

## PROSES FERMENTASI ETANOL DENGAN PENDEKATAN *MATHEMATICAL MODELLING*

Talita Adilael Budihardjo, Suhardi Djojoatmodjo, Dhira Satwika\*  
Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta  
\*E-mail: [dhira@staff.ukdw.ac.id](mailto:dhira@staff.ukdw.ac.id)

### ABSTRAK

Fermentasi merupakan proses biologis dengan bantuan mikroorganisme tertentu yang memecah substrat organik sehingga terbentuk sebuah produk. Produk fermentasi yang dihasilkan cukup beragam, baik yang berguna dalam industri pangan, kesehatan maupun lingkungan. Untuk memperoleh produk fermentasi dipengaruhi oleh beberapa hal, yakni jenis mikroorganisme, konsentrasi substrat sebagai medium pertumbuhan mikroorganisme serta kondisi lingkungan selama proses fermentasi tersebut berlangsung. Dalam penelitian ini dilakukan analisis parameter fermentasi etanol pada konsentrasi substrat glukosa yang berbeda oleh *Saccharomyces cerevisiae*, yaitu kadar gula reduksi, biomassa sel dan kadar etanol yang terbentuk. Selain itu, dilakukan analisis dengan pendekatan *mathematical modelling* yang berfungsi sebagai metode untuk menginterpretasikan dan mengevaluasi proses fermentasi. Dari penelitian ini, dapat diketahui analisis parameter dan pendekatan *mathematical modelling* menunjukkan konsistensi adanya pengaruh konsentrasi substrat glukosa dalam proses fermentasi etanol.

**Kata kunci:** fermentasi etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *mathematical modelling*

### PENDAHULUAN

Beragam produk kebutuhan manusia dalam bidang mikrobiologi industri dihasilkan dalam skala besar oleh mikroorganisme, misalnya antibiotik, enzim, zat aditif makanan, bahan bakar nabati serta minuman beralkohol. Organisme yang sering digunakan dalam bidang mikrobiologi industri adalah bakteri dan fungi (*yeast* dan *mold*). Menurut Madigan *dkk.* (2012), mikroorganisme tersebut dapat membentuk produk dalam jumlah besar dengan waktu relatif singkat, dapat diinokulasi dengan mudah dan bersifat non patogen, baik untuk manusia ataupun lingkungan sekitar.

Dalam bidang mikrobiologi industri, fermentasi merupakan proses metabolik untuk memecah substrat organik menjadi senyawa yang lebih sederhana. Dari proses metabolik tersebut, dihasilkan berbagai produk fermentasi, misalnya minuman beralkohol (Goold *dkk.* 2017), makanan fermentasi, produk energi terbarukan (bioenergi) (Suharto 2017) hingga senyawa rekombinan seperti asam organik, asam amino, enzim, vitamin dan antibiotik (Madigan *dkk.* 2012).

Proses fermentasi etanol sangat dipengaruhi oleh mikrobia yang mampu mengubah substrat glukosa menjadi hasil utama etanol. Mikrobia yang digunakan mempunyai beberapa kriteria penting seperti kemampuan melakukan fermentasi glukosa dengan cepat, sesuai dengan karakteristik flokulasi dan sedimentasi, memiliki stabilitas genetik, kemampuan melakukan fermentasi pada beragam konsentrasi substrat atau osmotoleran, dapat meningkatkan konsentrasi etanol, viabilitas sel yang tinggi serta toleran terhadap suhu (Stewart *dkk.* 1987).

Perkembangan riset bioteknologi dan bioinformasi mampu memperbaiki dan mempercepat proses penelitian sehingga menghasilkan data analisis bersifat rasional dan akurat. Salah satu perkembangan riset tersebut adalah penggunaan *mathematical modelling* dalam penelitian biologi. Menurut Motta & Pappalardo (2012), *mathematical modelling* digunakan sebagai metode untuk memprediksi, menginterpretasi maupun mengoptimalkan produk maupun proses kimiawi dalam suatu sistem biologi. Penerapan *mathematical modelling* dirumuskan melalui model-model persamaan diferensial biasa dengan berbagai asumsi, penentuan variabel bebas maupun variabel tak bebas, integral maupun operasi aritmatika. Pendekatan *mathematical modelling* dibentuk dari analisis regresi linear data laboratorium yang diperoleh, sehingga didapatkan suatu gradien yang berfungsi sebagai konstanta untuk persamaan diferensial biasa dengan orde pertama.

*Mathematical modelling* telah memberi kontribusi dalam penelitian di bidang mikrobiologi berupa analisis pertumbuhan dan dinamika mikroorganisme, baik bakteri, virus, maupun jamur.

Sebagai contoh dalam suatu proses fermentasi, pendekatan *mathematical modelling* digunakan untuk mengetahui jalur metabolisme maupun pertumbuhan sel, konsumsi substrat dan kecepatan pembentukan etanol. Untuk melakukan analisis proses fermentasi maupun mengoptimalkan proses, diperlukan beberapa asumsi dan fungsi estimasi parameter yang dapat dirumuskan dalam bentuk persamaan matematis. Saat ini pendekatan tersebut semakin sering diaplikasikan dalam penelitian fermentasi terkini (misal: Vilela *dkk.* 2013; Sultana *dkk.* 2017; Gombert & Nielsen 2000).

Berdasar paparan diatas, penelitian fermentasi etanol menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan, dan data yang diperoleh dilakukan analisis berbasis *mathematical modelling* yang bertujuan untuk mengetahui kinerja *S. cerevisiae* selama fermentasi menggunakan konsentrasi glukosa yang berbeda.

## METODE PENELITIAN

### a. Regenerasi sel *S. cerevisiae* D-01

Kultur murni *S.cerevisiae* D-01 diregenerasi pada medium PDA miring dalam tabung reaksi yang telah disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 20 menit. Setelah dilakukan inokulasi, tiap tabung diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C.

### b. Pembuatan medium fermentasi

Medium fermentasi mengandung glukosa, ekstrak *yeast*, monopotasium fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), amonium sulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) dan magnesium sulfat anhidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

### c. Persiapan *starter*

Diambil 10% dari volume total medium fermentasi untuk pembuatan *starter*, setelah itu 2 ose kultur *S. cerevisiae* D-01 yang sudah diregenerasi diinokulasikan. Inkubasi dalam *rotary shaker* selama 20-24 jam dengan kecepatan 90-100 rpm.

### d. Proses fermentasi

Setelah diinkubasi, *starter* ditambahkan ke medium fermentasi secara aseptis. Bagian atas erlenmeyer diberi 2 selang, selang pertama untuk pengambilan sampel dan selang lain untuk pertukaran udara. Dilakukan pengamatan tiap 8 jam untuk pengukuran kadar gula reduksi dan biomassa sel, sedangkan analisis kadar etanol dilakukan tiap 24 jam selama 96 jam fermentasi.

### e. Tahapan analisis

10 ml sampel diambil secara aseptis dari medium fermentasi, selanjutnya dilakukan sentrifugasi 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh digunakan untuk analisis gula reduksi dengan metode DNSA. Biomassa sel diukur menggunakan metode turbidimetri dari pellet yang diperoleh, sedangkan pengukuran etanol dilakukan menggunakan *gas chromatography* (GC).

### f. *Mathematical modelling*

Data hasil pengamatan yang diperoleh dilakukan analisis regresi linier menggunakan perangkat lunak (*software*) statistik, sehingga diperoleh persamaan umum sebagai berikut:

$$y = kx + l$$

dimana k adalah konstanta yang merupakan gradien (*slope*) garis tersebut; l merupakan intersep; y merupakan variabel tak bebas dan x merupakan variabel bebas.

Setelah dilakukan analisis regresi, nilai konstanta (k) pada persamaan diatas disubstitusikan sebagai nilai gradien ke dalam persamaan diferensial biasa dengan rumus berikut:

$$\frac{dy}{dt} = ky$$

Dengan menyelesaikan persamaan diferensial biasa diperoleh persamaan berikut:

$$|y| = e^{K \cdot t} \times A$$

$$\ln|y| = K \times t + \ln A$$

Kedua persamaan diatas dibedakan berdasarkan sifatnya yang merupakan persamaan dengan bentuk eksponensial (e) dan persamaan dengan nilai linear 'ln'. Dari persamaan eksponensial diubah menjadi bentuk linear dengan menggunakan sifat-sifat 'ln' pada tiap ruas serta menyederhanakan persamaan yang diperoleh, sehingga dihasilkan persamaan linear yang digunakan untuk melakukan prediksi proses fermentasi etanol berdasar parameter gula reduksi, biomassa sel maupun kadar etanol dengan lama waktu fermentasi tertentu.

Sebagai catatan, pendekatan *mathematical modelling* yang dilakukan termasuk pada persamaan diferensial biasa dengan orde satu, dan interval waktu 0-72 jam.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Fermentasi etanol dilakukan dengan menggunakan substrat glukosa dengan konsentrasi 10% dan 15%. Diketahui bahwa substrat glukosa lebih besar dari 150 gram/L atau 15% dapat berefek inhibitor bagi *Saccharomyces cerevisiae* selama proses fermentasi, seperti yang sudah banyak dilaporkan dalam literatur (misal: Suharto, 2017). Dengan adanya perbedaan konsentrasi substrat dalam medium fermentasi etanol dapat dibandingkan proses perubahan glukosa menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* maupun kuantitas produk fermentasi yang dihasilkan. Data penelitian fermentasi etanol dengan glukosa 10% dan 15% disajikan pada Tabel 1 di bawah ini:

**Tabel 1.** Parameter terukur selama fermentasi etanol menggunakan substrat glukosa 10% dan 15% oleh *S. cerevisiae* (suhu ruang; pH 5,7)

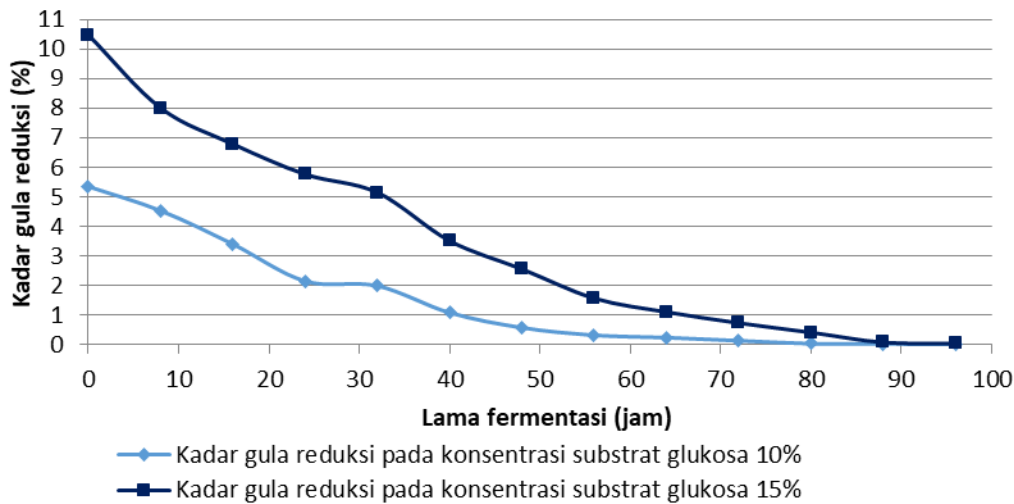
Lama fermentasi (Jam)	Parameter					
	Gula reduksi (%)		Biomassa sel (gram/L)		Kadar etanol (%)	
	1	2	1	2	1	2
0	5,346	10,471	0,0167	0,0164	0,059	0,044
8	4,530	8,001	0,0154	0,0153		
16	3,398	6,784	0,0147	0,0148		
24	2,147	5,762	0,0146	0,0147	0,346	0,655
32	1,988	5,143	0,0149	0,0149		
40	1,081	3,510	0,0148	0,0147		
48	0,575	2,556	0,0147	0,0147	2,175	1,178
56	0,319	1,568	0,0153	0,0150		
64	0,240	1,103	0,0149	0,0150		
72	0,135	0,732	0,0147	0,0147	1,551	3,533
80	0,035	0,414	0,0146	0,0146		
88	0,028	0,077	0,0147	0,0147		
96	0,010	0,035	0,0146	0,0146	1,724	1,843

**Keterangan:**

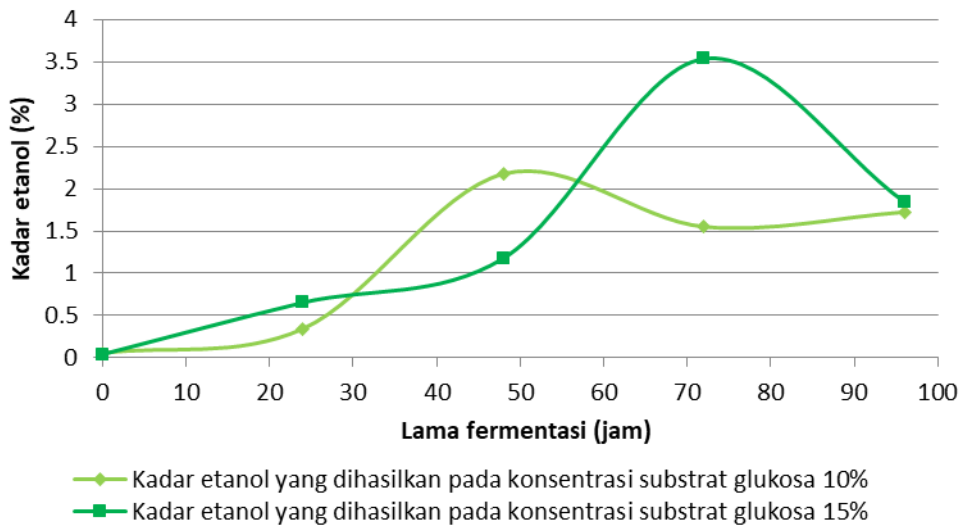
1: Fermentasi pada medium dengan 10% substrat glukosa

2: Fermentasi pada medium dengan 15% substrat glukosa

Berdasarkan data tersebut, dapat dilihat bahwa kadar gula reduksi pada jam ke-0 dengan substrat glukosa 10% sebesar 5,346%, dan 10,471% pada konsentrasi substrat 15%. Setelah proses fermentasi hingga 96 jam, kadar gula reduksi mengalami penurunan menjadi 0,010% pada substrat glukosa 10%, dan 0,035% pada substrat glukosa 15%. Hasil analisis gula reduksi (Grafik 1) dan kadar etanol (Grafik 2) selama penelitian ini dapat dilihat pada grafik di bawah:

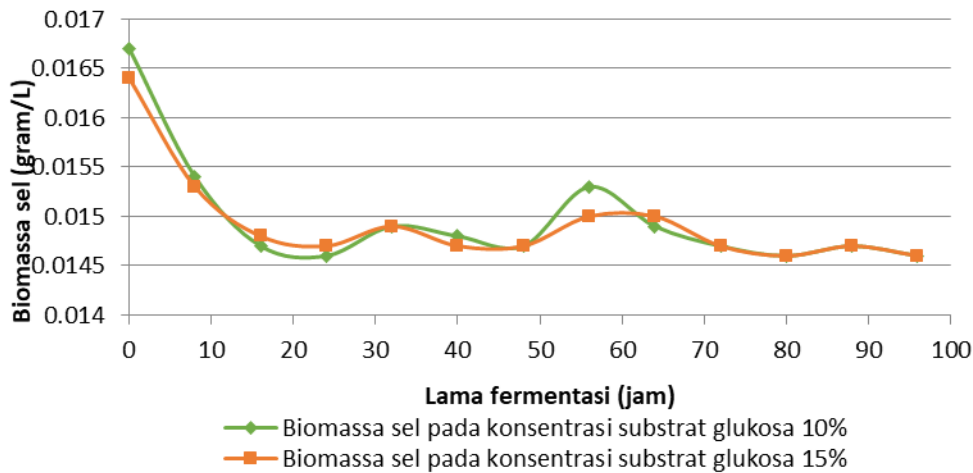


**Grafik 1.** Perubahan jumlah gula reduksi selama fermentasi



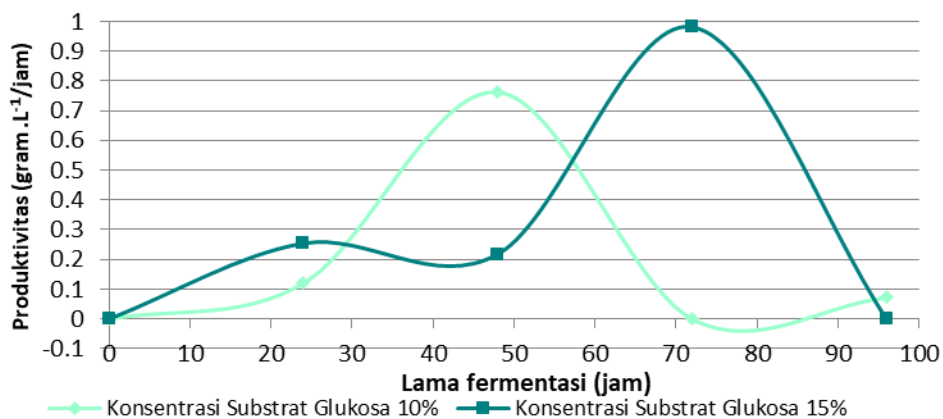
**Grafik 2.** Hubungan antara waktu fermentasi dan perubahan etanol selama waktu fermentasi

Biomassa sel yang terbentuk di awal fermentasi pada substrat glukosa 10% sebesar 0,0167 gram/L dan 0,0164 gram/L pada substrat glukosa 15%. Biomassa sel pada waktu fermentasi 8 dan 16 jam mengalami penurunan menjadi 0,0147 gram/L pada substrat glukosa 10% dan 0,0148 gram/L pada substrat glukosa 15%. Jumlah biomassa sel relatif konstan hingga 96 jam, nilai biomassa sel yang terukur sebesar 0,0146 gram/L pada kedua substrat glukosa. Hasil pengukuran biomassa sel dapat dilihat pada Grafik 3 di bawah ini:



**Grafik 3.** Pembentukan biomassa sel selama fermentasi 96 jam

Berdasar data kadar gula reduksi, biomassa sel dan etanol yang terbentuk, dilakukan penghitungan produktivitas etanol. Penghitungan produktivitas etanol tersebut berfungsi untuk mengetahui kinerja *S. cerevisiae* dalam menghasilkan etanol sebagai produk fermentasi utama. Hasil penghitungan produktivitas etanol dapat diamati pada Grafik 4 berikut:



**Grafik 4.** Produktivitas etanol

Produk etanol maksimum pada konsentrasi glukosa 10% terjadi pada waktu 48 jam fermentasi yang mencapai nilai 0,762 gram. L<sup>-1</sup>/jam. Sedangkan pada substrat glukosa 15%, peningkatan produk etanol terjadi pada 72 jam waktu fermentasi dan diperoleh produktivitas sebesar 0,981 gram. L<sup>-1</sup>/jam. Selanjutnya data ketiga parameter yang telah diukur diolah menggunakan *software* analisis statistik untuk mendapatkan konstanta regresi yang berfungsi membentuk suatu persamaan diferensial biasa dalam *mathematical modelling*. Hasil penghitungan disajikan pada Tabel 2 di bawah ini:

**Tabel 2.** Hasil analisis parameter fermentasi dengan pendekatan *mathematical modelling* selama 72 jam fermentasi

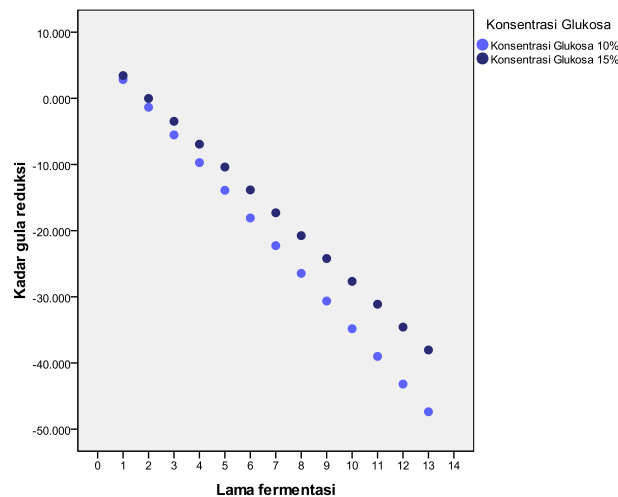
Parameter	Substrat glukosa 10%	Substrat glukosa 15%
Gula reduksi	$\ln S  = (-0,523 \times t) + 2,836$	$\ln S  = (-0,432 \times t) + 3,439$
Biomassa sel	$\ln X  = (-0,006 \times t) - 4,163$	$\ln X  = (-0,005 \times t) - 4,169$
Etanol	$\ln P  = (0,824 \times t) - 1,692$	$\ln P  = (0,914 \times t) - 1,837$
Keterangan:		

---

S = Gula reduksi; X = Biomassa sel; P = Produk etanol; t = lama fermentasi

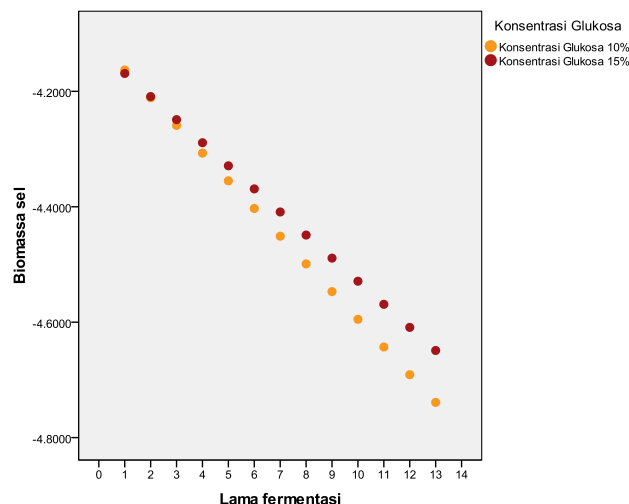
---

Melalui pendekatan *mathematical modelling* pada penelitian ini dapat mendukung analisis hasil fermentasi etanol yang telah dilakukan di laboratorium. Parameter gula reduksi, biomassa sel dan kadar etanol pada persamaan diferensial biasa pada Tabel 2, menunjukkan ada pengaruh konsentrasi glukosa selama fermentasi berlangsung. Durasi fermentasi etanol yang dilakukan kemudian diolah dengan persamaan diferensial biasa pada *mathematical modelling* diatas, sehingga diperoleh Grafik 5 seperti berikut:



**Grafik 5.** Perbandingan konsentrasi gula reduksi pada substrat glukosa 10% dan 15% dengan pendekatan persamaan diferensial biasa dan regresi linier

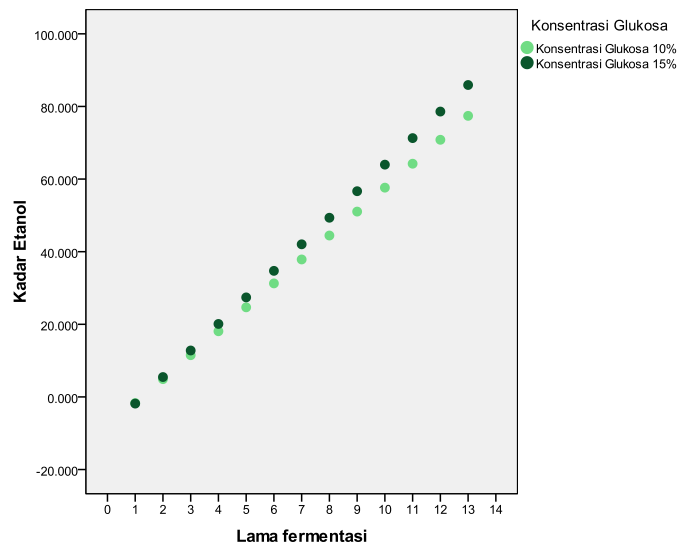
Grafik *scatter plot* diatas menunjukkan perbandingan data gula reduksi pada konsentrasi glukosa 10% dan 15% yaitu adanya peningkatan konsumsi glukosa oleh *yeast* sehingga kadar gula reduksi mengalami penurunan seiring dengan berjalannya proses fermentasi.



**Grafik 6.** Perbandingan produk biomassa sel pada konsentrasi glukosa 10% dan 15% dengan pendekatan persamaan diferensial biasa dan regresi linier

Perbandingan hasil biomassa sel pada kedua konsentrasi substrat glukosa (Grafik 6), menunjukkan tidak terjadi penambahan biomassa sel selama proses fermentasi. Sedangkan jumlah

etanol sebagai produk fermentasi pada kedua konsentrasi substrat glukosa berdasarkan pendekatan *mathematical modelling* (Grafik 7) menunjukkan bahwa substrat dengan konsentrasi 15% menghasilkan etanol lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi glukosa 10%.



**Grafik 7.** Perbandingan produk etanol pada konsentrasi glukosa 10% dan 15% dengan pendekatan persamaan diferensial biasa dan regresi linier

Berdasar analisis etanol terjadi penurunan produk, baik pada konsentrasi substrat 10% dan 15% setelah waktu fermentasi tertentu. Penurunan etanol pada kedua kondisi sebanding dengan berkurangnya kadar gula reduksi. Penurunan pada kondisi glukosa 10% terjadi setelah 48 jam dengan kadar gula reduksi tersisa 0,135%, sedangkan pada glukosa 15% menurun setelah 72 jam dengan kadar gula reduksi sebesar 0,035%. Berdasarkan analisis *gas chromatography* (data tidak ditunjukkan), terbentuk metabolit lain pada kedua kondisi fermentasi. Metabolit tersebut terbentuk mulai jam ke-48 (glukosa 10%) dan setelah jam ke-24 pada substrat glukosa 15%. Terbentuknya metabolit lain selama proses fermentasi juga telah dilaporkan sebelumnya (misal: Marsit & Dequin 2015), yang menyatakan bahwa sel *S. cerevisiae* akan mengalami perubahan menjadi tidak kompetitif dalam pembentukan produk etanol maupun biomassa sel setelah waktu fermentasi tertentu.

Berdasar analisis ketiga parameter yang dilakukan, nilai  $Y_p/s$  pada substrat glukosa 10% adalah 0,312, sedangkan substrat glukosa 15% memberi nilai  $Y_p/s$  sebesar 0,172. Hal ini menyatakan jika glukosa 10% memberi produk etanol per jumlah substrat yang dikonsumsi lebih banyak dibandingkan substrat glukosa 15%, meskipun dalam waktu relatif singkat dan total produk lebih rendah. Hal serupa diperoleh untuk % teoritikal *yield* yang menunjukkan 63,31% glukosa (pada kondisi glukosa 10%) yang diberikan diubah menjadi etanol. Sedangkan pada glukosa 15%, hanya 34,54% yang difermentasi menjadi etanol. Dari penghitungan tersebut dapat dinyatakan jika penggunaan glukosa lebih efisien pada konsentrasi 10% dibandingkan substrat glukosa 15%. Hal serupa dilaporkan dalam penelitian Supriyanto & Wahyudi (2010) bahwa konsentrasi glukosa 150 gram/L memiliki efektivitas lebih rendah dibandingkan konsentrasi 125 gram/L, antara lain karena tingginya konsentrasi glukosa yang akan mengurangi jumlah oksigen terlarut.

Didukung dengan pendekatan *mathematical modelling* dari ketiga parameter yang diukur, dapat dinyatakan jika penggunaan glukosa 10% yang diubah menjadi etanol oleh *S. cerevisiae* terjadi dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan substrat glukosa 15%. Analisis biomassa sel dengan pendekatan *mathematical modelling* menunjukkan semakin besarnya konsentrasi substrat

glukosa yang diberikan, menyebabkan pembentukan biomassa sel yang lebih besar. Sedangkan untuk kadar etanol, substrat glukosa 15% memberi produk etanol lebih tinggi dibandingkan substrat glukosa 10%, dikarenakan ketersediaan substrat yang lebih banyak.

Berdasarkan informasi dari penelitian ini, dapat dilakukan peningkatan produk etanol atau pengurangan waktu fermentasi dengan cara melakukan variasi konsentrasi substrat glukosa, seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Jin *dkk.* (2012) maupun Liu & Li (2014) tentang kinetika fermentasi etanol menggunakan pendekatan *mathematical modelling*. Dengan adanya perbedaan konsentrasi substrat dalam medium fermentasi, dapat dilakukan upaya optimasi proses fermentasi sehingga dihasilkan produk fermentasi yang lebih tinggi.

## KESIMPULAN

Perbedaan konsentrasi substrat yang digunakan dalam medium fermentasi mempengaruhi kinerja proses fermentasi etanol. Hasil pengukuran kadar gula reduksi, pembentukan biomassa sel dan kadar etanol selama fermentasi konsisten dengan pendekatan *mathematical modelling* yang berguna untuk memprediksi proses fermentasi etanol. Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi substrat yang diberikan, pembentukan etanol relatif lebih lambat dibandingkan pada substrat dengan konsentrasi lebih rendah, meskipun jumlah produk etanol yang dihasilkan lebih tinggi. Hasil yang sama diperoleh dari penghitungan kinetika fermentasi, *yield* produk per substrat maupun pendekatan *mathematical modelling*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Gombert, A.K., Nielsen, J., (2000). Mathematical modelling of metabolism. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 180-186.
- Goold, H.D., Kroukamp, H., Williams, T.C., Paulsen, I.T., Varela, C., Pretorius, I.S., (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb Biotechnol*, 10(2) : 264–278.
- Jin, H., Liu, R., He, Y., (2012). Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. *J Proenv*, 12 : 137–145.
- Liu, Z., Li, X., (2014). The kinetics of ethanol fermentation based on adsorption processes. *Kem. Ind*, 63(7–8) : 259–264.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P., (2012). *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco.
- Marsit, S., Dequin, S., (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast : a review. *FEMS Yeast Res.*, 15(7) : 1–12.
- Motta, S., Pappalardo, F., (2012). Mathematical modeling of biological systems. *Briefings in Bioinformatics*, 14(4) : 411–422.
- Stewart, G.G., Russell I, Klein, R.D., Hiebsch, R.R., (1987). *Biological Research on Industrial Yeasts* Volume I. CRC Press, Inc. Florida
- Suharto. (2017). *Bioteknologi dalam Bahan Bakar Nonfosil*. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Sultana, S., Jamil, N.M., Saleh, E.A.M., Yousuf, A., Faizal, C.K.M., (2017). A Mathematical Model for Ethanol Fermentation from Oil Palm Trunk Sap using *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Phys.: Conf. Ser*, 890 (2017) : 1-6.
- Vilela, P.R.C, Siqueria, A.A.G, (2013). Modeling, Simulation and Dynamic Optimization Applied to An Ethanol Fed-Batch Fermentation Process. 22nd International Congress of Mechanical Engineering (COBEM 2013), 3(7) : 8308-8319.