

# OPTIMASI FERMENTASI BAGAS TEBU OLEH *Zymomonas mobilis* CP4 (NRRL B-14023) UNTUK PRODUKSI BIOETANOL

Optimization of Sugarcane Bagasse Fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 (NRRL B-14023) for Bioethanol Production

Atmiral Ernes, Lia Ratnawati, Agustin Krisna Wardani, Joni Kusnadi

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang 65145  
Email: agustinwardani@ub.ac.id

## ABSTRAK

Bioetanol generasi kedua dapat diproduksi dari fermentasi bahan terbarukan, seperti produk hasil pertanian, dan limbah atau hasil samping pengolahan industri dan rumah tangga. Tujuan penelitian ini adalah optimasi parameter fermentasi yang meliputi konsentrasi inokulum, konsentrasi urea, dan lama fermentasi untuk produksi etanol dari bagas tebu oleh *Zymomonas mobilis* CP4 dengan menggunakan *response surface methodology* (RSM) *central composite experimental design* (CCD). Kondisi respon yang optimal berdasarkan prediksi model diperoleh pada konsentrasi inokulum 15% (v/v), konsentrasi urea 0,3% (b/v), dan lama fermentasi 45 jam, dengan prediksi respon kadar etanol sebesar 1,257% (v/v). Berdasarkan hasil penelitian, kadar etanol optimal diperoleh sebesar 1,213% (v/v), yang menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh dengan prediksi model. *Yield* etanol yang diperoleh sebesar 0,479 dengan efisiensi fermentasi 93,9%. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa strain bakteri *Zymomonas mobilis* CP4 memiliki potensi yang cukup menjanjikan sebagai mikroba penghasil etanol.

**Kata kunci:** Bioetanol, bagas tebu, *Zymomonas mobilis* CP4, optimasi fermentasi

## ABSTRACT

Second generation bioethanol can be produced from fermentation of natural renewable materials, such as agricultural crops, as well as from industrial and domestic waste. The present study was aimed to optimize the fermentation process (inoculum concentration, urea concentration, and fermentation time) for ethanol production from sugarcane bagasse by *Zymomonas mobilis* CP4 using *response surface methodology* (RSM) *central composite experimental design* (CCD). The RSM model predicted the optimum value of ethanol content was 1.257% (v/v) at inoculum concentration 15% (v/v), urea concentration 0.3% (w/v), and fermentation time 45 h. Based on the experiment, the ethanol concentration was 1.213% (v/v), which was in close agreement with the predicted value. Ethanol yield of this experiment was 0.479 with fermentation efficiency of 93.9%. The results presented here proved a significant contribution of *Z. mobilis* CP4 to the production of bioethanol from sugarcane bagasse.

**Keywords:** Bioethanol, sugarcane bagasse, *Zymomonas mobilis* CP4, fermentation optimization

## PENDAHULUAN

Kebutuhan etanol untuk berbagai tujuan seperti alternatif sumber energi, pelarut, *cleansing agents* dan pengawet, menyebabkan produksi etanol semakin meningkat. Disamping itu, sumber bahan bakar fosil yang semakin menipis ketersediaannya dan kebutuhan akan bahan bakar yang ramah lingkungan, menjadi fokus penelitian dunia saat ini untuk menemukan sumber energi yang baru, bersih dan

murah (Afifi dkk., 2011). Bioetanol merupakan salah satu sumber energi alternatif yang berpotensi sebagai *biofuel* untuk menggantikan bahan bakar fosil dan bersifat ramah lingkungan (Um, 2007).

Pengembangan bioetanol generasi kedua diproduksi dari bahan berlignoselulosa yang dapat menjaga ketersediaan ian (Rabelo dkk., 2011). Bagas tebu adalah bahan berlignoselulosa yang berpotensi sebagai bahan baku bioetanol. Sebanyak 10,5

juta ton per tahun bagas tebu dihasilkan dari 61 pabrik gula yang aktif giling pada tahun 2008 (Santoso, 2011). Sekitar 60% dari jumlah bagas tebu yang dihasilkan dimanfaatkan oleh pabrik gula sebagai bahan bakar dan diperkirakan 40% dari bagas tebu tersebut belum dimanfaatkan (Husin, 2007 dalam Andaka, 2011). Dawson dan Boopathy (2008) mengungkapkan bahwa kandungan selulosa, hemiselulosa dan lignin dari bagas tebu masing-masing 30%, 23% dan 22%.

*Saccharomyces cerevisiae* telah lama dikenal sebagai mikroorganisme yang umum digunakan dalam pembuatan etanol (Panesar dkk., 2006). Penelitian yang sekarang difokuskan pada bakteri gram negatif dan fakultatif anaerob, *Zymomonas mobilis* yang berpotensi sebagai alternatif untuk produksi etanol. Bakteri ini memiliki kelebihan dibandingkan *Saccharomyces cerevisiae*, diantaranya produktivitas etanol 3-5 kali lebih tinggi dengan *yield* etanol secara teoritis sebesar 97%, toleran terhadap kadar gula tinggi, dan waktu fermentasi yang lebih cepat karena konsumsi gula yang lebih cepat dibandingkan *S. cerevisiae* (Sprenger, 1996; Gunasekaran dan Raj, 1999; Glazer dan Nikaido, 2007).

Optimasi parameter fermentasi memegang peranan yang penting dalam keberhasilan suatu industri bioproses, disamping jenis mikroorganisme yang digunakan. Penambahan konsentrasi inokulum, konsentrasi urea, dan lama fermentasi menjadi hal yang utama untuk dioptimasi agar etanol yang dihasilkan optimal dan waktunya efisien. Beberapa penelitian yang melibatkan penambahan konsentrasi inokulum *Zymomonas mobilis* dan konsentrasi urea pada berbagai medium fermentasi serta lama fermentasi telah dilakukan (Onsoy dkk., 2007; Zhang dan Feng, 2010; Maiti dkk., 2011; Nofemele dkk., 2012), namun penelitian terkait dengan optimasi fermentasi pada bahan berlignoselulosa seperti bagas tebu masih belum banyak dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah optimasi konsentrasi inokulum, konsentrasi urea, dan lama fermentasi untuk produksi etanol dari bagas tebu. Optimasi dilakukan dengan menggunakan *response surface methodology* (RSM) *central composite experimental design* (CCD) dengan tiga faktor perlakuan yaitu konsentrasi inokulum ( $X_1$ , %v/v), konsentrasi urea ( $X_2$ , %b/v), serta lama fermentasi ( $X_3$ , Jam) yang merupakan variabel bebas serta konsentrasi etanol ( $Y_i$ , %v/v) sebagai variabel respon. Metode RSM dipilih untuk optimasi karena memiliki keunggulan dibandingkan dengan metode konvensional, diantaranya jumlah perlakuan yang lebih sedikit dengan akurasi yang lebih tinggi sehingga lebih efisien dari segi waktu dan biaya. Metode ini mampu mengeksplorasi korelasi antar banyak faktor untuk mendapatkan kondisi produksi paling optimal dalam suatu bioproses serta memprediksi suatu respon (Chang dkk., 2006).

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Mikroba yang digunakan sebagai penghasil etanol adalah *Zymomonas mobilis* CP4 (NRRL B-14023) yang diperoleh dari *ARS Culture Collection National Center for Agricultural Utilization Research*, Preoria II, USA. Bagas tebu diperoleh dari PG. Kribet, Malang, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan antara lain hidrogen peroksida (Merck), enzim selulase murni dari *Trichoderma viride* dengan aktivitas 0,2 unit/mg (Serva), urea (Merck), glukosa (Merck), *yeast extract* (Pronadisa),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck), DNS (Sigma-aldrich), Na-K Tartarat (Merck), NaOH (Merck), fenol kristal, natrium sulfat (Merck), asam asetat (Merck), dan Na-asetat (Merck).

### Alat

Alat yang digunakan dalam produksi etanol antara lain pengering kabinet, ayakan ukuran 40 mesh, timbangan analitik (Mettler Toledo AL 204), autoklaf (Model HL-36 AE, Hirayama Jepang), kompor listrik (Maspion S-300 220V), mikropipet 1000  $\mu\text{l}$  (Finnipipett, Labsystem), *laminar air flow* (Magneccetic), inkubator (Binder BD 53 Germany), dan *shaker waterbath* (model Memmert WNB 14). Alat yang digunakan untuk analisis adalah *reflux*, vorteks (Turbo Mixer model LW Scientific), *hot plate stirrer* (Model IKA RH Basic), pH meter (Hanna HI 8424), spektrofotometer (Jenway 6305), mikroskop (Olympus CH 20), sentrifuse dingin (Hettich Zentrifugen/Mikro 22R), serta *gas chromatography* (Gas Hewlett Pacard 5890 Series II).

### Profil Pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4

Pengamatan sel *Zymomonas mobilis* CP4 dilakukan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000 kali untuk mengetahui bentuk dan sifat motilitasnya, yaitu dengan membuat preparat basah *Zymomonas mobilis* CP4 (Cappucino dan Sherman, 2005). Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4 diketahui dengan menumbuhkan 4% (v/v) kultur pada media sintetik yang terdiri dari glukosa 10% (b/v), *yeast extract* 1% (b/v),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% (b/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% (b/v),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1% (b/v) (Ruanglek dkk., 2006). Pertumbuhan sel (OD) diamati dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 560 nm setiap 4 jam selama 24 jam. Nilai OD menyatakan jumlah sel yang tumbuh dalam medium sintetik.

### Pembuatan Stok Kultur dan Kultur Starter *Zymomonas mobilis* CP4

Inokulum ditumbuhkan dalam 10 mL medium sintetik (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30°C selama 24jam. 10 mL media pertumbuhan cair yang berisi kultur digoreskan pada media pertumbuhan agar miring (Ruanglek dkk., 2006), diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Stok kultur agar miring disimpan dalam lemari es suhu 2-3°C, diregenerasi tiga minggu sekali.

Kultur starter *Zymomonas mobilis* CP4 dibuat dengan menumbuhkan 2 ose kultur dari agar miring pada 10 mL media pertumbuhan cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. 10 mL media pertumbuhan cair yang berisi kultur ditransfer pada 90 mL media pertumbuhan cair pada erlenmeyer 250 mL serta diinkubasi selama 18 jam pada suhu 30°C dan goyangan 105 rpm.

### Pembuatan Serbuk Bagas Tebu

Bagas tebu diayak dengan ayakan 40 mesh sehingga ukurannya seragam kemudian dikeringkan pada suhu 60-70°C selama 1 jam. Serbuk bagas tebu yang diperoleh dimasukkan di dalam wadah yang kering dan tertutup rapat (Samsuri dkk., 2007).

### Pretreatment Bagas Tebu

Serbuk bagas tebu dilakukan analisis kadar lignin dan selulosa awal, kemudian ditimbang 5 g serbuk bagas tebu, dimasukkan dalam erlenmeyer 500 ml dan ditambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% (v/v) sebanyak 250 ml lalu dilakukan pengaturan pH dengan NaOH 2N sampai pH 11,5. Sampel diinkubasi pada suhu ruang (28±2°C) selama 72 jam lalu diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan setelah diautoklaf disaring, diambil bagian padatannya dan dioven 100°C selama 5 jam. Sampel yang diperoleh kemudian dilakukan analisis terhadap kadar selulosa dan lignin (Dawson dan Boophaty, 2008).

### Hidrolisis Enzimatis Bagas Tebu

Bagas tebu hasil *pretreatment* sebanyak 5 g ditempatkan pada erlenmeyer 250 ml. Enzim selulase dengan aktivitas 1,5 unit/ml dalam buffer asetat 0,1 M pH 4,5 ditambahkan sebanyak 100 ml untuk menghidrolisis sampel bagas tebu. Sampel diinkubasi dalam *shaker waterbath* suhu 40°C selama 72 jam dengan agitasi 105 rpm. Sampel kemudian disaring menggunakan kertas saring. Hidrolisat dipisahkan dari residu dan dianalisis pH dan kadar gula reduksi dengan metode DNS (Ewanick dan Bura, 2011).

### Fermentasi Etanol dari Hidrolisat Bagas Tebu

Hidrolisat bagas tebu sebanyak 100 ml ditambahkan urea dengan berbagai konsentrasi berdasarkan dengan desain

eksperimen (0,13-0,47% (b/v)), kemudian ditambahkan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (b/v) dan MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,05% (b/v). pH hidrolisat diatur pH 7 dengan menambahkan NaOH 2N. Hidrolisat dipanaskan pada suhu 100°C dan didinginkan. Kultur starter *Zymomonas mobilis* CP4 dengan konsentrasi 10% (v/v) yang mengandung jumlah sel 1,8x10<sup>6</sup> cfu/ml ditambahkan dengan berbagai konsentrasi sesuai dengan desain eksperimen (6,59%-23,41% (v/v)). Sampel diinkubasi pada *shaker waterbath* suhu 30°C dan agitasi 105 rpm sesuai dengan desain eksperimen (19,77-70,23 jam). Sampel disampling untuk dilakukan analisis gula reduksi, pH, OD sel, dan kadar etanol.

### Metode Analisis

Sampel bagas tebu dilakukan pengujian terhadap kadar selulosa metode Chesson (Datta, 1981) dan kadar lignin metode Klason (TAPPI, 1992). Hidrolisat bagas tebu dilakukan pengujian meliputi kadar gula reduksi metode DNS (Ceirwyn, 1995) dan pH menggunakan pH meter (Apriyantono dkk., 1989). Produk fermentasi dilakukan pengujian dengan memisahkan supernatan dan pelet dengan sentrifus dingin kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Pelet digunakan untuk pengukuran OD sel dengan menggunakan spektrofotometer pada λ 600 nm. Supernatan digunakan untuk analisis kadar gula reduksi metode DNS (Ceirwyn, 1995), pH menggunakan pH meter (Apriyantono dkk., 1989) dan etanol menggunakan *gas chromatography* (GC) Gas Hewlett Pacard 5890 Series II, dengan kolom CBP1 (30 m x 0,254 mm) dan total flow 40 ml/menit, gas pembawa He, suhu monokratik 50°C, suhu injeksi 200°C dan suhu detektor 260°C, detektor FID dan standar internal 1-propanol.

### Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Optimasi fermentasi dilakukan dengan menggunakan *central composite experimental design* (CCD) dengan kombinasi tiga faktor perlakuan yaitu konsentrasi inokulum ( $X_1$ , %v/v), konsentrasi urea ( $X_2$ , %b/v) dan lama fermentasi ( $X_3$ , jam) yang merupakan variabel bebas (Tabel 1) serta konsentrasi etanol ( $Y_p$ , %v/v) yang merupakan variabel respon.

Tabel 1. Variabel bebas pada rancangan penelitian

Variabel	Kode level				
	-1,682	-1	0	1	1,682
Kons. inokulum (% v/v) $X_1$	6,59	10	15	20	23,41
Kons. urea (% b/v) $X_2$	0,13	0,2	0,3	0,4	0,47
Lama fermentasi (jam) $X_3$	19,77	30	45	60	70,23

CCD dengan 2<sup>3</sup>- faktorial, dengan enam *axial point* ( $\alpha = \sqrt{3}$ ) dan enam pengulangan pada nilai tengah ( $n_0 = 6$ ) menghasilkan total 20 eksperimen. Nilai tengah kedua puluh

eksperimen tersebut kemudian digunakan untuk menyusun persamaan polinomial orde kedua. Derajat Polinomial (Persamaan 1) dihitung dengan paket perangkat lunak statistik (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) untuk menentukan respon dari variabel bebas:

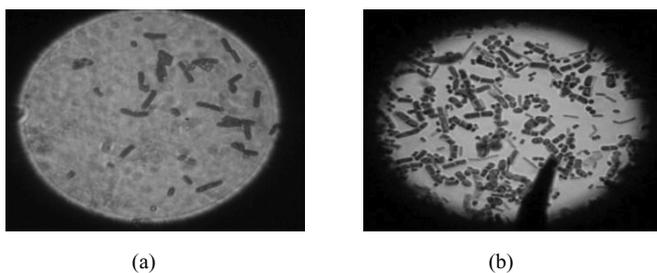
$$Y_i = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{13} X_1 X_3 \dots\dots\dots(1)$$

Dimana  $Y_i$  adalah respon prediksi.  $X_1, X_2, X_3$  adalah variabel bebas.  $b_0$  adalah *offset term*.  $b_1, b_2, b_3$  adalah efek linier.  $b_{11}, b_{22}, b_{33}$  adalah efek kuadrat dan  $b_{12}, b_{23}, b_{13}$  adalah interaksi. Nilai yang didapat dari persamaan model dibandingkan dengan hasil eksperimen kemudian diuji ANOVA dengan regresi linier. Langkah selanjutnya adalah menemukan daerah optimum dan menguji nilai yang diperoleh dari persamaan tersebut. Analisis data dilakukan menggunakan software *Design Expert DX.7.1.5* (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Profil Pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4**

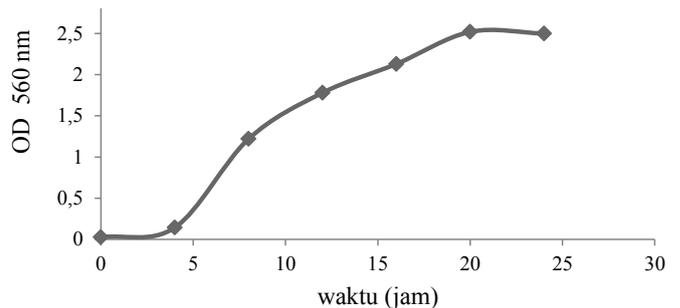
Berdasarkan hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x, diketahui bahwa *Zymomonas mobilis* berbentuk batang dan bersifat motil (Gambar 1). Karakteristik *Zymomonas mobilis* hasil pengamatan telah sesuai dengan pernyataan Obire (2005), yang menyatakan bahwa *Zymomonas mobilis* merupakan bakteri Gram negatif fakultatif anaerob, berbentuk batang, dan bersifat motil. Holt dkk. (2000) menambahkan, *Zymomonas mobilis* memiliki ukuran sel 2-6 µm, diameter 1,0-1,4 µm, dan tumbuh optimum pada suhu 25-30°C.



Gambar 1. *Zymomonas mobilis* (a) Hasil pengamatan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 1000x dan (b) Literatur dengan perbesaran 1000x (Joshi, 2010)

Pada penelitian ini dilakukan pula pengamatan terhadap pola pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui terjadinya fase awal stasioner yang menunjukkan jumlah sel paling maksimum. Kultur *Zymomonas mobilis* CP4 digunakan sebagai starter pada fase ini karena pada fase ini pertumbuhan sel berada pada kondisi

optimum, sehingga akan mempersingkat waktu adaptasi dari *Zymomonas mobilis* CP4 pada saat proses fermentasi di dalam medium hidrolisat bagas tebu. Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Profil pertumbuhan *Zymomonas mobilis* CP4

Gambar 2 menunjukkan bahwa fase lag dari *Z. mobilis* CP4 terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-4. Pada fase ini *Z. mobilis* beradaptasi pada lingkungan medium yang baru sehingga pertumbuhannya berjalan lambat. Pada fase ini OD berkisar 0,026-0,143. Fase logaritmik terjadi pada kisaran jam ke-4 sampai jam ke-20. Pada fase ini pertumbuhan *Z. mobilis* berlangsung paling cepat karena terjadi katabolisme substrat dalam jumlah besar yang digunakan untuk pertumbuhan, sintesis enzim dan sintesis senyawa lainnya. Menurut Waites dkk. (2001), lamanya fase log dipengaruhi oleh konsentrasi sumber karbon pada medium, umur dan konsentrasi inokulum. Pada fase ini OD berkisar 1,22-2,13. Pertumbuhan optimum dicapai pada jam ke-20 (fase awal stasioner). Pada waktu ini isolat sangat baik untuk dijadikan inokulum karena jumlah dan aktivitasnya yang optimum. Pada jam ke-20 hingga jam ke-24 OD sel tidak mengalami peningkatan bahkan cenderung konstan. Hal ini menunjukkan bahwa *Z. mobilis* telah masuk fase stasioner.

**Analisis Bahan Baku Bagas Tebu**

Komponen bagas tebu yang paling penting dalam pembuatan etanol adalah selulosa, dimana selulosa dalam strukturnya dilindungi oleh lignin, sehingga diperlukan proses *pretreatment* untuk menghilangkan lignin atau yang dikenal dengan *delignifikasi*. Tabel 2 menyajikan data selulosa dan lignin sebelum dan setelah *pretreatment*.

Tabel 2. Kadar selulosa dan lignin bagas tebu sebelum dan setelah *pretreatment*

Parameter	Sebelum <i>pretreatment</i>	Setelah <i>pretreatment</i>	% peningkatan (selulosa) dan % penurunan (lignin)
Kadar selulosa (%)	33,71	66,9	98,45
Kadar lignin (%)	21,11	3,22	84,75

Penurunan kadar lignin dan peningkatan kadar selulosa yang signifikan (Tabel 2) mengindikasikan bahwa hidrogen peroksida efektif dalam mengoksidasi lignin sehingga mempermudah selulosa untuk diakses oleh enzim selulase (Carvalho dkk., 2008) untuk menghasilkan gula yang selanjutnya difermentasi oleh *Zymomonas mobilis* CP4 untuk menghasilkan etanol. Hidrolisat bagas tebu dari hasil pemecahan secara enzimatik menggunakan enzim selulase komersial dari *Trichoderma viride* aktivitas 1,5 U/ml pada penelitian ini mengandung 3,67% total gula reduksi. *Yield* glukosa yang dihasilkan dari bagas tebu hasil *pretreatment* sebesar 98,92% dari *yield* secara teoritis. *Yield* glukosa dihitung sebagai % konversi selulosa yang terkandung dalam bagas tebu hasil *pretreatment* dengan asumsi *yield* teoritis 1,11 g gula/g selulosa (Velmurugan dan Muthukumar, 2012).

**Optimasi Fermentasi Bagas Tebu**

Penelitian ini menggunakan *central composite experimental design* (CCD) untuk mencari kombinasi

optimum dari konsentrasi inokulum, konsentrasi urea dan lama fermentasi untuk menghasilkan etanol yang optimum. Data yang diperoleh dari hasil penelitian berdasarkan desain statistik diolah dengan bantuan program *Design-Expert* DX 7.1.5 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) dan digunakan untuk analisis regresi dan *analysis of variance* (ANOVA). Persamaan regresi yang diperoleh setelah analisis regresi digunakan untuk mencari kondisi respon yang paling optimal. Persamaan regresi yang diperoleh dengan kadar etanol (*Y*) dan variabel bebas konsentrasi inokulum ( $X_1$ ), konsentrasi urea ( $X_2$ ) serta lama fermentasi ( $X_3$ ) ditunjukkan pada persamaan (2):

$$Y = 0,49892 - 0,077713X_1 - 2,08438X_2 + 0,073187X_3 + 0,11695X_1X_2 + 0,000274333X_1X_3 + 0,00861667X_2X_3 + 0,000831489X_1^2 - 0,25650X_2^2 - 0,000857178X_3^2 \dots\dots\dots (2)$$

Data kadar etanol hasil eksperimen dan data prediksi model yang dihitung berdasarkan persamaan (2) disajikan lengkap pada Tabel 3.

Tabel 3. Data respon kadar etanol dari rancangan CCD

Kode			Variabel bebas			Kadar etanol eksperimen (% v/v)	Kadar etanol prediksi model (% v/v)
$X_1$	$X_2$	$X_3$	inokulum (% v/v)	urea (% b/v)	fermentasi (jam)		
-1	1	-1	10	0,4	30	1,1031	1,0078
0	0	0	15	0,3	45	1,2973	1,2573
1	-1	-1	20	0,2	30	1,0279	0,9584
0	0	-1,682	15	0,3	19,77	0,4699	0,6425
0	0	0	15	0,3	45	1,2838	1,2573
1	1	-1	20	0,4	30	1,1089	1,0302
-1	1	1	10	0,4	60	1,0675	1,0747
-1	-1	1	10	0,2	60	1,1687	1,1851
0	0	0	15	0,3	45	1,2855	1,2573
0	-1,682	0	15	0,13	45	1,2263	1,2663
0	1,682	0	15	0,47	45	1,1857	1,2335
0	0	1,682	15	0,3	70,23	0,8656	0,7808
0	0	0	15	0,3	45	1,3401	1,2573
-1,682	0	0	6,59	0,3	45	1,2904	1,3610
1,682	0	0	23,41	0,3	45	1,2537	1,2712
0	0	0	15	0,3	45	1,1804	1,2573
1	-1	1	20	0,2	60	1,0229	1,0559
-1	-1	-1	10	0,2	30	1,2674	1,1699
1	1	1	20	0,4	60	1,1442	1,1794
0	0	0	15	0,3	45	1,1719	1,2573

Tabel 3 memperlihatkan bahwa kadar etanol yang paling optimal diperoleh pada titik nol (0), yaitu pada titik konsentrasi inokulum 15% (v/v), konsentrasi urea 0,3% (b/v) dan lama fermentasi 45 jam. Waktu fermentasi yang semakin lama menyebabkan penurunan kadar etanol. Maiti dkk. (2011) melaporkan, dari hasil penelitiannya menggunakan *Z. mobilis* dalam fermentasi *molasses* untuk produksi etanol, waktu fermentasi yang optimal adalah 43-45 jam. Waktu fermentasi yang lebih lama menyebabkan kadar etanol mengalami penurunan. Menurut Maiti dkk. (2011) penurunan kadar etanol dapat disebabkan oleh akumulasi etanol dalam medium fermentasi yang dapat mengganggu mikroba dalam produksi etanol. Secara lengkap detail mengenai inhibisi fermentasi oleh etanol dijelaskan oleh Osman dan Ingram (1985).

Analisis ragam (ANOVA) digunakan untuk mengetahui efek dari masing-masing variabel terhadap respon kadar etanol. Hasil dari ANOVA untuk respon Y (kadar etanol) secara lengkap disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 menunjukkan bahwa model signifikan atau berpengaruh nyata terhadap respon dimana nilai P kurang

dari 0,05 (5%). *Lack of fit* atau ketidaktepatan pengujian tidak signifikan sebesar 0,1029 (10,29%) menunjukkan bahwa model sesuai dengan seluruh nilai rancangan. Hal ini dikarenakan nilai P lebih besar dari 0,05. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa lama fermentasi (kuadrat) berpengaruh nyata (signifikan) terhadap respon. Faktor lain (konsentrasi inokulum (linier), konsentrasi urea (linier), lama fermentasi (linier), interaksi dua diantara tiga faktor, konsentrasi inokulum (kuadrat) dan konsentrasi urea (kuadrat)) berpengaruh tidak nyata (tidak signifikan) terhadap respon.

Nilai R<sup>2</sup> dari Tabel 4 sebesar 0,8607 yang menunjukkan bahwa faktor konsentrasi inokulum, konsentrasi urea dan lama fermentasi pada penelitian memberikan pengaruh sebesar 86,07% pada keragaman respon kadar etanol sedangkan sisanya sebesar 13,93% dipengaruhi faktor lain yang tidak dimasukkan dalam model. Nilai Adjusted R<sup>2</sup> sebesar 0,7353 yang berarti keeratan hubungan antara konsentrasi inokulum, konsentrasi urea dan lama fermentasi terhadap respon kadar etanol sebesar 73,53%. Adanya perbedaan antara nilai R<sup>2</sup> dan Adjusted R<sup>2</sup> diduga disebabkan oleh munculnya penambahan variabel yang tidak signifikan dalam pembangunan model.

Tabel 4. Hasil analisis ragam (ANOVA)

Sumber keragaman	Jumlah kuadrat	db	Mean kuadrat	Nilai F	Nilai P Prob>F	Keterangan
Model	0,63	9	0,070	6,86	0,0029	signifikan
A	9,730E-003	1	9,730E-003	0,96	0,3510	tidak signifikan
B	1,266E-003	1	1,266E-003	0,12	0,7315	tidak signifikan
C	0,023	1	0,023	2,27	0,1627	tidak signifikan
AB	0,027	1	0,027	2,69	0,1320	tidak signifikan
AC	3,387E-003	1	3,387E-003	0,33	0,5766	tidak signifikan
BC	1,336E-003	1	1,336E-003	0,13	0,7245	tidak signifikan
A <sup>2</sup>	6,227E-003	1	6,227E-003	0,61	0,4520	tidak signifikan
B <sup>2</sup>	9,481E-005	1	9,481E-005	9,327E-003	0,9250	tidak signifikan
C <sup>2</sup>	0,54	1	0,54	52,73	<0,0001	signifikan
Residual	0,10	10	0,010			
Lack of fit	0,079	5	0,016	3,40	0,1029	tidak signifikan
Pure error	0,023	5	4,626E-003			
Cor total	0,73	19				
Std. Dev.		0,10			R <sup>2</sup>	0,8607
Mean		1,14			Adj R <sup>2</sup>	0,7353
C.V. %8,86					Pred R <sup>2</sup>	0,1378
PRESS		0,63			Adeq Precision	10,076

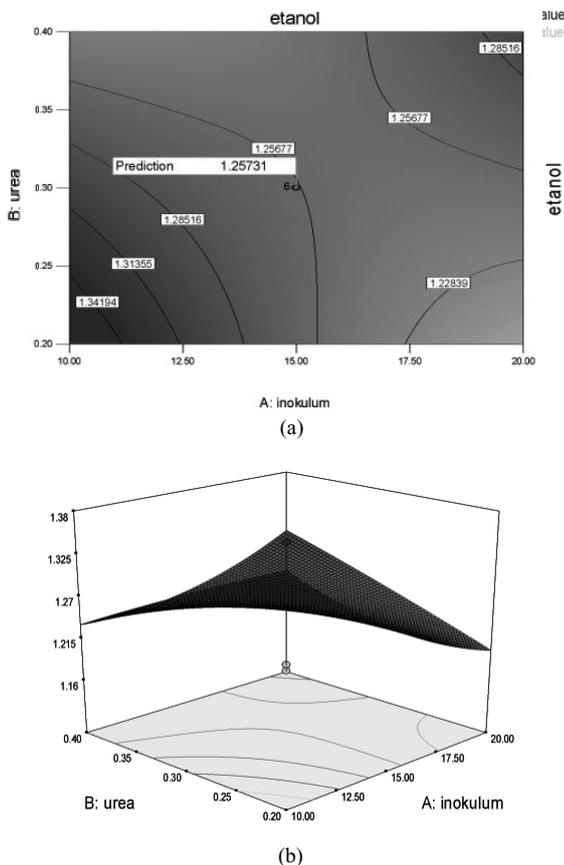
Keterangan: A = Variabel X<sub>1</sub> (konsentrasi inokulum (%v/v))  
 B = Variabel X<sub>2</sub> (konsentrasi urea (%b/v))  
 C = Variabel X<sub>3</sub> (lama fermentasi (jam))  
 AB, AC, BC, A<sup>2</sup>, B<sup>2</sup>, C<sup>2</sup> = interaksi antar perlakuan

Montgomery (2001) menyatakan bahwa penurunan nilai Adjusted R<sup>2</sup> akan terjadi jika variabel yang ditambahkan pada permodelan tidak berpengaruh.

**Pengaruh Konsentrasi Inokulum, Konsentrasi Urea dan Lama Fermentasi terhadap Respon Kadar Etanol**

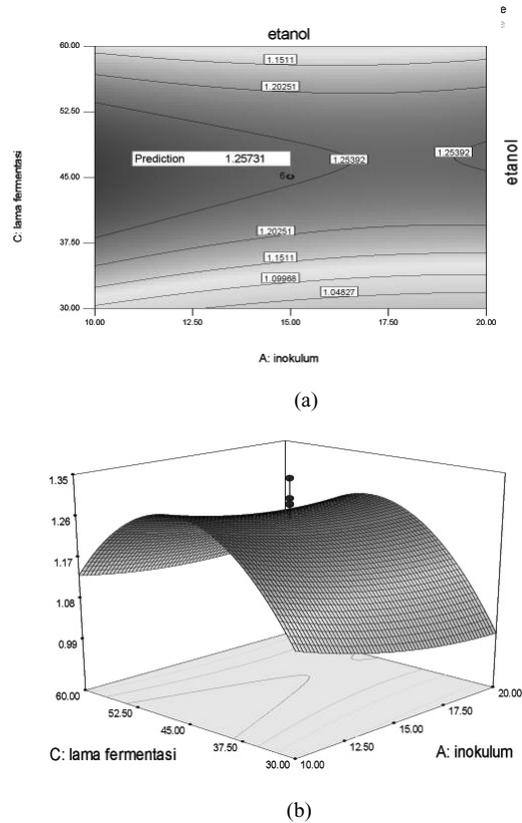
Grafik respon digunakan untuk mempermudah gambaran dalam mengetahui pengaruh variabel terhadap respon. Respon kadar etanol digambarkan dalam kurva 3 dimensi dan kontur plot. Kontur plot adalah plot 2 dimensi yang merupakan irisan melintang kurva 3 dimensi. Kontur plot berguna untuk menganalisis efek interaksi antar faktor pada respon (Hasan dkk., 2009).

Gambar 3, 4 dan 5 menggambarkan kurva 3 dimensi dan kontur plot untuk optimasi proses fermentasi dalam pembuatan etanol. Masing-masing gambar menggambarkan efek dari 2 parameter pada produksi etanol. Nilai-nilai yang tertera pada kotak yang ada di kontur plot mengindikasikan konsentrasi etanol pada berbagai kondisi proses fermentasi yang dikaji. Interaksi antara konsentrasi inokulum dan konsentrasi urea pada proses fermentasi ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. (a) Kontur plot dan (b) kurva permukaan respon (3 dimensi) konsentrasi inokulum dan konsentrasi urea terhadap respon kadar etanol

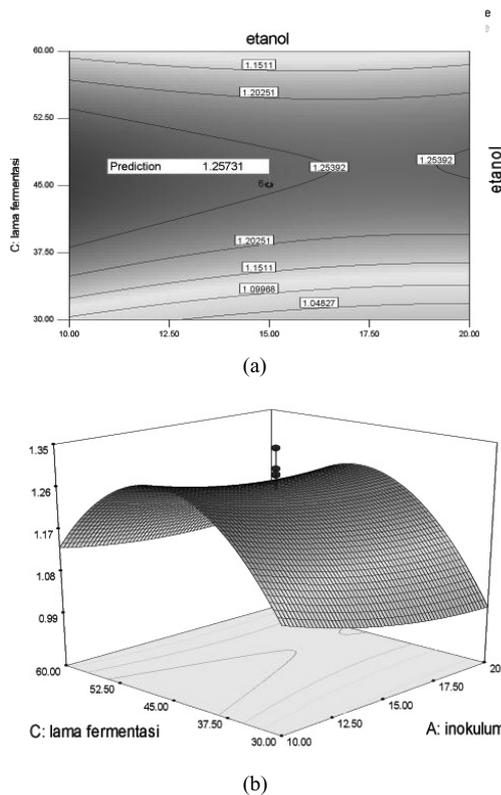
Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa bentuk kurva *saddle* yang menggambarkan kemungkinan dari variabel pada poin maksimum dan minimum. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi inokulum dan konsentrasi urea tidak berpengaruh nyata terhadap produksi etanol. Tidak adanya pengaruh yang nyata pada konsentrasi inokulum dan urea terhadap respon kadar etanol pada penelitian ini diduga konsentrasi inokulum dan konsentrasi urea yang digunakan pada penelitian ini belum mencapai konsentrasi yang optimal sehingga tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan ataupun peningkatan kadar etanol yang dihasilkan, serta adanya variabel lain yang tidak dapat dikontrol secara kontinyu yang berpengaruh terhadap produksi etanol.



Gambar 4. (a) Kontur plot dan (b) kurva permukaan respon (3 dimensi) konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap respon kadar etanol

Hubungan antara konsentrasi inokulum dan lama fermentasi terhadap respon kadar etanol disajikan pada Gambar 4. Gambar 4 (b) menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi inokulum bersifat linier dan lama fermentasi bersifat kuadratik terhadap respon kadar etanol. Dari Gambar 4 (b) dapat dilihat semakin tinggi konsentrasi inokulum, kadar etanol yang dihasilkan cenderung turun. Konsentrasi inokulum yang terlalu tinggi dapat menurunkan viabilitas sel setelah fase pertumbuhan (Mukhtar dkk., 2010). Jarzebski (1989) juga menyatakan bahwa kondisi pertumbuhan dan

metabolisme pada populasi sel yang tinggi tidak diharapkan karena mengganggu akses nutrisi, keterbatasan ruang, dan interaksi antar sel.



Gambar 5. (a) Kontur plot dan (b) kurva permukaan respon (3 dimensi) konsentrasi urea dan lama fermentasi terhadap respon kadar etanol

Gambar 5 menampilkan kontur dan kurva permukaan respon yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi urea dan lama fermentasi terhadap respon kadar etanol. Gambar 5 (b) menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi urea bersifat linier dan lama fermentasi bersifat kuadratik terhadap respon kadar etanol. Adanya peningkatan konsentrasi urea menunjukkan adanya penurunan kadar etanol yang dihasilkan. Penambahan urea yang lebih tinggi pada medium fermentasi dapat berefek negatif terhadap pembentukan etanol karena bersifat *inhibitor*. Garraway dan Evans (1984) menyatakan bahwa urea di dalam medium fermentasi akan diurai menjadi amonia dan karbondioksida. Amonia yang dihasilkan akan digunakan oleh mikroorganisme untuk pembentukan sel tubuh mereka. Hendriksen dan Ahrig (1991) menambahkan, produksi amonia dari urea mempunyai kecepatan empat kali lebih besar dari pembentukan sel tubuh mikroorganisme sehingga konsentrasi amonia akan tinggi yang selanjutnya bisa menjadi racun untuk proses fermentasi itu sendiri.

Pada kajian lama fermentasi (Gambar 4 dan Gambar 5), menunjukkan bahwa pengaruh lama fermentasi bersifat kuadratik. Semakin bertambah lama fermentasi, kadar etanol

mengalami peningkatan hingga titik tertentu. Kadar etanol akan kembali mengalami penurunan jika waktu fermentasi ditambah. Berkurangnya produksi etanol pada lama fermentasi yang berlanjut setelah mencapai titik optimal produksi etanol menurut Sulfahri dkk. (2011) dapat disebabkan oleh berkurangnya substrat dalam medium fermentasi yang digunakan untuk pembentukan etanol sehingga tidak ada pembentukan etanol secara signifikan serta akibat adanya inhibisi fermentasi oleh etanol (Maiti dkk., 2011).

### Penentuan Kondisi Optimum Respon Kadar Etanol

*Software Design Expert 7.1.5* digunakan untuk mengidentifikasi kombinasi terbaik dari parameter proses fermentasi (konsentrasi inokulum, konsentrasi urea dan lama fermentasi) yang digunakan untuk mengoptimasi produksi etanol. *Desirability* merupakan suatu alat yang digunakan untuk menjelaskan seberapa baik solusi optimal yang ditawarkan agar sesuai dengan tujuan dari respon (Laluce dkk., 2009). Nilai *desirability* 1 mengindikasikan *the perfect case*, tetapi nilai *desirability* 0 mengindikasikan respon harus dibuang (Laluce dkk., 2009). Pada penelitian ini, solusi optimal yang ditawarkan oleh model RSM adalah konsentrasi inokulum 15% (v/v), konsentrasi urea 0,3% (w/v), dan lama fermentasi 45 jam untuk prediksi respon sebesar 1,257% (v/v), dengan nilai *desirability* 1. Titik optimum masing-masing variabel merupakan titik stasioner yang diduga merupakan respon optimum.

### Verifikasi Kondisi Optimum Hasil Prediksi Model

Kombinasi perlakuan yang diperoleh dari prediksi model yaitu konsentrasi inokulum 15% (v/v), konsentrasi urea 0,3% (b/v) dan lama fermentasi 45 jam diverifikasi dengan melakukan fermentasi kembali berdasarkan dengan solusi yang ditawarkan tersebut. Penelitian yang dilakukan menghasilkan konsentrasi etanol sebesar 1,213% (v/v). Nilai prediksi dari model diketahui sebesar 1,257% (v/v). Dengan demikian, nilai ketepatan dari hasil penelitian dan prediksi sebesar 96%. *Yield* etanol sebesar 0,479 dengan efisiensi sebesar 93,9%. *Yield* etanol dihitung berdasarkan perbandingan antara jumlah produk yang dihasilkan (etanol 1,213% (v/v)) dan substrat yang dikonsumsi (gula awal 3,619% - gula sisa 1,088%). Efisiensi dihitung berdasarkan perbandingan antara *yield* etanol hasil penelitian (0,479) dan *yield* etanol teori (0,51). *Yield* etanol yang relatif tinggi ini mengindikasikan bahwa proses fermentasi pada penelitian ini cukup efisien. Konversi bagas tebu menjadi etanol pada penelitian ini sebesar 7,69%.

## KESIMPULAN

Kondisi fermentasi optimum diperoleh pada konsentrasi inokulum 15% (v/v), konsentrasi urea 0,3% (b/v) dan lama fermentasi 45 jam. Pada model RSM, prediksi etanol optimum yang dihasilkan adalah 1,257% (v/v). Hasil verifikasi pada kondisi optimum diperoleh etanol sebesar 1,213% (v/v). Perbedaan yang tidak signifikan antara hasil prediksi model dan hasil verifikasi menunjukkan keakuratan model matematis yang dihasilkan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bagas tebu merupakan bahan baku berselulosa yang memiliki potensi untuk dijadikan pilihan untuk produksi bioetanol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Affi, M.M., Abd El-Ghany, T.M., Al Abboud, M.A., Taha, T.M., dan Ghaleb, K.E. (2011). Biorefinery of industrial potato wastes to ethanol by solid state fermentation. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 7(1):126-134.
- Andaka, G. (2011). Hidrolisis ampas tebu menjadi furfural dengan katalisator asam sulfat. *Jurnal Teknologi* 4(2): 180-188.
- Apriyantono, A., Fardiaz, D., Puspita Sari, N.L., Sedarwati dan Budiyanto, S. (1989). *Analisa Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Um, B.W. (2007). *Optimization Production Ethanol from Concentrated Substrate*. Disertasi. Auburn University, Alabama.
- Cappucino, J.G. dan Sherman, N. (2005). *Microbiology: a Laboratory Manual*, Seventh Edition. Pearson Education, Inc., San Frasisco.
- Carvalho, F., Duarte, L.C. dan Gírio, F.M. (2008). Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67: 849-864.
- Ceirwyn, S.J. (1995). *Analytical Chemistry of Food*. Blackie Academic dan Professional, London.
- Chang, Y.C, Lee, C.L. dan Pan, T.M. (2006). Statistical optimization of media components for the production of *Antrodia cinnamomea* AC0623 in submerged cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 654-661.
- Datta, R. (1981). Acidogenic fermentation of lignocellulose acid yield and conversion of components. *Biotechnology and Bioengineering* 23(9): 2167-2170.
- Dawson, L. dan Boopathy, R. (2008). Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. *Bioresources* 3(2): 452-460.
- Ewanick, S. dan Bura, R. (2011). The effects of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. *Bioresources Technology* 102: 2651-2658.
- Garraway, M.O. dan Evans, R.C. (1984). *Fungal Nutrition and Physiology*. John Willey and Sons, New York.
- Glazer, A.N. dan Nikaído, H. (2007). *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, New York.
- Gunasekaran, P. dan Raj, K.C. (1999). Ethanol fermentation technology *Zymomonas mobilis*. *Current Science* 77(1): 56-68.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, H.A.P., Staley, J.T. dan Williams, S.T. (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Hasan, S.H., Srivastava, P. dan Talat, M. (2009). Biosorption of Pb(II) from water using biomass of *Aeromonas hydrophila*: central composite design for optimization of process variables. *Journal of Hazardous Materials* 168: 1155-1162.
- Hendriksen, H.V. dan Ahring, B.K. (1991). Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen-oxidizing methanogenic bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology* 85: 241-246.
- Jarzebski, A.B., Malinowski, J.J. dan Goma, G. (1989). Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 1225-1230.
- Joshi, M. (2010). *Bioengineers Develop Bacterial Strain to High Ethanol Biofuel Production*. Top News in Health News. United States, Washington.
- Laluce, C., Tognolli, J.O., Oliveira, K.F.D., Souza, C.S. dan Morais, M.R. (2009). Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 627-637.
- Maiti, B., Rathore, A., Srivastava, S., Shekhawat, M. dan Srivastava, P. (2011). Optimization of process parametera for ethanol production from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology and genetic algorithm. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 385-395.

- Montgomery, D.C. (2001). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley and Sons, New York.
- Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K. dan Ziaul-Hussnain, S. (2010). Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**: 1-5.
- Nofemele, Z., Shukla, P., Trussler, A., Permaul, K. dan Sigh, S. (2012). Improvement of ethanol production from sugarcane molasses through enhanced nutrient supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Brewing and Distilling* **3**(2): 29-35.
- Obire, O. (2005). Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in edo state, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **9**(1): 25-30.
- Onsoy, T., Thanonkeo, P., Thanonkeo, S. dan Yamada, M. (2007). Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. *King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Science Technology Journal* **7**(S1): 55-60.
- Osman, Y.A. dan Ingram, L.O. (1985). Mechanism of ethanol inhibition offermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *Journal of Bacteriology* **164**: 173-180.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S. dan Kennedy, J.F. (2006). *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**: 623-635.
- Rabelo, S.C., Carrere, H., Filho, R.M. dan Costa, A.C. (2011). Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse ain a biorefinery concept. *Bioresource Technology* **102**: 7887-7895.
- Ruanglek, V., Maneewatthana, D. dan Tripechkul, S. (2006). Evaluation of Thai agroindustrial waste for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry* **41**: 1423-1437.
- Samsuri, M., Gozan, M., Mardias, R., Baiquni, M., Hermansyah, H., Wijanarko, A., Prasetya, B. dan Nasikin, M. (2007). Pemanfatan selulosa bagas untuk produksi ethanol melalui sakarifikasi dan fermentasi serentak dengan enzim xylanase. *Makara Teknologi* **11**(1): 17-24.
- Santoso, B.E. (2011). *Limbah Pabrik Gula: Penanganan, Pencegahan dan Pemanfaatannya dalam Upaya Program Langit Biru dan Bumi Hijau*. Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Pasuruan.
- Sprenger, G.A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* **145**(3): 301-307.
- Sulfahri, Nurhatika, S. dan Nurhidayati, T. (2011). Aerobic and anaerobic processes of spirogyra extract using different doses of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences* **1**(10): 420-425.
- TAPPI (Technical Association of The Pulp and Paper Industry). (1992). *TAPPI Test Methods*. Tappi Press, USA.
- Velmurugan, R. dan Muthukumar, K. (2012). Sono-assisted enzymatic saccharification of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal* **63**: 1-9.
- Waites, M.J., Morgan, N.L., John, S.R. dan Gary, H. (2001). *Industrial Microbiology an Introduction*. Blackwell Publishing Company, Victoria Australia.
- Zhang, K. dan Feng, H. (2010). Fermentation potentials of *Zymomonas mobilis* and its application in ethanol production from low-cost raw sweet potato. *Biotechnology* **9**(37): 6122-6128.