



Optimasi Suhu, pH, dan Konsentrasi Inokulum pada Proses Ko-Fermentasi Batang Sorgum Manis (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) dengan Biakan *Saccharomyces cerevisiae*-*Trichoderma reesei*

Ferdinand Alberth Limahelu^{1,*}, Jasman², dan Kasimir Sarifudin³

^{1,2,3}Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Nusa Cendana

Jl. Adi Sucipto, Penfui, Kupang, Indonesia

*e-mail korespondensi: ferdi.limahelu@gmail.com

Info Artikel:

Dikirim:

23 September 2021

Revisi:

30 September 2021

Diterima:

24 Oktober 2021

Kata Kunci:

Sorghum manis, gula terlarut, lignoselulosa, bioetanol, hidrolisis dan fermentasi serentak.

Abstrak- Penelitian ini dilatarbelakangi oleh pemanfaatan tanaman sorgum manis sebagai penghasil bioetanol. Tujuan penelitian ini untuk menentukan nilai optimum suhu, pH, dan konsentrasi inokulum pada proses ko-fermentasi gula terlarut dan lignoselulosa dengan biakan campuran *Trichoderma reesei*-*Saccharomyces cerevisiae* pada pembuatan bioetanol dari batang sorgum manis (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Penelitian ini terdiri dari lima tahap, yakni persiapan dan pra-penanganan bahan, pembiakan inokulum, pengukuran kadar gula reduksi dan gula total, produksi bioetanol dengan metode hidrolisis dan fermentasi serentak, dan perhitungan yield etanol. Penentuan kondisi optimum menggunakan metode respons permukaan. Hasil penelitian ini menjelaskan bahwa kondisi optimal untuk mendapatkan yield bioetanol tertinggi dengan menggunakan biakan campuran *Trichoderma reesei*-*Saccharomyces cerevisiae* berada pada suhu 37.194 °C, pH 5, dan konsentrasi inokulum sebesar 18.128% (v/v) menghasilkan respons sebesar 0.751.

Abstract- This research is motivated by the utilization of sweet sorghum plants as a bioethanol producer. The purpose of this study was to determine the optimum value of temperature, pH, and inoculum concentration in the co-fermentation process of dissolved sugars and lignocellulose by breeding a mixture of *Trichoderma reesei*-*Saccharomyces cerevisiae* in the manufacture of bioethanol from sweet sorghum stems (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). This research consists of five stages; These are firstly preparation and pre-treatment of raw materials, secondly inoculum cultivation, thirdly measurement of reducing sugar and total sugar levels, fourthly production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation method, and finally calculation of ethanol yield. Determination of optimum conditions using response surface methodology. The results of this study explained that optimal conditions to obtain the highest bioethanol yield by using a mixture of *Trichoderma reesei*-*Saccharomyces cerevisiae* at a temperature of 37.194 °C, pH 5, and inoculum concentration of 18.128% (v/v) resulted in a response of 0.751.

PENDAHULUAN

Konsumsi energi fosil seperti batu bara, minyak, dan gas alam terus meningkat tiap tahun namun peningkatan ini tidak sejalan dengan ketersediaannya di alam. Keadaan ini semakin kompleks mengingat energi fosil tergolong dalam kelompok energi tidak terbarukan, sehingga sangat diperlukan pengembangan bahan bakar baru yang terbarukan dan ramah lingkungan [1]. Sejalan dengan hal tersebut, pemerintah menetapkan penggunaan bahan bakar nabati (BBN) sebagai bahan bakar alternatif pengganti bahan bakar minyak (BBM). Hadirnya BBN diharapkan mampu menyokong ketersediaan BBM di Indonesia yang kian hari semakin menipis [2].

Salah satu contoh BBN adalah bioetanol. Bioetanol yang diproduksi dari biomassa (tumbuhan penghasil energi) melalui proses fermentasi merupakan bentuk energi biomassa dengan potensi yang sangat baik untuk mendukung keberlanjutan energi karena kualitas pembakarannya yang baik dan dapat diproduksi terus-menerus [3]. Bioetanol juga memiliki angka oktan yang tinggi, efisien dalam pembakaran, dan ramah lingkungan karena minim kadar gas buangan seperti karbon monoksida (CO), nitrogen oksida (NO_x), dan gas-gas beracun lainnya [4-5]. Bioetanol diproduksi dari tanaman yang mengandung gula dan lignoselulosa di dalamnya. Misalnya tebu, jagung, singkong, hingga limbah kulit melon. Dari berbagai jenis

tanaman yang telah disebutkan, salah satu tanaman yang mengandung gula dan lignoselulosa serta mampu dikonversi menjadi bioetanol adalah tanaman sorgum manis (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) [6].

Sorgum manis merupakan salah satu tanaman sereal dengan daya toleransinya yang luas terhadap iklim dan jenis tanah dan banyak dikembangkan di daerah Gunung Kidul, Nusa Tenggara Barat, dan Nusa Tenggara Timur yang memiliki lahan kering dan kurang subur [7]. Beberapa hal yang menjadikan sorgum manis unggul sebagai bahan dasar pembuatan bioetanol adalah masa panennya yang jauh lebih singkat daripada masa panen tebu, dapat tumbuh di lahan kering, rendah biaya pemeliharaan, dan kualitas etanol sebagai bahan bakar lebih baik daripada etanol dari tebu terutama angka oktannya serta minim emisi gas buang sulfurnya [8-9].

Sorgum memiliki kandungan glukosa, fruktosa, hingga sukrosa yang mampu dikonversi melalui proses fermentasi menjadi bioetanol [10]. Akumulasi kandungan gula yang ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti waktu panen, waktu tanam, dan varietas [11]. Bagian tanaman sorgum yang biasanya diolah menjadi BBN adalah nira dan bagasnya. Sebelum bagas diubah menjadi bioetanol maka perlu dihidrolisis menjadi gula terfermentasi terlebih dulu [12].

Proses pengolahan lignoselulosa menjadi bioetanol dibagi menjadi dua metode yakni *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)* dan *Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)*. Metode SHF merupakan metode ketika hidrolisis dan fermentasi dilakukan dengan menggunakan reaktor yang berbeda. Sedangkan metode SSF merupakan metode dimana hidrolisis dan fermentasi dilakukan secara serempak/simultan dengan menggunakan satu reaktor. Keuntungan dari metode ini adalah polisakarida yang terkonversi menjadi monosakarida tidak kembali menjadi polisakaridanya karena langsung terjadi fermentasi monosakarida menjadi etanol. Selain itu dapat menghemat biaya dan tenggat waktu karena hanya menggunakan satu reaktor untuk menjalankan proses hidrolisis dan fermentasi sekaligus [13].

Pada metode SSF maupun SHF, produksi etanol dengan bahan dasar lignoselulosa dilakukan melalui proses hidrolisis dan fermentasi. Pada proses hidrolisis secara kimia (dengan asam) atau secara enzimatis terjadi penguraian rantai polisakarida menjadi monosakarida atau dalam hal ini selulosa ($C_6H_{10}O_5$) menjadi glukosa ($C_6H_{12}O_6$) [14]. Salah satu agen yang mampu menghasilkan enzim selulolitik adalah jamur *Trichoderma reesei*. Enzim selulolitik yang dihasilkan seperti *endo-1,4- β -xylanase*, *endo-1,4-D- β -glucanase*, *exocellobiohydrolase*, *glucan 1,4- β -glucosidase*, dan *exo-1,4- β -glucosidase* bekerja secara bersinergi dalam menghidrolisis selulosa dan hemiselulosa [15]. Setelah hidrolisis selesai, dilanjutkan dengan fermentasi di mana monosakarida (glukosa) dengan bantuan ragi/yeast diubah menjadi etanol. Selama proses ini berlangsung, terjadi perubahan kimia dalam substrat (glukosa) akibat aktivitas enzim yang dihasilkan oleh *Sacharomyces cerevisiae* [13]. Penggunaan mikroba ini didasari atas kemampuannya dalam produksi etanol yang banyak serta memiliki toleransi yang tinggi terhadap kondisi alkohol dan senyawa penghambat pertumbuhan lainnya [16].

Sejauh ini, penelitian terkini mengenai produksi bioetanol dari batang sorgum manis yang telah dilakukan adalah menggunakan biakan campuran *Saccharomyces cerevisiae-Pichia stipitis* yang menghasilkan kadar bioetanol tertinggi sebesar 2,1% (v/v) dengan waktu fermentasi selama 24 jam, konsentrasi inokulum optimum sebesar 10% (v/v), dan substrat batang sorgum manis yang digunakan sebesar 50 gr. Kadar etanol yang cukup rendah dalam penelitian ini disebabkan karena terbentuknya produk samping seperti furfural hasil degradasi xilosa, asam karboksilat dan asam asetat hasil dekomposisi hemiselulosa dan komponen fenol dari hasil degradasi lignin [17]. Oleh karenanya, penelitian ini akan berfokus pada optimasi suhu, pH, dan konsentrasi inokulum campuran *Saccharomyces cerevisiae-Trichoderma reesei* untuk mengonversi gula terlarut dan serat (lignoselulosa) batang sorgum manis sekaligus menjadi bioetanol dengan metode SSF.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme, Bahan Kimia, dan Media

a. *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevisiae*

Isolat *Trichoderma reesei* yang dipakai berasal dari strain FNCC 6012 dengan bentuk liophilisasi yang dikembangkan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gajah Mada. Isolat *Saccharomyces cerevisiae* yang dipakai berasal dari ragi instan fermipan.

b. Batang Sorgum Manis

Batang sorgum yang digunakan sebagai bahan utama diperoleh dari Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Naibonat, Kabupaten Kupang.

c. Metode

Persiapan dan *Pre-treatment* Bahan Baku

Batang sorgum manis dibersihkan, dipotong menjadi ukuran kecil lalu diblender hingga menjadi bubur batang sorgum manis (BBSM) dengan perbandingan 1:1. Diambil 50 gram BBSM lalu diukur kadar gula awalnya. Selanjutnya, BBSM dimasukkan ke dalam erlenmeyer 750 mL dan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Untuk proses SSF, diperlukan BBSM sebanyak 5400 mL BBSM per 54 botol.

Pembiakan Inokulum *T. reesei* dan *S. cerevisiae*

Isolat murni *T. reesei* ditumbuhkan pada medium *potato dextrose agar* (PDA) miring lalu diinkubasi selama 48 jam pada 37 °C. Inokulum *T. reesei* yang akan digunakan pada fermentasi dibuat dengan cara mensuspensikan kultur *T. reesei* dari agar miring ke dalam 250 gram BBSM yang disuplementasi dengan urea 2 gram, amonium sulfat 2 gram, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O masing-masing 75 miligram dan 5 mL larutan CMC 1%. Setelah diinkubasi selama 48 jam dan suspensi spora di dalam medium mencapai konsentrasi 1,8x10⁸ sel/mL, inokulum tersebut siap digunakan [18].

Inokulum *S. cerevisiae* yang akan digunakan dipersiapkan dengan membiakkan 1 gram ragi instan di dalam larutan glukosa 12,5% lalu ditambahkan *yeast extract* dan *bacteriological peptone* dengan konsentrasi masing-masing 0,5%, MgSO₄·7H₂O dan KH₂PO₄ masing-masing dengan konsentrasi 0,15%. Inokulum diinkubasi selama satu malam (20 jam) pada suhu ruang.

Pengukuran Kadar Gula Reduksi dan Total

Untuk mengukur kadar gula reduksi secara kualitatif dengan metode DNS, dilarutkan 1,06 gram asam 3,5-dinitrosalisilat dan 1,98 gram NaOH dalam 141,6 mL aquades, ditambahkan 30,6 gram Na-K-Tartrat, 0,76 gram fenol yang dicairkan pada suhu 50°C dan 0,83 gram natrium metabisulfit. Larutan lalu dihomogenkan. Untuk membuat kurva standar, dibuat larutan glukosa dengan melarutkan 100 mg glukosa monohidrat dalam 100 mL aquades, selanjutnya dari larutan tersebut diencerkan sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 350, 300, 250, 200, 150, dan 100 ppm [19]. Sebelum sampel di analisis, diambil 5 mL sampel dan disentrifugasi pada kecepatan 300 rpm selama 3 menit, setelahnya diambil 1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 3 mL pereaksi DNS kemudian dipanaskan pada penangas air (sekitar 90 °C) selama 5 menit lalu didinginkan pada suhu ruang. Larutan dipindahkan ke dalam kuvet diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 550 nm. Kadar gula reduksi ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut [20].

$$\%gula\ reduksi = \frac{absorbansi}{slope} \times 100\% \quad (1)$$

Untuk mengukur kadar gula total dengan metode *luff-schoorl* maka perlu dibuat larutan A dengan melarutkan 2,5 g CuSO₄ anhidrat dalam 10 mL aquades, larutan B dengan melarutkan 5 g asam sitrat dalam 5 mL aquades, dan larutan C dengan melarutkan 38,8 g Na₂CO₃ dalam 40 mL aquades mendidih. Larutan B dituang dalam larutan C sambil diaduk lalu dicampur dengan larutan A dalam labu 100 mL. Tera hingga tanda batas. Untuk pembakuan natrium tiosulfat, ditambahkan 100 mg KIO₃ ke dalam erlenmeyer, 25 mL air mendidih, 2 gram KI, dan 5 ml HCl pekat, digojog, kemudian ditutup. Segera setelah itu dititrasi dengan larutan Na₂S₂O₃ 0,1 N hingga berwarna kuning pucat setelah itu ditambahkan 5 mL indikator amilum 1%, lalu titrasi dilanjutkan hingga warna biru hilang dan larutan menjadi putih susu.. Sebanyak 5-10 g dilarutkan dalam labu takar 100 mL lalu tepatkan sampai tanda dengan aquades kemudian ditambah Pb asetat. Setelah itu ditambah Na₂CO₃, lalu sampel direfluks selama 3 jam dengan HCl. Setelah direfluks, diambil 10 mL larutan dan ditambahkan 25 mL larutan *luff schoorl*. Dibuat pula perlakuan blanko yaitu dengan menambahkan 25 mL larutan *luff schoorl* dengan 25 mL aquades. Erlenmeyer dihubungkan dengan pendingin balik, kemudian dididihkan selama 10 menit. Selanjutnya segera didinginkan kemudian ditambah

15 mL KI 20% dan 25 mL H₂SO₄ 25%. Iodium yang dibebaskan dititrasi dengan larutan Na₂S₂O₃ 0,1 N memakai indikator amilum 1% sebanyak 5 mL. Kadar gula total ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut [21].

$$\% \text{ Gula reduksi (sebelum/setelah inversi)} = \text{berat contoh} \times \frac{100}{\text{berat sampel}} \times F_p \times \frac{1}{1000} \quad (2)$$

$$\% \text{ Sukrosa} = 0,95 \times (\% \text{ gula setelah inversi} - \% \text{ gula sebelum inversi}) \quad (3)$$

$$\text{Gula Total} = \% \text{ Gula reduksi} + \% \text{ Sukrosa} \quad (4)$$

Produksi Bioetanol dengan SSF

Dimasukkan BBSM dan aquades dengan perbandingan 1:1 ke dalam botol kaca 150 mL, kultur campuran *S. cerevisiae*-*T. reesei* diinokulasi ke dalam campuran dengan perbandingan 1:1 dengan variasi 4, 14, dan 25% (v/v) pada kondisi pH 3,4, dan 5, serta suhu 25, 35, dan 45°C. Sampel lalu diinkubasi selama 24 jam. Serat sisa dan alkohol yang terbentuk dipisahkan dengan penyaringan lalu didestilasi. Kadar alkohol diukur dengan alkoholmeter. Yield etanol akan dihitung dengan persamaan berikut.

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (5)$$

Dengan P adalah konsentrasi produk pada akhir reaksi dan S adalah konsentrasi substrat (gula) pada akhir reaksi.

Teknik Pengambilan dan Analisis Data

Desain percobaan untuk sistem simultan (SSF) akan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial desain 3×3×3 dengan variasi suhu 25, 35, dan 45 °C, variasi pH 3, 4, dan 5, dan variasi konsentrasi inokulum 4, 14, dan 25% dengan pengulangan sebanyak 2 kali. Untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan yang diberikan, serta pengaruh keterkaitan antarvariabel terhadap yield etanol, data yang dihasilkan dianalisis menggunakan ANOVA dua arah dengan taraf signifikansi 0,05 (95%). Untuk mengetahui persamaan matematis kondisi optimal maka data diolah dengan *response surface methodology* (RSM) menggunakan *design expert II*. Melalui metode RSM dapat diketahui kondisi terbaik untuk memperoleh bioetanol yang optimal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Bioetanol dengan SSF

Produksi bioetanol dimulai dengan mencampurkan BBSM dan aquades dengan perbandingan 1:1 Selanjutnya pH sampel diatur sesuai dengan rancangan percobaan kemudian sampel dimasukkan ke dalam 54 botol fermentor lalu ditambahkan inokulum *T. reesei* dan *S. cerevisiae* dengan perbandingan 1:1 dan variasi konsentrasi inokulum dari 4, 14, hingga 25%. Proses SSF ini dijalankan pada suhu yang berbeda yakni pada 25, 35, dan 45 °C. Hasil Fermentasi kemudian disaring dan didestilasi. Kadar alkohol dalam destilat diukur dengan alkoholmeter. Data rerata kadar alkohol dalam destilat tergambar dalam tabel 1.

Tabel 1. Rerata Kadar Alkohol dalam Destilat (%m/v)

Suhu	pH	Konsentrasi Inokulum (%v/v)		
		4%	14%	25%
25 °C	3	5,262	7,893	5,262
	4	5,262	7,893	5,262
	5	5,262	10,524	7,893
35 °C	3	5,262	7,893	5,262
	4	5,262	10,524	7,893
	5	5,262	13,155	10,524
45 °C	3	5,262	5,262	5,262
	4	5,262	7,893	5,262

5	5,262	10,524	10,524
---	-------	--------	--------

Berdasarkan tabel 1, pada berbagai variasi suhu dan pH dimana konsentrasi yang digunakan sebesar 4%, hasil fermentasi terlihat sama sebesar 5,262%. Hal ini menunjukkan pengaruh kombinasi suhu dan pH pada konsentrasi ini tidak signifikan. Penyebab yang mungkin adalah karena pada konsentrasi yang rendah, mikroorganisme kelelahan dalam mengubah substrat menjadi etanol. Jumlah mikroorganisme yang sedikit tentu dapat memperlambat laju hidrolisis dan fermentasi sehingga sangat mungkin pada berbagai kondisi suhu dan pH, kadar etanol yang terbentuk relatif sama dan kecil. Pada variasi suhu dan pH dimana konsentrasi yang digunakan sebesar 14% dan 25%, kadar etanol yang dihasilkan menunjukkan peningkatan seiring kenaikan pH, namun pada kenaikan suhu menjadi 45 °C etanol yang terbentuk tidak sebesar variasi suhu sebelumnya. Kondisi ini dapat terjadi karena pada dasarnya setiap mikroorganisme memiliki suhu optimum dalam pertumbuhan maupun aktivitasnya. Menurut penelitian sebelumnya, kenaikan suhu dapat meningkatkan reaksi kimia enzim namun bila suhu relatif tinggi akan terjadi denaturasi struktur enzim yang berakibat pada penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim [22]. *Saccharomyces cerevisiae* mampu mengonversi etanol dengan baik pada rentang suhu 28-37 °C dan kisaran pH 3,5-6,0. Meskipun demikian, *Saccharomyces cerevisiae* mampu bertahan hidup hingga kisaran suhu 47 °C [23]. Dengan demikian, pada suhu 45 °C hasil etanol yang terbentuk cenderung tidak sebesar variasi suhu sebelumnya karena suhu ini bukan merupakan titik optimum bagi *Saccharomyces cerevisiae*. Berdasarkan data pada tabel 4.1, kadar etanol tertinggi sebesar 13.155% yakni pada kondisi suhu 35 °C, pH 5, dan konsentrasi 14%. Kecenderungan lainnya yang muncul adalah kadar etanol yang terbentuk pada berbagai variasi suhu dan pH, menunjukkan kenaikan lalu penurunan seiring meningkatnya konsentrasi biakan campuran yang digunakan. Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menggunakan mikroba asosiasi dalam memproduksi bioetanol. Mikroba asosiasi dengan konsentrasi 15% menunjukkan hasil tertinggi dibanding konsentrasi 25% dengan kadar sebesar 5,65%. Tendensi ini muncul karena semakin banyak konsentrasi yang digunakan maka akan terjadi kompetisi antarmikroorganisme dalam mengonsumsi substrat sehingga kadar yang dihasilkan menurun [24].

Optimasi dengan *Response Surface Methodology*

Untuk mengetahui titik optimum dan pengaruh mandiri serta interaksi faktor-faktor dalam desain penelitian ini, maka selanjutnya hasil penelitian dianalisis dengan *response surface methodology* (RSM) menggunakan software design expert II. Diketahui persamaan yang menggambarkan pengaruh variabel bebas terhadap respon serta hubungan antagonis-sinergis interaksi variabel terhadap respon disebut sebagai *coded equation* ditulis dalam persamaan 5 berikut.

$$Y = +0.6059 + 0.0174X_1 + 0.0696X_2 + 0.0609X_3 + 0.0196X_1X_2 + 0.0196X_1X_3 + 0.0587X_2X_3 - 0.1054X_1^2 + 0.0512X_2^2 - 0.1837X_3^2 \quad (5)$$

Persamaan matematis yang memprediksikan besarnya respon yang akan didapat disajikan sebagai *actual equation* sesuai dengan persamaan 6 berikut

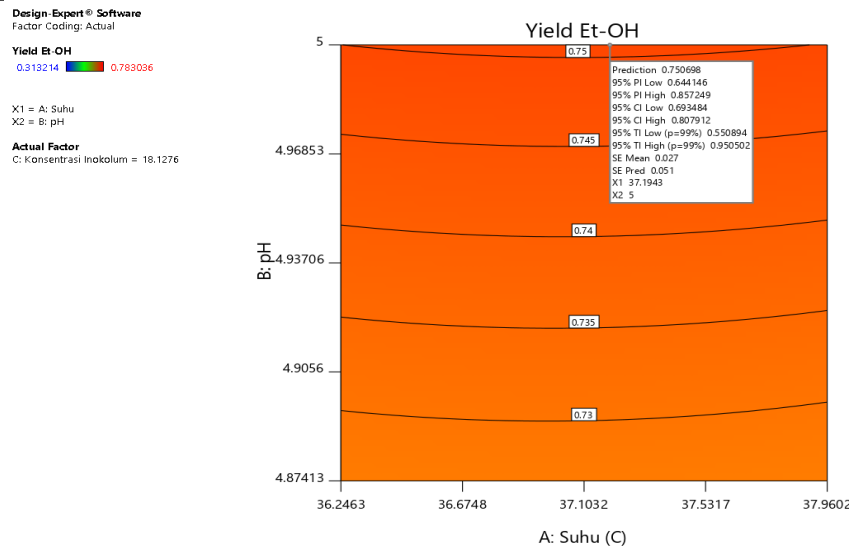
$$Y = +0,054021 + 0,064973X_1 - 0,489827X_2 + 0,025219X_3 + 0,001958X_1X_2 + 0,000186X_1X_3 + 0,005593X_2X_3 - 0,001054X_1^2 + 0,051227X_2^2 - 0,001666X_3^2 \quad (6)$$

dengan Y sebagai respon (*yield* etanol), X_1 mewakili suhu, X_2 mewakili pH, dan X_3 mewakili konsentrasi inokulum.

Berdasarkan analisis dengan *design expert* sesuai tabel 2, *yield* tertinggi dari model yang diberikan berada pada suhu 37,194 °C, pH 5, dan konsentrasi inokulum sebesar 18,128%. Kondisi ini memiliki nilai fungsi *desirability* sebesar 0,886. Rentang nilai *desirability* 0,8-1 menyatakan bahwa tingkat kesesuaian dan ketepatan model terhadap respon sangat baik sehingga tujuan telah tercapai [25-26]. Plot kontur solusi optimasi ditampilkan dalam Gambar 1.

Tabel 2. Solusi Optimasi

Suhu	Ph	Konsentrasi	Yield Et-OH	Desirability
37,194 °C	5	18,128%	0,751	0,886



Gambar 1. Plot Kontur Solusi Optimasi

Untuk mengetahui interaksi respon antarvariabel yang terkandung dalam persamaan yang didapat, kita harus merujuk pada hasil *analysis of variance* (ANOVA). Model percobaan yang didapat memiliki 10 term dengan masing-masing term terdiri atas 1 derajat bebas. Term tersebut terdiri dari 3 term efek linear, 4 term efek interaksi, dan 3 term efek kuadratik. Analisis varians dapat dilihat pada tabel 3 berikut.

Tabel 3. ANOVA Model Kuadratik Respon

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	0,5723	10	0,0636	34,74	< 0,0001	Significant
A-Suhu	0,0055	1	0,0055	2,98	0,1016	
B-pH	0,0872	1	0,0872	47,64	< 0,0001	
C-Konsentrasi Inokulum	0,0668	1	0,0668	36,47	< 0,0001	
AB	0,0061	1	0,0061	3,35	0,0838	
AC	0,0061	1	0,0061	3,35	0,0838	
BC	0,0552	1	0,0552	30,15	< 0,0001	
A ²	0,0313	1	0,0313	17,08	0,0006	
B ²	0,0074	1	0,0074	4,04	0,0598	
C ²	0,0950	1	0,0950	51,90	< 0,0001	
ABC	0,0061	1	0,0061	3,89	0,0652	
Residual	0,0329	17	0,0018			
Lack of Fit	0,0329	4	0,0066		0,4526	Not significant
Pure Error	0,0000	13	0,0000			
Cor Total	0,6053	27				

Berdasarkan tabel 3 disimpulkan bahwa model ini signifikan dan kondisi ini mengindikasikan bahwa pH, konsentrasi, interaksi pH dan konsentrasi, efek kuadratik suhu, dan efek kuadratik berkorelasi signifikan selama proses ko-fermentasi terhadap *yield* etanol optimum. Interaksi suhu, pH, dan konsentrasi inokulum tidak berpengaruh signifikan selama proses ko-fermentasi terhadap *yield* etanol optimum.

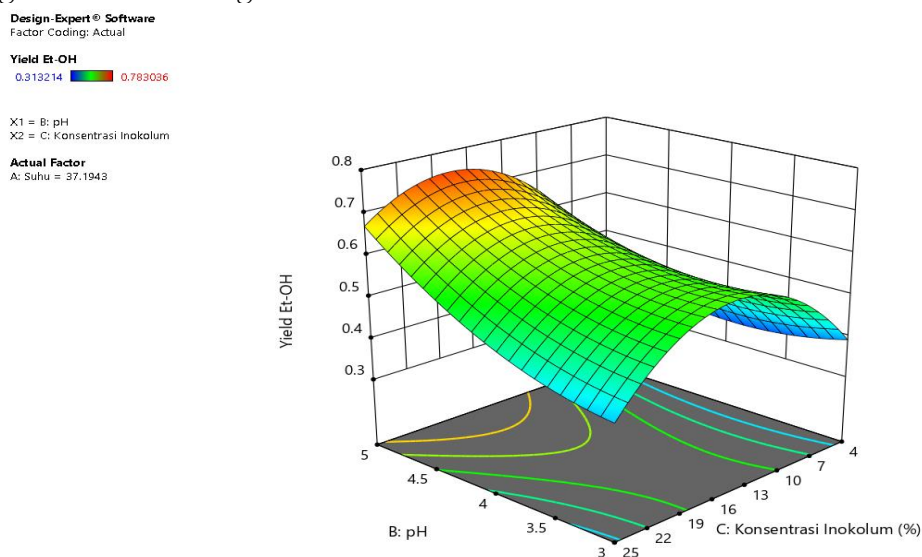
Selanjutnya, untuk mengetahui bagaimana pengaruh yang diberikan masing-masing term, perlu dilihat estimasi koefisien masing-masing term pada tabel 4 berikut.

Tabel 4. Estimasi Koefisien

Factor	Coefficient Estimate	Df	Standard Error
Intercept	0,6059	1	0,0146
A-Suhu	0,0174	1	0,0101

B-pH	0,0696	1	0,0101
C-Konsentrasi Inokulum	0,0609	1	0,0101
AB	0,0196	1	0,0107
AC	0,0196	1	0,0107
BC	0,0587	1	0,0107
A ²	-0,1054	1	0,0255
B ²	0,0512	1	0,0255
C ²	-0,1837	1	0,0255
ABC	0,0196	1	0,0099

Dari tabel 4 terlihat bahwa efek linear suhu, efek interaksi suhu dan pH, efek interaksi suhu dan konsentrasi, efek interaksi suhu, pH, dan konsentrasi, dan efek kuadrat pH tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap respon. Hal ini dibuktikan dengan nilai koefisien estimasinya yang kecil dibanding *terms* lainnya sehingga tidak berpengaruh nyata terhadap respon. Dari setiap *terms*, yang memberikan pengaruh positif terhadap respon adalah efek linear pH dan efek linear konsentrasi. Sedangkan yang memberikan pengaruh negatif terhadap respon adalah efek kuadrat suhu dan efek kuadrat konsentrasi. Untuk interaksi antardua faktor, kita tidak dapat langsung menjustifikasi bahwa tanda positif pada estimasi koefisien selalu memberikan efek positif pada respon *yield* etanol. Ada kalanya, nilai kedua faktor yang besar menghasilkan respon yang kecil. Yang dapat dipastikan dalam kondisi ini adalah nilai positif pada interaksi variabel pH dan konsentrasi inokulum adalah interaksi sinergis. Berdasarkan tabel 4 dapat diketahui pula, interaksi antarvariabel yang berpengaruh signifikan pada respon adalah interaksi antara pH dan konsentrasi inokulum. Pola kontur interaksi keduanya digambarkan dalam gambar 2 berikut.



Gambar 2. Plot Kontur Interaksi pH dan Konsentrasi Inokulum

Dari gambar 2 terlihat bahwa *yield* etanol optimum yang dihasilkan cenderung meningkat ketika pH bergeser dari kisaran pH 3 menjadi pH 5 dengan kisaran konsentrasi inokulum yang juga meningkat. Pada pH yang rendah dan konsentrasi yang rendah, *yield* yang dihasilkan juga kecil yakni berkisar diantara 0,3-0,4. Kasus ini dapat saja terjadi karena pada pH yang rendah, metabolisme biakan campuran inokulum (*T. reesei* dan *S. cerevisiae*) dalam mensekresikan enzim dan beraktivitas terganggu. Disamping itu, pH yang rendah ini bukan merupakan lingkungan yang baik sebab setiap mikroorganisme memiliki pH tertentu agar dapat bertahan hidup dan melakukan aktivitasnya. Bila kedua inokulum digunakan bersamaan dalam proses SSF, maka kemungkinan pH optimum berkisar diantara pH 4 hingga pH 5 [23, 27-28]. Dari gambar 2 terlihat bahwa, bila pH dinaikkan menjadi 5 dan konsentrasi dinaikkan menjadi 18%, respon tertinggi yang akan dihasilkan sebesar 0,751. Namun, pada konsentrasi tertinggi yakni 25%, peneliti menemukan bahwa respon yang dihasilkan cenderung menurun karena adanya kemungkinan terjadi kompetisi

antarmikroorganisme dalam mengubah substrat menjadi produk sesuai yang dilaporkan pada penelitian sebelumnya [24]. Interaksi yang terjadi antara pH dan konsentrasi inokulum adalah interaksi sinergis.

KESIMPULAN

Kondisi optimal untuk mendapatkan *yield* bioetanol tertinggi (0,751) dengan menggunakan biakan campuran *Trichoderma reesei-Saccharomyces cerevisiae* berada pada suhu 37,194 °C, pH 5, dan konsentrasi inokulum sebesar 18,128% (v/v). Adapun persamaan matematis yang menggambarkan hubungan variabel terhadap respon ditulis dalam

$$Y = +0,054021 + 0,064973X_1 - 0,489827X_2 + 0,025219X_3 + 0,001958X_1 X_2 + 0,000186X_1 X_3 + 0,005593X_2 X_3 - 0,001054X_1^2 + 0,051227X_2^2 - 0,001666X_3^2$$

dengan Y sebagai respon (*yield* etanol), X_1 mewakili suhu, X_2 mewakili pH, dan X_3 mewakili konsentrasi inokulum. Perlu dikembangkan lagi ke depannya penelitian optimasi waktu hidrolisis dan fermentasi serentak menggunakan biakan campuran yang sama untuk mendapatkan *yield* etanol optimum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin berterimakasih kepada Bapak Dr. Jasman, S.Pd.,M.Si yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian ini dan membantu kebutuhan finansial selama penelitian. Penulis juga ingin berterimakasih kepada Bapak Kasimir Sarifudin, S.Si.,M.Si. selaku Kepala Lab Pendidikan Kimia Undana dan segenap teknisi laboratorium yang membantu dalam urusan administrasi hingga teknis penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Y. Tiandho, W. Sunanda, F. Afriani, A. Indriawati dan T. Handayani, "Accurate model for temperature dependence of solar cell performance according to phonon energy," *Latvian Journal of Physics and Technical Sciences*, vol. 55, no. 5, pp. 15-25, 2018.
- [2] A. K. Wardani, Pengaruh Lama Waktu Fermentasi Pada Pembuatan Bioetanol dari *Sargassum* sp. Menggunakan Metode Hidrolisis Asam dan Fermentasi Menggunakan Mikroba Asosiasi (*Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* dalam Ragi Tape dan Ragi Roti), Yogyakarta: Universitas Sanata Darma, 2018.
- [3] D. Ginting, "Pembuatan Bioetanol Secara Fermentasi dari Hidrolisat Tongkol Jagung dengan Menggunakan Campuran *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae*," 2017.
- [4] K. Seungdo dan B. E. Dale, *Global Potential Bioethanol Production From Wasted Crops And Crop Residue*, Michigan: Michigan State University, 2014.
- [5] Smunindar, *Produksi Bioetanol dari Limbah Tanaman Jagung melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Simultan dengan Kultur Campuran *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis**, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 2010.
- [6] U. Murdiyatmo, "Pengembangan Industri Ethanol: Prospek, Kendala, dan Tantangan," *Workshop Nasional Bisnis Biodiesel dan Bioethanol di Indonesia*, pp. 80-86, 2006.
- [7] T. Nurmala, *Serealia Sumber Karbohidrat Utama*, Jakarta: Rineka Cipta, 2003.
- [8] Jasman, "Produktivitas biomassa dan gula dari sorgum manis (*sorghum bicolor* (L) Moench) sebagai bahan fermentasi bioetanol (laporan akhir penelitian hibah disertasi doktor)," LPPM Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2010.
- [9] B. Reddy, S. Ramesh, P. Reddy, A. Kumar, K.K.Sharma, S. C. dan A. Palaniswamy, *Sweet Sorghum: Food, Feed, Fodder, and Fuel Crop*, India: ICRISAT, 2006.
- [10] A. Zubair, *SORGUM: Tanaman Multi Manfaat*, Bandung: Unpad Press, 2016.

- [11] S. Prasad, A. Singh, N. Jain dan H. Hoshi, "Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India," *Energy Fuel*, vol. 21, pp. 2415-2420, 2007.
- [12] V. H. Teetor, D. V. Duclos, E. T. Wittenberg, K. M. Young, J. Chawhuaymak, M. R. Riley dan D. T. Ray, "Effects of planting date on sugar and ethanol yield of sweet sorghum grown in Arizona," *Elsevier*, vol. 34, no. 2, pp. 1293-1300, 2010.
- [13] M. B. Pabendon, M. Aqil dan S. Mas'ud, "Kajian Sumber Bahan Bakar Nabati Berbasis Sorgum Manis," pp. 123-129, 2011.
- [14] M. Gozan, *Teknologi Bioetanol Generasi-Kedua*, Jakarta: Erlangga, 2014.
- [15] Megawati, *Bioetanol Generasi Kedua*, Yogyakarta: Graha Ilmu, 2015.
- [16] H. Xiong, "Production and Characterization of *Trichoderma reesei* and *Thermomyces Lanuginosus Xylanases*," Technical biochemistry report, Teknillisen biokemian tiedote, 9, Finlandia, 2004.
- [17] M. Balat, H. Balat dan C. Öz, "Progress in bioethanol processing," *Journal Progress in Energy and Combustion Science*, pp. 551-573, 2008.
- [18] A. Kartini dan E. Pandebesie, "Produksi Bioetanol dari Batang Sorghum bicolor (L.) Moench dengan *Saccharomyces cerevisiae* dan Konsorsium *Saccharomyces cerevisiae*-*Pichia stipitis*," *Jurnal Purifikasi*, vol. 16, no. 2, pp. 118-129, 2016.
- [19] R. Fransistika, N. Indiwati dan L. Destiarti, "Pengaruh waktu fermentasi campuran *Trichoderma reesei* dan *aspergillus niger* terhadap kandungan protein dan serat kasar ampas sagu," *JKK*, vol. 1, no. 1, pp. 35-39., 2012.
- [20] Y. Rismawati, S. Bahri dan Prismawiryanti, "Produksi Glukosa dari Jerami Padi (*Oryza sativa*) Menggunakan Jamur *Trichoderma sp.*," *Jurnal Kovalen*, vol. 2, no. 2, pp. 67-76, 2016.
- [21] Azura, *Pembuatan Bioetanol dari Bagas Batang Sorgum Manis melalui Delignifikasi oleh NaOH*, Bogor: Instituit Pertanian Bogor, 2015.
- [22] Ifmaily, "Penetapan Kadar Pati Buah Sukun (*Artocarpus altilis* L) dengan Metode Luff School," *Chempublish Journal*, vol. 3, no. 1, pp. 1-10, 2018.
- [23] P. Duque, *Acid-Functionalized Nanoparticles for Hydrolysis Of Lignocellulosic Feedstocks.*, Manhattan, Kansas: Department of Biological and Agricultural Engineering, Kansas State University, 2009.
- [24] Y. Sun dan J. Cheng, "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review," *Bioresource Technology Journal*, no. 83, pp. 1-11, 2002.
- [25] R. Duenas, R. Tengerdy dan M. Correa, "Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse," *World Journal Microbiology Biotechnology*, vol. 11, pp. 333-337, 1995.
- [26] K. Apriani, Y. Haryani dan G. Kartika, "Produksi dan Uji Aktivitas Selulase dari Isolat Bakteri Selulolitik Sungai Indragari," *Jom FMIPA*, pp. 261-267, 2014.
- [27] E. Taufik, *Fermentasi Media Padat Kulit Buah Cokelat oleh Aspergillus niger untuk Produksi Pektinase*, Bogor: Institut Pertanian Bogor, 1992.
- [28] Gandjar dan Indrawati, *Mikologi Dasar dan Terapan*, Jakarta: Yayasan Obor Indonesia, 2006.
- [29] D. Maurya, D. Singh, D. Pratap dan J. Maurya, "Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*," *Journal of Environmental Biology*, vol. 33, pp. 5-8, 2012.

-
- [30] B. Nidetzky, M. Hayn, R. Macarron dan W. Steiner, "Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses," *Biotechnology Letters*, vol. 15, no. 1, pp. 71-76, 1993.
- [31] D. Saropah, Penentuan Kondisi Optimal Ekstrak Kasar Selulase Bakteri Selulolitik Hasil Isolasi dari Bekatul, Malang: UIN Malang, 2012.
- [32] K. Olofsson, M. Bertilsson dan G. Liden, "A Short Review on SSF- An Interesting Process Option For Ethanol Production From Lignocellulosic Feedstock," *Biotechnology Biofuels*, no. 1, 2008.
- [33] E. Dompeipen dan M. A. Leha, "Pengaruh Konsentrasi Inokulum dan Waktu Fermentasi dalam Produksi Bioetanol dari Rumput Laut *Eucheuma cottonii* dengan Menggunakan Mikroba Asosiasi," *Jurnal Kimia Kemasan*, vol. 38, no. 1, pp. 21-30, 2016.
- [34] S. Sunaryo, "Optimasi Multi Respon dengan Pendekatan Fungsi Desirability untuk Rancangan Gabungan Mixture Design dan Orthogonal Array dari Taguchi pada Proses Pembuatan Lem di PT. XYZ," *Jurnal Sains dan Teknologi*, vol. 7, no. 2, pp. 106-113, 2008.
- [35] M. J. Anderson dan P. J. Whitcomb, *RSM Simplified: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiment*, Florida: CRC Press, 2017.
- [36] S. Sukadarti, S. Kholisoh, H. Prasetyo, W. Santoso dan T. Mursini, "Produksi Gula Reduksi dari Sabut Kelapa Menggunakan Jamur *Trichoderma reesei*," dalam " *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan". Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta, 2010.
- [37] Kodri, B. Argo dan R. Yulianingsih, "Pemanfaatan Enzim Selulase dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus Niger* sebagai Katalisator Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi dengan Pretreatment Microwave," *Bioproses Komoditas Tropis*, pp. 36-43, 2013.