



TESIS - SB 185401

**SAKARIFIKASI ENZIMATIK SELULOLITIK BATANG
SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI SUBSTRAT
FERMENTASI BIOETANOL**

**DEWINA SYAHRIFA
6005231009**

Dosen Pembimbing
Prof. Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T.
Dr. Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si.

**PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN ANALITIKA DATA
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
2025**



TESIS - SB 185401

**SAKARIFIKASI ENZIMATIK SELULOLITIK BATANG
SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI SUBSTRAT
FERMENTASI BIOETANOL**

**DEWINA SYAHRIFA
6005231009**

**Dosen Pembimbing
Prof. Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T.
Dr. Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si.**

**PROGRAM MAGISTER
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN ANALITIKA DATA
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
2025**



THESIS - SB 185401

ENZYMATIC CELLULOLYTIC SACCHARIFICATION OF SORGHUM (*Sorghum bicolor*) STEM AS BIOETHANOL PRODUCTION SUBSTRATE

**DEWINA SYAHRIFA
6005231009**

Supervisor

**Prof. Dr.techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T.
Dr. Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si.**

**MASTER PROGRAM
DEPARTEMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE AND DATA ANALYTICS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
2025**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

Tesis disusun untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar
Magister Biologi (M.Si)

di

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

DEWINA SYAHRIFA

NRP: 6005231009

Tanggal Ujian: 25 Juli 2025

Periode Wisuda: September 2025

Disetujui oleh:

Pembimbing:

1. Prof. Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si.,
M.T.
NIP: 197310142000121001

2. Dr. Nengah Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si.
NIP: 19700915 199802 2 006

Penguji:

1. Dr. Dra. Dian Saptarini, M.Sc.
NIP: 19690408 199203 2 001

2. Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.
NIP: 19700621 199802 2001



**Kepala Departemen Biologi
Fakultas Sains dan Analitika Data**

Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si.

NIP: 19700621 199802 2 001

SAKARIFIKASI ENZIMATIK SELULOLITIK BATANG SORGUM (*Sorghum bicolor*) SEBAGAI SUBSTRAT FERMENTASI BIOETANOL

Nama Mahasiswa : Dewina Syahrifa
NRP : 6005231009
Dosen Pembimbing : Prof. Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T.
Dr. Nengah Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si.

ABSTRAK

Batang sorgum memiliki banyak potensi untuk dimanfaatkan contohnya sebagai pakan ternak, biomaterial, juga sebagai bahan bakar karena mengandung *yield* biomassa lignoselulosa yang besar. Sakarifikasi merupakan proses yang penting dimana dapat mengubah biomassa menjadi gula yang dapat difermentasi. Penelitian ini melihat efektivitas desain Plackett-Burman dan *central composite design* (CCD) *Response Surface Methodology* (RSM) dalam proses seleksi faktor sakarifikasi dan mendukung produksi bioetanol melalui proses enzimatik dan fermentasi. Pendekatan statistik digunakan untuk mengoptimalkan proses sakarifikasi enzimatik batang sorgum. Desain Plackett–Burman digunakan untuk menyeleksi tujuh faktor penting, yaitu konsentrasi selulase, konsentrasi substrat (1-5%), ukuran partikel substrat (60–100 mesh), suhu (40-50°), pH (4-5), kecepatan agitasi (100–120 rpm), dan waktu inkubasi (1-3 hari). Selulase yang digunakan pada penelitian ini diproduksi dari *Trichoderma* sp.. Hasil proses seleksi faktor sakarifikasi menunjukkan signifikansi pada faktor waktu dan agitasi. Kedua faktor signifikan tersebut dioptimalkan lebih lanjut menggunakan desain RSM-CCD untuk melihat efek interaksi dan menentukan kondisi optimum. Kondisi optimum proses sakarifikasi ada pada agitasi 100 rpm dengan waktu inkubasi 3 hari. Hasil proses sakarifikasi yang optimal digunakan sebagai sumber karbon dalam proses fermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* untuk produksi etanol. Dalam kondisi optimal, sakarifikasi menghasilkan konsentrasi gula pereduksi 7,36 mg/mL, yang kemudian difermentasi untuk menghasilkan 2,62% etanol setelah 24 jam.

Kata Kunci : *Bioetanol, Sakarifikasi, Selulase, Sorgum, Trichoderma*

ENZYMATIC CELLULOLYTIC SACCHARIFICATION OF SORGHUM (*Sorghum bicolor*) STEM AS BIOETHANOL PRODUCTION SUBSTRATE

Student Name : Dewina Syahrifa

NRP : 6005231009

Supervisor : Prof. Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T.

Dr. Nengah Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si.

ABSTRACT

Sorghum stalks have a lot of potential for use, for example as animal feed, biomaterial, and also as biofuel because they contain a large yield of lignocellulosic biomass. Saccharification is an important process that can convert biomass into fermentable sugar. This research observe the effectiveness of Plackett-Burman and central composite design (CCD) Response Surface Methodology (RSM) designs in the saccharification factor selection process and supported bioethanol production through enzymatic and fermentation processes. Statistical design approach is used to optimize the enzymatic saccharification of sorghum stalks using two stages. The Plackett-Burman design was used to select seven important factors: cellulase concentration, substrate concentration (1–5%), substrate size (60–100 mesh), temperature (40–50°C), pH (4–5), agitation speed (100–120 rpm), and incubation time (1–3 days). The cellulase used in this research produced from *Trichoderma* sp. The results of the saccharification factor selection process showed significance in the factors of time and agitation. These two significant factors were further optimized using a RSM-CCD to examine interaction effects and determine optimal conditions. The optimal conditions for the saccharification process were achieved at 100 rpm agitation speed with a 3 day incubation time. The optimal saccharification process results were used as a carbon source in the fermentation process using *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Under optimal conditions, saccharification produced a reducing sugar concentration of 7.36 mg/mL, which was then fermented to produce 2.62% ethanol after 24 hours.

Keywords: *Bioethanol, Cellulase, Saccharification, Sorghum, Trichoderma*

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis yang berjudul “Sakarifikasi Enzimatis Selulolitik Batang Sorgum (*Sorghum bicolor*) Sebagai Substrat Fermentasi Bioetanol” dapat terselesaikan dengan tepat. Dalam kesempatan ini, penulis juga hendak mengucapkan kepada semua pihak yang telah membantu proses pengerjaan tesis ini hingga selesai.

Dengan segenap hati, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada kedua pembimbing, yaitu bapak Prof. Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T. serta ibu Dr. Nengah Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si. yang telah memberi wadah, masukan, dukungan, dan banyak ilmu pengetahuan baru terutama yang terkait dengan pengerjaan tesis ini. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada ibu Dr. Dra. Dian Saptarini, M.Sc. dan ibu Prof. Dr. Awik Puji Dyah Nurhayati, S.Si., M.Si. selaku ketua sidang dan penguji yang telah memberi banyak saran serta masukan terkait penulisan tesis ini.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada kedua orang tua penulis, bapak Adriansyah serta ibu Puspa Dewi Wulandari yang selalu memberi dukungan sehingga membangkitkan semangat penulis selama proses pengerjaan tesis. Juga kepada teman-teman yang selalu mendukung penulis; Ina, Luluk, Silfa, Intan, Syakirah, Arum, Jiji, Alya, Icha, Amel, Hesti, Val; serta pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu-persatu. Penulis menyadari bahwa laporan tesis ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis terbuka atas segala saran dan masukan dari pembaca. Penulis berharap agar laporan tesis ini dapat memberi manfaat dan dipergunakan dengan sebaik-baiknya.

Surabaya, 16 Juli 2025

Penulis

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN TESIS	vii
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	xi
KATA PENGANTAR	xiii
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR TABEL	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 KAJIAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Sorghum bicolor</i>	5
2.2 <i>Trichoderma</i> sp.	7
2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.4. Selulase	9
2.5. Sakarifikasi.....	10
2.5.1. Ukuran dan Konsentrasi Substrat.....	11
2.5.2. Konsentrasi Enzim	11
2.5.3. Agitasi	11
2.5.4. Waktu	12

2.6.	Bioetanol.....	12
2.7.	Fermentasi	13
2.8.	Desain Penelitian Placket-Burman	14
2.9.	Optimasi dengan <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	15
BAB 3 METODE PENELITIAN		17
3.1	Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	17
3.2	Diagram Alir.....	17
3.3	Metode Kerja	17
3.3.1	Peremajaan Isolat <i>Trichoderma</i> sp.	17
3.3.2	Pembuatan Media dan Produksi Selulase	18
3.3.3	Uji Aktivitas Selulase	18
3.3.4	Uji Kadar Protein.....	19
3.3.5	Penentuan Titik Isoelektrik.....	19
3.3.6	Pemurnial Parsial.....	20
3.3.7	Perlakuan Batang Sorgum	20
3.3.8	Seleksi Faktor Sakarifikasi Batang Sorgum	20
3.3.9	Optimasi Sakarifikasi Batang Sorgum	21
3.3.10	Uji kadar Gula Pereduksi Hasil Sakarifikasi	22
3.3.11	Peremajaan Isolat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
3.3.12	Produksi Bioetanol	23
3.3.13	Uji Kadar Etanol.....	23
3.3.14	Analisis Data	23
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		25
4.1	Peremajaan Isolat <i>Trichoderma</i> sp.	25
4.2	Produksi dan Karakterisasi Selulase.....	26
4.3	Seleksi Faktor Sakarifikasi	28
4.4	Optimasi Faktor Sakarifikasi	32
4.5	Peremajaan Isolat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35

4.6	Produksi Bioetanol.....	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		37
5.1	Kesimpulan	37
5.2	Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA		39
LAMPIRAN.....		49
BIODATA PENULIS		57

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Tanaman <i>Sorghum bicolor</i> (Jardim et al., 2020)	6
Gambar 2. 2 Jalur Sintesis Etanol oleh <i>S. cerevisiae</i>	8
Gambar 2. 3 Mekanisme Kerja Selulase dalam Menghidrolisis Selulosa.....	9
Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian	17
Gambar 4. 1 <i>Trichoderma</i> sp. pada Media PDA	25
Gambar 4. 2 Kurva produksi selulase dari jamur <i>Trichoderma</i> sp.....	26
Gambar 4. 3 Pengendapan protein selulase pada pH 5.....	28
Gambar 4. 4 Diagram pareto faktor sakarifikasi	30
Gambar 4. 5 Grafik 3D respon hasil optimasi sakarifikasi.....	35
Gambar 4. 6 Isolat <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35

DAFTAR TABEL

Tabel 3. 1 Desain seleksi faktor sakarifikasi.....	21
Tabel 3. 2 Rancangan optimasi sakarifikasi.....	22
Tabel 4. 1 Aktivitas spesifik dan kandungan protein selulase pada masing-masing fraksi pemurnian	27
Tabel 4. 2 Hasil sakarifikasi dengan rancangan Plackett-Burman.....	29
Tabel 4. 3 Hasil analisis dengan <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA) respons dari proses sakarifikasi	32
Tabel 4. 4 Hasil optimasi sakarifikasi dengan rancangan RSM.....	33
Tabel 4. 5 Analisis regresi ANOVA dari rancangan RSM	34
Tabel 4. 6 Kadar etanol dari hasil produksi menggunakan 3 variasi sumber karbon.	36

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Batang sorgum (*Sorghum bicolor*) merupakan bagian tanaman yang tidak dikonsumsi namun memiliki banyak manfaat (Cardoso et al., 2013). Batang sorgum memiliki banyak potensi untuk dimanfaatkan contohnya sebagai pakan ternak, biomaterial, juga sebagai bahan bakar karena mengandung *yield* biomassa lignoselulosa yang menyusun 30% dari keseluruhan berat tanaman sorgum (Ismadi dkk, 2020). Secara struktural, batang sorgum tersusun dari polimer lignoselulosa yakni, selulosa, hemiselulosa, dan lignin (Thanapimmetha dkk., 2019). Penyusun selulosa dan hemiselulosa adalah dua jenis unit gula monomer, yaitu glukosa dan xilosa. Pada proses fermentasi, terutama pada produksi bioetanol membutuhkan gula sederhana supaya dapat terjadi fermentasi oleh mikroba (Bedzo et al., 2024; Thanapimmetha et al., 2019).

Sebelum memasuki proses fermentasi, biomassa lignoselulosa yang berupa polimer dengan struktur kompleks perlu diubah ke bentuk monomernya atau bentuk yang lebih sederhana dengan proses sakarifikasi. Sakarifikasi membantu proses fermentasi untuk menyediakan sumber karbon dengan bentuk yang lebih sederhana agar lebih efisien dalam prosesnya sehingga perlu diberikan perhatian khusus (Sulyman et al., 2020; Tse et al., 2021). Proses sakarifikasi atau hidrolisis terbagi menjadi beberapa jenis, yaitu hidrolisis asam dan sakarifikasi enzimatik (Keshav dkk., 2023). Sakarifikasi enzimatik secara prosesnya dibantu oleh enzim dari kelas hidrolase, salah satu yang paling sering digunakan adalah selulase (Khan et al., 2020). Selulase mampu mendegradasi ikatan β -1,4-glikosidik dari rantai selulosa (Ejaz et al., 2021).

Pada proses produksi bioetanol, sakarifikasi dan fermentasi dapat dilakukan baik secara simultan maupun terpisah. Metode simultan disebut sebagai *simultaneous saccharification and fermentation* (SSF), sedangkan metode yang terpisah disebut dengan metode *separate hydrolysis and fermentation* (SHF) (Afedzi & Parakulsuksatid, 2023). Pada metode SHF, proses sakarifikasi dapat

dilakukan dengan mempertimbangkan faktor lingkungan seperti suhu, waktu, konsentrasi enzim, dan sebagainya (Mendieta et al., 2021).

Salah satu jenis desain penelitian yang cukup umum digunakan pada penelitian seputar sakarifikasi dan fermentasi berjenis *one factor at a time* (OFAT). Desain OFAT memiliki limitasi seperti, membutuhkan banyak waktu dan interaksi antar faktornya tidak dapat diukur (V. Singh et al., 2017). Proses seleksi menggunakan desain Plackett-Burman dengan faktor yang memiliki efek negatif hasilnya akan terlihat bentuk atau area yang menurun, sedangkan faktor yang memiliki efek positif hasilnya akan terlihat bentuk atau area yang menaik (Muharja et al., 2019). Dengan dilakukannya proses seleksi dengan desain Plackett-Burman dapat, mengeliminasi efek-efek yang rancu akibat dari variabel yang tidak jelas desainnya, memperhitungkan data sehingga mendapat hasil yang terbaik (Vanaja & Rani, 2007).

Penelitian menerapkan metode *separate hydrolysis and fermentation* (SHF) yang dioptimasi dengan desain Plackett-Burman dan menggunakan 7 jenis faktor, seperti ukuran substrat (mesh), konsentrasi substrat (g), konsentrasi enzim (U/mL), agitasi (rpm), suhu (°C), pH, dan waktu (hari) (Kappaun et al., 2018).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Faktor manakah yang paling mempengaruhi proses sakarifikasi batang sorgum dengan selulase?
2. Berapa kandungan bioetanol yang terbentuk setelah difermentasi menggunakan substrat gula sederhana dari sakarifikasi enzimatik?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah yang diterapkan pada penelitian ini adalah:

1. Selulase yang digunakan pada penelitian ini akan didapat dari jamur *Trichoderma* sp.
2. Tanaman sorgum (*Sorghum bicolor*) yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Pulau Poteran, Kabupaten Sumenep, Jawa Timur.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan pada penelitian ini yaitu:

1. Mengetahui faktor optimum sakarifikasi dengan desain Plackett-Burman dan *response surface method* (RSM).
2. Mengetahui kadar bioetanol yang terbentuk dari fermentasi menggunakan gula sederhana hasil sakarifikasi enzimatik.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini yaitu dapat memberikan referensi pengembangan terkait riset sakarifikasi batang sorgum sebagai substrat produksi bioetanol serta potensi riset yang berbeda mengenai produksi bahan bakar terbarukan.

BAB 2

KAJIAN PUSTAKA

2.1 *Sorghum bicolor*

Sorgum merupakan tanaman yang memiliki potensi besar untuk menjadi sumber pangan cadangan. Tanaman ini memiliki kemampuan adaptasi yang bagus apabila tumbuh di lahan suboptimal (Lestari et al., 2019). Tanaman ini termasuk dalam kelompok sereal dengan kandungan gizi yang cukup tinggi, yakni karbohidrat sebesar 83%, protein sebesar 11%, lemak sebesar 3,3%, dan mikronutrien lainnya (Pamungkas et al., 2021). Sari batang sorgum biasanya dimanfaatkan sebagai salah satu bahan dasar pembuatan gula pasir (Cardoso et al., 2013). Negara-negara tropis semi-kering di beberapa benua seperti Asia dan Afrika menggunakan sorgum sebagai salah satu bahan makanan primer. Bagian yang biasa dikonsumsi adalah biji dan air batangnya (Syahfitri et al., 2024). Penyusun batang sorgum yang telah dikeringkan terdiri dari beberapa komponen, yaitu 41,75% selulosa; 25,4% hemiselulosa; 10,8% lignin; dan 21,97% lainnya (Thanapimmetha et al., 2019).

Tanaman sorgum merupakan tanaman dengan jenis habitus herba. Berikut merupakan klasifikasi dari tanaman sorgum,

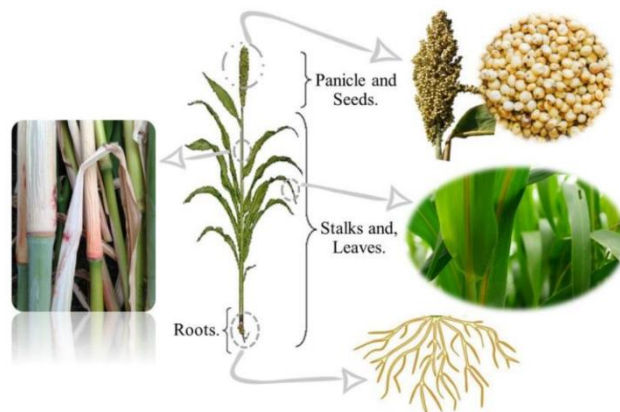
Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Liliopsida*
Ordo : *Cyperales*
Famili : *Poaceae*
Genus : *Sorghum*
Spesies : *Sorghum bicolor*

Sorgum merupakan tanaman perennial dari famili *Poaceae* yang mampu tumbuh dengan cepat, dengan tinggi bervariasi antara 0,5 hingga 5 m. Tanaman ini terdiri dari bagian akar, batang, daun, bunga (malai), dan biji. Tanaman ini menghasilkan satu atau beberapa anakan, yang awalnya muncul dari pangkal batang dan kemudian dari nodus batang. Sistem akar terdiri dari akar serabut adventif yang

muncul dari nodus terendah batang, di bawah dan tepat di atas permukaan tanah. Akar biasanya terkonsentrasi di bagian atas tanah tetapi dapat menjangkau dua kali kedalaman tersebut dan menyebar lateral (Hassaballa & Ahmed, 2023; Jardim et al., 2020).

Batang dari tanaman ini padat dan biasanya tumbuh tegak. Bagian tengahnya dapat kering atau berair, rasanya tawar atau manis. Bagian tengah batang dapat menjadi berongga dengan ruang-ruang kosong. Jumlah daun bervariasi antara 6 hingga 24 helai, tergantung pada varietas. Daunnya tumbuh secara bergantian dalam dua baris. Pelepah daun memiliki panjang yang bervariasi antara 15 hingga 35 cm dan tumbuh melingkari batang dengan tepi yang tumpang tindih. Pelepah daun seringkali memiliki lapisan lilin. Daun berukuran panjang 30 hingga 135 cm dan lebar 1,5 hingga 13 cm dengan tepi datar atau bergelombang. Tulang daun berwarna putih atau kuning pada varietas kering dan berongga, atau hijau pada varietas berair (Hassaballa & Ahmed, 2023).

Bunga majemuk berupa malai (*panicle*), biasanya tegak, tetapi kadang-kadang melengkung membentuk leher angsa. Malai memiliki batang tengah, dengan cabang primer, sekunder, dan kadang-kadang tersier yang pendek atau panjang, yang membawa kelompok spikelet. Panjang dan kerapatan cabang malai menentukan bentuk malai, yang bervariasi dari kerucut atau oval yang padat hingga menyebar dan longgar. Biji biasanya sebagian tertutup oleh gluma. Biji berbentuk bulat dan runcing tumpul, berdiameter (4 - 8 mm.) dan bervariasi dalam ukuran, bentuk, dan warna tergantung pada varietas (Ariefin et al., 2021; Hassaballa & Ahmed, 2023). Pada Gambar 2.1 merupakan gambar tanaman sorgum.



Gambar 2. 1 Tanaman *Sorghum bicolor* (Jardim et al., 2020)

2.2 *Trichoderma* sp.

Jamur selulolitik pada dasarnya adalah pengurai karbohidrat dan umumnya tidak dapat menggunakan protein atau lipid sebagai sumber energi untuk pertumbuhannya. Jamur selulolitik merupakan salah satu jamur yang berperan dalam proses penguraian bahan organik. Jamur selulolitik menguraikan bahan organik yang mengandung selulosa dengan menghasilkan enzim selulase. Selulosom telah ditemukan di berbagai mikroorganisme selulolitik dan anaerobik, termasuk clostridia, ruminokokus, dan jamur anaerobik. Sebagian besar sistem selulosom pada mikroba mengandung selulase dari banyak keluarga glikosil hidrolase. Pendegradasi selulosa aerobik, terutama pada organisme jamur, memanfaatkan selulosa melalui produksi sejumlah besar enzim ekstraseluler yang dapat dipulihkan secara bebas dari supernatan kultur. Sebagian besar penelitian di bidang ini berfokus pada mutasi dan pemilihan strain *Trichoderma* yang lebih baik untuk komersialisasi enzim selulase (Antonov et al., 2016).

Secara morfologi, *Trichoderma* sp. memiliki warna koloni dimulai dari warna putih, hijau keputihan, hijau tua keputihan, dan hijau tua setelah 7 hari setelah inokulasi. Konidiofor dari *Trichoderma* sp tegak, bercabang, fialida tebal dan pendek, bentuk konidium lonjong, dinding konidia tebal, warna konidia hijau, dan hifanya berbentuk hialin dan bersekat (Kamala et al., 2015).

Berikut merupakan klasifikasi fungi *Trichoderma* sp. berdasarkan Kamala et al. (2015):

Kingdom	: Fungi
Divisi	: <i>Ascomycota</i>
Kelas	: <i>Sordariomycetes</i>
Ordo	: <i>Hypocreales</i>
Famili	: <i>Hypocreaceae</i>
Genus	: <i>Trichoderma</i>

2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

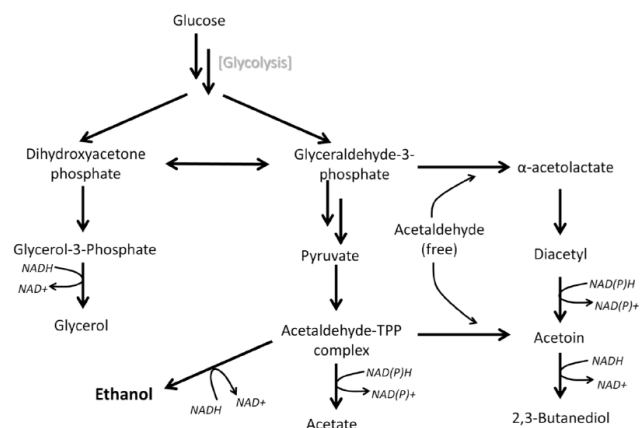
Saccharomyces cerevisiae merupakan yeast yang mampu melakukan fermentasi alkoholik. Spesies ini memiliki toleransi yang cukup tinggi terhadap lingkungan dengan kadar alkohol yang tinggi. *S. cerevisiae* merupakan mikroba anaerob fakultatif yang mana mampu untuk tumbuh di keadaan yang aerob maupun

anaerob selama mendapat sumber karbon (Tse et al., 2021). *S. cerevisiae* paling banyak digunakan untuk produksi etanol. Yeast spesies ini mampu menahan kondisi stres dan memiliki efisiensi fermentasi yang tinggi, pertumbuhan yang cepat, penggunaan gula yang efektif, kemampuan untuk memproduksi dan mengonsumsi etanol, toleransi konsentrasi etanol tinggi dan kadar oksigen rendah, osmotoleran, termotoleran, dan aktivitas sel di lingkungan asam, yang mendasar untuk kegunaan industrinya (Reis et al., 2013).

Berikut merupakan klasifikasi dari yeast *S. cerevisiae* (Belda et al., 2019):

Kingdom : Fungi
Divisi : *Ascomycota*
Ordo : *Saccharomycetales*
Famili : *Saccharomycetaceae*
Genus : *Saccharomyces*
Spesies : *Saccharomyces cerevisiae*

Penggunaan gula sebagai sumber karbon oleh *S. cerevisiae* akan disintesis melalui proses glikolisis dengan hasil berupa piruvat. Selanjutnya, dalam kondisi anaerob, *S. cerevisiae* mengkonversi asam piruvat menjadi asetaldehida dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilase (PDC), yang melepaskan CO₂. Asetaldehida kemudian direduksi menjadi etanol oleh enzim alkohol dehidrogenase (ADH), dengan memanfaatkan NADH dari tahap glikolisis, sehingga NAD⁺ dapat didaur ulang untuk mempertahankan laju glikolisis (Walker & Stewart, 2016). Pada Gambar 2.2 merupakan gambaran jalur sintesis etanol oleh *S. cerevisiae*.

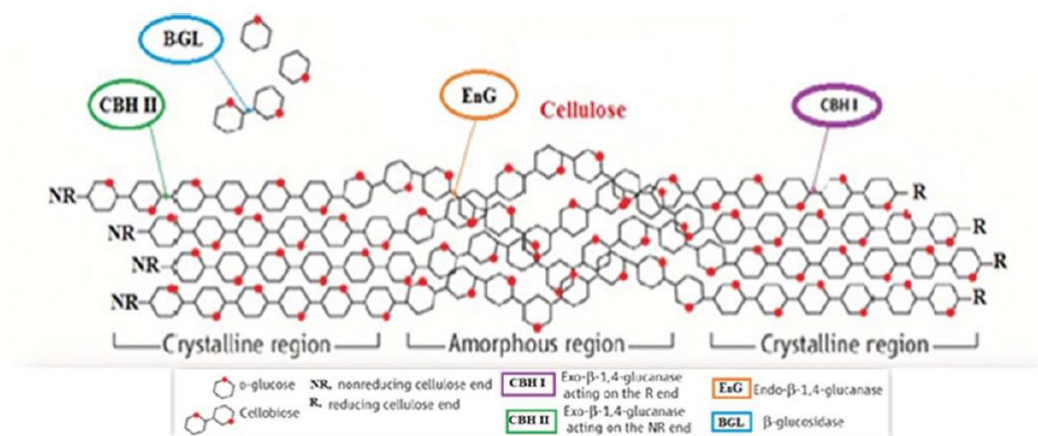


Gambar 2. 2 Jalur Sintesis Etanol oleh *S. cerevisiae*

S. cerevisiae memiliki bentuk bulat hingga ovoid dan berkembang biak dengan mekanisme tunas. Sel *S. cerevisiae* dapat tumbuh dalam bentuk haploid dan diploid. Sel haploid menunjukkan siklus hidup mitosis sederhana yang dalam kondisi stres akan mati. Sel diploid, seperti yang haploid, menunjukkan siklus hidup mitosis, tetapi di bawah situasi stres yang tinggi, memasuki siklus hidup meiosis dan menghasilkan empat spora haploid. Waktu penggandaan sel yeast ini membutuhkan waktu sekitar 90 menit (Salari et al., 2017).

2.4. Selulase

Selulase mendegradasi selulosa dengan melakukan hidrolisis ikatan β -1,4-glikosidik (Ejaz et al., 2021). Kondisi optimum bekerja enzim ini pada suhu 30 hingga 50°C dengan kondisi pH 4,0 hingga 5,0 (Bernardi et al., 2023; Chasanah et al., 2013). Hidrolisis selulosa memerlukan gabungan dari beberapa jenis enzim, yaitu endo-1,4 glukanas (EC 3.2.1.4) yang melakukan hidrolisis struktur internal amorf dari selulosa; exo-1,4 eksoglukanase atau selobiodehidrolase (EC 3.2.1.91) yang melepaskan molekul selobiosa dari ujung struktur selulosa; dan β -glukosidase (EC 3.2.1.21) yang melakukan hidrolisis selobiosa menjadi glukosa (Bernardi et al., 2023). Ketiga enzim ini bekerja secara sinergis untuk menghidrolisis selulosa, ilustrasi proses hidrolisis selulosa oleh selulase ada pada Gambar 2.2. Salah satu jamur penghasil selulase yang sudah banyak dipelajari adalah *Trichoderma reesei*, dimana mampu menghasilkan 7 komponen β -glukosidase, 8 komponen endo- β -1,4 glukanas, dan 2 komponen selobiohidrolase (Ejaz et al., 2021).



Gambar 2. 3 Mekanisme Kerja Selulase dalam Menghidrolisis Selulosa

2.5. Sakarifikasi

Sakarifikasi merupakan metode di mana selulosa dan hemiselulosa diubah menjadi gula sederhana berupa heksosa dan pentosa. Sakarifikasi mengubah selulosa menjadi glukosa, tetapi pada hemiselulosa diubah menjadi beberapa jenis pentosa dan heksosa, terutama jika terjadi hidrolisis total. Proses sakarifikasi akan lebih cepat apabila struktur lignoselulosa lebih terbuka dari hasil perlakuan awal. Strategi hidrolisis konvensional adalah hidrolisis kimiawi dan enzimatik. Beberapa pendekatan lain dapat dilakukan untuk hidrolisis lignoselulosa, menghitung gelombang mikro dan sinar elektron serta hidrolisis sinar gamma (Østby et al., 2020).

Hidrolisis enzimatik memiliki tujuan untuk melepaskan monosakarida dari polisakarida yang terletak di dinding sel tanaman. Hidrolisis polisakarida, seperti selulosa dan hemiselulosa, menghasilkan gula yang dapat difermentasi sehingga dapat dikonversi menjadi etanol melalui proses fermentasi. Banyaknya gula pada hidrolisat tergantung pada jenis bahan yang digunakan dan metode perlakuan awal yang diterapkan. Bahan seperti biomassa lignoselulosa tersusun atas gula sederhana, biasanya berjenis monosakarida pentosa atau heksosa. Monosakarida adalah sumber karbon bagi mikroorganisme yang bertanggung jawab untuk fermentasi. Glukosa merupakan produk penguraian utama lignoselulosa yang terdapat dalam hidrolisat setelah perlakuan awal dan hidrolisis enzimatik (Saini et al., 2013).

Hidrolisis enzimatik menggunakan enzim hidrolitik untuk menguraikan selulosa dan hemiselulosa. Biomassa yang tidak diberi perlakuan sulit dicerna sehingga membutuhkan enzim hidrolitik. Enzim yang berasal dari mikroorganisme dapat digunakan dalam banyak aplikasi industri, termasuk produksi bahan bakar nabati, deterjen, kertas dan bubur kertas, serta industri makanan dan pakan. Enzim yang digunakan dalam aplikasi industri diproduksi terutama oleh jamur berfilamen seperti *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* dan *Trichoderma sp* (Robak & Balcerek, 2018). Berikut merupakan faktor-faktor yang dapat mempengaruhi proses sakarifikasi.

2.5.1. Ukuran dan Konsentrasi Substrat

Ukuran partikel substrat sangat memengaruhi luas permukaan yang tersedia untuk enzim; semakin halus (mesh lebih tinggi), semakin besar luas permukaannya untuk hidrolisis. Bagasse dengan porositas tinggi (setelah pretreatment alkali) menunjukkan peningkatan signifikan dalam hasil sakarifikasi, terutama pada ukuran partikel yang lebih kecil (40–100 mesh) karena penetrasi enzim yang lebih baik (Pramanik et al., 2021). Namun, ukuran substrat yang terlalu halus (mesh sangat tinggi) bisa menyebabkan efek aglomerasi dan pembentukan gel, menurunkan efisiensi. Hasil terbaik dicapai pada ukuran substrat menengah (50–100 mesh), yang seimbang antara akses permukaan dan kelancaran agitasi (Tiwari et al., 2022).

2.5.2. Konsentrasi Enzim

Konsentrasi selulase secara langsung meningkatkan laju hidrolisis selulosa menjadi gula pereduksi karena lebih banyak situs aktif enzim tersedia untuk bertindak. Dalam penelitian dengan bagasse jeruk, ditemukan bahwa penggunaan selulase 6 U/g menghasilkan gula pereduksi lebih tinggi dibandingkan konsentrasi lebih rendah (Pires Nogueira et al., 2019). Studi lain menunjukkan bahwa peningkatan selulase hingga 40 FPU/g pada bagasse tebu yang diberi perlakuan asam dan alkali mampu menghasilkan hingga 536 mg/g gula tersingkir, dengan waktu hidrolisis optimal 24 jam. Namun, titik jenuh tercapai ketika semua serat yang dapat diakses telah dihidrolisis setelah itu penambahan selulase hanya meningkatkan biaya tanpa manfaat signifikan (Mkhize et al., 2016).

2.5.3. Agitasi

Agitasi membantu distribusi enzim dan substrat serta mencegah pengendapan. Kecepatan agitasi yang terlalu rendah dapat menyebabkan pengendapan partikel dan distribusi enzim yang tidak merata, sehingga menurunkan efisiensi hidrolisis. Sebaliknya, kecepatan terlalu tinggi berisiko merusak struktur enzim akibat gesekan mekanis, serta meningkatkan pembentukan busa dan konsumsi energi. Studi oleh Rashid et al. (2020) menunjukkan bahwa agitasi optimal pada 120 rpm dapat meningkatkan produksi gula reduksi dari biomassa lignoselulosa, terutama jika dikombinasikan dengan suhu dan pH optimal.

2.5.4. Waktu

Waktu reaksi merupakan faktor penting dalam proses sakarifikasi karena menentukan sejauh mana enzim selulase mampu menghidrolisis selulosa menjadi gula sederhana. Pada umumnya, laju sakarifikasi meningkat pesat selama 24 jam pertama karena enzim mudah mengakses fraksi selulosa yang tersedia di permukaan. Namun, setelah waktu tersebut, laju hidrolisis melambat karena penurunan jumlah substrat yang mudah diakses dan akumulasi produk yang dapat menghambat aktivitas enzim. Penelitian oleh Tiwari et al., (2022) menunjukkan bahwa hasil sakarifikasi bagasse pretreated alkali mencapai titik optimal pada 24 jam hingga 48 jam hanya meningkatkan hasil secara pesat.

2.6. Bioetanol

Bioetanol merupakan sumber energi terbarukan yang diproduksi dengan metode fermentasi biomassa. Berdasarkan (Purwoko et al., 2017) emisi yang dihasilkan dari hasil pembakaran bioetanol tergolong rendah dibanding bahan bakar fosil. Bioetanol terbagi menjadi 4 jenis, yakni generasi pertama, generasi kedua, generasi ketiga, dan generasi keempat (Tse et al., 2021).

Bioetanol generasi pertama diturunkan dari proses fermentasi dengan substrat yang memiliki banyak kandungan pati atau glukosa. Produksi bioetanol jenis ini sudah banyak dipraktikkan serta mulai diproduksi dengan skala industri di beberapa negara. Kekurangan dari bioetanol generasi pertama adalah menggunakan bagian tanaman yang tergolong sebagai bahan pangan sehingga dapat menyebabkan adanya persaingan antara bahan dasar untuk produksi bioetanol dan bahan untuk makanan sehari-hari. Berbanding terbalik dari bioetanol generasi pertama, pada generasi kedua produksinya menggunakan biomassa yang tidak digunakan sebagai bahan pangan seperti bahan lignoselulosa, dan residu dari kegiatan agrikultur. Walaupun tidak seperti bioetanol generasi pertama yang menggunakan bahan pangan, bioetanol generasi kedua yang menggunakan bahan yang mengandung lignoselulosa membuat proses fermentasinya memerlukan inovasi pada produksi dan penerapan teknologinya (Tse et al., 2021).

Bioetanol generasi ketiga memanfaatkan biomassa alga untuk produksi etanolnya. Alga sebagai bahan untuk produksi bioetanol cukup menguntungkan

karena alga cepat menyerap karbondioksida, mudah dikultivasi, dan tidak memerlukan banyak lahan untuk pertumbuhannya. Proses produksi bioetanol generasi ketiga mirip dengan generasi kedua dimana membutuhkan proses perlakuan awal sebelum mulai diproduksi menjadi bioetanol. Pada bioetanol generasi keempat produksinya masih dalam proses pengembangan Dimana menggunakan mikroorganisme yang telah direkayasa (Tse et al., 2021). Produksi bioetanol di Indonesia sudah mulai banyak, tidak hanya dari skala mikro namun juga sudah mulai merambah ke skala industri. Bioetanol yang diproduksi kebanyakan berasal dari bahan yang tinggi akan gula, seperti molase yang mana merupakan bioetanol generasi pertama (Mohan et al., 2015).

2.7. Fermentasi

Fermentasi merupakan proses konversi metabolik monosakarida menjadi bioetanol dan produk sampingan lainnya dengan adanya mikroorganisme dalam kondisi suhu dan kisaran pH yang menguntungkan. Pada proses fermentasi, spesies tertentu seperti ragi atau bakteri sering digunakan dalam proses fermentasi. Contoh mikroorganisme ini termasuk *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Escherichia coli*, dan *Zymomonas mobilis*. Secara teoritis, 1 kg glukosa dan xilosa dapat menghasilkan 0,49 kg CO₂ dengan hasil etanol sebanyak 0,51 kg. Mikroorganisme seperti *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis* dan *Saccharomyces cerevisiae* memiliki potensi produksi etanol yang menjanjikan dengan efisiensi yang tinggi, terutama *Saccharomyces* (Phwan et al., 2018).

Separate hydrolysis and fermentation (SHF) adalah proses fermentasi yang didasarkan pada pemisahan hidrolitik untuk menguraikan polisakarida menjadi monosakarida melalui fermentasi dengan bantuan mikroorganisme fermentatif yang mengubah gula yang dapat difermentasi (bisa disebut juga sebagai gula sederhana) menjadi etanol. Dalam proses ini, sakarifikasi enzimatis biomassa lignoselulosa dilakukan pada suhu optimal dengan bantuan enzim sakarifikasi seperti contohnya selulase. Kemudian, mikroorganisme yang sesuai ditambahkan untuk memfermentasi larutan sakarifikasi. Dalam proses SHF, suhu hidrolisis dan fermentasi enzimatis dapat dioptimalkan secara independen. Karena hidrolisis

enzimatis dilakukan pada suhu optimal, proses ini membutuhkan jumlah enzim sakarifikasi yang lebih sedikit daripada sakarifikasi dan fermentasi secara simultan. Selain itu, keuntungan dari proses ini adalah biaya bahan kimia yang rendah, waktu tinggal yang singkat dan sistem peralatan yang sederhana. SHF dapat secara mandiri menghasilkan etanol pada suhu optimal (Ishizaki & Hasumi, 2013; Phwan et al., 2018).

2.8. Desain Penelitian Placket-Burman

Desain eksperimen diperlukan pada suatu penelitian dengan tujuan membandingkan efek antar faktor. Keuntungan pembuatan desain eksperimen meliputi dapat menangani error yang muncul, dapat menentukan variabel yang penting dan perlu dikontrol serta membedakan dengan variabel lain yang tidak perlu dikontrol, mengeliminasi efek-efek yang rancu akibat dari variabel yang tidak jelas desainnya, memperhitungkan data sehingga mendapat hasil yang terbaik, dan mendapatkan gambaran bagaimana keterkaitan dan hasil optimum dari variabel yang telah ditentukan dalam bentuk model statistik. Salah satu desain eksperimen adalah proses seleksi atau screening. Desain dari proses seleksi merujuk pada eksperimen yang membutuhkan banyak faktor potensial agar dapat diidentifikasi respon terbaiknya. Hasil terbaik biasanya akan dilanjutkan dengan eksperimen atau penelitian baru. Proses seleksi perlu diadakan untuk mengurangi faktor yang tidak dibutuhkan demi meningkatkan efisiensi penelitian (Vanaja & Rani, 2007).

Desain Plackett–Burman merupakan pendekatan matematis yang kuat dan efisien untuk menentukan dan menyaring pengaruh parameter. Ini merupakan desain yang sangat ekonomis dengan jumlah run kelipatan empat dan terdiri dari dua desain penyaringan tingkat. Desain Plackett–Burman menawarkan prosedur seleksi yang baik dan cepat serta menghitung secara matematis signifikansi sejumlah besar faktor dalam satu percobaan, yang menghemat waktu dan memberikan pengaruh perubahan lebih dari satu faktor dalam satu percobaan (A. Singh et al., 2011).

Karakteristik dari desain ini adalah ukuran sampel berjumlah kelipatan empat, bukan pangkat dua. Desain Plackett-Burman digunakan untuk menyelidiki variabel $n-1$ dalam n eksperimen yang mengusulkan desain eksperimen untuk lebih dari tujuh faktor dan khususnya untuk eksperimen $n \times 4$, yaitu, 8, 12, 16, 20, dan

seterusnya, yang cocok untuk mempelajari hingga 7, 11, 15, 19, dan seterusnya, faktor secara berurutan. Desain seperti itu dikenal sebagai desain jenuh. Keuntungan utama dari desain jenuh adalah jumlah observasi minimum yang diperlukan untuk menghitung efek untuk faktor tertentu. Faktor yang dipilih pada eksperimen bisa berdasar pada pengalaman atau penelitian sebelumnya. Level atau tingkatan dari masing-masing faktor yang dipilih harus memiliki jarak yang dekat. Apabila jarak variasinya terlalu dekat atau jauh maka dapat muncul error pada responnya. Desain Plackett-Burman merupakan jenis desain jenuh yang efek utamanya tidak dapat menunjukkan error standar. Setelah determinasi faktor-faktor yang signifikan, variabel dependen dari respon kemudian akan dianalisis dengan menggunakan analisis varians atau ANOVA (Vanaja & Rani, 2007).

2.9. Optimasi dengan *Response Surface Methodology* (RSM)

Proses optimasi dapat dilakukan melalui pendekatan statistik seperti *Response Surface Methodology* (RSM). RSM merupakan metode matematika-statistika untuk menganalisis masalah dengan banyak faktor yang memengaruhi respons guna mengoptimalkannya (Myers et al., 2009). RSM menggunakan teknik empiris untuk mengevaluasi hubungan antara sejumlah faktor terkontrol dan respons yang diamati (Zhang et al., 2024). Selain mengidentifikasi pengaruh variabel bebas, RSM juga membangun model matematis untuk menentukan hubungan antara variabel dan respons, serta kondisi optimum proses (Zhang et al., 2024).

Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak Design Expert® (Stat-Ease Inc, Minneapolis, MN, Amerika Serikat). Model dianggap layak untuk optimasi bila signifikan ($p < 0,05$), yang menunjukkan variabel berpengaruh terhadap respons dan dapat digunakan untuk mengevaluasi interaksi variabel bebas terhadap respons (Iris, 2018). Desain faktorial RSM bertujuan mengevaluasi pengaruh variabel terhadap respons serta menentukan tingkat optimal faktor signifikan melalui regresi. Dalam RSM, variabel bebas dinotasikan sebagai $X_1, X_2, \dots, X_k$ (kontinu), sedangkan respons sebagai variabel tak bebas Y (Myers et al., 2009).

BAB 3

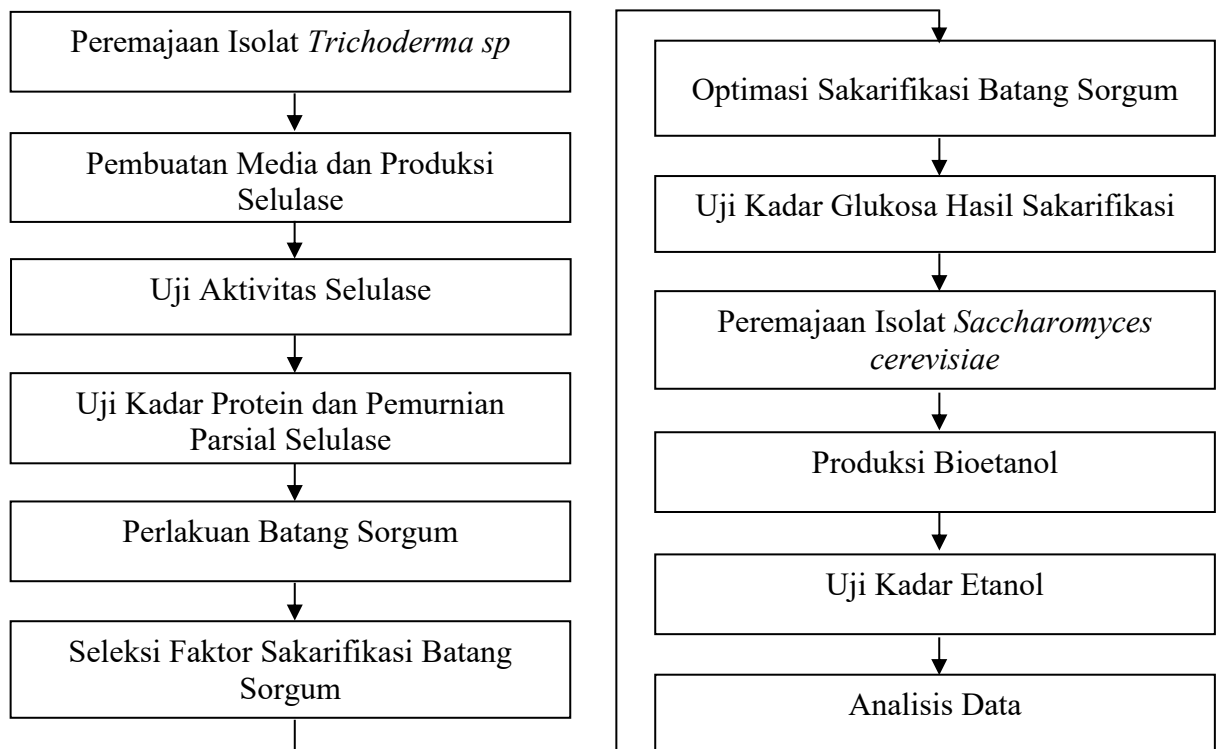
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2025 hingga Juli 2025 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Analitika Data, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

3.2 Diagram Alir

Diagram alir pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3. 1 Diagram alir penelitian

3.3 Metode Kerja

3.3.1 Peremajaan Isolat *Trichoderma* sp.

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat *Trichoderma* sp. adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan 100 mL media PDA memerlukan 4,2 g *potato dextrose broth* (PDB); 2 g agar dan akuades 100 mL. PDB, agar dan akuades dicampur hingga homogen kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1,5 atm. PDA yang sudah steril

kemudian dituang ke cawan petri dan ditunggu hingga padat. Pada PDA baru yang sudah padat, Isolat *Trichoderma sp.* lama diinokulasikan sebanyak 1 blok (ukuran 1x1 cm) kemudian diinkubasi selama 6 hari (Peng et al., 2021).

3.3.2 Pembuatan Media dan Produksi Selulase

Trichoderma sp. yang sudah diremajakan diinokulasi ke media cair sebanyak 3 blok (masing-masing berukuran 1x1 cm) ke erlenmeyer yang berisi 250 mL media cair kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 12 hari dengan agitasi 120 rpm pada suhu 30°C. Komposisi media cair terdiri dari peptone 1 g/L; glukosa 15 g/L; urea 0,3 g/L; *yeast extract* 20 g/L; (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/L; KH₂PO₄ 2 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,8 g/L; FeSO₄·7H₂O 0,5 g/L; CaCl 21 g/L, Tween 80 2 g/L; dan larutan CMC (*carboxymethyl cellulose*) 10 g/L pH 5. Setiap 24 jam dilakukan panen dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit (Gupta et al., 2012). Supernatan yang diperoleh kemudian disimpan di dalam kulkas 4°C hingga akan digunakan untuk uji aktivitas atau aplikasi. Enzim harus berada di suhu dingin atau 4°C agar menghindari denaturasi enzim (Paul et al., 2015).

3.3.3 Uji Aktivitas Selulase

Uji aktivitas selulase memerlukan reagen dinitrosalicylic acid (DNS). Pembuatan reagen DNS adalah sebagai berikut: (1) 1 g DNS ditimbang lalu dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, (2) 1 g NaOH ditimbang lalu dilarutkan ke dalam 15 mL akuades, (3) Larutan DNS dan NaOH dihomogenkan pada suhu 45°C menggunakan water bath, (4) 30 g potassium sodium tartrate ditambahkan lalu ditambah akuades hingga volumenya menjadi 100 mL. Penghitungan aktivitas selulase membutuhkan kurva standar glukosa. Kurva standar dibuat dengan konsentrasi glukosa 0,01-0,1 mg/mL yang kemudian dibuat grafik untuk mendapatkan persamaan regresinya.

Sampel yang digunakan yakni 1 mL crude enzim dari media produksi. Pengujian aktivitas menggunakan metode DNS yang terdiri dari dua kelompok sampel dan blanko. Sebanyak 500 µl substrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan kemudian ditambahkan 500 µl sampel. Inkubasi selama 30 menit untuk reaksi (per 5 menit). Ditambahkan 500 µl larutan DNS. Inkubasi selama 15 menit pada

suhu 100°C. Perubahan warna diukur pada gelombang 540 nm. Kadar gula sederhana diplot untuk mendapatkan persamaan kurva standar glukosa.

3.3.4 Uji Kadar Protein

Kadar protein diukur dengan menggunakan metode Bradford dengan acuan dari Nouroozi dkk. (2015). Reagen Bradford dibuat dengan komposisi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 yang dilarutkan dalam 5 mL 95% etanol. Kemudian ditambahkan 10 mL 85% asam fosfat. Setelah itu larutan dihomogenkan dengan akuades hingga volume mencapai 100 mL sehingga didapatkan konsentrasi 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (w/v) etanol, dan 8,5% (w/v) asam fosfor (Bradford, 1976). Campuran larutan tersebut kemudian disaring dengan kertas Whattman No. 1. Reagen Bradford disimpan di dalam botol tertutup yang dilapisi aluminium foil dan disimpan di lemari pendingin dengan suhu 4°C.

Pengukuran kadar protein membutuhkan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA). Pembuatan standar protein BSA menggunakan interval konsentrasi 0,01-0,1 mg/mL. BSA ditimbang sebanyak 100 mg lalu dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Lalu larutan dihomogenkan secara perlahan. Larutan BSA 1 mg/mL dilakukan pengenceran hingga memperoleh interval konsentrasi yang telah ditentukan pada poin 1. Larutan BSA standar sebanyak 0,1 mL dilarutkan dengan 5 mL reagen Bradford lalu ditunggu selama 30 menit. Larutan dihomogenkan dengan vortex dengan kecepatan 2500 rpm selama 15 menit dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm. Penggunaan blanko berisi akuades 0,1 mL dan reagen Bradford 5 mL. Nilai absorbansi yang diperoleh dibuat kurva standar atau grafik dengan persamaan regresi dari standar protein.

3.3.5 Penentuan Titik Isoelektrik

Pengujian titik isoelektrik dilakukan dengan menyiapkan 6 tabung reaksi. Selulase 1 ml dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Pada setiap tabung ditambahkan 1 mL larutan buffer asetat 0,5 M masing-masing dari pH 4, 5, 6, 7, 8 dan 9. Tabung kemudian dikocok, lalu diamati endapan yang terbentuk. Pembentukan endapan paling banyak merupakan titik isoelektrik

3.3.6 Pemurnial Parsial

Ammonium sulfat dari konsentrasi 0-40%, 40-60%, dan 60-80% ditambahkan dan dilarutkan secara bertahap ke *crude* enzim serta dilakukan dikondisi dingin atau di atas es. Setelah dilarutkan dengan sempurna, sampel kemudian diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Setelah inkubasi, sampel disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifugasi digunakan untuk presipitasi berikutnya. Natan hasil sentrifugasi kemudian diresuspensi dengan buffer asetat 0,1 M pH 5 dan diukur aktivitas enzimnya

3.3.7 Perlakuan Batang Sorgum

Batang sorgum didapatkan dari Kecamatan Talango. Pulau Poteran, Kabupaten Sumenep, Provinsi Jawa Timur. Batang yang telah didapatkan kemudian dibersihkan dari sisa daun dan akar yang masih menempel. Setelah itu batang diperas secara mekanik untuk memisahkan sarinya. Selanjutnya, batang yang telah diperas kemudian dibilas menggunakan air mengalir. Batang yang telah dicuci kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu 70°C selama 48 jam.

Batang yang telah kering kemudian dihaluskan hingga menjadi serpihan. Setelah dihaluskan, batang sorgum kemudian disortir ukurannya menggunakan saringan ukuran 60, 80, dan 100 mesh. Setelah tahapan tersebut, batang sorgum dapat digunakan untuk proses selanjutnya.

3.3.8 Seleksi Faktor Sakarifikasi Batang Sorgum

Sakarifikasi batang sorgum melalui dua tahapan, yaitu seleksi faktor terlebih dahulu kemudian dilakukan optimasi. Pada Tabel 3.1 merupakan faktor sakarifikasi yang didesain menggunakan desain Plackett-Burman pada *software Statease Design Expert-11*. Faktor sakarifikasi yang akan digunakan adalah sebanyak 7 jenis dengan masing-masingnya terdiri dari 3 taraf. Faktor sakarifikasi yang digunakan adalah (1) ukuran substrat dengan taraf 60, 80, dan 100 mesh, (2) konsentrasi substrat dengan taraf 1, 3, dan 5 % (w/v), (3) konsentrasi enzim 12, 13, dan 14 U/mL, (4) agitasi dengan taraf 100, 110, dan 120 rpm, (5) suhu dengan taraf 40, 45, dan 50°C, (6) pH dengan taraf 4; 4,5; dan 5, dan (7) waktu dengan taraf 1, 2, hingga 3 hari. Setelah melalui seleksi dengan menggunakan desain Plackett-Burman, faktor yang memiliki hasil terbaik kemudian dioptimasi menggunakan RSM.

Tabel 3. 1 Desain seleksi faktor sakarifikasi

Run	Ukuran Substrat	Konsentrasi Substrat	Konsentrasi Enzim	Agitasi	Suhu	pH	Waktu Inkubasi
	mesh	%	U/mL	rpm	°C		Hari
1	100	1	14	120	40	5	3
2	60	1	12	100	40	4	1
3	60	5	14	100	50	5	3
4	80	3	13	110	45	4.5	2
5	100	5	12	100	40	5	1
6	60	1	14	100	50	5	1
7	100	1	12	100	50	4	3
8	60	5	14	120	40	4	1
9	60	1	12	120	40	5	3
10	100	5	12	120	50	5	1
11	100	5	14	100	40	4	3
12	60	5	12	120	50	4	3
13	80	3	13	110	45	4.5	2
14	100	1	14	120	50	4	1
15	80	3	13	110	45	4.5	2

3.3.9 Optimasi Sakarifikasi Batang Sorgum

Faktor terbaik dari hasil seleksi dengan menggunakan desain Plackett-Burman adalah agitasi dan waktu. Kedua faktor tersebut dioptimasi menggunakan desain *Response Surface Method* (RSM) jenis *central composite design* (CCD) pada aplikasi *Design Expert-11*. Taraf yang digunakan oleh masing-masing faktor terdiri dari 3 level. Taraf untuk faktor agitasi adalah 100, 110, dan 120 rpm; sedangkan taraf untuk faktor waktu adalah 1, 2, dan 3 hari. Optimasi dilakukan pada 40°C, pH 5, konsentrasi substrat 1%, dan konsentrasi enzim 14 U/mL. Pada Tabel 3.2 merupakan rancangan uji.

Tabel 3. 2 Rancangan optimasi sakarifikasi

Run	Agitasi	Suhu
	rpm	°C
1	2	100
2	3	120
3	1	100
4	2	110
5	3	110
6	2	120
7	2	110
8	1	120
9	2	110
10	3	100
11	1	110

3.3.10 Uji kadar Gula Pereduksi Hasil Sakarifikasi

Uji kadar gula pereduksi memerlukan reagen *dinitrosalicylic acid* (DNS). Pembuatan reagen DNS adalah sebagai berikut: (1) timbang 1 g DNS lalu dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, (2) timbang 1 g NaOH lalu dilarutkan ke dalam 15 mL akuades, (3) Larutan DNS dan NaOH dihomogenkan pada suhu 45°C menggunakan water bath, (4) tambahkan 30 g potassium sodium tartrate lalu tambahkan akuades hingga menjadi 100 mL.

Pertama, hasil sakarifikasi diambil sebanyak 0,5 mL dan dicampur dengan reagen DNS sebanyak 0,5 mL di dalam tabung reaksi. Kedua, campuran tersebut dicampur hingga homogen. Setelah homogen, sampel diinkubasi selama 15 menit di dalam waterbath dengan suhu 99°C. Hasil inkubasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm. Kandungan gula pereduksi hasil sakarifikasi dihitung dengan bantuan kurva standar glukosa (Deshavath et al., 2020). Konsentrasi yang digunakan adalah 125-400 ppm. Standar glukosa tersebut

kemudian diuji dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.

3.3.11 Peremajaan Isolat *Saccharomyces cerevisiae*

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat *S. cerevisiae* adalah media agar *yeast peptone glucose* (YPG). Komposisi media agar YPG adalah 20 g/L agar, 20 g/L pepton, 20 g/L glukosa dan 10 g/L ekstrak *yeast* (Jugwanth et al., 2020). Pada media agar yang sudah steril, *S. cerevisiae* diinokulasi kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang

3.3.12 Produksi Bioetanol

Media yang digunakan untuk produksi bioetanol sama seperti pada proses peremajaan isolat, yaitu media YPG cair yang akan dimodifikasi. Modifikasi media produksi terletak pada sumber karbonnya. Sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini ada 3 variasi, yaitu glukosa, kombinasi glukosa dan hasil sakarifikasi, serta hasil sakarifikasi. Proses fermentasi akan dilakukan selama 48 jam pada suhu 30°C.

3.3.13 Uji Kadar Etanol

Kadar etanol diukur berdasarkan metode gravimetri. Sebanyak 1 mL kultur yang telah disentrifugasi dipindahkan ke *microtube* ditimbang berat bersihnya dengan menggunakan timbangan analitik. Kemudian dilakukan pemanasan dengan suhu 78°C selama 5 menit dengan kondisi tutup *microtube* dibuka. Suhu 78°C merupakan titik didih dari etanol. Setelah 5 menit perebusan, sampel didinginkan kemudian ditimbang kembali.

3.3.14 Analisis Data

Penelitian ini bersifat deskriptif kuantitatif. Desain dan analisis hasil seleksi faktor sakarifikasi menggunakan desain Plackett-Burman pada aplikasi Statease Design-Expert 11. Desain dan analisis hasil optimasi sakarifikasi menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) jenis *central composite design* (CCD) pada aplikasi *Statease Design-Expert 11*.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Peremajaan Isolat *Trichoderma* sp.

Media pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah *potato dextrose agar* (PDA). Pertumbuhan *Trichoderma* sp. diamati morfologi koloninya pada cawan petri setelah 7 hari inkubasi. Koloni jamur pada cawan petri diamati karakteristiknya berupa warna koloni, tekstur permukaan koloni, serta arah pertumbuhannya. Pada Gambar 4.1 merupakan koloni *Trichoderma* sp. setelah diinkubasi selama 7 hari.

Warna koloni *Trichoderma* sp. yang tumbuh pada cawan petri tampak berwarna hijau muda hingga putih keabu-abuan serta dikelilingi zona hijau tua. Warna hijau merupakan indikator kuat produksi konidia. Hal ini sesuai dengan Asis et al. (2021) yang menyatakan bahwa ciri khas *Trichoderma* sp. yaitu memiliki warna koloni yang bervariasi mulai dari putih, kekuningan, hingga hijau. Selain itu, Asis et al. (2021) juga menyatakan bahwa zona hijau tua atau biasa disebut dengan cincin kosentris merupakan ciri morfologi lain dari *Trichoderma* sp.. Zona tersebut merupakan konidia dari *Trichoderma* sp..

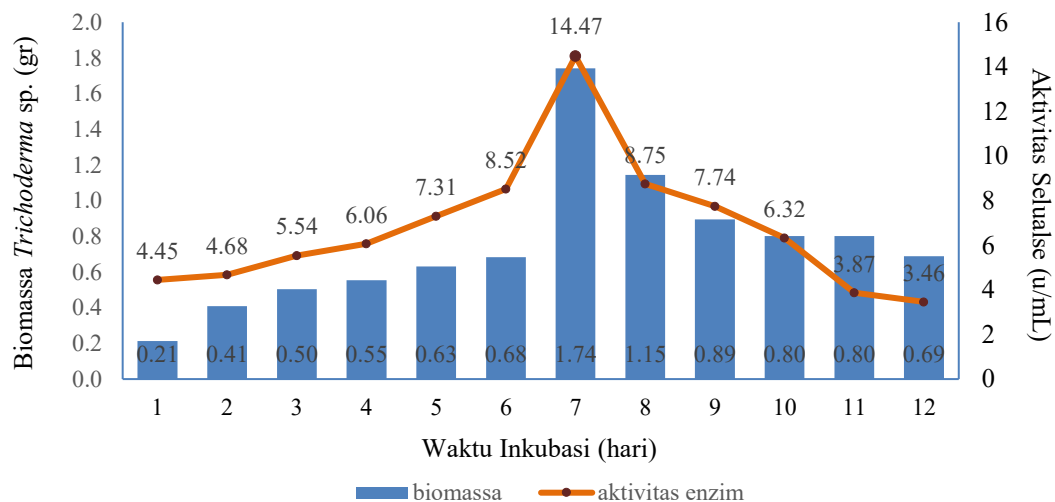
Tekstur permukaan koloni tampak berbulu hingga granular, menandakan pembentukan konidia yang melimpah. Hal ini sesuai dengan penelitian Bint-e-Zahira et al. (2024). Pertumbuhan koloninya bersifat konsentris dan simetris, menyebar dari pusat ke arah tepi. Ini sesuai dengan karakter cepat tumbuhnya *Trichoderma* pada medium PDA seperti pada penelitian Asis et al. (2021).



Gambar 4. 1 *Trichoderma* sp. pada Media PDA

4.2 Produksi dan Karakterisasi Selulase

Produksi selulase dilakukan selama 14 hari. Setiap 24 jam sekali dilakukan panen enzim sekaligus penghitungan biomassa jamur *Trichoderma* sp.. Enzim yang telah dipanen kemudian diukur aktivitasnya dan digabungkan dengan data biomassa jamur untuk membuat kurva produksi seperti pada Gambar 4.2. Kurva produksi berisi tentang profil pertumbuhan *Trichoderma* sp. dan aktivitas selulase.



Gambar 4. 2 Kurva produksi selulase dari jamur *Trichoderma* sp.

Berdasarkan visualisasi pada Gambar 4.2, diketahui bahwa hari pertama dan kedua merupakan fase lag atau fase adaptasi *Trichoderma* sp. pada media. Biomassa pada hari pertama berjumlah 0,2 g kemudian mulai bertambah menjadi 0,4 g pada hari kedua. Pada hari berikutnya, hari ke-3 hingga 7, terlihat bahwa terdapat peningkatan jumlah biomassa jamur dari 0,5 g meningkat menjadi 1,74 g. Fase ini disebut dengan fase eksponensial dimana jamur yang telah beradaptasi pada media mampu memperbanyak diri. Setelah fase eksponensial merupakan fase kematian dimana biomassa jamur mengalami penurunan. Pada penelitian ini, fase kematian terjadi pada waktu inkubasi hari ke 8 hingga 12.

Penelitian oleh Gomes et al. (2006) menyatakan bahwa proses produksi enzim pada fungi biasanya dimulai setelah melewati fase lag yang biasanya dimulai setelah inkubasi selama 24 jam atau lebih lalu puncaknya ada pada hari ke-5 hingga

ke-7 inkubasi. Hal ini sejalan dengan hasil dari penelitian ini dimana aktivitas enzim tertinggi ada pada hari ke-7.

Berdasarkan kurva produksi *Trichoderma* sp. dapat diketahui bahwa aktivitas selulase meningkat seiring dengan bertambahnya biomassa dan juga menurun seiring dengan penurunan jumlah biomassa. Aktivitas selulase tertinggi berada pada hari ke-7 dengan nilai aktivitas sebesar 14,47 U/mL (perhitungan aktivitas lebih lengkap terdapat pada Lampiran 1). Pertumbuhan biomassa serta produksi enzim dipengaruhi oleh nutrisi yang ada pada media serta lingkungan pertumbuhannya (Nathan et al., 2014). Nutrien yang tepat yang diikuti dengan parameter lingkungan seperti suhu dan pH membantu meningkatkan produksi selulase pada *Trichoderma* sp (Saravanan et al., 2012).

Selulase dengan aktivitas tertinggi kemudian dipurifikasi dengan menggunakan amonium sulfat. Pada Tabel 4.1 merupakan hasil uji aktivitas setelah proses pemurnian. Fraksi terbaik untuk pemurnian selulase ditandai dengan tingginya aktivitas spesifik dimana pada penelitian ini ada pada fraksi 60-80% dengan nilai aktivitas sebesar 4,37 U/mg.

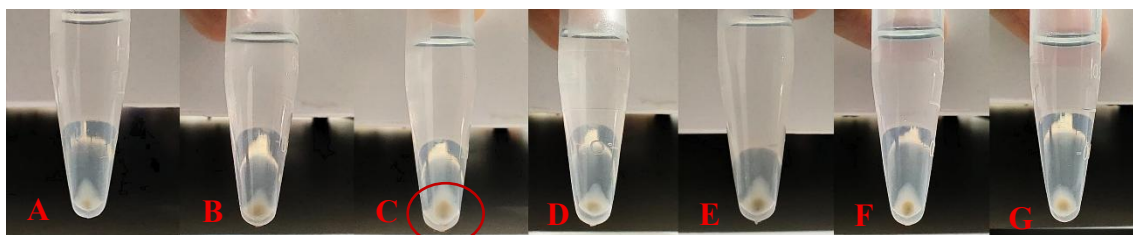
Proses pemurnian enzim dengan amonium sulfat menurunkan solubilitas protein sehingga terjadi proses presipitasi protein yang dinamakan dengan fenomena *salting out* (Wingfield, 2001). Proses *salting out* yang menyebabkan protein terpresipitasi pada konsentrasi tertentu atau dapat disebut juga sebagai fraksi. Pada penelitian ini, pemurnian selulase dengan fraksi 60-80% memiliki hasil yang terbaik. Fraksi pemurnian di bawah atau di atasnya dapat menyebabkan inaktivasi enzim yang disebabkan oleh garam atau dapat disebut juga sebagai inhibisi garam (Fouda et al., 2024).

Tabel 4. 1 Aktivitas spesifik dan kandungan protein selulase pada fraksi pemurnian

Fraksi Pemurnian Selulase	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Kandungan Protein (mg/ml)
Crude Selulase	3,77	3,84
Fraksi 1 (0-40%)	0,38	0,52
Fraksi 2 (40-60%)	0,79	0,21
Fraksi 3 (60-80%)	4,37	0,07

Proses karakterisasi selulase terakhir pada penelitian ini adalah uji titik isoelektrik yang mengamati pengendapan protein pada pH tertentu seperti pada Gambar 4.3. Titik isoelektrik (pI) protein didefinisikan sebagai pH di mana muatan bersih molekul protein adalah nol. Oleh karena itu, protein bermuatan positif pada pH di bawah pI dan bermuatan negatif pada pH di atas pI. pI protein sangat bervariasi dari nilai yang sangat asam hingga sangat basa mulai dari sekitar 4 hingga 12 (Tokmakov et al., 2021).

Pada penelitian ini, variasi pH yang digunakan untuk uji pI bervariasi dari pH 3 hingga 9. Hasil menunjukkan bahwa pI dari selulase penelitian ini ada pada pH 5 yang diindikasikan dengan pengendapan protein paling banyak (ditunjukkan pada Gambar 4.3 C). Hal ini sesuai dengan penelitian Pachauri et al. (2020) yang menyatakan bahwa selulase *Trichoderma* stabil pada pH ~4,8.



Gambar 4. 3 Pengendapan protein selulase pada pH 5. Gambar A-G menunjukkan hasil pengendapan protein pada pH 3-9 secara berurutan.

4.3 Seleksi Faktor Sakarifikasi

Seleksi faktor sakarifikasi dirancang menggunakan rancangan Plackett-Burman pada aplikasi *Statease Design-Expert 11*. Faktor yang diuji berupa ukuran substrat, konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, agitasi, suhu, pH, dan waktu. Kombinasi dari semua faktor tersebut menghasilkan 15 *run* (uji coba). Berdasarkan hasil eksperimen yang ditunjukkan pada Tabel 4.2, kombinasi faktor pada *run* nomor 1 menghasilkan respons berupa pembentukan gula pereduksi tertinggi yaitu sebesar 5,82 mg/mL mengindikasikan berhasilnya proses sakarifikasi. Sakarifikasi merupakan proses pemecahan polimer yang memiliki struktur kompleks seperti selulosa menjadi monomer yang sederhana seperti glukosa (Saini et al., 2013).

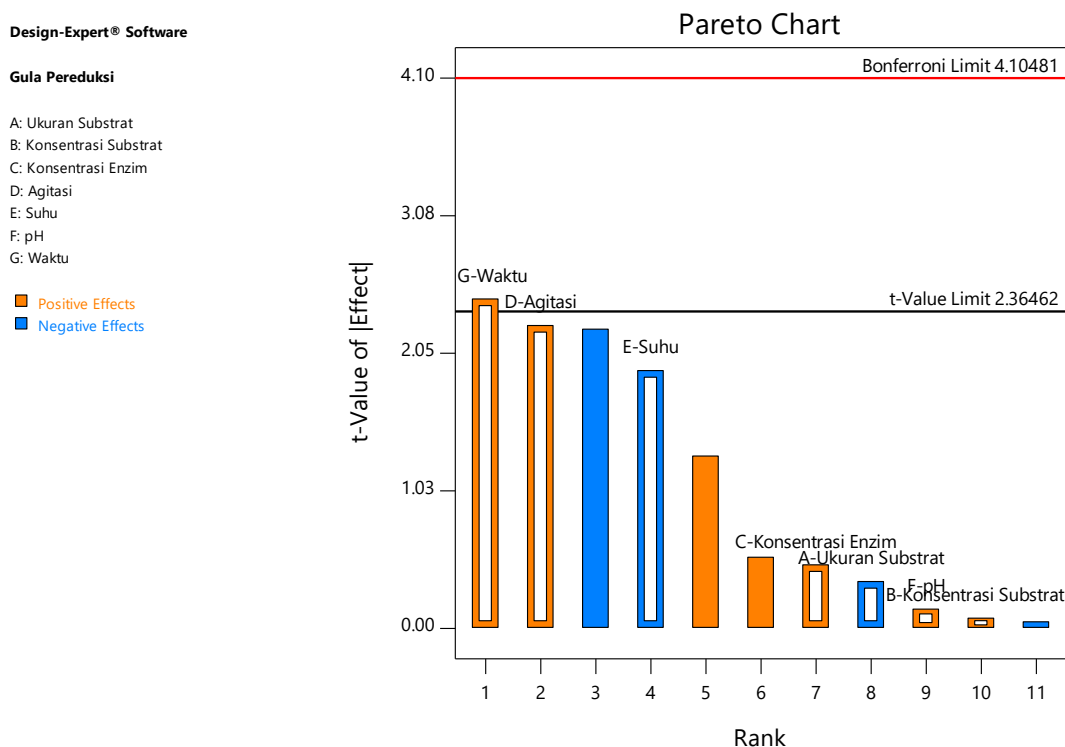
Tabel 4. 2 Hasil sakarifikasi dengan rancangan Plackett-Burman*

Run	Ukuran Substrat	Konsentrasi Substrat	Konsentrasi Enzim	Agitasi	Suhu	pH	Waktu Inbukasi	Respon (Gula Pereduksi)
	mesh	%	U/mL	rpm	°C		Hari	mg/mL
1	100	1	14	120	40	5	3	5,82
2	60	1	12	100	40	4	1	0,77
3	60	5	14	100	50	5	3	1,87
4	80	3	13	110	45	4,5	2	1,70
5	100	5	12	100	40	5	1	3,15
6	60	1	14	100	50	5	1	2,27
7	100	1	12	100	50	4	3	2,84
8	60	5	14	120	40	4	1	4,70
9	60	1	12	120	40	5	3	5,34
10	100	5	12	120	50	5	1	1,10
11	100	5	14	100	40	4	3	3,55
12	60	5	12	120	50	4	3	5,04
13	80	3	13	110	45	4,5	2	1,06
14	100	1	14	120	50	4	1	2,05
15	80	3	13	110	45	4,5	2	1,01

Dalam rangka memahami kontribusi masing-masing faktor sakarifikasi terhadap respon berupa pembentukan gula pereduksi dilakukan visualisasi dengan analisis diagram pareto. Pada Gambar 4.4 menunjukkan adanya 2 jenis efek, yakni efek positif dan negatif. Efek positif yang dilambangkan dengan warna oranye memperlihatkan bahwa adanya peningkatan respon yang dipengaruhi oleh adanya faktor tersebut. Sebaliknya, efek negatif yang dilambangkan dengan warna biru menunjukkan hasil respon yang berlawanan terhadap efek positif. Selain efek positif dan negatif, pada diagram pareto juga dapat diamati faktor yang memiliki pengaruh signifikan terhadap respon apabila melampaui garis *t-value*. Diagram

pareto merupakan representasi visual yang efektif untuk mendemonstrasikan relevansi efek yang berbeda pada rancangan Plackett-Burman (Rajput et al., 2025).

Pada penelitian ini faktor yang memiliki pengaruh signifikan sekaligus memiliki efek positif terhadap respon adalah waktu. Selain faktor waktu, agitasi juga dipertimbangkan menjadi faktor yang memiliki pengaruh signifikan walaupun tidak melampaui garis *t-value*.



Gambar 4. 4 Diagram pareto faktor sakarifikasi

Dalam rangka memperdalam analisis data hasil sakarifikasi, selanjutnya dilakukan analisis regresi dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Tabel 4.3 merupakan hasil ANOVA faktor-faktor sakarifikasi. Di antara ke-7 faktor yang telah diuji, faktor waktu memiliki nilai yang signifikan. Signifikansi menunjukkan bahwa waktu memiliki pengaruh bagi proses sakarifikasi. Pada tahap awal sakarifikasi, laju reaksi cenderung tinggi karena substrat masih banyak tersedia dan enzim dalam kondisi aktif (Westh et al., 2025). Seiring waktu, substrat batang sorgum sebagian besar telah dihidrolisis oleh selulase sehingga terjadi akumulasi produk (berupa glukosa atau gula pereduksi). Akumulasi produk dapat menghambat kerja enzim, serta memunculkan potensi terjadinya denaturasi enzim

karena lingkungan reaksi yang tidak lagi optimal. Oleh karena itu, waktu reaksi yang terlalu singkat belum cukup untuk menghasilkan konversi maksimal, sedangkan waktu yang terlalu lama tidak selalu memberikan peningkatan signifikan dan bahkan bisa menurunkan efisiensi proses (Alrumman, 2016; Kassanov et al., 2017).

Selain faktor waktu, terdapat satu faktor lain yang dapat diikutsertakan untuk dioptimasi yaitu agitasi yang memiliki nilai signifikansi sebesar 0,0646. Walaupun nilai tersebut tergolong tidak signifikan, tetapi hasil diagram pareto pada Gambar 4.4 menunjukkan bahwa faktor ini terletak pada posisi ke-2 dengan diagramnya yang paling mendekati garis t-value. Posisi faktor ini disebut sebagai faktor yang *marginally significant* dimana walaupun nilai p nya di atas ambang batas 0,05 tetapi dapat dipertimbangkan untuk menjawab hipotesis penelitian (Vail & Avidan, 2022).

Berdasarkan penelitian dari Kadić et al. (2014) agitasi memiliki peran penting dalam sakarifikasi enzimatis karena dapat meningkatkan transfer massa, kontak enzim-substrat, dan homogenitas dalam medium reaksi. Agitasi yang tepat memastikan selulase dapat mengakses selulosa di dalam matriks lignoselulosa yang kompleks pada batang sorgum, sehingga meningkatkan hasil glukosa. Agitasi juga membantu menangguk partikel bagasse yang tidak larut, mencegah pengendapan, dan memungkinkan enzim memiliki kontak yang lebih besar dengan permukaan substrat.

Secara keseluruhan, model dari rancangan sakarifikasi tidak signifikan (Tabel 4.3). Sebaliknya, nilai *curvature* yang signifikan menunjukkan bahwa ada kemungkinan tidak sesuai model linier Plackett-Burman dengan bentuk nyata dari respon, yang umumnya menandakan adanya efek kuadratik yang tidak tertangkap oleh model. Hal ini memperkuat alasan untuk melanjutkan ke desain optimasi *Response Surface Methodology* (RSM) untuk mengevaluasi interaksi dan efek non-linier antar faktor (Goupy, 2005; Tasharrofi et al., 2011). *Lack of fit* model tidak signifikan, yang berarti tidak terdapat penyimpangan besar antara model dengan data eksperimen, tetapi model linier masih cukup merepresentasikan data secara umum.

Tabel 4. 3 Hasil analisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) respons dari proses sakarifikasi

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	22,83	7	3,26	2,17	0,1817	<i>not significant</i>
A-Ukuran Substrat	0,1832	1	0,1832	0,1221	0,7388	
B-Konsentrasi Substrat	0,0087	1	0,0087	0,0058	0,9418	
C-Konsentrasi Enzim	0,3374	1	0,3374	0,2247	0,6522	
D-Agitasi	7,66	1	7,66	5,10	0,0646	
E-Suhu	5,55	1	5,55	3,70	0,1029	
F-pH	0,0310	1	0,0310	0,0207	0,8904	
G-Waktu	9,06	1	9,06	6,04	0,0493	<i>significant</i>
Curvature	9,11	1	9,11	6,07	0,0489	
Residual	9,01	6	1,50			
Lack of Fit	8,71	4	2,18	14,72	0,0646	<i>not significant</i>
Pure Error	0,2959	2	0,1479			
Cor Total	40,95	14				

4.4 Optimasi Faktor Sakarifikasi

Tahap lanjutan dari seleksi faktor sakarifikasi adalah optimasi. Berdasarkan hasil analisis data pada proses seleksi, faktor yang dioptimasi yaitu waktu dan agitasi. Pada penelitian ini, dari kombinasi 2 faktor menghasilkan eksperimen dengan 11 *run* (uji coba). Respon berupa pembentukan gula pereduksi ditunjukkan pada Tabel 4.4 dimana hasil yang terbaik ada pada run nomor 10 yaitu sebanyak 7,36 mg/mL.

Pada Tabel 4.5 dapat terlihat bahwa agitasi merupakan faktor yang paling signifikan dibandingkan dengan faktor waktu. Agitasi memainkan peran penting dalam proses sakarifikasi lignoselulosa karena dapat mempercepat pemecahan biomassa batang sorgum dan mengurangi viskositas campuran. Intensitas agitasi juga berpengaruh pada proses ini. Pada penelitian Digaitis et al. (2021) diketahui bahwa kecepatan agitasi yang semakin rendah membantu pemecahan biomassa yang lebih cepat. Berdasarkan penelitian dari Takahashi et al. (2014) diketahui

bahwa sirkulasi yang terjadi saat proses agitasi memberi tekanan pada partikel biomassa sehingga terjadi pemecahan partikel. Bersamaan dengan tekanan yang terjadi akibat agitasi, enzim melakukan proses hidrolisis terhadap biomassa yang menyebabkan terjadinya perubahan pada biomassa yang semula memiliki struktur kompleks menjadi lebih sederhana.

Tabel 4. 4 Hasil optimasi sakarifikasi dengan rancangan RSM

Run	Waktu Inkubasi	Agitasi	Respon (Gula Pereduksi)
	Hari		
1	2	100	6,04
2	3	120	3,37
3	1	100	4,11
4	2	110	3,56
5	3	110	2,64
6	2	120	3,44
7	2	110	2,79
8	1	120	3,61
9	2	110	3,55
10	3	100	7,36
11	1	110	3,67

Interaksi antara kedua faktor yang dilambangkan oleh notasi AB berada di batas signifikansi, menunjukkan adanya potensi pengaruh sinergis yang patut dipertimbangkan dalam optimasi (Tasharrofi et al., 2011). Pada Tabel 4.5 efek kuadratik dari faktor agitasi yang dilambangkan oleh notasi B^2 terbukti signifikan, yang mengindikasikan adanya hubungan non-linier antara kecepatan agitasi dan respon yang artinya peningkatan agitasi tidak hanya fokus ke meningkatkan respon tetapi juga terdapat titik optimum. Sebaliknya, efek kuadratik dari waktu sakarifikasi yang dilambangkan oleh notasi A^2 tidak signifikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa pengaruh waktu terhadap respon lebih bersifat linier dalam

rentang kondisi yang diuji. Nilai *lack of fit* yang tidak signifikan menunjukkan bahwa model sesuai dengan data eksperimental dan tidak ada penyimpangan besar.

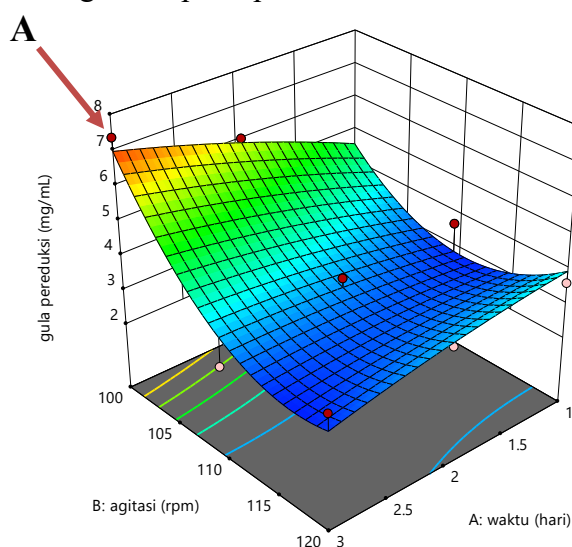
Tabel 4. 5 Analisis regresi ANOVA dari rancangan RSM

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	17,59	5	3,52	6,78	0,0279	<i>significant</i>
A-waktu	0,6468	1	0,6468	1,25	0,3149	
B-agitasi	8,40	1	8,40	16,19	0,0101	
AB	3,05	1	3,05	5,87	0,0599	
A ²	0,0465	1	0,0465	0,0897	0,7766	
B ²	5,32	1	5,32	10,26	0,0239	
Residual	2,59	5	0,5188			
Lack of Fit	2,20	3	0,7346	3,77	0,2169	<i>not significant</i>
Pure Error	0,3902	2	0,1951			

Kombinasi antar faktor sakarifikasi dapat saling mempengaruhi nilai respon. Pada RSM terdapat grafik respon 3D seperti pada Gambar 4.5 yang menggambarkan pengaruh nilai respon yang ditunjukkan dari warnanya. Nilai respon tertinggi terlihat pada area yang ditandai dengan warna oranye hingga hijau, sedangkan nilai respon terendah ditandai oleh warna biru. Titik-titik merah pada permukaan mewakili titik eksperimen aktual, termasuk titik pusat, aksial, dan sudut, yang digunakan untuk membentuk model prediktif kuadratik dari proses sakarifikasi.

Titik yang ditunjuk oleh poin A pada Gambar 4.5 menunjukkan posisi optimum dari proses optimasi sakarifikasi pada plot kontur grafik 3 dimensi (3D). Titik tersebut merupakan hasil respon dari *run* nomor 10 dengan kombinasi faktornya adalah agitasi 100 rpm dan waktu inkubasi 3 hari. Plot kontur atau peta kontur, menyediakan salah satu cara paling informatif untuk mengilustrasikan dan

menginterpretasikan sistem permukaan respons. Berdasarkan (Myers et al., 2009) plot kontur adalah grafik yang menunjukkan kontur respons konstan dengan sistem sumbu berupa pasangan variabel desain tertentu sementara variabel desain lainnya tetap konstan. Grafik ini memungkinkan interpretasi disarankan pada proses analisis dilanjutkan dengan tampilan plot kontur.



Gambar 4. 5 Grafik 3D (plot kontur) respon hasil optimasi sakarifikasi. (A) Titik optimum optimasi

4.5 Peremajaan Isolat *Saccharomyces cerevisiae*

Media yang digunakan untuk peremajaan isolat *Saccharomyces cerevisiae* adalah agar *yeast peptone glucose* (YPG). Pada Gambar 4.6 merupakan isolat *S. cerevisiae* yang telah ditumbuhkan pada media agar YPG selama 48 jam. Warna dari koloninya adalah putih krem dan memiliki permukaan yang halus. Bentuk koloni yang diamati pada cawan petri adalah bulat dengan sedikit elevasi. Hasil pengamatan pada penelitian ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Plocek et al. (2020).



Gambar 4. 6 Isolat *Saccharomyces cerevisiae*

4.6 Produksi Bioetanol

Produksi bioetanol dilakukan selama 48 jam dan diukur kadar etanolnya setiap 24 jam. Pada Tabel 4.6 terdapat hasil fermentasi dimana menunjukkan kadar etanol tertinggi ada pada 24 jam pertama. Diantara ketiga sumber karbon yang digunakan (glukosa, hasil sakarifikasi, dan kombinasi glukosa serta hasil sakarifikasi) kadar etanol tertinggi sebesar 2,62% dihasilkan dari fermentasi dengan sumber karbon kombinasi diikuti dengan fermentasi menggunakan glukosa saja dengan kadar etanol 2,45% lalu terakhir adalah hasil sakarifikasi saja dengan kadar etanol 1,86%.

Fermentasi dengan menggunakan ketiga jenis sumber karbon menunjukkan hasil pembentukan etanol tertinggi ada pada inkubasi 24 jam. Pada 24 jam pertama, merupakan fase eksponensial bagi *Saccchamoryces cerevisiae* sehingga mampu memproduksi etanol secara aktif (Beluhan et al., 2023). Proses sakarifikasi yang efektif dapat mendukung pembentukan etanol pada fase awal sehingga dapat mempercepat fermentasi karena memotong waktu adaptasi mikroba. Oleh karena itu, kombinasi substrat menyediakan lingkungan fermentasi yang lebih optimal untuk pembentukan etanol dalam 24 jam pertama (González-Gloria et al., 2024)

Tabel 4. 6 Kadar Etanol dari Hasil Produksi Menggunakan 3 Variasi Sumber Karbon

Sumber karbon	Kadar Etanol (%)	
	24 jam	48 jam
Glukosa	2,45	1,59
Glukosa + hasil sakarifikasi	2,62	1,79
Hasil sakarifikasi	1,86	1,34

Pada pengujian hasil fermentasi 48 jam terdapat penurunan kadar etanol pada masing-masing sumber karbon seperti yang tertera pada Tabel 4.6. Penurunan kadar etanol dapat mengindikasikan beberapa hal. Pertama adalah adanya penurunan jumlah sumber karbon sehingga *S. Cerevisiae* terhambat metabolismenya (H. Zhang et al., 2023). Selain itu, pada proses fermentasi terdapat akumulasi inhibitor sehingga memperlambat metabolismenya (Tsegaye et al., 2024).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Faktor optimum pada seleksi faktor sakarifikasi adalah waktu dan agitasi. Kedua faktor tersebut kemudian dioptimasi. Faktor yang paling signifikan dari hasil optimasi merupakan agitasi. Pada proses sakarifikasi, dihasilkan gula pereduksi sebanyak 5,82 mg/mL. Selanjutnya, pada proses optimasi jumlah gula pereduksi yang dihasilkan meningkat menjadi 7,36 mg/mL.
2. Setelah melakukan proses seleksi dan optimasi faktor sakarifikasi kemudian dilanjutkan produksi bioetanol. Kadar bioetanol tertinggi sebesar 2,62% didapatkan dari fermentasi menggunakan sumber karbon kombinasi gula hasil sakarifikasi dan glukosa.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Eksplorasi taraf faktor seleksi sakarifikasi agar mendapatkan model yang signifikan
2. Identifikasi profil hasil sakarifikasi agar mengetahui gula apa saja yang terbentuk sehingga dapat mengoptimalkan proses produksi bioetanol

DAFTAR PUSTAKA

- Afedzi, A. E. K., & Parakulsuksatid, P. (2023). Recent advances in process modifications of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosic biomass for bioethanol production. In *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (Vol. 54). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102961>
- Alrumman, S. A. (2016). Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.015>
- Antonov, E., Wirth, S., Gerlach, T., Schlembach, I., Rosenbaum, M. A., Regestein, L., & Büchs, J. (2016). Efficient evaluation of cellulose digestibility by *Trichoderma reesei* Rut-C30 cultures in online monitored shake flasks. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0567-7>
- Ariefin, M. N., Harsono, P., & Sakya, A. T. (2021). Potential of Sorghum Varieties as Biofuel. *Agromet*, 35(2), 108–115. <https://doi.org/10.29244/j.agromet.35.2.108-115>
- Asis, A., Shahriar, S. A., Naher, L., Saallah, S., Fatihah, H. N. N., Kumar, V., & Siddiquee, S. (2021). Identification patterns of *Trichoderma* strains using morphological characteristics, phylogenetic analyses and lignocellulolytic activities. *Molecular Biology Reports*, 48(4), 3285–3301. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06321-0>
- Bedzo, O. K. K., Diedericks, D., McIntosh, P., Rorke, D. C. S., van Rensburg, E., & Görgens, J. F. (2024). Maximizing Total Sugar Recovery from Low Severity Pretreatment-Hydrolysis of Sweet Sorghum Bagasse Through Cultivar Selection and Process Optimization. *Bioenergy Research*, 17(1), 234–244. <https://doi.org/10.1007/s12155-023-10642-2>
- Belda, I., Ruiz, J., Santos, A., Van Wyk, N., & Pretorius, I. S. (2019). *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics*, 35(12), 956–957. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.08.009>

- Beluhan, S., Mihajlovski, K., Šantek, B., & Ivančić Šantek, M. (2023). The Production of Bioethanol from Lignocellulosic Biomass: Pretreatment Methods, Fermentation, and Downstream Processing. In *Energies* (Vol. 16, Issue 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/en16197003>
- Bernardi, A. V., Gerolamo, L. E., Dinamarco, T. M., & Tapia-Blácido, D. R. (2023). Optimization of biomass saccharification processes with experimental design tools for 2G ethanol production: a review. In *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* (Vol. 17, Issue 6, pp. 1789–1806). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/bbb.2534>
- Cardoso, C. R., Oliveira, T. J. P., Santana Junior, J. A., & Ataíde, C. H. (2013). Physical characterization of sweet sorghum bagasse, tobacco residue, soy hull and fiber sorghum bagasse particles: Density, particle size and shape distributions. *Powder Technology*, 245, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.04.029>
- Chasanah, E., Rahma Dini, I., & Mubarik, N. R. (2013). Characterization of PMP 0126Y Cellulase Enzyme from Agar Processing Waste. *JPB Perikanan*, 8(2). <http://www.ebi.ac.uk>
- Deshavath, N. N., Mukherjee, G., Goud, V. V., Veeranki, V. D., & Sastri, C. V. (2020). Pitfalls in the 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) assay for the reducing sugars: Interference of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.045>
- Digaitis, R., Thybring, E. E., & Thygesen, L. G. (2021). Investigating the role of mechanics in lignocellulosic biomass degradation during hydrolysis: Part II. *Biotechnology Progress*, 37(1). <https://doi.org/10.1002/btpr.3083>
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From bioactivity to a variety of industrial applications. In *Biomimetics* (Vol. 6, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Fouda, A., Alshallash, K. S., Atta, H. M., El Gamal, M. S., Bakry, M. M., Alawam, A. S., & Salem, S. S. (2024). Synthesis, Optimization, and Characterization of Cellulase Enzyme Obtained from Thermotolerant *Bacillus subtilis* F3: An

- Insight into Cotton Fabric Polishing Activity. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 207–223. <https://doi.org/10.4014/jmb.2309.09023>
- Gomes, I., Shaheen, M., Rahman, S. R., & Gomes, D. J. (2006). Comparative Studies on Production of Cell Wall-Degrading Hydrolases by *Trichoderma reesei* and *T. viride* in Submerged and Solid-State Cultivations. *J Microbiol*, 23(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3329/bjm.v23i2.882>
- González-Gloria, K. D., Tomás-Pejó, E., Amaya-Delgado, L., Rodríguez-Jasso, R. M., Loredó-Treviño, A., Singh, A., Hans, M., Martín, C., Kumar, S., & Ruiz, H. A. (2024). Biochemical and Biorefinery Platform for Second-Generation Bioethanol: Fermentative Strategies and Microorganisms. In *Fermentation* (Vol. 10, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/fermentation10070361>
- Goupy, J. (2005). What kind of experimental design for finding and checking robustness of analytical methods? *Analytica Chimica Acta*, 544(1-2 SPEC. ISS.), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.01.051>
- Hassaballa, L. A., & Ahmed, A. A. (2023). Molecular Genetic Identification of Some Sweet Sorghum-Sorghum bicolor L. (Ankolib) Accessions-Sudan. *International Journal of Stem Cells and Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.58489/2836>
- Ishizaki, H., & Hasumi, K. (2013). Ethanol Production from Biomass. In *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems* (pp. 243–258). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404609-2.00010-6>
- Jardim, A., Novaes da Silva, G. Í., Biesdorf, E. M., Pinheiro, A. G., Da Silva, M. V., Do Nascimento Araújo Júnior, G., Dos Santos, A., Muniz Nunes Alves, H. K., De Sá Souza, M., Florentino de Moraes, J. E., Pereira Alves, C., & Freire da Silva, T. G. (2020). Potencial produtivo da cultura do Sorghum bicolor (L.) Moench no semiárido brasileiro: revisão. *Pubvet*, 14(04). <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n4a550.1-13>
- Jugwanth, Y., Sewsynker-Sukai, Y., & Gueguim Kana, E. B. (2020). Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.116552>

- Kadić, A., Palmqvist, B., & Lidén, G. (2014). *Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed*. <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/7/1/77>
- Kamala, T., Devi, S. I., Sharma, K. C., & Kennedy, K. (2015). Phylogeny and taxonomical investigation of *Trichoderma* spp. from Indian region of Indo-Burma Biodiversity hot spot region with special reference to Manipur. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/285261>
- Kassanov, B., Wang, J., Fu, Y., & Chang, J. (2017). Cellulose enzymatic saccharification and preparation of 5-hydroxymethylfurfural based on bamboo hydrolysis residue separation in ionic liquids. *RSC Advances*, 7(49), 30755–30762. <https://doi.org/10.1039/c7ra05020h>
- Khan, M. T., Ejaz, U., & Sohail, M. (2020). Evaluation of Factors Affecting Saccharification of Sugarcane Bagasse Using Cellulase Preparation from a Thermophilic Strain of *Brevibacillus* sp. *Current Microbiology*, 77(9), 2422–2429. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02059-3>
- Kumar Keshav, P., Banoth, C., Kethavath, S. N., & Bhukya, B. (2023). Lignocellulosic ethanol production from cotton stalk: an overview on pretreatment, saccharification and fermentation methods for improved bioconversion process. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13, 4477–4493. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01468-z/Published>
- Lestari, E. G., Dewi, I. S., Nur, A., Yunita, R., & Mastur. (2019). Genetic x environment interaction on agronomic characters and yield components of sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) mutant strain. *Biodiversitas*, 20(12), 3705–3714. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201233>
- Mendieta, C. M., Felissia, F. E., Arismendy, A. M., Kruyeniski, J., & Area, M. C. (2021). Enzymatic Hydrolysis and Fermentation Strategies for the Biorefining of Pine Sawdust. *BioResources*, 16(4). <https://doi.org/10.15376/biores.16.4.7474-7491>
- Mkhize, T., Mthembu, L. D., Gupta, R., Kaur, A., Kuhad, R. C., Reddy, P., & Deenadayalu, N. (2016). Enzymatic saccharification of acid/alkali pre-treated, mill-run, and depithed sugarcane bagasse. *BioResources*, 11(3), 6267–6285. <https://doi.org/10.15376/biores.11.3.6267-6285>

- Mohan, M., Banerjee, T., & Goud, V. V. (2015). Hydrolysis of bamboo biomass by subcritical water treatment. *Bioresource Technology*, 191(May), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.05.010>
- Muharja, M., Albana, I., Zuhdan, J., Bachtiar, A., & Widjaja, A. (2019). Reducing Sugar Production in Subcritical Water and Enzymatic Hydrolysis using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *JURNAL TEKNIK ITS*, 2(8).
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY: Process and Product Optimization Using Designed Experiments* (3rd ed). John Wiley & Sons, Inc.
- Nathan, V. K., Rani, M. E., Rathinasamy, G., Dhiraviam, K. N., & Jayavel, S. (2014). Process optimization and production kinetics for cellulase production by *Trichoderma viride* VKF3. *SpringerPlus*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-92>
- Nouroozi, V., Nouroozi, R. V., Noroozi, M. V., & Ahmadizadeh, M. (2015). Determination of Protein Concentration Using Bradford Microplate Protein Quantification Assay. In *International Electronic Journal of Medicine* (Vol. 4, Issue 1).
- Østby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., & Várnai, A. (2020). Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. In *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (Vol. 47, Issues 9–10, pp. 623–657). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>
- Pachauri, P., Aranganathan, V., More, S., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2020). Purification and characterization of cellulase from a novel isolate of *Trichoderma longibrachiatum*. *Biofuels*, 11(1), 85–91. <https://doi.org/10.1080/17597269.2017.1345357>
- Pamungkas, K., Santi, R., & Lestari, T. (2021). KERAGAAN BEBERAPA VARIETAS SORGUM (*SORGHUM BICOLOR* [L.] MOENCH.) DI MEDIA TAILING PASIR PASCA TAMBANG TIMAH. *Seminar Nasional Penelitian Dan Pengabdian Pada Masyarakat*.

- Paul, J. S., Tiwari, K. L., & Jadhav, S. K. (2015). Long Term Preservation of Commercial Important Fungi in Glycerol at 4°C. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 79–85. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.79.85>
- Peng, Z. Q., Li, C., Lin, Y., Wu, S. S., Gan, L. H., Liu, J., Yang, S. L., Zeng, X. H., & Lin, L. (2021). Cellulase production and efficient saccharification of biomass by a new mutant *Trichoderma afroharzianum* MEA-12. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02072-z>
- Phwan, C. K., Ong, H. C., Chen, W. H., Ling, T. C., Ng, E. P., & Show, P. L. (2018). Overview: Comparison of pretreatment technologies and fermentation processes of bioethanol from microalgae. In *Energy Conversion and Management* (Vol. 173, pp. 81–94). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.07.054>
- Pires Nogueira, D., Ferreira Rosa, P. R., Aparecida Seolatto, A., Galeano Suarez, C. A., & Ferreira Freitas, F. (2019). Saccharification of Orange Bagasse Pre-treated with Calcium Hydroxide using an enzymatic blend Diluted Hydrochloric Acid. *Revista ION*, 32(1), 75–85. <https://doi.org/10.18273/revion.v32n1-2019007>
- Plocek, V., Váchová, L., Št'ovíček, V., & Palková, Z. (2020). Cell distribution within yeast colonies and colony biofilms: How structure develops. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21113873>
- Pramanik, S. K., Mahmud, S., Paul, G. K., Jabin, T., Naher, K., Uddin, M. S., Zaman, S., & Saleh, M. A. (2021). Fermentation optimization of cellulase production from sugarcane bagasse by *Bacillus pseudomycoloides* and molecular modeling study of cellulase. *Current Research in Microbial Sciences*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100013>
- Purwoko, T., Sari, S. L. A., Mahadjoeno, E., & Sunarto. (2017). Bioethanol Production From Rice and Corn Husks After Enzymatic and Microbes Hydrolysis and Yeast Fermentation. *Biotechnologi*, 14(1), 19–23. <https://doi.org/10.13057/biotek/c140105>

- Rajput, K., Jassim, A. Y., Mohammed, A. A., Al-Tawaha, A. R. M. S., Karnwal, A., & Malik, T. (2025). Statistical Optimization of Culture Conditions for Enhanced Biomass Yield of *Lactobacillus acidophilus* CM1 Using Plackett–Burman and Response Surface Methodology. *International Journal of Food Science*, 2025(1). <https://doi.org/10.1155/ijfo/5576637>
- Rashid, R., Ejaz, U., Ali, F. I., Hashmi, I. A., Bari, A., Liu, J., Wang, L., Fu, P., & Sohail, M. (2020). Combined pretreatment of sugarcane bagasse using alkali and ionic liquid to increase hemicellulose content and xylanase production. *BMC Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00657-4>
- Reis, V. R., Bassi, A. P. G., da Silva, J. C. G., & Ceccato-Antonini, S. R. (2013). Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1121–1131. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000020>
- Robak, K., & Balcerek, M. (2018). Review of second generation bioethanol production from residual biomass. In *Food Technology and Biotechnology* (Vol. 56, Issue 2, pp. 174–187). University of Zagreb. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.02.18.5428>
- Saini, J. K., Anurag, R. K., Arya, A., Kumbhar, B. K., & Tewari, L. (2013). Optimization of saccharification of sweet sorghum bagasse using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 44, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.011>
- Salari, R., Salari, R., & Medicine, C. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth Condition. *Electronic Physician*, 9(January), 3592–3597.
- Saravanan, P., Muthuvelayudham, R., Rajesh Kannan, R., & Viruthagiri, T. (2012). Optimization of cellulase production using *Trichoderma reesei* by RSM and comparison with genetic algorithm. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 6(4), 443–452. <https://doi.org/10.1007/s11705-012-1225-1>
- Singh, A., Tuteja, S., Singh, N., & Bishnoi, N. R. (2011). Enhanced saccharification of rice straw and hull by microwave-alkali pretreatment and lignocellulolytic

- enzyme production. *Bioresource Technology*, 102(2), 1773–1782.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.113>
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review. *Frontiers in Microbiology*, 7(JAN).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02087>
- Sulyman, A. O., Igunnu, A., & Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, 6(12).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>
- Syahfitri, A., Hermawan, D., Kusumah, S. S., Ismadi, Lubis, M. A. R., Widyaningrum, B. A., Ismayati, M., Amanda, P., Ningrum, R. S., & Sutiawan, J. (2024). Conversion of agro-industrial wastes of sorghum bagasse and molasses into lightweight roof tile composite. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(1), 1001–1015. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02435-y>
- Tasharrofi, N., Adrangi, S., Fazeli, M., Rastegar, H., Khoshayand, M. R., & Faramarzi, M. A. (2011). Optimization of Chitinase Production by *Bacillus pumilus* Using Plackett-Burman Design and Response Surface Methodology. *RSC Advances*.
- Thanapimmetha, A., Saisriyoot, M., Khomlaem, C., Chisti, Y., & Srinophakun, P. (2019). A comparison of methods of ethanol production from sweet sorghum bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, 151.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107352>
- Tiwari, S., Yadav, J., Gaur, R., Singh, R., Verma, T., Yadav, J. S., Pandey, P. K., & Rath, S. K. (2022). Multistep Structural and Chemical Evaluation of Sugarcane Bagasse, Pretreated With Alkali for Enhancing the Enzymatic Saccharification by Cellulase and Xylanase of the *Pseudomonas* sp. CVB-10 (MK443365) and *Bacillus paramycoides* T4 (MN370035) Mix-Culture System. *Frontiers in Energy Research*, 9.
<https://doi.org/10.3389/fenrg.2021.726010>

- Tokmakov, A. A., Kurotani, A., & Sato, K. I. (2021). Protein pI and Intracellular Localization. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.775736>
- Tse, T. J., Wiens, D. J., & Reaney, M. J. T. (2021). Production of bioethanol—a review of factors affecting ethanol yield. *Fermentation*, 7(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Tsegaye, K. N., Alemnew, M., & Berhane, N. (2024). *Saccharomyces cerevisiae* for lignocellulosic ethanol production: a look at key attributes and genome shuffling. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1466644>
- Vanaja, K., & Rani, R. H. S. (2007). Design of experiments: Concept and applications of plackett burman design. In *Clinical Research and Regulatory Affairs* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1–23). <https://doi.org/10.1080/10601330701220520>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Westh, P., Kari, J., Badino, S., Sørensen, T., Christensen, S., Røjel, N., Schiano-di-Cola, C., & Borch, K. (2025). Are cellulases slow? Kinetic and thermodynamic limitations for enzymatic breakdown of cellulose. In *BBA Advances* (Vol. 7). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbadv.2024.100128>
- Wingfield, P. (2001). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>
- Zhang, H., Zhang, P., Wu, T., & Ruan, H. (2023). fermentation Bioethanol Production Based on *Saccharomyces cerevisiae*: Opportunities and Challenges. *Fermentation*. <https://doi.org/10.3390/fermentation>
- Zhang, Q., Zhao, C., Yin, Z., Sun, R., Zhao, Y., Yang, N., & Zhang, S. (2024). Response Surface Methodology in Experimental Design: A Comprehensive Review of Its Development, Applications, and Analytical Techniques.

Scientific Journal of Technology, 6(12).

<https://doi.org/https://doi.org/10.54691/sa0adp44>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan aktivitas selulase

		Abs	mean					Total		total	
Hari	rep	sampel	abs sampel	abs kontrol	selisih abs	µg/mL glukosa	FP	volume reaksi	µg/mL glukosa	µg/mL glukosa	Akt U/ml
d1	1	0.234	0.228	0.220	0.008	16.0208 3333	5	1	80.104 16667	80.104 16667	4.44529 2268
	2	0.229									
	3	0.220									
d2	1	0.220	0.213	0.203	0.010	16.8541 6667	5		84.270 83333	84.270 83333	4.67651 6833
	2	0.188									
	3	0.232									
Hari	rep	Abs sampel	mean abs sampel	abs kontrol	selisih abs	µg/mL glukosa	FP		µg/mL glukosa	total µg/mL glukosa	Akt U/ml
d3	1	0.320	0.270	0.250	0.020	19.9791 6667	5		99.895 83333	99.895 83333	5.54360 8953
	2	0.234									
	3	0.257									
d4	1	0.335	0.338	0.312	0.026	21.8541 6667	5		109.27 08333	109.27 08333	6.06386 4225
	2	0.330									
	3	0.350									
d5	1	0.412	0.431	0.390	0.041	26.3333 3333	5		131.66 66667	131.66 66667	7.30669 6263
	2	0.450									
	3	0.430									
d6	1	0.588	0.614	0.559	0.055	30.7083 3333	5		153.54 16667	153.54 16667	8.52062 5231
	2	0.612									

	3	0.641									
d7	1	0.546	0.626	0.503	0.123	52.1666 6667	5		260.83 33333	260.83 33333	14.4746 5779
	2	0.666									
	3	0.667									
d8	1	0.547	0.527	0.470	0.057	31.5416 6667	5		157.70 83333	157.70 83333	8.75184 9797
	2	0.523									
	3	0.512									
d9	1	0.488	0.476	0.430	0.046	27.8958 3333	5		139.47 91667	139.47 91667	7.74024 2323
	2	0.470									
	3	0.469									
d10	1	0.388	0.348	0.319	0.029	22.7916 6667	5		113.95 83333	113.95 83333	6.32399 1861
	2	0.350									
	3	0.307									
Hari	rep	Abs sampel	mean abs sampel	abs kontrol	selisih abs	µg/mL glukosa	FP		µg/mL glukosa	total µg/mL glukosa	Akt U/ml
d11	1	0.212	0.213	0.212	0.001	13.9375	5		69.687 5	69.687 5	3.86723 0855
	2	0.220									
	3	0.207									
d12	1	0.188	0.176	0.180	-0.004	12.4791 6667	5		62.395 83333	62.395 83333	3.46258 7865
	2	0.175									
	3	0.166									
	3	0.170									

Lampiran 2. Perhitungan pemurnian selulase

Hari	rep	Abs sampel	mean abs sampel	abs kontrol	selisih abs	µg/mL glukosa	FP	Total volume reaksi	µg/mL glukosa	total µg/mL glukosa	Akt U/ml
Fraksi 0-40	1	0.118	0.132	0.118	0.014	17.8958 3333	1	1	17.895 83333	17.895 83333	0.19862 19016
	2	0.142									
	3	0.135									
Fraksi 40-60	1	0.035	0.039	0.038	0.001	13.9375	1		13.937 5	13.937 5	0.15468 92342
	2	0.049									
	3	0.033									
Fraksi 60-80	1	0.166	0.168	0.144	0.024	21.125	1		21.125	21.125	0.23446 17092

Lampiran 3. Perhitungan kadar gula pereduksi seleksi sakarifikasi Plackett-Burman

run	abs			FP	abs x FP			mean	kadar gula pereduksi ppm	
	A	B	C		A	B	C			
1	0.959	0.958	0.951	20	19.180	19.160	19.020	19.120	5818.424	5.82
2	0.101	0.125	0.145	20	2.020	2.500	2.900	2.473	773.980	0.77
3	0.311	0.305	0.300	20	6.220	6.100	6.000	6.107	1874.990	1.87
4	0.268	0.269	0.294	20	5.360	5.380	5.880	5.540	1703.273	1.70
5	0.604	0.382	0.560	20	12.080	7.640	11.200	10.307	3147.717	3.15
6	0.399	0.347	0.364	20	7.980	6.940	7.280	7.400	2266.909	2.27
7	0.549	0.370	0.474	20	10.980	7.400	9.480	9.287	2838.626	2.84
8	0.753	0.735	0.824	20	15.060	14.700	16.480	15.413	4695.192	4.70
9	0.978	0.887	0.767	20	19.560	17.740	15.340	17.547	5341.657	5.34

	abs	FP	abs x FP	mean	kadar gula pereduksi		run	abs	FP	abs x FP
run	A	B	C		A	B		A	B	C
10	0.174	0.171	0.189	20	3.480	3.420	3.780	3.560	1103.273	1.10
11	0.561	0.527	0.658	20	11.220	10.540	13.160	11.640	3551.758	3.55
12	0.857	0.860	0.764	20	17.140	17.200	15.280	16.540	5036.606	5.04
13	0.209	0.156	0.150	20	4.180	3.120	3.000	3.433	1064.889	1.06
14	0.330	0.341	0.330	20	6.600	6.820	6.600	6.673	2046.707	2.05
15	0.192	0.149	0.148	20	3.840	2.980	2.960	3.260	1012.364	1.01

Lampiran 4. Analisis data Plackett-Burman

- Normal plot

Design-Expert® Software

Gula Pereduksi

Warning! Pure error terms not shown

Shapiro-Wilk test

W-value = 0.921

p-value = 0.541

A: Ukuran Substrat

Right-click to export full text of legend

- Pareto

Design-Expert® Software

Gula Pereduksi

A: Ukuran Substrat

B: Konsentrasi Substrat

C: Konsentrasi Enzim

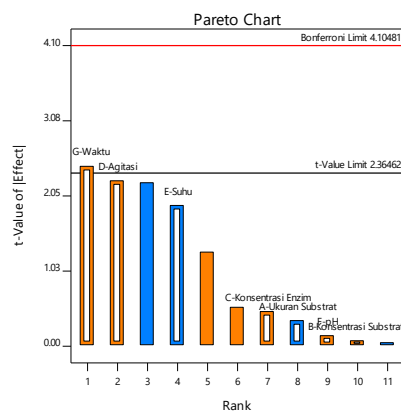
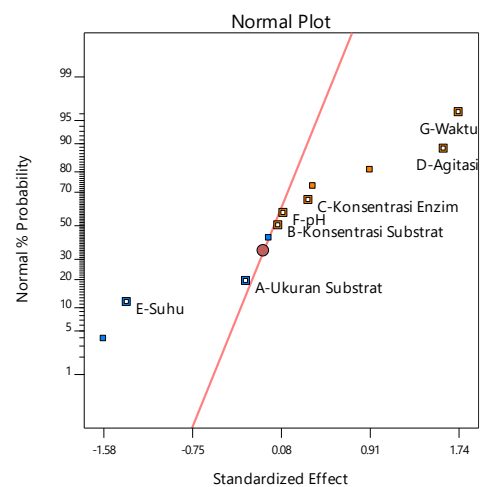
D: Agitasi

E: Suhu

F: pH

G: Waktu

Right-click to export full text of legend



- Fit statistics

Fit Statistics

Std. Dev.	1.23	R²	0.7171
Mean	2.82	Adjusted R²	0.3871
C.V. %	43.47	Predicted R²	-1.4832
		Adeq Precision	4.6878

A negative **Predicted R²** implies that the overall mean may be a better predictor of your response than the current model. In some cases, a higher order model may also predict better.

Adeq Precision measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 4.688 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

- Pred vs actual

Design-Expert® Software

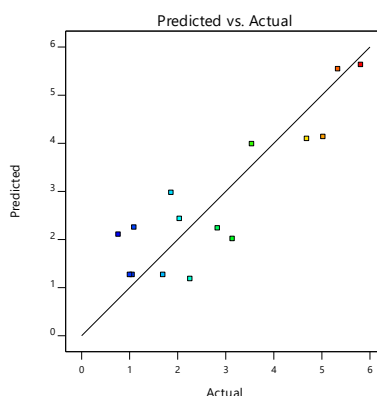
Gula Pereduksi

(adjusted for curvature)

Color points by value of

Gula Pereduksi:

0.77398  5.81842



Lampiran 5. Perhitungan kadar gula pereduksi optimasi sakarifikasi RSM

run	absorbansi			FP	abs x FP			mean	kadar gula pereduksi	
	A	B	C		A	B	C		ppm	mg/mL
1	0.917	1.037	1.022	20	18.340	20.740	20.440	19.840	6036.606	6.04
2	0.453	0.631	0.573	20	9.060	12.620	11.460	11.047	3371.960	3.37
3	0.742	0.617	0.665	20	14.840	12.340	13.300	13.493	4113.374	4.11
4	0.670	0.539	0.543	20	13.400	10.780	10.860	11.680	3563.879	3.56
5	0.446	0.408	0.439	20	8.920	8.160	8.780	8.620	2636.606	2.64

6	0.571	0.574	0.545	20	11.420	11.480	10.900	11.267	3438.626	3.44
7	0.407	0.512	0.451	20	8.140	10.240	9.020	9.133	2792.162	2.79
8	0.592	0.556	0.629	20	11.840	11.120	12.580	11.847	3614.384	3.61
9	0.649	0.544	0.554	20	12.980	10.880	11.080	11.647	3553.778	3.55
10	1.200	1.209	1.224	20	24.000	24.180	24.480	24.220	7363.879	7.36
11	0.512	0.557	0.738	20	10.240	11.140	14.760	12.047	3674.990	3.67

Lampiran 6. Analisis data RSM CCD

- Fit statistics

Fit Statistics

Std. Dev.	0.7203	R²	0.8715
Mean	4.01	Adjusted R²	0.7429
C.V. %	17.96	Predicted R²	-0.1938
		Adeq Precision	7.8237

A negative **Predicted R²** implies that the overall mean may be a better predictor of your response than the current model. In some cases, a higher order model may also predict better.

Adeq Precision measures the signal to noise ratio. A ratio greater than 4 is desirable. Your ratio of 7.824 indicates an adequate signal. This model can be used to navigate the design space.

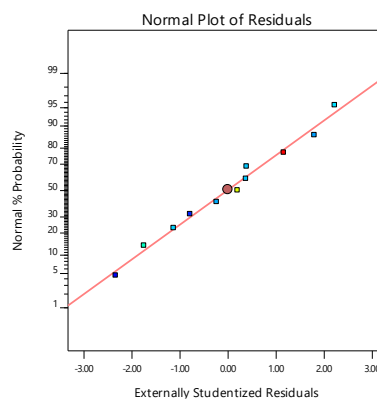
- Normal plot

Design-Expert® Software

gula pereduksi

Color points by value of gula pereduksi:

2.63  7.36



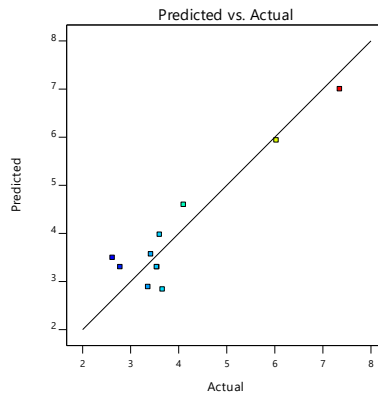
- Prediction vs actual

Design-Expert® Software

gula pereduksi

Color points by value of
gula pereduksi:

2.63  7.36



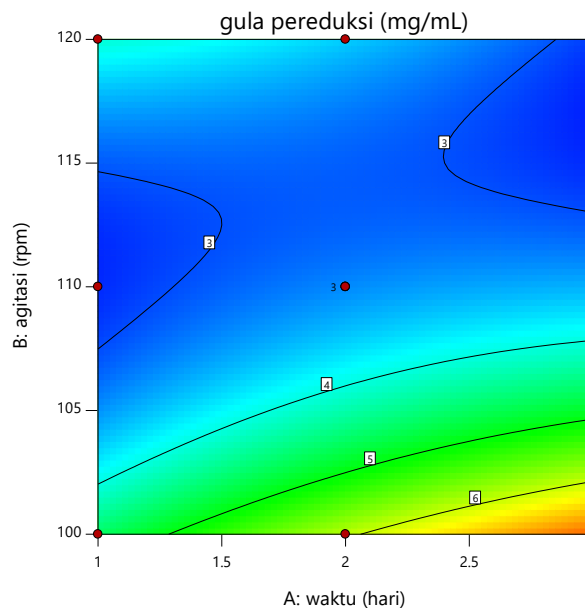
- Contour

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

gula pereduksi (mg/mL)

● Design Points
2.63  7.36

X1 = A: waktu
X2 = B: agitasi



Lampiran 7. Perhitungan kadar etanol

24 jam	berat tube kosong	berat sbilm dipanaskan	berat stlh	A	B	etanol	mean
1	0.748	1.726	1.707	0.98	0.96	1.94	2.45
1	0.763	1.728	1.700	0.97	0.94	2.90	
1	0.798	1.759	1.735	0.96	0.94	2.50	
2	0.791	1.738	1.715	0.95	0.92	2.43	2.62
2	0.815	1.755	1.728	0.94	0.91	2.87	
2	0.772	1.709	1.685	0.94	0.91	2.56	
3	0.778	1.737	1.720	0.96	0.94	1.77	1.86
3	0.804	1.758	1.742	0.95	0.94	1.68	
3	0.748	1.693	1.673	0.95	0.93	2.12	

48 jam	berat tube kosong	berat sblm dipanaskan	berat stlh	A	B	etanol	mean
1	0.782	1.770	1.754	0.99	0.97	1.62	1.59
1	0.720	1.673	1.657	0.95	0.94	1.68	
1	0.732	1.688	1.674	0.96	0.94	1.46	
2	0.800	1.747	1.730	0.95	0.93	1.80	1.79
2	0.791	1.736	1.719	0.95	0.93	1.80	
2	0.816	1.780	1.763	0.96	0.95	1.76	
3	0.781	1.703	1.691	0.92	0.91	1.30	1.34
3	0.782	1.676	1.664	0.89	0.88	1.34	
3	0.758	1.696	1.683	0.94	0.93	1.39	

BIODATA PENULIS



Dewina Syahrifa lahir di Surabaya pada tanggal 19 Mei 2001. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis lulus jenjang pendidikan sekolah dasar dari SD PLUS RAHMAT, Kota Kediri. Kemudian melanjutkan jenjang pendidikan sekolah menengah pertama di SMPN 2 Kota Mojokerto lalu melanjutkan ke SMA Muhammadiyah 2 Surabaya. Pada tahun 2019, penulis telah diterima sebagai mahasiswa S-1 di Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember dan lulus pada tahun 2023. Penulis sempat aktif berorganisasi dalam satu kepengurusan Badan Legislatif Mahasiswa ITS sebagai perwakilan atau Senat Mahasiswa Biologi. Penulis juga memiliki pengalaman dalam bidang acara yaitu pada acara Olimpiade Biologi ITS yang merupakan salah satu rangkaian dari acara tahunan yang diselenggarakan oleh Himpunan Mahasiswa Biologi ITS, yaitu Biological Opus Fair. Penulis telah menyelesaikan kerja praktek di Badan Riset dan Inovasi Nasional selama 2 bulan yang kemudian melanjutkan magang penelitian untuk mengerjakan riset Tugas Akhir selama 4 bulan.