Bakteri dan mikroba lain yang terdapat di dalam EM-4 melonggarkan dan memutuskan ikatan selulosa, hemiselulosa dan lignin yang menyebabkan karbohidrat sederhana meningkat. Dinyatakan pula[16], bahwa peningkatan kadar BETN dipengaruhi oleh karena hilangnya lignin, selulosa dan hemiselulosa dalam proses fermentasi yang mengakibatkan penurunan kandungan serat kasar sehingga dengan menurunnya kandungan serat kasar tersebut secara otomatis dapat meningkatkan kandungan BETN.

Perlakuan E3 kadar BETN mengalami penurunan kembali, hal ini dikarenakan pada perlakuan E3 bakteri asam laktat yang terdapat pada EM-4 tidak bekerja dengan maksimal karena bakteri asam laktat yang yang dihasilkan tidak mencukupi untuk memecah ikatan lignoselulosa dan *lignohemiselulosa* yang mengakibatkan kandungan serat kasar menjadi meningkat dan mengakibatkan kandungan BETN menjadi turun. Dilaporkan juga, bahwa kandungan BETN akan menurun seiring dengan bertambahnya hemisellulosa dalam proses fermentasi[17]. Rataan kandungan lemak kasar fermentasi bagasse tebu dengan menggunakan EM-4 di sajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rataan persentase kandungan Lemak kasar pada fermentasi bagasse tebu dengan menggunakan EM-4

Perlakuan	Kandungan Lemak Kasar (%)
E0	1.513a
E1	2.677b
E2	3.427c
E3	2.873bc

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan berbeda nyata (P<0.05)

Berdasarkan hasil analisis keragaman menunjukkan bahwa peningkatan level pemberian EM-4 memberikan pengaruh berbeda nyata (P<0.05) terhadap kandungan lemak kasar hasil fermentasi bagasse tebu dengan menggunakan EM-4. Hasil yang diperoleh setelah dilakukan uji lanjut menunjukkan bahwa perlakuan E0 berbeda nyata (P<0.05) dibandingkan ketiga perlakuan lainnya, perlakuan E3 memberikan pengaruh tidak nyata (P>0.05) pada perlakuan E1 dan E2.

Peningkatan lemak kasar pada penelitian ini berpengaruh sampai perlakuan E3. Peningkatan lemak kasar ini di mungkinkan karena jumlah bakteri yang terkandung di dalam bagasse tebu yang berasal dari EM-4 selama fermentasi, sehingga terjadi peningkatan kadar lemak kasar sebesar 126.5% (dari 1.513% sampai 3.427) pada bagasse tebu terfermentasi sampai pada perlakuan E2 (EM-4 15ml). Hal ini sesuai dengan penelitian, yang melaporkan bahwa jumlah bakteri pada pelepah sawit yang berasal dari poultry manure yang lebih sedikit menyebabkan jumlah lemak yang terbentuk lebih sedikit.[18] Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian, yang menyatakan bahwa substrat padat ampas-gula dapat meningkatkan lemak 82,39% dan protein 32,92% dan juga semua substrat (padat/cair) dapat menghasilkan asam lemak.[19]

Pada perlakuan E3 mulai terjadi penurunan kandungan lemak kasar. Penurunan kandungan lemak ini terjadi karena selama pada proses fermentasi mikroba yang terdapat pada EM-4 berkembang biak sehingga jumlah bakteri yang memanfaatkan lemak juga semakin banyak, ini menyebabkan kandungan lemak kasar bagasse tebu terfermentasi mengalami penurunan. Mikroba yang bekerja selama proses fermentasi memanfaatkan lemak yang terdapat pada bagasse tebu sebagai sumber energinya dalam menghidrolisa asam-asam lemak, karena pada saat melakukan metabolisme sebagian karbohidrat, protein dan lemak akan digunakan sebagai sumber energi.[20]