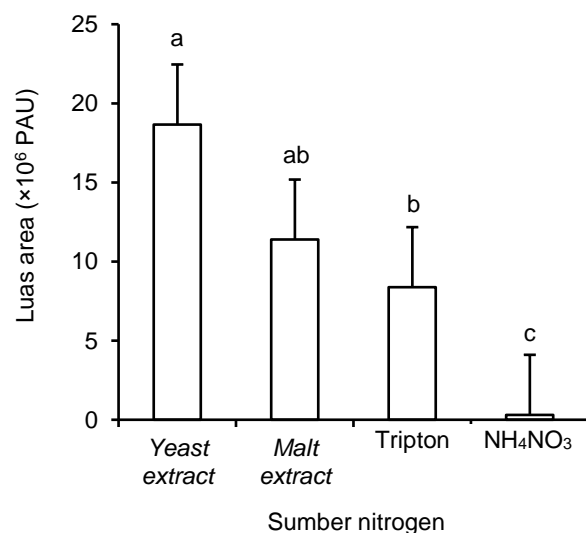
(Gambar 3). *Yeast extract* dipilih sebagai sumber nitrogen terbaik. *Yeast extract* adalah substrat yang sangat baik untuk banyak mikroorganisme dalam proses fermentasi karena mengandung asam amino dan peptida, vitamin larut air, dan karbohidrat (Mitrovic et al. 2017).

Media kultivasi tanpa larutan mineral memiliki luas area *peak* KCKT yang lebih rendah dibandingkan media kultivasi yang ditambahkan dengan larutan mineral. Hasil uji lanjut dengan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05 menunjukkan bahwa luas area *peak* senyawa antifungi berbeda nyata antara media kultivasi tanpa larutan mineral dengan yang menggunakan larutan mineral. Namun konsentrasi larutan mineral antara 20, 40, 60, dan 80  $\text{mL L}^{-1}$  tidak berbeda nyata (Gambar 4). Mineral dengan konsentrasi 0-20  $\text{mL L}^{-1}$  dipilih untuk tahap selanjutnya. Mineral dibutuhkan oleh seluruh mikroorganisme untuk pertumbuhan dan metabolisme (Ali et al. 2018; Kim dan Roh 2018).

Rancangan optimasi media menggunakan rancangan *central composite design* (CCD) dengan tiga variabel, yaitu laktosa, *yeast extract*, dan mineral. Rancangan percobaan dikodekan untuk tiap faktor, yaitu -1 batas bawah, 0 batas tengah,



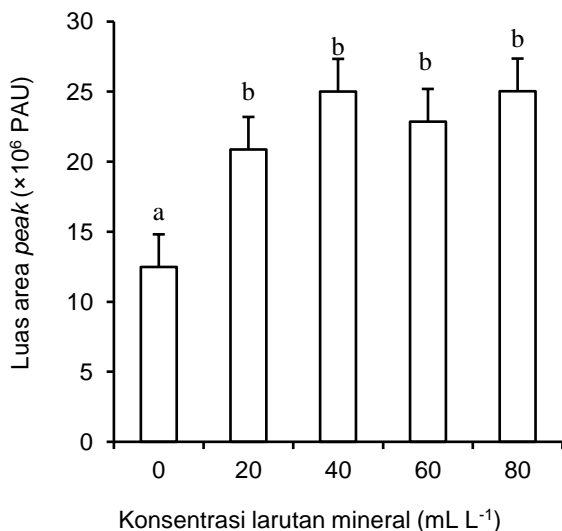
**Gambar 2.** Luas area *peak* KCKT senyawa aktif *S. prasinopilosus* yang ditumbuhkan pada media dengan sumber karbon yang berbeda. Garis vertikal di atas tiap balok data menunjukkan galat baku dan huruf-huruf di atas balok data menunjukkan perbandingan nilai tengah antar sumber karbon berdasarkan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05



**Gambar 3.** Luas area *peak* KCKT senyawa aktif *S. prasinopilosus* yang ditumbuhkan pada media dengan sumber nitrogen yang berbeda. Garis vertikal di atas tiap balok data menunjukkan galat baku dan huruf-huruf di atas balok data menunjukkan perbandingan nilai tengah antar sumber nitrogen berdasarkan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05

1 batas atas, dan 1,68 atau -1,68 *starting point* dengan nilai untuk masing-masing kode dan faktor berdasarkan Tabel 1. Data hasil analisa respon pada optimasi media kultivasi (Tabel 2) diuji jumlah kuadratnya pada beberapa model (Tabel 3) dan menunjukkan bahwa model kuadratik vs 2FI adalah model yang signifikan ( $p=0,0002$ ) dan disarankan. Ringkasan model statistik (Tabel 4) menunjukkan bahwa model kuadratik memiliki nilai *adjusted R-squared* paling besar diantara yang lain, yaitu 0,5025. Nilai *adjusted R-squared* ini menunjukkan bahwa ketiga variabel berpengaruh terhadap keragaman respon sebesar 50,25% sedangkan sisanya dipengaruhi oleh variabel lain yang tidak diteliti. Nilai PRESS (*prediction error sum of squares*) untuk model kuadratik paling rendah, hal ini menunjukkan bahwa model kuadratik adalah model yang paling baik dibandingkan yang lain.

Hasil analisis varian untuk model kuadratik (Tabel 5) menunjukkan bahwa model kuadratik secara signifikan (nilai  $p = 0,0011$ ) dapat mempengaruhi respon yang dihasilkan. Pengaruh linier ( $x_2, x_3$ ) dan kuadratik juga menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Hasil *lack of fit* tidak signifikan (nilai  $p = 0,1846$ ) hal ini



**Gambar 4.** Luas area *peak* KCKT senyawa aktif *S. prasinopilosus* yang ditumbuhkan pada media dengan larutan mineral yang berbeda konsentrasinya. Garis vertikal di atas tiap balok data menunjukkan galat baku dan huruf-huruf di atas balok data menunjukkan perbandingan nilai tengah antar konsentrasi larutan mineral berdasarkan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05

**Tabel 2.** Data hasil analisa respon pada optimasi media kultivasi menggunakan *central composite design*

Std	Laktosa (g L <sup>-1</sup> )	Yeast extract (g L <sup>-1</sup> )	Mineral (mL L <sup>-1</sup> )	Luas area <i>peak</i> (PAU)
1	-1	-1	-1	25632213,49
2	-1	-1	-1	28043940,95
3	1	-1	-1	13644658,29
4	1	-1	-1	20707790,44
5	-1	1	-1	30616399,24
6	-1	1	-1	13062091,77
7	1	1	-1	8147747,73
8	1	1	-1	13573920,10
9	-1	-1	1	20701987,58
10	-1	-1	1	21060811,07
11	1	-1	1	15533080,01
12	1	-1	1	14356295,24
13	-1	1	1	19108353,76
14	-1	1	1	26136337,28
15	1	1	1	27961506,23
16	1	1	1	27395837,89
17	-1,68	0	0	16081040,76
18	-1,68	0	0	7267467,40
19	1,68	0	0	10474195,31
20	1,68	0	0	22166660,26
21	0	-1,68	0	14192296,87
22	0	-1,68	0	17861819,14
23	0	1,68	0	18755308,96
24	0	1,68	0	20671255,27
25	0	0	-1,68	13584879,60
26	0	0	-1,68	16567566,31
27	0	0	1,68	24910128,85
28	0	0	1,68	25461122,26
29	0	0	0	27544701,98
30	0	0	0	36016796,77
31	0	0	0	25678699,37
32	0	0	0	32831997,60
33	0	0	0	36050132,54
34	0	0	0	46612443,00

menunjukkan bahwa model kuadratik model yang tepat. Ulangan pada *center point* menghasilkan nilai *pure error*. Perbandingan nilai *mean square lack of fit* dengan *pure error* menghasilkan uji F yang apabila hasilnya tidak signifikan mengindikasikan bahwa model tersebut adalah model yang tepat

**Tabel 3.** Uraian jumlah kuadrat beberapa model (*sequential model sum of square*) untuk respon luas area senyawa aktif *S. prasinopilosus*

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value Prob > F	Keterangan
Mean vs Total	1,60368E+16	1	1,6E+16			
Linear vs Mean	1,42525E+14	3	4,75E+13	0,608226	0,6149	
2FI vs Linear	2,87292E+14	3	9,58E+13	1,257602	0,3086	
Quadratic vs 2FI	1,15658E+15	3	3,86E+14	10,28736	0,0002	suggested
Cubic vs Quadratic	1,73164E+14	4	4,33E+13	1,19217	0,3447	aliased
Residual	7,26255E+14	20	3,63E+13			
Total	1,85226E+16	34	5,45E+14			

**Tabel 4.** Ringkasan model statistik (*model summary statistics*) untuk respon luas area senyawa aktif *S. prasinopilosus*

Source	Std. dev.	R-squared	Adjusted R-squared	Predicted R-squared	PRESS	Keterangan
Linear	8837968	0,057335	-0,03693	-0,1289116	2,8063E+15	
2FI	8726287	0,172908	-0,01089	-0,0920982	2,7148E+15	
Quadratic	6121745	0,63818	0,502497	0,29552865	1,7512E+15	suggested
Cubic	6026005	0,70784	0,517937	0,21003759	1,9637E+15	aliased

**Tabel 5.** Analisis varian untuk permukaan respon model kuadrat

Source	Sum of squares	df	Mean Square	F value	p-value Prob > F	Keterangan
Model	1,59E+15	9	1,76E+14	4,703475	0,0011	signifikan
$x_1$ -Laktosa	2,75E+13	1	2,75E+13	0,734172	0,4000	
$x_2$ -Yeast xtract	1,28E+13	1	1,28E+13	0,342371	0,5639	
$x_3$ -Mineral	1,02E+14	1	1,02E+14	2,726581	0,1117	
$x_1x_2$	2,34E+13	1	2,34E+13	0,624632	0,4371	
$x_1x_3$	9,76E+13	1	9,76E+13	2,604702	0,1196	
$x_2x_3$	1,66E+14	1	1,66E+14	4,436737	0,0458	signifikan
$x_1^2$	8,72E+14	1	8,72E+14	23,26307	< 0,0001	signifikan
$x_2^2$	5,3E+14	1	5,3E+14	14,14599	0,0010	signifikan
$x_3^2$	3,7E+14	1	3,7E+14	9,86675	0,0044	signifikan
Residual	8,99E+14	24	3,75E+13			
Lack of fit	2,77E+14	5	5,55E+13	1,693411	0,1846	tidak signifikan
Pure error	6,22E+14	19	3,27E+13			
Cor total	2,49E+15	33				

(Bradley 2007). Persamaan kuadrat yang diperoleh, yaitu:

$$y = 33862025,028 - 1003653,384x_1 + 685382,854x_2 + 1934167,551x_3 + 1209559,938x_1x_2 + 2469984,912x_1x_3 + 3223644,098x_2x_3 - 6218218,642x_1^2 - 4848966,772x_2^2 - 4049669,461x_3^2$$

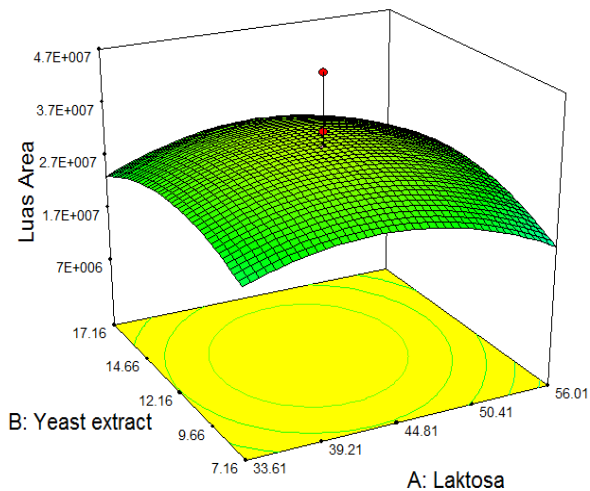
$y$  = luas area senyawa antifungi  
 $x_1$  = konsentrasi laktosa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$x_2$  = konsentrasi yeast extract ( $\text{g L}^{-1}$ )  
 $x_3$  = konsentrasi larutan mineral ( $\text{mL L}^{-1}$ )

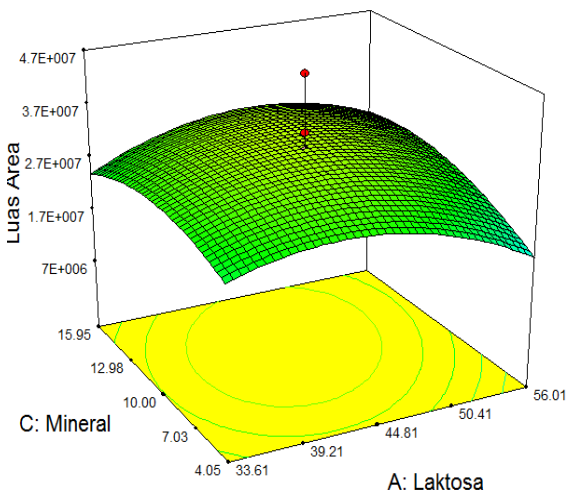
Tanda negatif (-) pada koefisien kuadrat ( $x_1^2$ ,  $x_2^2$ , dan  $x_3^2$ ) menunjukkan bahwa grafik respon yang diperoleh adalah maksimum atau grafik parabola terbuka ke bawah.

Plot permukaan respon antara variabel laktosa dengan yeast extract (Gambar 5) menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi

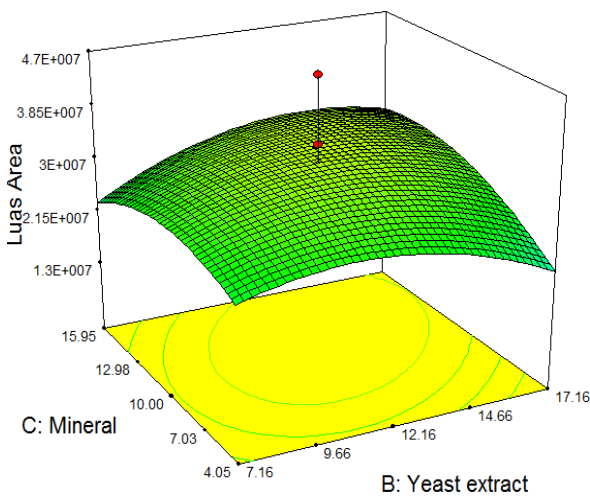




**Gambar 5.** Plot permukaan respon antara variabel laktosa dengan yeast extract terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*



**Gambar 6.** Plot permukaan respon antara variabel laktosa dengan mineral terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*



**Gambar 7.** Plot permukaan respon antara variabel yeast extract dengan mineral terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*

laktosa dan yeast extract berpengaruh terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* dengan pengaruh yang relatif sama. Konsentrasi laktosa di atas 56,01 g L<sup>-1</sup> level (1) dan konsentrasi yeast extract di atas 17,16 g L<sup>-1</sup> level (1) mengakibatkan penurunan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Tidak ada interaksi antara laktosa dengan yeast extract (p=0,4371). Konsentrasi substrat yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan sel mikroorganismenya (Gonzalez-Figueroa et al. 2018). Pertumbuhan sel yang terhambat menyebabkan metabolit sekunder yang dihasilkan menjadi menurun.

Plot permukaan respon antara variabel laktosa dengan mineral (Gambar 6) menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi laktosa dan mineral berpengaruh terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Kenaikan konsentrasi mineral lebih berpengaruh terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* dibandingkan kenaikan konsentrasi laktosa. Konsentrasi laktosa di atas 56,01 g L<sup>-1</sup> level (1) menyebabkan penurunan produksi senyawa aktif sedangkan konsentrasi larutan mineral di atas 10 mL L<sup>-1</sup> level (0) meningkatkan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Ghatora et al. (2006) menggunakan larutan mineral ini untuk kultivasi xilanase dari fungi termofilik dan termotoleran dengan konsentrasi 1% atau 10 mL L<sup>-1</sup>. *S. prasinopilosus* termasuk actinomycetes termotoleran. Tidak ada interaksi antara yeast extract dengan mineral (p=0,1196).

Plot permukaan respon antara variabel yeast extract dengan mineral (Gambar 7) menunjukkan bahwa kenaikan konsentrasi yeast extract dan mineral berpengaruh terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Kenaikan konsentrasi mineral lebih berpengaruh terhadap produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* dibandingkan kenaikan konsentrasi yeast extract. Konsentrasi yeast extract di atas 17,16 g L<sup>-1</sup> level (1) mengakibatkan penurunan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* sedangkan konsentrasi larutan mineral di atas 10 mL L<sup>-1</sup> level (0) meningkatkan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus*. Ada interaksi antara yeast extract dengan mineral (p=0,0458). Kenaikan dan penurunan senyawa aktif yang dipengaruhi oleh konsentrasi sumber



nitrogen seperti halnya *yeast extract* dan mineral belum dapat dijelaskan dengan pasti, hal ini disebabkan senyawa aktif yang dihasilkan belum diketahui (*unknown compound*) demikian juga jalur metabolismenya juga belum diketahui. Menurut Gadd (2010) mineral dalam jumlah tertentu dibutuhkan untuk reaksi enzimatik sebagai *co-factor*. Namun demikian konsentrasi larutan mineral yang tinggi justru akan menghambat proses metabolisme. *Yeast extract* dibutuhkan oleh mikroorganisme sebagai sumber nitrogen dan sebagian kecil sebagai sumber karbon. Selain digunakan sebagai medium pertumbuhan biomassa, sumber nitrogen juga berperan dalam pembentukan senyawa metabolit mikroba (Stanbury dan Whitaker 1995; Sharma dan Thakur 2018).

Konsentrasi maksimum senyawa aktif *S. prasinopilosus* diprediksi sebesar 32269366,338 PAU kromatogram KCKT dengan komposisi medium 44,77 g L<sup>-1</sup> laktosa, 13,02 g L<sup>-1</sup> *yeast extract*, dan 15,95 mL L<sup>-1</sup> larutan mineral. Hasil verifikasi ulang di laboratorium menghasilkan senyawa aktif *S. prasinopilosus* sebesar 27203907,310 PAU kromatogram KCKT. Hasil ini 15,7% lebih rendah dibandingkan prediksi. Hasil optimasi meningkatkan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* 9 kali lipat dibandingkan dengan medium standar (medium basal).

## KESIMPULAN

Komponen medium kultivasi yang mampu meningkatkan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* adalah laktosa sebagai sumber karbon, *yeast extract* sebagai sumber nitrogen, dan penambahan mineral. Produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* tertinggi pada medium dengan komposisi 44,77 g L<sup>-1</sup> laktosa, 13,02 g L<sup>-1</sup> *yeast extract*, dan 15,95 mL L<sup>-1</sup> larutan mineral. Optimasi komposisi medium mampu meningkatkan produksi senyawa aktif *S. prasinopilosus* 9 kali lipat dibandingkan medium basalnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Insinas RISTEK-DIKTI 2018 Surat Keputusan nomor: 4/E/KPT/2018 tanggal 5 Februari 2018 yang telah memberikan pendanaan penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadi P, Muharam FM, Ahmad K, Mansor S, Seman IA (2017) Early detection of *Ganoderma* basal stem rot of oil palms using artificial neural network spectral analysis. *J Plant Dis* 101:1009–1016. doi: 10.1094/PDIS-12-16-1699-RE
- Aydar AY (2018) Utilization of response surface methodology in optimization of extraction of plant materials. *Statistical approaches with emphasis on design of experiments applied to chemical processes*, Valter Silva, IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.73690
- Behera SK, Meena H, Chakraborty S, Meikap BC (2018) Application of response surface methodology (RSM) for optimization of leaching parameters for ash reduction from low-grade coal. *Int J Min Sci Technol* 28:621–629. doi: 10.1016/j.ijmst.2018.04.014
- Bradley N (2007) The response surface methodology. Thesis, Indiana University of South Bend, Bloomington
- Elbendary AA, Hessain AM, El-Hariri MD, Seida AA, Moussa IM, Mubarak AS, Kabli SA, Hemeg HA, El Jakee JK (2017) Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples. *Saudi J Biol Sci* 25:44–46. doi: 10.1016/j.sjbs.2017.05.003
- Gadd GM (2010) Metal, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol* 156: 609–643. doi: 10.1099/mic.0.037143-0
- Ghatora SK, Chandha BS, Badhan AK, Saini HS, Bhat MK (2006) Identification and characterization of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. *BioResources* 1:18–33. doi: 10.15376/biores.1.1.18-33
- Gonzalez-Figueroa C, Flores-Estrella RA, Rojas-Rejón OA (2018) Fermentation: Metabolism, kinetic models, and bioprocessing. *Current Topics in Biochemical Engineering*, Naofumi Shiomi, IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.82195
- Izzati MZNA, Abdullah F (2008) Disease suppression on *Ganoderma* infected oil palm seedlings treated with *Trichoderma harzianum*. *Plant Protect Sci* 44:101–107. doi: 10.17221/23/2008-PPS

- Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J (2018) Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Pol J Microbiol* 67:259–272. doi: 10.21307/pjm-2018-048
- Kanoh K, Matsuo Y, Adachi K, Imagawa K, Nishizawa M, Shizuri Y (2005) Mechercharmocins A and B, cytotoxic substances from marine-derived *Thermoactinomyces* sp. YM3-251. *J Antibiot* 58:289–292. doi: 10.1038/ja.2005.36
- Khunaw AR, Othman R, Ali NS, Musa MH, Rabara FS (2017) Role of microbial community in suppressing development *Ganoderma* in oil palm seedlings. *Int J Plant Soil Sci* 19:1–14. doi: 10.9734/IJPSS/2017/36192
- Khuri AI, Mukhopadhyay S (2010) Response surface methodology. *Wires Comp Stat* 2:128–149. doi: 10.1002/wics.73
- Kim Y, Roh Y (2018) Effect of mineral growth conditions on synthesis of magnetite nanoparticles using indigenous Fe(III)-reducing bacteria. *J Miner* 8:1009–1016. doi:10.3390/min8050212
- Lisnawita, Hanum H, Tantawi AR (2016) Survey of basal stem rot disease on oil palms (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Kebun Bukit Kijang, North Sumatera, Indonesia. IOP Conference on Agricultural and Biological Sciences (ABS 2016), Earth and Environmental Science 41:012007. doi: 10.1088/1755-1315/41/1/012007
- Mitrovic I, Grahovac JA, Dodic JM, Dodic SN, Grahovac MS (2017) Effect of nitrogen sources on the production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygrosopicus*. *Matica Srpska J Nat Sci Novi Sad* 133:183–191. doi: 10.2298/zmspn1733183m
- Munthe KPSM, Dahang D (2018) Hosting of Hendersonia against *Ganoderma* (*Ganoderma boninense*) disease in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Int J Multidiscip Res Dev* 5:46–50. Doi: 10.22271/ijmrd
- Naher L, Tan SG, Yusuf UK, Ho CL, Abdullah F (2012) Biocontrol agent *Trichoderma harzianum* strain FA 1132 as an enhancer of oil palm growth. *Pertanika J Trop Agric Sci* 35:173–182
- Panda T, Theodore T, Kumar RA (2015) Statistical optimization of biological systems. CRC Press, Boca Raton, Florida, Pages: 278. doi: 10.1201/b19558
- Papagianni M (2012) Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria. *Microb Cell Fact* 11:50. doi: 10.1186/1475-2859-11-50
- Priwiratama H, Prasetyo AE, Susanto A (2014) Pengendalian penyakit busuk pangkal batang kelapa sawit secara kultur teknis. *J Fitopatologi* 10:1–7. doi: 10.14692/jfi.10.1.1
- Randa D (2016) Pengaruh perlakuan belerang terhadap kecepatan infeksi patogen *Ganoderma boninense* di pembibitan kelapa sawit. Skripsi, Sekolah Tinggi Ilmu Pertanian
- Rifai I, Yanti Y, Nurbailis (2019) Mechanism of indigenous Rhizobacteria isolate growth inhibition of *Ganoderma boninense*. *Inter J Environ Agric Biotechnol* 4:1518–1522. doi:10.22161/ijeab.45.36
- Ruiz B, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2010) Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon sources. *Crit Rev Microbiol* 36:146–167. doi: 10.3109/10408410903489576
- Selim KA, El-Beih AA, AbdEl-Rahman TM, El-Diwany AI (2012) Biology of endophytic fungi. *Curr Res Environ Appl Mycol J* 2:31–82. doi: 10.5943/cream/2/1/3
- Sharma P, Thakur RL (2018) Studies on effect of organic nitrogen source on production of antifungal substance from *Clostridium* species. *J Antimicrob Agents* 4:157–164. doi: 10.4172/2472-1212.1000157
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ (1995) Principles of Fermentation Technology (2nd Edition). Pergamon Press, Toronto
- Wang Y, Deng L, Fan Y (2018) Preparation of soy-base adhesive enhanced by waterborne polyurethane: Optimization by response surface methodology. *Adv Mater Sci Eng* 2018: ID 9253670. doi: 10.1155/2018/9253670