

**BUKU AJAR**

**PRETREATMENT  
MIKROALGA SEBAGAI  
BAHAN BAKU BIOFUEL**



**Penulis**

**Faizah Hadi| Indriana Lestari | Heni Anggorowati**

**Penerbit**

**LPPM UPN “Veteran” Yogyakarta**

**KATA PENGANTAR**

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga buku ajar mengenai *PRETREATMENT MIKROALGA SEBAGAI BAHAN BAKU BIOFUEL* ini dapat diterbitkan. Materi pada buku ajar ini diambil dari berbagai sumber baik buku maupun jurnal penelitian terpercaya yang terkait dengan proses *pretreatment* mikroalga. Penyusunan buku ajar ini dimaksudkan untuk bahan ajar pada perkuliahan, referensi pada penelitian, serta sebagai sumber teori.

Buku ajar ini memuat informasi tentang berbagai macam metode *pretreatment* mikroalga baik cara fisika, kimia, dan termal agar diperoleh hasil ekstraksi yang optimum, khususnya untuk memperoleh biomassa mikroalga berupa lipid, protein, karbohidrat dan bahan bernilai tambah lainnya. Selain itu di dalam buku ajar ini juga berisi uraian mengenai hidrolisis enzimatis karbohidrat pada mikroalga menjadi bahan baku bioetanol. Secara umum buku ajar ini dibagi menjadi tiga bagian besar. Bagian pertama mengulas mengenai biomassa mikroalga. Bagian kedua membahas metode-metode *pretreatment* yang telah dikembangkan selama beberapa dekade terakhir ini. Dan bagian ketiga merupakan tahap lanjutan dari proses *pretreatment* untuk menghasilkan bahan baku utama bioetanol sebagai aplikasinya.

Akhirnya pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak

yang telah membantu hingga selesainya penyusunan dan penerbitan buku ini. Kepada pembaca buku ini, kami dengan senang hati mengharapkan adanya kritik dan saran demi perbaikan kualitas buku ajar ini. Semoga buku ajar ini dapat bermanfaat bagi pengembangan pendidikan di Indonesia.

Yogyakarta, Januari 2020

Tim Penulis

## **DAFTAR ISI**

<b>KATA PENGANTAR</b>	ii
<b>DAFTAR ISI</b>	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	v
<b>DAFTAR TABEL</b>	vii
<b>PENDAHULUAN</b>	1
<b>BIOMASSA MIKROALGA</b>	4
Pati	11
<b><i>PRETREATMENT BIOMASSA MIKROALGA</i></b>	13
Metode Kimia	16
Metode Termal	20
Metode Fisika	29
Metode Mekanik	35
<b><i>HIDROLISIS KARBOHIDRAT SECARA ENZIMATIS</i></b>	39
Konversi Pati Menjadi Gula	42
Hidrolisis Enzimatik Karbohidrat di dalam Mikroalga	44
<b><i>METODE PENENTUAN PATI DAN KARBOHIDRAT TOTAL</i></b>	46
<i>Metode Penentuan Pati</i>	46
<i>Metode Penentuan Karbohidrat Total</i>	50
<b><i>DAFTAR PUSTAKA</i></b>	52

## **DAFTAR GAMBAR**

Gambar 1. *Biorefinery* mikroalga

- Gambar 2. Distribusi global perusahaan swasta yang memproduksi makanan dan produk pakan komersial berbasis mikroalga
- Gambar 3. Pengembangan berbagai jenis bioenergi dari mikroalga
- Gambar 4. Sistem budidaya alga
- Gambar 5. Struktur (a) amilosa, (b) glukosa, (c) amilopektin
- Gambar 6. Visualisasi letak pati pada mikroalga
- Gambar 7. Komposisi dinding sel mikroalga
- Gambar 8. Klasifikasi *pretreatment* sel mikroalga
- Gambar 9. Skema hidrolisis enzimatis dinding sel
- Gambar 10. Skema instalasi sebelum dan sesudah *pretreatment* pada metode *steam explosion*
- Gambar 11. Penampakan sel sebelum dan sesudah *steam explosion pretreatment*
- Gambar 12. Visualisasi optik (a) tanpa dan (b) dengan *autoclave*
- Gambar 13. Hasil SEM *Spirulina subsalsa* (a) keadaan awal; (b) 100°C, 30 menit; (c) 120°C, 30 menit
- Gambar 14. Hasil SEM (a) sebelum pretreatment (b) setelah pretreatment dengan metode *freezing-thawing*
- Gambar 15. Iradiasi *microwave* selama proses *pretreatment* mikroalga

- Gambar 16. *Microwave pretreatment* terhadap mikroalga (kiri : sebelum dan kanan: setelah pretreatment).
- Gambar 17. Skema pemecahan sel oleh energi ultrasonic
- Gambar 18. Rangkaian alat *ultrasonic pretreatment*
- Gambar 19. Rangkaian alat *PEF*
- Gambar 20. Skema alat pretreatment dengan *Hydrodynamic Cavitation*
- Gambar 21. *Chlorella sp.* sebelum (kanan) dan sesudah (kiri) *pretreatment*
- Gambar 22. Mekanisme pemutusan ikatan oleh enzim
- Gambar 23. Skema hidrolisis enzimatik pada pati

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi biokimia beberapa jenis mikroalga

Tabel 2. Penelitian tentang pembuatan etanol dengan katalis asam dan basa

Tabel 3. Beberapa enzim yang dapat digunakan untuk memecah dinding sel mikroalga

Tabel 4. Perbandingan metode penentuan pati dengan karbohidrat total

# PENDAHULUAN

Penggunaan bahan bakar minyak bumi meningkat pesat, mengakibatkan penurunan kuantitas sumber bahan baku fosil. Disisi lain, bahan bakar fosil juga menghasilkan gas CO<sub>2</sub> yang menyebabkan efek rumah kaca (GHG). Kedua hal tersebut memicu dilakukannya pengembangan berbagai macam sumber energi baru dan terbarukan untuk memenuhi kebutuhan energi dunia (Borines et al. dalam Lucio et al., 2018). Biofuel adalah bahan bakar alternatif untuk mengurangi ketergantungan terhadap bahan bakar fosil dimasa yang akan datang. Produksi bioetanol dunia yang digunakan sebagai bahan bakar di tahun 2018 mencapai lebih dari 100 juta m<sup>3</sup> (Licht, 2018). Saat ini ada 2 jenis bahan bakar campuran antara bensin-etanol yang telah digunakan pada kendaraan bermotor di Amerika Serikat, yaitu E15 yang didefinisikan oleh *Environmental Protection Agency* (EPA) sebagai campuran bensin-etanol dengan konsentrasi etanol sebesar 10,5 – 15% digunakan untuk kendaraan konvensional yang dirakit mulai tahun 2001 hingga saat ini, dan E85 (atau *flexible fuel*) adalah campuran bensin-etanol dengan konsentrasi etanol sekitar 51 - 83%. Tujuan utama substitusi bahan bakar ini yaitu untuk mendapatkan bahan bakar yang fleksibel untuk kendaraan bermotor, menghemat biaya bahan



bakar dan mengurangi emisi gas rumah kaca (GHG) (RFA, 2015; DOE, 2016).

Langkah pertama untuk menemukan bahan baku terbarukan (atau *renewable raw materials*) adalah menentukan komposisi yang sesuai, terutama komposisi karbohidratnya. Produksi bahan bakar dari biomassa atau *biofuel* dikategorikan menjadi 3 generasi yaitu, generasi satu, dua dan tiga yang didasarkan pada sumber bahan bakunya, secara berturut-turut tanaman pangan (contohnya kedelai, jagung, padi, gandum, kelapa sawit dll.), bahan berlignoselulosa (bongol jagung, tandan kosong kelapa sawit, jerami padi, ampas tebu, dll), dan alga. Dikarenakan generasi satu bersaing dengan kebutuhan pangan, maka dilakukan pengembangan menuju bioenergi dari sumber non-pangan, salah satunya adalah alga yang menyimpan karbohidrat dalam jumlah tinggi. Alga menyimpan karbohidrat dalam bentuk cadangan makanan dan bahan struktural, oleh karena itu alga memiliki potensi sebagai bahan baku bioetanol yang berkelanjutan (Abdallah et al., 2016).

Secara umum alga diklasifikasikan menjadi mikroalga dan makroalga. Mikroalga adalah organisme fotosintetik prokariotik atau eukariotik. Alga dapat hidup di kondisi yang sulit dalam bentuk uniseluler maupun koloni sederhana (Ozcimen dan Inan, 2015). Prokariotik

mikroalga dikenal sebagai *cyanobacteria* (*Cyanophyceae*), dan eukariotik termasuk alga hijau (*Chlorophyta*), diatom (*Bacillariophyta*) di antara kelompok lainnya (Mata et al., 2010). Selain itu mikroalga dapat memanfaatkan beberapa jalur metabolisme yaitu fototropik, heterotropik, miktotropik dan fotoheterotropik (Pacheco et al., 2015).

# BIOMASSA MIKROALGA

Mikroalga adalah organisme fotosintesis dengan ukuran sel antara 2-200  $\mu\text{m}$  dan kapasitas penangkapan  $\text{CO}_2$  yang tinggi. Mikroalga dapat tumbuh secara autotrof maupun heterotrof dan mampu memproduksi sejumlah besar biomassa yang mengandung minyak, protein dan karbohidrat (komposisi tersebut tergantung dari spesies dan kondisi pertumbuhan) (Alaswad et al., 2015; Baroukh et al., 2015). Karena alga merupakan organisme yang melakukan fotosintesis untuk memperoleh makanannya, maka alga dapat memproduksi sejumlah besar minyak, protein dan karbohidrat dalam waktu yang singkat. Minyak merupakan komponen utama struktur internal mikroalga, sedangkan karbohidrat dalam struktur alga dapat digunakan untuk produksi etanol dengan berbagai macam proses hidrolisis. Produksi bioetanol dari alga memiliki beberapa keuntungan diantaranya, (1) tidak bersaing dengan bahan pangan; (2) memiliki kandungan karbohidrat cukup tinggi; (3) tidak memiliki lignin dan memiliki kandungan hemiselulosa yang relatif rendah, sehingga meningkatkan yield hidrolisis dan fermentasi; (4) mampu mengurangi kandungan  $\text{CO}_2$  di atmosfer; (5) dapat tumbuh dengan cepat diberbagai kondisi lingkungan (misalnya, air tawar, air laut, air limbah); dan

siklus produksi dan panen sel mikroalga sangat cepat (Li et al., 2014).

Dinding sel mikroalga tersusun dari selulosa, tetapi dapat mengandung pektin dan polisakarida sulfat. Pati intraseluler ditemukan dalam plastida, berkisar dari 20 sampai 50 %. Sebagian besar lipid ditemukan intraseluler dengan konsentrasi berkisar 20 sampai 60 % (Ho et al., 2013b; Chen et al., 2014a). Komponen lain seperti protein juga ditemukan dengan konsentrasi antara 20 sampai 50 %. Tabel 1 menunjukkan perbandingan komposisi berbagai jenis mikroalga.

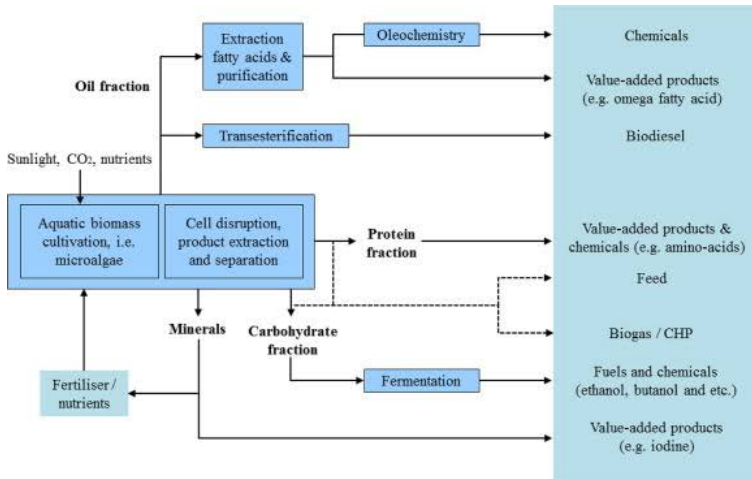
**Tabel 1.** Komposisi biokimia beberapa jenis mikroalga

<b>Biomassa</b>	<b>Karbohidrat</b>	<b>Protein</b>	<b>Lipid</b>
Chlorella vulgaris	20,99	15,67	41,5 1
Spirulina platensis	30,21	13,30	48,3 6
Chlorella sorokiniana	35,67	9,90	18,8 1
Nannochloropsis oceanica	22,70	24,80	19,1 0
Scenedesmus obliquus	13,41	4,66	30,3 8
Dunaliella tertiolecta	21,69	2,87	61,3 2
Dunaliella salina	32,00	57,00	9,00
Scenedesmus dimorphus	21-52	8-18	16- 40
Chlorococum humicola	32,50	-	-
Chlamydomonas reinhardtii	22,60	64,70	12,6 0

Spirogyra sp.	33-64	6-20	11-21
Porphyridium cruentum	40-57	28-39	9-14
Dunaliella salina	85,58	8,46	11,47

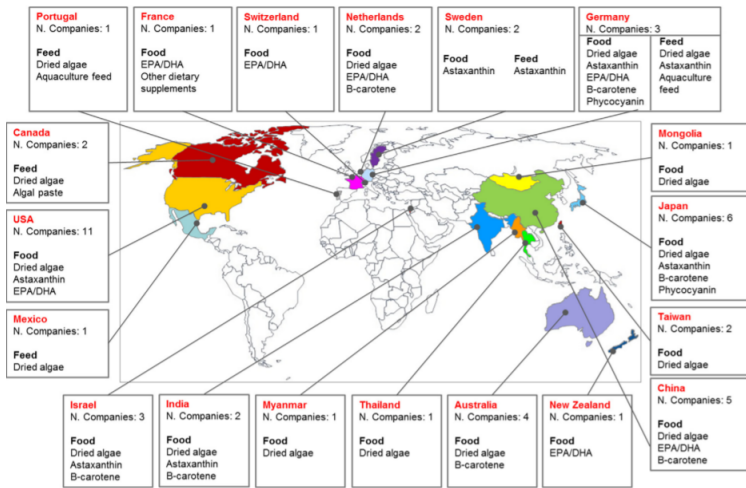
Konsentrasi senyawa biokimia pada mikroalga dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan dan media tumbuh mikroalga.

Biomassa mikroalga seperti minyak, mineral, karbohidrat dan protein dapat dimanfaatkan menjadi bahan-bahan kimia, bahan bakar, pakan, biogas dan produk bernilai tambah. Residu dari proses pengolahan seperti gliserin dan digestate/sludge juga dapat diolah menjadi produk bernilai tambah. Selain itu komponen yang bernilai rendah dari fraksi protein dan karbohidrat juga memiliki potensi sebagai daya untuk memproduksi kombinasi panas dan daya (CPH) di kilang (Chew et al., 2017). Gambar 1 menunjukkan beberapa produk turunan hasil pengolahan biomassa mikroalga.



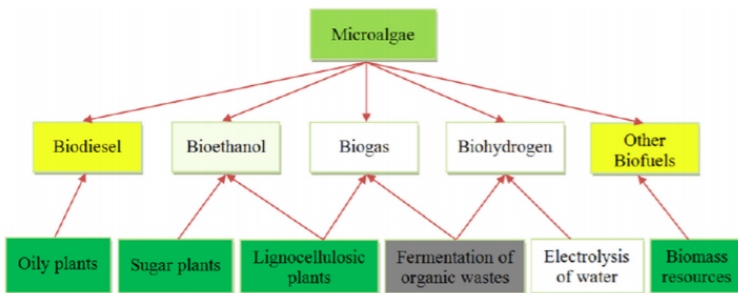
**Gambar 1.** Biorefinery mikroalga (González et al., 2015)

Produk bioteknologi berbasis biomassa mikroalga telah banyak diproduksi secara global, baik dalam bentuk bahan mentah maupun produk olahan. PT Evergen Resources (PT ER) merupakan pabrik bioteknologi berbasis mikroalga pertama di Indonesia yang memproduksi antioksidan *astaxanthin* dari alga berjenis *Haematococcus pluvialis*. Negara yang memiliki industri bioteknologi berbasis mikroalga lainnya adalah Amerika Serikat, Israel, Jepang dan beberapa negara Eropa (Adi dan Syamsul, 2019). Gambar 2 menunjukkan peta distribusi global perusahaan swasta yang memproduksi makanan dan produk pakan komersial yang berasal dari mikroalga. N menunjukkan jumlah perusahaan.



**Gambar 2.** Distribusi global perusahaan swasta yang memproduksi makanan dan produk pakan komersial berbasis mikroalga (Vigani et al., 2015).

Konstituen yang terkandung dalam mikroalga seperti lipid, protein, karbohidrat dan sedikit lemak, menyebabkan mikroalga menjadi bahan baku bioenergi serbaguna untuk memproduksi biodiesel, bioetanol, biogas, bio-hidrogen dan berbagai jenis bahan bakar lainnya melalui metode termokimia dan biokimia. Produksi bioenergi dari mikroalga untuk pembangunan berkelanjutan yang fleksibel dibandingkan dengan sumber daya alam lainnya secara teori ditunjukkan pada gambar 3.



**Gambar 3.** Pengembangan berbagai jenis bioenergi dari mikroalga (Zhu et al., 2014).

Banyak sedikitnya konstituen pada mikroalga salah satunya dipengaruhi oleh metode budidaya mikrolaga yang digunakan. Budidaya mikroalga dapat dilakukan dengan sistem terbuka (seperti kolam) dan sistem tertutup (seperti fotobioreaktor). Kolam terbuka merupakan sistem budidaya yang paling banyak digunakan dalam industri, karena sistem terbuka memiliki biaya investasi dan operasi yang rendah daripada sistem lainnya karena. Namun, kondisi operasi yang sulit dikontrol dan risiko kontaminasi oleh organisme lain adalah kelemahan utama dari sistem terbuka. Selain murah dan membutuhkan energi yang relatif rendah, pembersihannya juga mudah. Meskipun sistem terbuka memiliki biaya rendah dan pengoperasian yang mudah, parameter seperti intensitas cahaya, suhu, pH, dan konsentrasi oksigen terlarut tidak dapat dikontrol dengan mudah. Spesies alga yang paling banyak diproduksi dalam sistem terbuka adalah *Spirulina*, *Chlorella* dan



*Dunaliella* (Costa dan Morais, 2014). Dibandingkan dengan sistem terbuka, fotobioreaktor memiliki efisiensi fotosintesis yang sangat tinggi, sehingga menghasilkan biomassa yang tinggi. Meskipun harganya mahal, fotobioreaktor lebih disukai untuk budidaya mikroalga tertentu. Hal ini dikarenakan, parameter utama yang harus dikendalikan dalam budidaya mikroalga seperti cahaya, pH, karbon dioksida dapat dicapai dan dikontrol, serta rendahnya risiko kontaminasi pada sistem fotobioreaktor. Selain itu, penguapan tidak terjadi pada sistem tertutup sehingga memungkinkan mikroalga untuk memproduksi bahan biokimia tertentu. Ada berbagai jenis fotobioreaktor, namun sistem yang paling umum adalah *vertical* dan *horizontal tubular columns* serta *flat-type* (Yen et al., 2014). Budidaya mikroalga dengan sistem terbuka dan tertutup yang telah beroperasi secara komersial ditunjukkan oleh Gambar 4.



k



**Gambar 4.** Sistem budidaya alga. (a) Sistem tertutup jenis *raceway pond system* milik Cyanotech; (b) Sistem tertutup jenis fotobioreaktor milik Algatech (cyanotech.com, foodnewsinternational.com).

Budidaya mikroalga juga dikembangkan pada air limbah, karena mikroalga berpotensi untuk menghilangkan nitrogen, fosfor, karbon, dan residu lainnya dari air limbah. Selain itu, air limbah menyediakan nutrisi penting untuk pertumbuhan mikroalga, dapat mengurangi biaya untuk budidaya, juga mengurangi biaya terkait penambahan sumber karbon (Pawar, 2016; Cai et al., 2013). Limbah yang digunakan antara lain air limbah perkotaan, industri, pertanian dan limbah primer, sekunder dari proses anaerob (Zhang et al., 2016; Cai et al., 2013; Guldhe et al., 2017).

## **Pati**

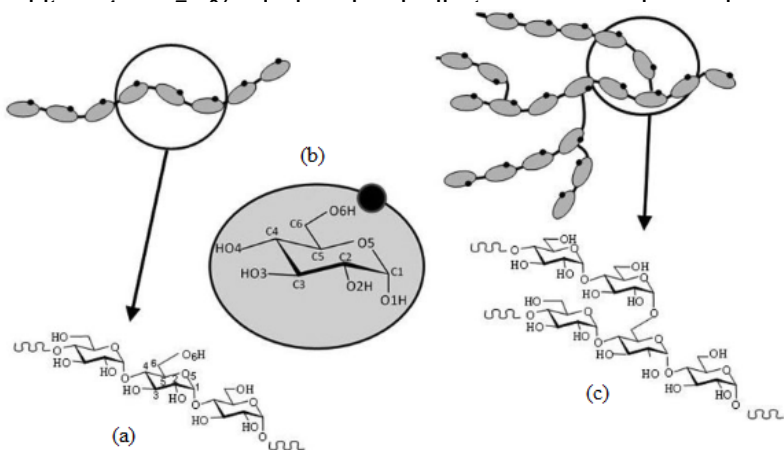
Pati merupakan salah satu polisakarida yang keberadaannya cukup melimpah di alam. Sebagian besar

pati terdapat dalam tumbuhan sebagai bahan utama untuk menyimpan cadangan glukosa.

Pati adalah karbohidrat kompleks berwujud bubuk putih, tidak berbau dan tidak larut dalam air. Pati merupakan polisakarida yang terdiri dari dua jenis polisakarida yaitu amilosa dan amilopektin. Umumnya pati mengandung 20 - 30 % amilosa dan 70 - 80 % amilopektin (Fessenden, 1982).

Amilosa merupakan D-Glukosa dengan ikatan  $\alpha$ -(1,4) glikosida (Gambar 5) yang berbentuk rantai lurus. Amilosa dapat dihidrolisis dengan  $\beta$ -amilase menjadi unit-unit glukosa dengan memutus ikatan  $\alpha$ -(1,4) dari ujung non pereduksi rantai amilosa menghasilkan maltosa.

Amilopektin seperti amilosa mempunyai ikatan  $\alpha$ -(1,4) pada rantai lurus serta ikatan  $\beta$ -(1,6) pada titik percabangannya. Ikatan percabangan tersebut berjumlah



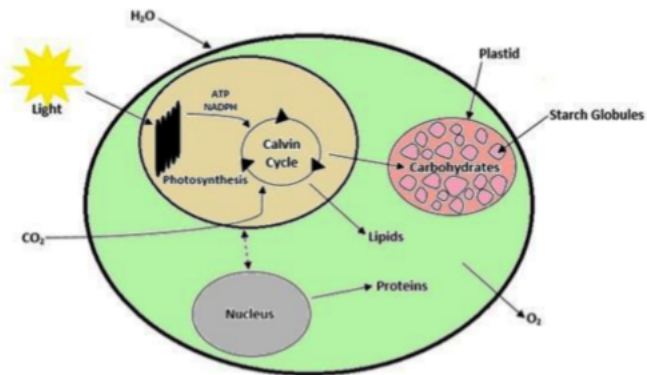
**Gambar 5.** Struktur (a) amilosa, (b) glukosa, (c) amilopektin

# **PRETREATMENT BIOMASSA MIKROALGA**

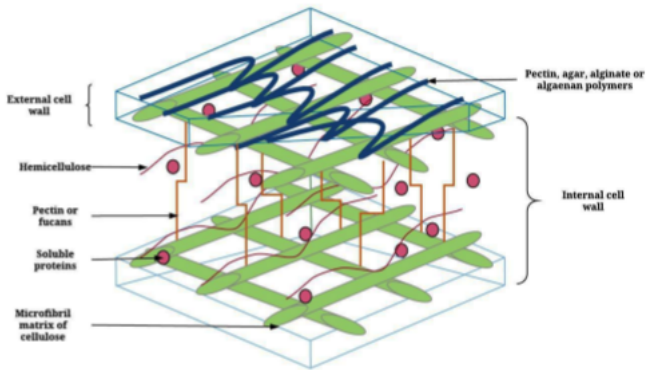
Tahapan utama pada proses biorefinery dari biomassa mikroalga adalah *pretreatment* bahan baku. *Pretreatment* bertujuan untuk memperoleh senyawa intraseluler seperti karbohidrat, protein, lipid dan senyawa tambahan lainnya seperti oligosakarida rantai pendek, anti oksidan serta pigmen dengan cara memecah dinding sel dan memodifikasi struktur karbohidrat intraseluler (Harun et al., 2014; Demuez et al., 2015).

Karbohidrat pada mikroalga ditemukan di dinding sel dalam bentuk selulosa dan dalam plastid yang berbentuk pati, utamanya sebagai gula cadangan. Kandungan gula pada beberapa mikroalga menjadi pertimbangan khusus untuk memproduksi bioetanol. Gambar 6 menunjukkan letak pati dalam sel mikroalga. Dinding sel mikroalga terdiri dari selulosa, pektin (asam poligalakturonat), dan polisakarida sulfat, yang dapat diimpregnasi dengan zat anorganik seperti Kalsium karbonat, silika, dan magnesium (Castrillón et al., 2013; Chen et al., 2013). Dinding sel mikroalga terdiri dari dua lapisan, yaitu eksternal dan internal (Gambar 7). Dinding sel eksternal dibentuk oleh matriks polisakarida seperti pektin, agar, alginat, dan polimer algaenan; sedangkan dinding sel internal terdiri dari pektin, fucans,

hemiselulosa, dan glikoprotein dalam matriks mikrofibril selulosa, dan ditemukan juga fukosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, dan galaktosa (Scholz et al., 2014).



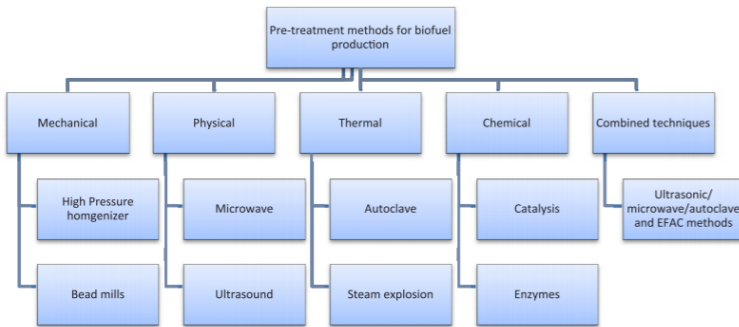
**Gambar 6.** Visualisasi letak pati pada mikroalga (Lucio et al., 2018)



**Gambar 7.** Komposisi dinding sel mikroalga (Lucio et al., 2018)

Produksi bioenergi dari mikroalga yang berbeda akan memerlukan *pretreatment* yang berbeda pula, hal ini dikarenakan komposisi dinding sel mikroalga berbeda

untuk setiap jenisnya. Beberapa mikroalga memiliki dinding sel dengan struktur yang lunak ataupun rigid (kaku) sehingga lebih sulit untuk dihancurkan. Dinding sel yang bersifat rigid atau kaku dapat menghambat ekstraksi lipid untuk produksi biofuel, oleh karena itu perlu dilakukan *pretreatment* untuk menghilangkan gangguan produksi yang diakibatkan oleh sifat dinding sel mikroalga. Di sisi lain tujuan akhir proses yaitu produk biofuel yang diinginkan, dalam hal ini bioetanol, biogas, biohidrogen menjadi pertimbangan khusus dalam pemilihan metode *pretreatment*. Sebagai contohnya produksi bioetanol, memerlukan gula sebagai bahan bakunya, dimana gula dihasilkan dari degradasi selulosa, sehingga hidrolisis secara kimia ataupun enzimatik merupakan pilihan yang tepat. Metode *pretreatment* pada mikroalga diklasifikasikan menjadi: mekanik (*high-pressure homogenizer* dan *bead mills*), fisika (ultrasonik dan *microwave*), panas/termal (*autoclave* dan *steam explosion*), kimia (katalis dan enzim), dan kombinasi beberapa metode. Klasifikasi tersebut secara jelas dapat dilihat pada Gambar 8 (Onumaegbu et al., 2018).



**Gambar 8.** Klasifikasi *pretreatment* sel mikroalga

## Metode Kimia

**Katalis.** Katalis yang dimaksud adalah senyawa asam atau basa yang dikombinasikan dengan pemanasan pada suhu sedang (120 hingga 150 °C). Senyawa asam yang umum digunakan adalah Asam sulfat, Asam klorida, Asam fosfat dan Asam nitrat, sedangkan senyawa basa yang umum digunakan adalah Natrium hidroksida, Kalium hidroksida, Amonia, dan Natrium karbonat. Senyawa-senyawa tersebut digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis selulosa dan pati menjadi gula. Parameter utama yang mempengaruhi reaksi hidrolisis dengan menggunakan katalis asam maupun basa adalah pH, konsentrasi katalis, suhu dan waktu hidrolisis. Tabel 2 berisi hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan katalis asam ataupun basa untuk memproduksi etanol.



**Tabel 2.** Penelitian tentang pembuatan etanol dengan katalis asam dan basa

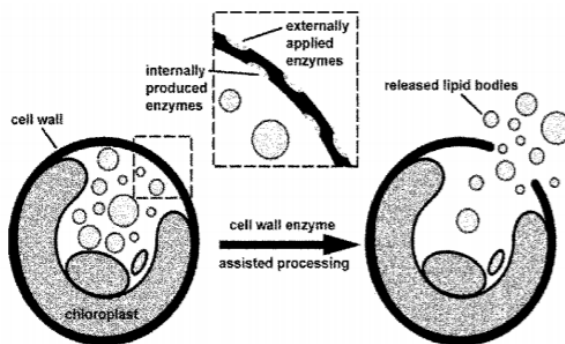
Jenis	Katalis	Kondisi Operasi	Yield gula (% massa kering biomassa)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90 *	3% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	110 °C, 30 menit	58
<i>Chlorococcum infusionum</i> **	0,75% NaOH	120 °C, 30 menit	35

\*Nguyen et al., 2009; \*\*Harun et al., 2011

Kelemahan metode katalis asam-basa ini adalah konsumsi bahan yang sangat besar, mahalnya biaya konstruksi alat yang anti-korosi, perlu menetralkan campuran asam/basa yang dilarutkan secara homogen dalam suspensi mikroalga karena tidak dapat dipisahkan setelah digunakan. Keunggulannya adalah mudah dioperasikan dan menghasilkan yield hidrolisis yang tinggi (Yoo, Park dan Yang, 2015).

**Enzimatik.** Enzim digunakan untuk menghidrolisis dinding sel mikroalga, melepaskan komponen intraseluler (seperti lipid) ke dalam bulk media, sehingga memudahkan proses recovery. Keuntungan utama dari hidrolisis enzimatik adalah reaksinya spesifik, tidak membutuhkan kondisi khusus (seperti suhu tinggi dan tekanan tinggi) dan mudah di *scale up* ke skala industri. Kelemahan utamanya adalah pada segi biaya, penggunaan enzim memerlukan biaya yang cukup tinggi (Günerken et al., 2015). Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan menggunakan berbagai enzim seperti selulase,

amilase dan amiloglukosidase yang dapat menghidrolisis dinding sel polisakarida. Penggunaan proteinase juga telah dilakukan dan mampu menghidrolisis glikoprotein yang ada di dalam dinding sel beberapa jenis mikroalga (Günerken et al., 2015; Pirwitz et al., 2016), sehingga lebih efisien untuk memecah sel dan mengekstrak senyawa yang diinginkan. Liang et al., (2012) menggunakan campuran proteinase netral dan basa untuk mendorong terjadinya degradasi sel. Untuk mengkonversi polimer yang ada di dinding sel mikroalga, endo -  $\beta$  - (1,4) - D - glukonase diperlukan untuk memecah matriks selulosa dan cellulosic linkages, sedangkan exo -  $\beta$  - (1,4) - D - glukonase menghidrolisis selulosa menjadi oligosakarida yang lebih kecil, dan  $\beta$ -glukosidase memecah ikatan glikosidik menjadi glukosa dan maltosa. Skema hidrolisis sel mikroalga dengan menggunakan enzim diilustrasikan pada **Gambar 9**.



**Gambar 9.** Skema hidrolisis enzimatik dinding sel (Rudshaug et al., 2013)

Zheng et al (2016) melaporkan bahwa penggunaan campuran selulosa dengan beberapa jenis polimer dapat meningkatkan efek hidrolisis enzim dengan melindungi strukturnya sehingga dapat memperpanjang masa hidupnya tanpa terjadi perubahan. Dinding sel mikroalga dapat bersifat permeabel atau tidak tergantung dari jenis mikroalganya. Enzim spesifik tidak sering diperlukan untuk memecah dinding sel karena enzim ini dapat mencapai karbohidrat intraseluler. Berbagai enzim yang dapat digunakan dalam proses degradasi dinding sel mikroalga dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Beberapa enzim yang dapat digunakan untuk memecah dinding sel mikroalga

Microalgae	Enzymes	vSc*	References
Chlorella vulgaris	Cellulase (0.122 FPU/mg); Pectinase (240 IU/mg protein); Amylase (16 FAU/mL); $\beta$ -glucosidase (10 U/mL); Xylanase (100 U/mL); Chitinase (0.2 U/mL); Lysozyme (4000 U/mL); Sulfatase (50 U/mL); suhu 50 ° C pH 4.8 72 jam	79 %	Kim et al. (2014)
Chlorella vulgaris Chlamydomona	Glucanase (0.3 mL/g biomass); Protease (0.2	86 - 96 %	Mahdy et al. (2014)

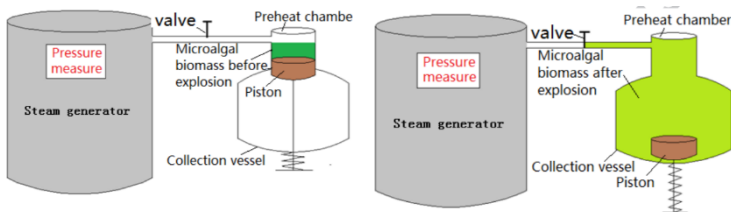
s reinhardtii	mL/g biomass); suhu 50 °C pH 4.5 5 jam		
Chlorella sorokiniana	Cellulase 1.5 L (60 µL/3 g biomasa); Novozyme 188 (30 µL / 3 g biomasa); Suhu 55 °C pH 4.5 72 jam	100 %	Hernández et al. (2015)
Dunaliella tertiolecta	0.4 mL enzim / g biomasa; Suhu 55 °C pH 5.5	80.9 %	Lee et al. (2013)
Chlamydomonas reinhardtii	120 KNU/g (300 AGU/mL); Suhu 50 - 65 °C pH 4.5 – 5.5 10 – 60 menit	56%	Choi et al. (2010)

\* *Saccharification rate*

## Metode Termal

**Heat explosion.** Heat explosion atau ledakan panas digunakan untuk memecah sel mikroga agar diperoleh efisien ekstraksi biomassa yang tinggi. Agar degradasi konstituen dalam biomassa tidak terjadi maka metode ini harus dilakukan pada suhu rendah. Suhu yang digunakan pada *heat explosion* berkisar antara 160 ° hingga 260 °C, dengan menjaga tekanan konstan antara 1,03 hingga 3,45 MPa. Salah satu hasil penelitian menunjukkan bahwa *pretreatment Nannochloropsis gaditana* dengan metode *steam explosion* dapat menaikkan efisiensi ekstraksi lipid dengan pelarut n-

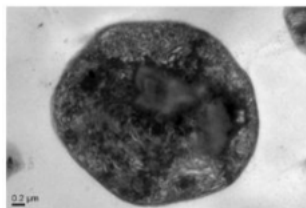
heksan dari 0,3 – 3,6% pada suhu 120°C dan tekanan 2 bar menjadi 8,8% pada suhu 150 °C dengan tekanan 10 bar. Secara berturut-turut diperoleh lipid sebesar 21,4% dan 22%. Nilai ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstraksi tanpa *pretreatment* yaitu 19,6%. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa peningkatan tekanan akan menaikkan kelarutan biomassa. (Velásquez et al., 2003; Cheng et al., 2011; Nurra et al., 2014; Lorente et al., 2015; Onumaegbu et al., 2018). Rangkaian alat *steam explosion* pada mikroalga dapat digambarkan seperti pada Gambar 10.



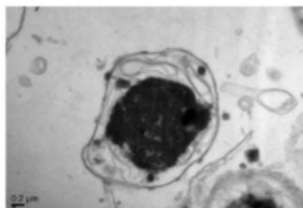
**Gambar 10.** Skema instalasi sebelum dan sesudah *pretreatment* pada metode *steam explosion* (Cheng et al., 2015).

Adapun mekanisme kerja *steam explosion* yakni dengan cara mengalirkan uap bertekanan 1,0 hingga 2,1 MPa selama 1 hingga 20 menit yang bertujuan untuk memanaskan biomassa mikroalga basah, kemudian aliran dihentikan dengan cara menutup kran (*valve*). Selanjutnya piston dilepaskan sehingga menyebabkan ledakan dalam waktu 0,1 detik dan produk *pretreatment* ditampung pada *collection vessel*. Proses ini

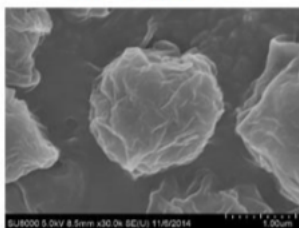
menyebabkan pecahnya dinding sel mikroalga yang ditunjukkan oleh Gambar 11.



TEM image of original microalgal cell

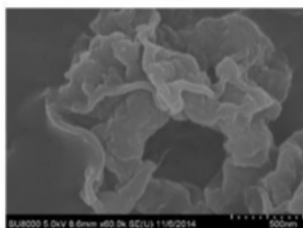


TEM image of exploded microalgal cell



SEM image of original microalgal cell

Sebelum



SEM image of exploded microalgal cell

Sesudah

**Gambar 11.** Penampakan sel sebelum dan sesudah *steam explosion pretreatment* (Cheng et al., 2015)

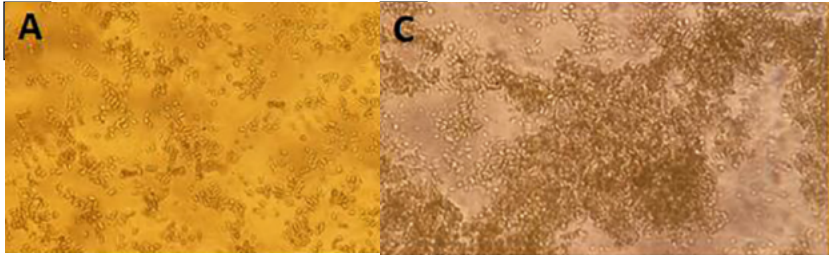
Hasil SEM pada Gambar 11 menunjukkan bahwa sel mikroalga sebelum proses *steam explosion pretreatment* memperlihatkan struktur berbentuk bola dengan permukaan yang halus, namun setelah proses *pretreatment* struktur sel mikroalga yang awalnya berbentuk bola menjadi hancur dan tidak ada sel terintegrasi lagi. Hal serupa juga terjadi pada pengamatan hasil dengan menggunakan TEM. Sebelum *pretreatment* sel mikroalga tampak padat dan terisi

dengan sitoplasma, namun setelah *pretreatment* muncul daerah terang pada sel mikroalga. Daerah gelap tersebut menunjukkan senyawa dengan nomor atom yang tinggi, sedangkan daerah yang terang menunjukkan ruang tanpa sampel, hal ini artinya telah terjadi pelepasan sitoplasma dari sel mikroalga akibat proses *steam explosion*.

Jadi secara keseluruhan dapat dinyatakan bahwa metode *steam explosion* dapat menghancurkan struktur sel mikroalga, sehingga mengakibatkan sitoplasma keluar dari sel (Cheng et al., 2015). Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan *steam explosion* adalah suhu, tekanan, konsentrasi sel dan jenis mikroalga. Kelebihan metode ini adalah tidak menghasilkan limbah berbahaya, konsumsi energy yang relative rendah, biaya perawatan dan potensi terjadinya korosi juga rendah. Kelemahannya adalah metode ini spesifik untuk jenis mikroalga tertentu dan masih dalam skala laboratorium (Al hattab dan Ghaly, 2015).

***Autoclave.*** *Autoclave* merupakan metode termal yang beroperasi pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs. Tekanan gas panas selama proses menyebabkan sel mikroba pecah, sehingga meningkatkan pelepasan lipid intaseluler. Efisiensi metode *autoclave* tergantung pada lama pemrosesan dan jenis mikroalga yang diberi *pretreatment* karena perbedaan jenis dinding selnya.

Gambar 12 memperlihatkan perbedaan kenampakan sel setelah dan sebelum *pretreatment*, gambar (b) menunjukkan terjadinya pemecahan sel mikroalga akibat *pretreatment*.



**Gambar 12.** Visualisasi optik tanpa (a) dan dengan *autoclave* (b)(Silva dan Managhello, 2018).

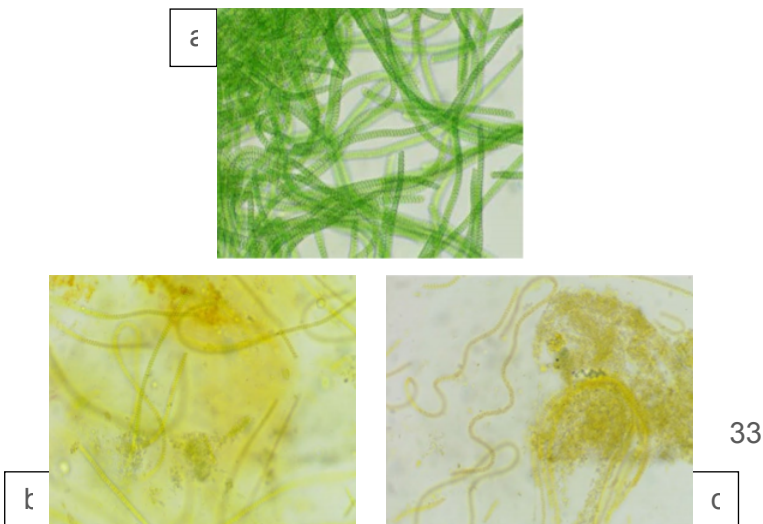
Hasil penelitian pada *Nannochloropsis oculata* menunjukkan bahwa *pretreatment* menggunakan metode *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs dan interval waktu 10, 20 dan 30 menit, menunjukkan perolehan lipid tertinggi sebesar 29,34% dengan waktu *pretreatment* selama 30 menit (Surendhiran and Vijay, 2014).

Kelebihan dari metode ini adalah ekstraksi lipid lebih mudah karena menghasilkan tingkat penetrasi yang tinggi sehingga mudah memecah membran ekstraseluler. Pengoperasian dengan waktu durasi yang singkat dan suhu yang tinggi dapat mengurangi degradasi produk bahan yang diinginkan. Namun metode ini juga memiliki kelemahan yaitu, sulit untuk di scale up, durasi waktu operasi yang cukup lama, dan apabila digunakan dalam



skala besar akan membutuhkan konsumsi energi yang tinggi (King, 2014; Luo, Xiao, Luo, 2010).

**Hydrothermal.** *Hydrothermal* juga merupakan metode termal untuk memecah dinding sel dan membuat gelatin pati intaseluler. Suhu operasinya berkisar antara 60 – 180 °C dengan waktu reaksi di bawah 60 menit. Pada metode ini digunakan larutan asam, basa maupun air yang berfungsi sebagai katalis (Chen et al., 2013; Ruiz et al., 2013a and 2015). Asam yang digunakan umumnya Asam sulfat dan Asam klorida dengan konsentrasi 1 – 10%, sedangkan basa yang digunakan umumnya Natrium hidroksida. Dar dan Phutela (2019) melakukan *hydrothermal pretreatment* pada *Spirulina subsalsa* untuk meningkatkan produksi biogas, setelah pretreatment pengamatan menggunakan SEM menunjukkan perbedaan yang signifikan, dimana terjadi depigmentasi dan agregasi sel mikroalga, akibat lepasnya konstituen seluler. Hal ini merupakan indikasi terjadinya kerusakan dinding sel (**Gambar 13**).



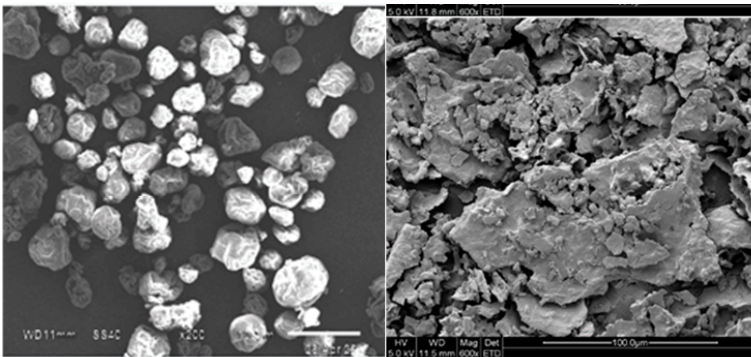
**Gambar 13.** Hasil SEM *Spirulina subsalsa* (a) keadaan awal; (b) 100°C, 30 menit; (c) 120°C, 30 menit (Dar dan Phutela, 2019).

Keunggulan metode ini adalah waktu reaksi yang relatif lebih singkat. Kelemahannya adalah memerlukan proses netralisasi sesaat setelah *pretreatment*, karena senyawa asam maupun basa dapat menjadi inhibitor bagi mikroorganisme saat proses fermentasi. Selain itu memerlukan desain alat yang mahal (anti-korosi) dan menimbulkan limbah, sehingga dianggap kurang ramah lingkungan (Lucio et al., 2018). Penggunaan air sebagai katalis memberikan manfaat yang sangat besar karena tidak menimbulkan limbah beracun, tidak perlu menetralkan sampel setelah *pretreatment*, sehingga dianggap sebagai proses yang ramah lingkungan (Hu et al., 2011).

**Freezing.** Mekanisme dari metode *freezing* adalah pembekuan secara lambat yang dilakukan pada suhu 10 °c di bawah titik beku air. Hal ini dilakukan untuk membentuk kristal es yang dapat memecah dinding sel secara mekanik (Yang et al., 2015). Senyawa intraseluler seperti karbohidrat, lipid, protein, dan pigmen akan dilepaskan ke media (misalnya air) selama proses pencairan, sedangkan senyawa membran sel dan

senyawa organik yang terlarut dalam air juga dapat diekstrak (Carbonel et al., 2006; Ando et al., 2016). Pretreatment ini dapat dilakukan secara berulang, yaitu proses pembekuan dan pencairan terjadi berulang untuk meningkatkan pemecahan sel sehingga dapat meningkatkan ekstrak karbohidrat atau senyawa lainnya. Meskipun pretreatment ini hanya digunakan untuk merusak sel, tetapi penelitian terbaru telah mengaplikasikan metode ini untuk biomasa berlignoselulosa (yang lebih sulit untuk dipretreatment dibandingkan dengan biomasa mikroalga). Smichi et al., 2016 melakukan penelitian menggunakan 5 gram *J. maritimus* yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam freezer konvensional selama 24 jam pada suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kemudian dimasukkan ke dalam water bath pada suhu  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Sampel selanjutnya disaring untuk memisahkan padatan dengan cairan lalu dikeringkan pada suhu  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Residu yang sudah dikeringkan dapat dilanjutkan ke langkah berikutnya yaitu hidrolisis enzimatis. Dari hasil penelitian tersebut dapat dibuktikan bahwa metode pretreatment ini efisien untuk memecah sel biomasa, namun pretreatment ini tidak mampu mendegradasi senyawa apapun. Kelemahan utama dari metode pretreatment *freezing* ini adalah waktu yang dibutuhkan untuk satu kali siklus yaitu selama 24 jam.

Yu, 2017 juga melakukan penelitian dengan metode *freezing-thawing* untuk mengekstrak C-Phycocyanin dari *Spirulina platensis*. Gambar 14 menunjukkan hasil SEM sampel sebelum dan sesudah pretreatment dengan metode *freezing-thawing*.

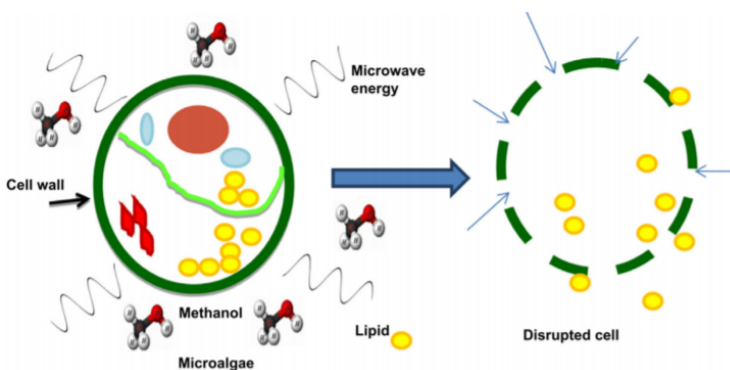


**Gambar 14.** Hasil SEM (a) sebelum pretreatment(b) setelah pretreatment dengan metode *freezing-thawing*

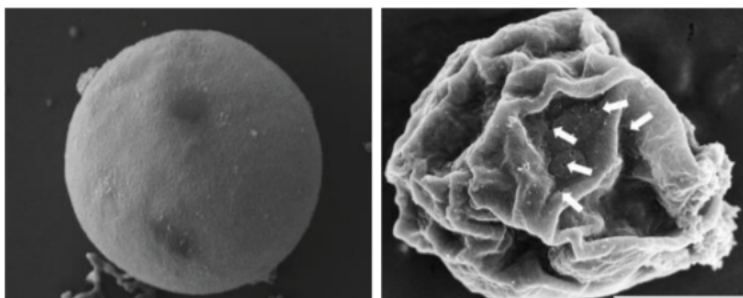
## Metode Fisika

**Microwave.** *Microwave pretreatment* memanfaatkan gelombang mikro yang terdiri dari gelombang elektromagnetik dengan frekuensi 0,3 – 300 GHz untuk memecah dinding sel mikroalga. Peningkatan suhu yang disebabkan oleh gelombang elektromagnetik akan meningkatkan energi kinetik selama disintegrasi sel mikroalga, kemudian akan mempolarisasi molekul mikro,

menyebabkan terjadinya sedikit variasi dalam struktur protein. Parameter pada metode ini adalah pengadukan *microwave*, waktu dan daya (Günerken et al., 2015). Osilasi cepat, medan listrik dan dielektrik bahan polar dalam metode *oven microwave* menginduksi panas oleh gaya gesek struktur molekul selama pemecahan biomassa. Gambar 15 menunjukkan bagaimana pemecahan sel akibat energi gelombang mikro dan Gambar 16 menunjukkan hasil citra mikroalga menggunakan SEM. Osilasi cepat, medan listrik bahan polar dan dielektrik dalam metode *oven microwave* menginduksi panas oleh gaya gesek struktur molekul selama pemecahan biomassa (Pan et al., 2002).



**Gambar 15.** Iradiasi *microwave* selama proses *pretreatment* mikroalga (Muley dan Boldor 2013).



**Gambar 16.** *Microwave pretreatment* terhadap mikroalga (kiri : sebelum dan kanan: setelah pretreatment) (Al hattab dan Ghaly, 2015).

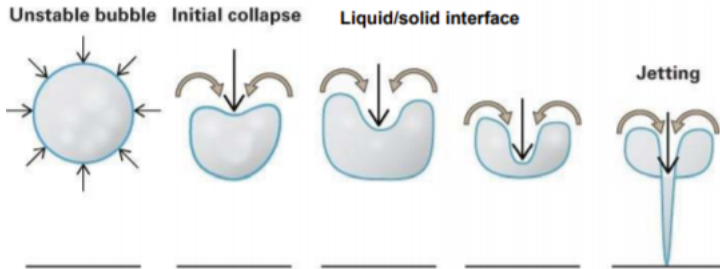
Jika dibandingkan dengan metode konduksi, selama proses *pretreatment*, pada metode *oven microwave* energi bersirkulasi ke dalam bahan secara seragam, sehingga memberikan lebih banyak panas ke semua bagian biomassa (Passof et al., 2014). Selama iradiasi oven, ikatan tidak terbentuk ataupun rusak, tetapi energi ditransfer dengan cepat ke sampel biomassa untuk meningkatkan efisiensi pemecahan sel. Ling et al., (2016) menyatakan bahwa sifat dielektrik gelombang mikro dari bahan memainkan peran utama, yang sangat tergantung pada suhu, frekuensi, katalis dan waktu selama proses iradiasi oven. Ali dan Watson (2016) menggunakan *pretreatment* microwave untuk mengekstraksi *N. oculata* dan pada kondisi operasi 943 W selama 5 menit diperoleh kerusakan dinding sel sebanyak 70%.

Kelebihan metode ini adalah cocok digunakan untuk skala besar, sederhana, tingkat ekstraksi yang

cepat, tingkat pemanasan yang tinggi, biaya operasi rendah, bersifat ramah lingkungan, dan membutuhkan sedikit pelarut. Kekurangannya adalah suhu tinggi dapat mendegradasi lipid dan memerlukan waktu pendinginan yang lama untuk menghindari kehilangan lipid (Al hattab dan Ghaly, 2015).

***Ultrasonic pretreatment.*** *Ultrasonic pretreatment* atau proses ultrasonik menggunakan gelombang suara yang merambat ke dalam media cair dan menciptakan area tekanan balik yang tinggi atau kompresi (tergantung pada frekuensi yang diterapkan) dan siklus bertekanan rendah atau penjernihan, di mana perubahan tekanan ini menciptakan kavitasi yang mendorong pembentukan gelembung di media elastis (Cervantes-Cisneros et al., 2015). Saat gelembung mencapai volume maksimum, dimana gelembung tidak dapat menyerap energi lagi, maka akan melepaskan sejumlah besar energi yang menyebabkan runtuhnya gelembung dengan kekerasan yang menghasilkan gelombang kejut dan daerah dengan suhu dan tekanan yang sangat tinggi. Fenomena ini disebut kavitasi. Proses kavitasi sangat efektif untuk perpindahan panas dan massa, menciptakan titik panas yang dapat menyebabkan percepatan reaktivitas kimia dalam medium (Picó, 2013). Proses ultrasonik dapat membantu memecahkan dinding sel mikroalga karena ketika gelembung runtuh pada permukaan benda padat,

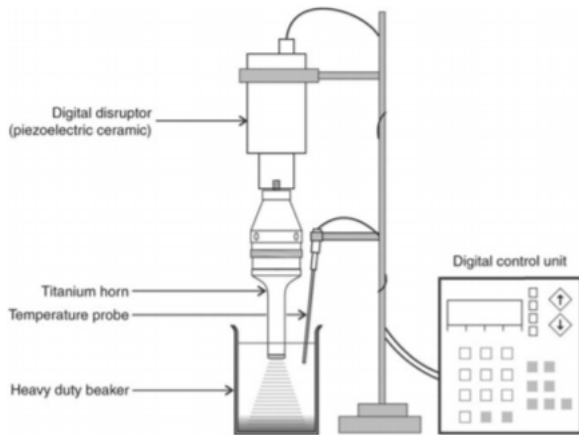
tekanan dan suhu yang meningkat akan menciptakan mikrojet yang memungkinkan pelarut menembus ke dalam bahan mentah dan memecah dinding sel (Luo et al., 2014), peristiwa ini diilustrasikan seperti pada Gambar 17.



Gambar 17. Skema pemecahan sel oleh energi ultrasonic (ASA, 2013)

Metode ultrasonik dipengaruhi oleh viskositas, suhu media cair, waktu proses dan frekuensi. Ultrakavitasi jauh lebih intens pada frekuensi rendah (sekitar 18 – 40 kHz) daripada frekuensi tinggi (Sekitar 400 – 800 kHz) (Wahidin et al., 2014). Rangkaian alat teknik ultrasonik untuk menghasilkan kavitasi dalam cairan ditunjukkan oleh Gambar 18.



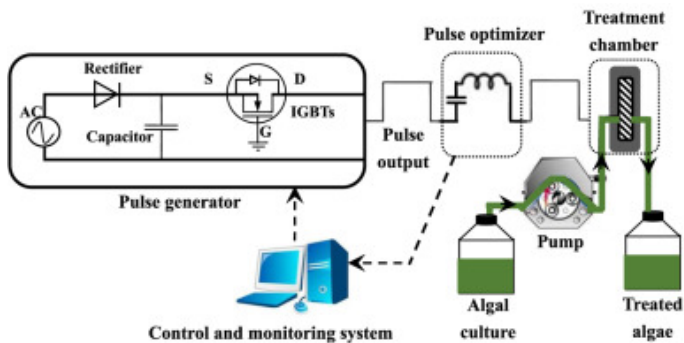


**Gambar 18.** Rangkaian alat *ultrasonic pretreatment*

Kelebihan metode ultrasonik yaitu mengurangi waktu ekstraksi, membutuhkan sedikit pelarut, menghasilkan yield yang lebih besar karena penetrasi selnya mudah, mikroalga tidak perlu dalam kondisi kering, komponen intraseluler mudah dikeluarkan dari sel menuju bulk pelarut, dan dapat dioperasikan pada suhu rendah. Kelemahannya adalah membutuhkan daya yang tinggi, sulit untuk di scale up, penggunaan intensitas yang tinggi dapat menghasilkan tekanan dan panas sehingga merusak sel, dan tidak cocok untuk spesies mikroalga diatomic dengan lapisan seluler yang tebal (Chemat et al., 2011; Wang & Weller, 2006; Natarajan et al., 2014; Joyce et al., 2013).

*Pulse electric field pretreatment* (PEF). PEF adalah suatu teknik sederhana untuk memecah sel

mikroalga menggunakan listrik. Metode ini merupakan metode non-termal dengan durasi waktu yang singkat mulai dari nanodetik hingga milidetik, tetapi menggunakan amplitudo yang besar mulai dari 100 – 300 V cm<sup>-1</sup> hingga 300 kV cm<sup>-1</sup>. Metode ini dapat bekerja pada konsentrasi sel yang rendah maupun tinggi dalam cairan, oleh karena itu metode ini dapat digunakan langsung dengan kultur mikroalga. Selama *pretreatment* terjadi efek elektroporasi atau elektropermeasi, yaitu pembukaan atau perbesaran pori-pori membrane sel dengan menggunakan kejutan listrik, sehingga dapat meningkatkan permeabilitas membrane sel. Elektroporasi akan terjadi setelah melampaui nilai ambang batas tertentu (antara 0,5 sampai 1,5 V) (Goettel et al., 2013; Vorobiev dan Lebovka, 2015). Saat elektroporasi terjadi, permeabilitas membran sel meningkat. Sebagian besar selaput sel bermuatan negatif dan dibentuk oleh ion dan protein yang berbeda. Di sini potensial transmembran terbentuk akibat gradien ionik internal dan eksternal, dan ketika medan listrik eksternal berada di atas nilai potensial terjadi, polaritas seluler akan diinduksi, sehingga menciptakan pemisahan muatan dan menghasilkan momen dipol yang sejajar dengan bidang eksternal (Sheng et al., 2011; Zbinden et al., 2013).



Gambar 19. Rangkaian alat PEF (Han et al., 2018)

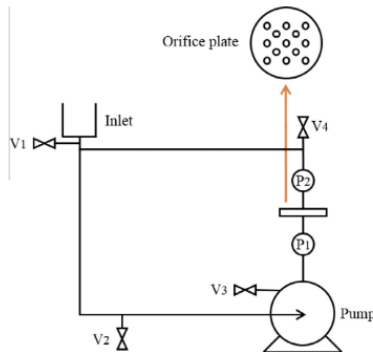
Beberapa kelebihan metode PEF yaitu dioperasikan pada suhu ruang, waktu pretreatment relative singkat, konsumsi energi rendah, dan ramah lingkungan.

## Metode Mekanik

Metode mekanik konvensional merupakan metode yang paling banyak digunakan di industri karena menawarkan hasil yang menguntungkan pada skala besar serta recovery produk yang tinggi. Metode yang paling banyak digunakan diantaranya adalah *high-pressure homogenization*, *hydrodynamic cavitation*, *bead milling* dan *ball milling*. Prinsip kerja metode *high-pressure homogenization* adalah sel ditempatkan dalam suspensi kemudian dipindahkan menggunakan pompa ke lubang dengan katup yang dirancang khusus untuk menahan tekanan. Selanjutnya, laju aliran meningkat dengan cepat dan tekanan cairan berkurang saat keluar dari sistem. Secara keseluruhan mekanisme perusakan

sel dengan *high-pressure homogenization* adalah *fluid shear*, turbulensi, perubahan kecepatan yang mendadak, dan kavitasi. (Spiden et al., 2013; Yap et al., 2015; Xie et al., 2016).

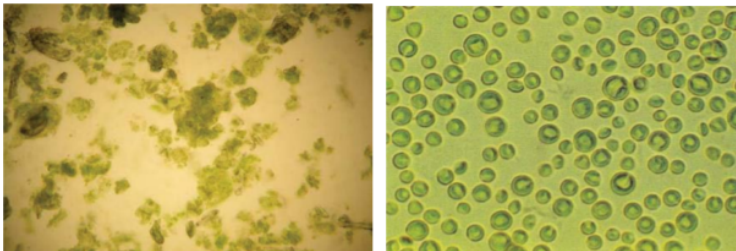
Metode *hydrodynamic cavitation* mempunyai prinsip kerja dengan melewati cairan atau *slurry* ke dalam rongga transversal yang besar kemudian diarahkan ke rongga yang sangat kecil yang disebut katup throttle yang menyebabkan pendesakan material suspensi. Proses ini menghasilkan penurunan tekanan ketika cairan atau *slurry* jatuh di bawah tekanan uap membentuk gelembung mikro yang akan pecah ketika tekanan kembali di atas tekanan uap normal. Pecahnya gelembung mikro ini menghasilkan gelombang kejut sehingga meningkatkan tekanan dan suhu yang pada akhirnya dapat memecah sel (Lee dan Han, 2015).



**Gambar 20.** Skema *Hydrodynamic Cavitation*

Dalam bidang bioteknologi, metode *bead mill* dan *ball mill* ini sudah digunakan untuk memecah sel

beberapa mikroorganisme (Gambar 21) dan dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti laju unpan dari suspensi sel, kecepatan agitasi, design agitator, diameter dan ukuran bola, serta design ruang penggilingan. Selain konsentrasi biomasa, densitas suspensi, dan morfologi mikroorganisme juga perlu dipertimbangkan interaksi alat dengan biomassa yang berasal dari mikroorganisme yang berbeda. (Montalescot et al., 2015; Postma et al., 2015).



**Gambar 21.** *Chlorella sp.* sebelum (kanan) dan sesudah (kiri) *pretreatment* (Doucha dan L'vansky', 2008).

Secara keseluruhan, terlepas dari efektifitas pretreatmen ini untuk memecah sel biomasa mikroalga, kelemahan utama dari metode mekanik ini adalah metode ini tidak secara langsung mempengaruhi struktur karbohidrat intraseluler sehingga diperlukan langkah lanjutan untuk memodifikasi struktur pati. Selain itu metode ini juga memerlukan energi yang tinggi, oleh karena itu diperlukan kombinasi metode mekanik ini dengan metode lain.

# ***HIDROLISIS KARBOHIDRAT SECARA ENZIMATIS***

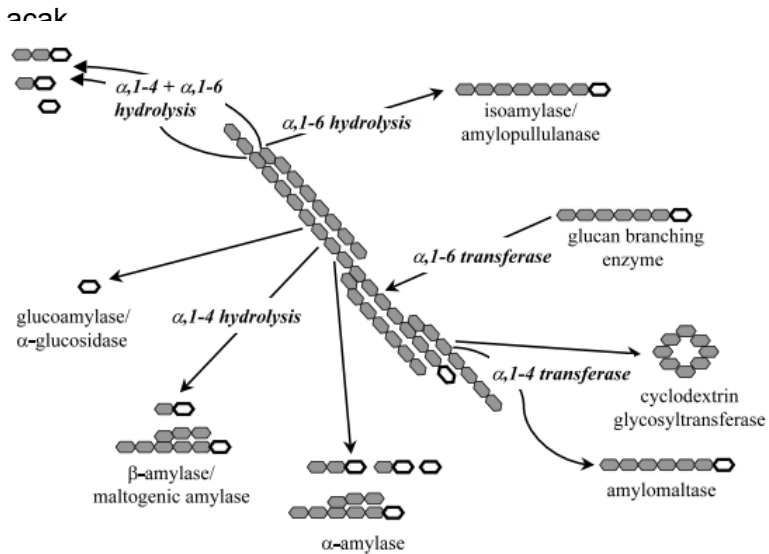
Hidrolisis merupakan salah satu tahapan dalam pembuatan bioetanol berbahan baku mikroalga. Hidrolisis ini bertujuan untuk memecah pati menjadi monosakarida (glukosa) yang kemudian akan difermentasi menjadi bioetanol. Pada umumnya proses hidrolisis dibagi menjadi dua yaitu : hidrolisis asam dan hidrolisis enzim.

Enzim adalah suatu protein yang berperan sebagai katalis yang mampu meningkatkan hasil produk lebih tinggi, dapat bekerja pada pH relatif netral, suhu rendah serta bersifat selektif dan spesifik terhadap substrat tertentu (Noraini et al, 2014). Enzim mempunyai beberapa karakteristik yaitu :

1. Enzim berasal dari protein yang dihasilkan oleh sel hidup
2. Aktivitas enzim spesifik terhadap substrat tertentu
3. Penggunaanya dalam jumlah yang sedikit
4. Struktur enzim tidak berubah baik sebelum dan sesudah reaksi karena enzim hanya berperan sebagai biokatalisator
5. Enzim mempunyai bagian aktif yang disebut sisi aktif

Pada proses hidrolisis enzimatis, enzim berperan sebagai fasilitator pembelahan dalam molekul dengan penambahan unsur air.

Hidrolisis enzimatis berbeda dengan hidrolisis kimia maupun fisik dalam hal pemutusan rantai polimer karbohidrat. Hidrolisis enzimatis dapat memutus rantai polimer secara spesifik pada percabangan tertentu seperti yang terlihat pada Gambar 22 sedangkan hidrolisis kimia maupun fisik akan memutus rantai secara



**Gambar 22.** Mekanisme pemutusan ikatan oleh enzim (Van Der Maarel dkk., 2002)

Pati dapat dipecah menjadi unit yang lebih sederhana yaitu dengan memotong ikatan glikosidiknya.

Salah satu enzim yang dapat memotong ikatan tersebut adalah enzim  $\alpha$ -amilase.

Enzim  $\alpha$ -amilase termasuk endo enzim yaitu enzim yang dapat memutus ikatan  $\alpha$ -(1,4) baik yang terdapat dalam amilosa maupun amilopektin. Enzim  $\alpha$ -amilase memotong ikatan rantai di bagian tengah. Hidrolisis dengan enzim  $\alpha$ -amilase akan menyebabkan amilosa terurai menjadi maltosa dan maltotriosa. Selanjutnya, maltotriosa akan terurai menjadi maltosa dan glukosa (Walker dan Whelan dalam Fogarty, 1983).

Mekanisme kerja enzim  $\alpha$ -amilase terjadi melalui dua tahap yaitu (Winarno, 1986) :

1. Degradasi amilosa menjadi maltosa dan maltotriosa yang terjadi secara acak dan cepat serta diikuti dengan menurunnya viskositas dengan cepat.
2. Pembentukan glukosa dan maltosa yang terjadi secara teratur dan lambat.

Aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dipengaruhi oleh beberapa faktor penting yaitu (Fogarty, 1983) :

1. pH : optimum antara 4,5 – 6,5
2. Suhu : optimum antara 40 – 60 °C

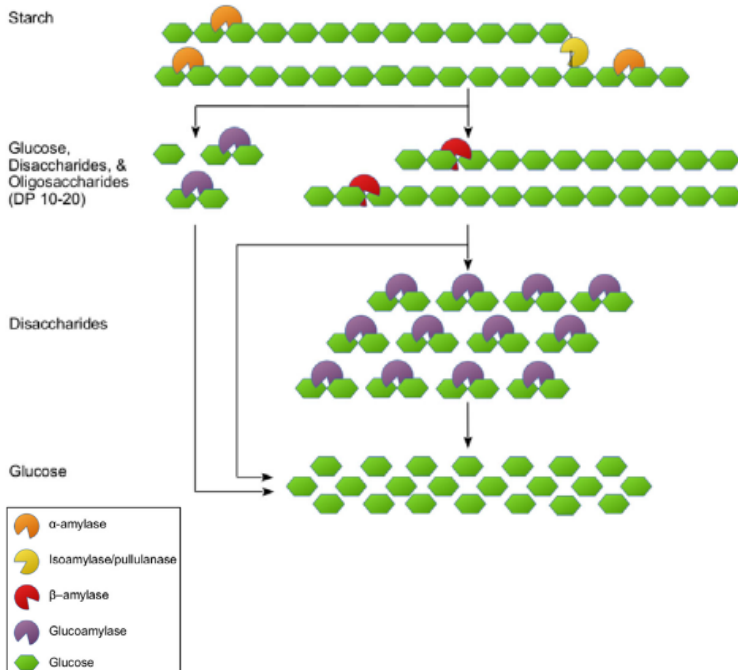
## **Konversi Pati Menjadi Gula**



Hidrolisis enzimatis pati merupakan reaksi yang kompleks karena melibatkan aktivitas beberapa enzim seperti  $\alpha$ -amilase, isoamilase, pullulanase,  $\beta$ -amilase dan glukoamilase. Enzim isoamilase dan pullulanase mengubah amilopektin menjadi amilose dengan pembelahan cabang  $\alpha$ -(1,6) glikosida. Enzim  $\alpha$ -amilase menghidrolisis amilosa dan amilopektin dengan memutus ikatan  $\alpha$ -(1,4) glikosida secara acak menghasilkan glukosa, maltosa dan maltodekstrin yang terdiri dari 10 – 20 unit glukosa. Enzim  $\beta$ -amilase menghidrolisa amilosa dari ujung yang tidak mereduksi menghasilkan maltosa (disakarida) yang selanjutnya di pecah dengan enzim glukoamilase menjadi glukosa seperti yang terlihat pada Gambar 23 (Abdallah et al, 2016)

Pada skala industri, hidrolisis enzimatis pati dilakukan pada suhu tinggi dan dibagi menjadi 3 tahap : gelatinisasi pati, *liquefaction*, dan *saccharification*. Gelatinisasi pati dan *liquefaction* terlibat dalam pemutusan granula pati menjadi suspensi gelatin pada suhu 105 °C diikuti dengan konversi gelatin menjadi oligosakarida pada suhu 95 °C, secara berurutan menggunakan  $\alpha$ -amilase yang tahan panas. Sakarifikasi adalah proses konversi dari oligosakarida menjadi glukosa primer bersama dengan beberapa disakarida lainnya seperti maltosa dan isomaltosa pada konsentrasi yang sangat rendah. Pada proses ini glukoamilase dan

isoamilase ditambahkan untuk menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -(1,4) seperti menghidrolisa ikatan  $\alpha$ -(1,6) glikosida pada suhu 65 °C (Kearsley and Dziedzic, 1995; Kulp and Ponte, 2000; Ratnayake and Jackson, 2009).



Gambar 23. Skema hidrolisis enzimatis pada pati

## Hidrolisis Enzimatik Karbohidrat di dalam Mikroalga

Produksi bioetanol dari biomasa mikroalga terdiri dari tiga tahap yaitu : pretreatmen, sakarifikasi, dan fermentasi. Salah satu keuntungan penggunaan biomasa mikroalga adalah dalam beberapa metode pretreatmen, proses sakarifikasi dapat diikuti dengan pretreatmen tanpa harus menggunakan peralatan yang berbeda. Hidrolisis enzimatis (sakarifikasi) adalah salah satu langkah terpenting untuk mendapatkan gula esensial seperti glukosa dan mannosa yang selanjutnya difermentasi untuk menghasilkan bioetanol (Harun and Danquah, 2011; Milano et al., 2016). Salah satu enzim yang digunakan adalah endo-amilase yang menyerang ikatan  $\alpha$ -(1,4) glikosidik dari pati. Kemudian enzim amiloglukosidase menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -(1,6) glikosidik sehingga diperoleh glukosa dan gula lainnya seperti maltosa (Chen et al., 2013; Ometto et al., 2014; Hernández et al., 2015). Enzim lainnya seperti selulase dan hemiselulase juga dapat digunakan untuk memperoleh gula sederhana dari dinding sel dan polisakarida intraseluler (selulosa, hemiselulosa, dll) Mahdy et al. (2015)

Hidrolisis enzimatis gula dalam biomasa mikroalga memberikan banyak keuntungan dibandingkan hidrolisis kimiawi dengan asam maupun basa. Hidrolisis enzimatis tidak memerlukan peralatan yang mahal karena proses hidrolisis dilakukan pada kondisi operasi yang rendah.

Selain itu juga tidak menghasilkan degradasi produk atau senyawa toksik (yang berpotensi mempengaruhi proses fermentasi dan produksi bioetanol).

# ***METODE PENENTUAN PATI DAN KARBOHIDRAT TOTAL***

## **Metode Penentuan Pati Dan Karbohidrat Total**

Pati merupakan polisakarida yang terdapat dalam biomasa mikroalga yang dapat menjadi sumber bioetanol generasi ketiga. Oleh karena itu, kita perlu mengetahui bagaimana metode penentuan kuantitatif pati serta karbohidrat total yang ada di dalam biomasa mikroalga.

### *Metode Penentuan Pati*

Ada beberapa pendekatan untuk penentuan pati dalam mikroalga yaitu :

#### 1. Metode perchloric acid

Tahap pertama metode ini adalah mengekstrak senyawa-senyawa pengganggu (pigments, soluble sugars, dan lipids) dengan aseton atau etanol. Kemudian pati yang terdapat dalam mikroalga diekstrak dan dilarutkan dengan perchloric acid. Pada tahap akhir, gula total dianalisa dengan metode colorimetric Anthrone (Rose et al., 1991; Branyikova et al., 2011) Anthrone (9,10-dihydro-9-oxanthracene) merupakan hasil reduksi anthraquinone. Anthrone bereaksi secara spesifik

dengan karbohidrat dalam asam kuat menghasilkan warna biru kehijauan yang khas.

2. Metode hydrochloric acid

Seperti pada metode perchloric acid, tahap awal dilakukan dengan mengekstrak senyawa pengganggu dengan aseton kemudian diikuti dengan ekstraksi ethanolic untuk memastikan semua senyawa pengganggu sudah hilang. Selanjutnya pati diekstrak dengan hydrochloric acid kemudian gula total ditentukan dengan metode Anthrone (Meyer et al., 1988)

3. Metode enzymatic

Penentuan dengan metode ini didasarkan pada degradasi enzimatik pati menjadi glukosa dengan enzim  $\alpha$ -amilase dan amiloglukosidase yang dilakukan melalui uji pati total. Seperti dua metode sebelumnya, untuk mengekstraksi senyawa pengganggu, biomasa ditumbuk lalu diinkubasi dalam water bath diikuti penambahan  $\alpha$ -amilase pada pH 7 kemudian ditambahkan amyloglukosidase pH 4,5 selanjutnya ditambahkan reagen GOPOD (Glukosa oksida, peroksida, dan 4-aminoantipirin sebagai sampel lalu diinkubasi. Absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm.

Tabel 4 menunjukkan perbandingan penentuan pati dan karbohidrat total beserta keuntungan dan kerugiannya.

Tabel 4 Perbandingan metode penentuan pati dengan karbohidrat total (Velazquez et al, 2018)

Metode	Reagen	Metode Perhitungan	Keuntungan	Kerugian
Perchloric acid	5 - 10 mg sample Ethanol 80% (v/v) HClO <sub>4</sub> 35% (v/v)	Anthrone	- kebutuhan sampel sedikit murah	- reagen bersifat korosi spesifitasnya rendah kemungkinan terjadi human error tinggi gangguan
Hydrochloric acid	5 - 10 mg sample Acetone Ethanol 80% (v/v) HCl 1.1 % (v/v)	Anthrone		
Enzymatic	5 mg sample Ethanol 80% (v/v) α-amylase Amyloglucosidase Glucose oxidase/peroxidase	Absorbance	Spesifitasnya tinggi metodenya stabil rendah terhadap gangguan	mahal memerlukan kontrol terhadap reagen
Kimia	10 mg sample Diluted HClO <sub>4</sub> / HCl	Anthrone Phenol-Sulfuric	kebutuhan sampel sedikit murah	Reagen bersifat korosif dan beracun tingkat gangguannya tinggi spesifitas rendah
Fisika	10 mg sample H <sub>2</sub> O 10 mL	Anthrone Phenol-Sulfuric	kebutuhan sampel sedikit	Reagen bersifat korosif dan beracun

	Mortar / Ultrasound 10 min or Freezing/thawing 12 h		biayanya tidak terlalu mahal	tingkat gangguannya tinggi spesifitas rendah kemungkinan terjadi human error
HPLC	300 mg sample H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 72% (v/v) Column 87 H RI detector H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.025 M/0.005 M 0.6 mL/min flow; 50 °C	HPLC	kebutuhan sampel sedikit spesifitas tinggi ramah lingkungan	Mahal memerlukan peralatan khusus dibutuhkan tindakan peencegahan karena menggunakan reagen yang korosif

---

### *Metode Penentuan Karbohidrat Total*

Terdapat tiga metode penentuan karbohidrat total yaitu secara kimia, fisika, dan HPLC.

1. Metode kimia untuk menentukan karbohidrat total sama dengan metode kimia dalam penentuan pati.
2. Metode fisika dapat dilakukan grinding dengan mortar atau ultrasonik probe (pretreatment sampel kira-kira 10 menit). Hasil ekstrak dengan cara kimia



maupun fisika kemudian ditentukan total karbohidrat secara kuantitatif menggunakan metode phenol-sulfuric (Dubois et al., 1956) atau metode Anthrone (Dreywood, 1946).

### 3. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Sampel biomasa mikroalga terlebih dahulu dihidrolisis dengan asam.  $H_2SO_4$  72% b/b ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi biomasa kering, kemudian campuran dibiarkan selama 1 jam pada suhu 30 °C. Sampel kemudian diencerkan menjadi 4 % dengan air suling lalu diautoklaf pada suhu 121 °C selama 1 jam. Setelah itu, fraksi cair dipisahkan untuk dianalisa dengan HPLC menggunakan kolom jenis Bio-Rad HPX-87H atau Agilent MetaCarb 87H. Fase gerak yang digunakan adalah  $H_2SO_4$  0,025 M atau 0,005 M dengan kecepatan aliran 0,5 – 0,6 mL/menit dan suhu kolom 50 °C. Beberapa senyawa yang dapat diukur dengan metode ini adalah glukosa, xilosa, selobiosa, arabinosa serta produk samping seperti oksalat, format, asetat, butirrat, suksinat dan asam levulinat (Juarez et al., 2016)

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Abdallah, Q. A., Nixon, B. T. and Fortwendel, J. R. 2016. The enzymatic Conversion of Major Algal and Cyanobacterial Carbohydrates to Bioethanol. *Frontiers in Energy Research*. Volume 4 Article 36. doi: 10.3389/fenrg.2016.00036.
- Acoustical Society of America (ASA). 2013. Ultrasound 'making waves' for enhancing biofuel production. *Biomass Magazine*, BBI International, Grand Forks, North Dakota.
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T., Olabi, A.G., 2015. Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renew. Sust. Energy Rev.* 51, 1446-1460.

- Ali, M., Watson, I.A., 2016. Microwave, thermolysis and lipid recovery from dried microalgae powder for biodiesel production. *Energy Technol.* 4(2), 319-330.
- Ambar Adi dan Syamsul Hidayat. 25 Juli 2019. Pabrik mikroalga satu-satunya di Asia Tenggara ada di Kendal. Diunduh dari: <https://www.gatra.com/detail/news/432580/kesehatan/pabrik-mikroalga-satu-satunya-di-asia-tenggara-ada-di-kendal>
- Ando, Y., Maeda, Y., Mizutani, K., Wakatsuki, N., Hagiwara, S., Nabetani, H., 2016. Impact of blanching and freeze-thaw pretreatment on drying rate of carrot roots in relation to changes in cell membrane function and cell wall structure. *LWT Food Sci. Technol.* 71, 40-46.
- Baroukh, C., Muñoz-Tamayo, R., Bernard, O., Steyer, J.P., 2015. Mathematical modeling of unicellular microalgae and cyanobacteria metabolism for biofuel production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33, 198-205.
- Branyiková, I., Marsálkova, B., Doucha, J., Brányik, T., Bisová, K., Zachleder, V., Vítová, M., 2011. Microalgae-novel highly efficient starch producers. *Biotechnol. Bioeng.* 108(4), 766-776.
- Cai, T., Park, S.Y., Li, Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 19 (2013) 360–369, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>.
- Carbonell, S., Oliveira, J.C., Kelly, A. L., 2006. Effect of pretreatments and freezing rate on the firmness of potato tissue after a freeze-thaw cycle. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41(7), 757-767.
- Castrillón, L.J.R., Carmona, M.E.R., Salazar, Y.V., 2013. *Microalgas para la industria alimenticia*. Editorial Universidad Pontificia Bolivariana. Colombia.
- Cervantes-Cisneros, D.E., Ruiz, H.A., Aguilar, C.N., Galindo, A.S., Rodríguez-Jasso, R.M., 2015. Evaluación del perfil de compuestos bioactivos de *Macrocystis pyryfera* extraídos por microondas y

- ultrasonido. Biorefinery Group, Food Research Department, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of Coahuila Undergraduate Thesis (In Spanish).
- Chemat F, Zill EH, Khan MK (2011) Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 813-835.
- Chen, C.Y., Zhao, X.Q., Yen, H.W., Ho, S.H., Cheng, C.L., Lee, D.J., Bai, F.W., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.* 78, 1-10.
- Chen, W.H., Huang, M.Y., Chang, J.S., Chen, C.Y., 2014. Thermal decomposition dynamics and severity of microalgae residues in torrefaction. *Bioresour. Technol.* 169, 258-264.
- Chen, W.H., Lin, B.J., Huang, M.Y., Chang, J.S., 2015. Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: a review. *Bioresour. Technol.* 184, 314-327.
- Cheng, J., Huang, R., Li, T., Zhou, J., Cen, K. 2015. Physicochemical characterization of wet microalgal cells disrupted with instant catapult steam explosion for lipid extraction. *Bioresource Technology* (Accepted Manuscript). doi.org/10.1016
- Cheng, J., Huang, R., Yu, T., Li, T., Zhou, J., Cen, K., 2014. Biodiesel production from lipids in wet microalgae with microwave irradiation and bio-crude production from algal residue through hydrothermal liquefaction. *Bioresour. Technol.* 151, 415-418.
- Cheng, J.J., Timilsina, G.R. 2011. Status and barriers of biofuel technologies: A review. *Renew Energy* 36: 3541-3549
- Chew, K.W., Yap, J.Y., Show, P.L., Suan, N.H., Juan, J.C., Ling, T.C., Lee, D.J., Chang, J.S. 2017. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresour Technol.* 2017 Apr;229:53-62. doi: 10.1016.

- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101(14). 5330-5336.
- Costa, J. A. V., & de Moraes, M. G. 2014. *An Open Pond System for Microalgal Cultivation. Biofuels from Algae*, 1–22. doi:10.1016/b978-0-444-59558-4.00001-2.
- Cyanotech.com. Whole health through Hawaiian microalgae. Diunduh dari: <https://www.cyanotech.com>.
- Dar, R. A., & Phutela, U. G. (2019). Enzymatic and Hydrothermal Pretreatment of Newly Isolated *Spirulina subsalsa* BGLR6 Biomass for Enhanced Biogas Production. *Waste and Biomass Valorization*. doi:10.1007/s12649-019-00712-y
- De Farias Silva, C. E., Meneghello, D., de Souza Abud, A. K., & Bertucco, A. (2018). Pretreatment of microalgal biomass to improve the enzymatic hydrolysis of carbohydrates by ultrasonication: Yield vs energy consumption. *Journal of King Saud University - Science*. doi:10.1016
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomás-Pejó, E., González-Fernández, C., Ballesteros, M., 2015. Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery processes. *Biotechnol. Bioeng.* 112(10), 1955-1966.
- DEO: Department of Energy, 2016. *Alternative Fuels Data Center*. USA.
- Doucha J, L'vansky' K (2008) Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 431-440.
- Dreywood, R., 1946. Qualitative test for carbohydrate material. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18(8), 499-499.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K. , Rebers, P.T., Smith, F., 1956. Colorimetric method for

- determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28(3), 350-356.
- Fessenden, R.J. and Fessenden, J.S., 1982, *Kimia Organik*, diterjemahkan oleh Pudjaatmakan, A. H., Edisi Ketiga, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- F.O. Licht. 2018. World Ethanol Production to Expand Steadily in 2019. Diunduh dari <https://informaconnect.com/world-ethanol-production-to-expand-steadily-in-2019>.
- Fogarty, William M. 1983. *Microbial Enzyme and Biotechnology*. New York :Applied Science Publisher.
- Food news international.com. 25 September 2017. Middle east: Organic astaxanthin receives certifications. Diunduh dari: <https://foodnewsinternational.com/2017/09/25/middle-east-organic-astaxanthin-receives-certifications/>
- Goettel, M., Eing, C., Gusbeth, C., Straessner, R., Frey, W., 2013. Pulsed electric field assisted extraction of intracellular valuables from microalgae. *Algal Res.* 2(4), 401-408.
- González, L. , Díaz, G. , Aranda, D. , Cruz, Y. and Fortes, M. (2015) Biodiesel Production Based in Microalgae: A Biorefinery Approach. *Natural Science*, 7, 358-369. doi: 10.4236/ns.2015.77039.
- Guldhe, A., Ansari, F.A., Singh, P., Bux, F. 2016. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: a biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation, *Ecol. Eng.* 99 (2017) 47–53, doi:10.1016/j.ecoleng.2016.11.013.
- Günerken, E., Hondt, E.D., Eppink, M.H.M., Garcia-gonzalez, L., Elst, K., Wijffels, R.H., 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol. Adv.* 33(2), 243-260.
- Han S-F, Jin W, Yang Q, El-Fatah Abomohra A, Zhou X, Tu R, Chen C, Xie G-J, Wang Q, Application of pulse electric field pretreatment for enhancing lipid extraction from *Chlorella pyrenoidosa* grown in

- wastewater, *Renewable Energy* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.10.034>.
- Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T., Danquah, M.K. 2011. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production. *Appl Energy* 2011;88(10):3464-7.
- Harun, R., Yip, J.W., Thiruvankadam, S., Ghani, W.A., Cherrington, T., Danquah, M.K., 2014. Algal biomass conversion to bioethanol-a step-by-step assessment. *Biotechnol. J.* 9(1), 73-86.
- Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M.C., 2015. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chem. Eng. J.* 262, 939-945.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, J.S., 2013. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour. Technol.* 135, 157-165.
- Hu, Z., Foston, M., Ragauskas, A.J., 2011. Comparative studies on hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of leaves and internodes of alamo switchgrass. *Bioresour. Technol.* 102(14), 7224-7228.
- Jena, U., Das, K.C., Kastner, J.R., 2011. Effect of operating conditions of thermochemical liquefaction on biocrude production from *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 102(10), 6221-6229.
- Joyce, E.M., King, P.M., Mason, T.J., 2013. The effect of ultrasound on the growth and viability of microalgae cells. *J Appl Phycol* 26: 1741-1748.
- Juárez, J.M., Hernando, A.L., Torre, R.M., Lanza, S.B., Rodríguez, S.B., 2016. Saccharification of microalgae biomass obtained from wastewater treatment by enzymatic hydrolysis. Effect of alkaline-peroxide pretreatment. *Bioresour. Technol.* 218, 265-271.

- Kearsley, M. W., and Dziedzic, S. Z. 1995. *Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivatives*. New York: Springer.
- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wi, S.G., Bae, H.J., 2014. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresour. Technol.* 153, 47-54.
- King, P.M. 2014. The use of ultrasound on the extraction of microalgal lipids. Unpublished PhD Thesis. Coventry University, Coventry, United Kingdom.
- Knoshaug, E.P., Donohoe, B.S., Gerken, H., Laurans, L., Wychen, S.R. 2013. Disruption of cell walls for enhanced lipid recovery. Google Patents: US20130171721 A1.
- Kulp, K., and Ponte, J. G. (2000). *Handbook of Cereal Science and Technology*. New York, NY: Marcel Dekker Inc.
- Lee, O.K., Kim, A.L., Seong, D.H., Lee, C.G., Jung, Y.T., Lee, J.W., Lee, E.Y., 2013. Chemo-enzymatic saccharification and bioethanol fermentation of lipid-extracted residual biomass of the microalga, *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.* 132, 197-201.
- Lee, I., Han, J.I., 2015. Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. *Bioresour. Technol.* 186, 246-251.
- Li, T., Zheng, Y.B., Yu, L., Chen, S.L. 2014. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass Bioenergy*. 66,204–213. doi: 10.1016.
- Liang, K., Zhang, Q., Cong, W., 2012. Enzyme-assisted aqueous extraction of lipid from microalgae. *J. Agric. Food. Chem.* 60(47), 11771-11776.
- Ling J, Nip S, de Toledo RA, Tian Y, Shim H. Evaluation of specific lipid production and nutrients removal from wastewater by *Rhodospiridium toruloides* and biodiesel production from wet biomass via



- microwave irradiation. *Energy* 2016;108:185–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2015.05.141>.
- Lorente, E., Farriol, X., Salvado, J. 2015. Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Proc Technol* 131: 93-98.
- Luo, J., Fang, Z., Smith, R.L., 2014. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 41, 56-93.
- Luo, J., Xiao, X., Luo, S.L. 2010. Biosorption of cadmium (II) from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 20:1104-1111.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-fernández, C., 2014. Enhanced methane production of *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii* by hydrolytic enzymes addition. *Energy Convers. Manag.* 85, 551-557.
- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar, M. M., Ballesteros, M., González-Fernández, C., 2015. Influence of enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91(5), 1299-1305.
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. A. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2010) 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020.
- Meyer, J., Schneider, B. U., Werk, K., Oren, R., Schulze, E.D., 1988. Performance of two *Picea abies* (L.) Karst. stands at different stages of decline. *Oecologia*. 77(1), 7-13.
- Milano, J., Chyuan, H., Masjuki, H.H., Chong, W.T., Kee, M., 2016. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. *Renew. Sust. Energy. Rev.* 58, 180-197.
- Montalescot, V., Rinaldi, T., Touchard, R., Jubeau, S., Frappart, M., Jaouen, P., Bourseau, P., Marchal, L.,

2015. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: process modeling and application to *Porphyridium cruentum* and *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* 196, 339-346.
- Muley PD, Boldor D. 2013. Investigation of microwave dielectric properties of biodiesel components. *Bioresour Technol* ; 127:165–74. doi:10.1016/j.biortech. 2012.10.008.
- Natarajan R, Chen X, Lau R (2014) Ultrasound applications in lipid extraction from microalgae. *Springer*, 4: 117-139.
- Nguyen, M.T., Choi, S.P., Lee, J., Lee, J.H., Sim, S.J. 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19(2):161e6.
- Noraini, M. Y., Ong, H. C., Badrul, M. J., & Chong, W. T. (2014). A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.089>
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Rios, S., Rey, M. 2014. Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation. *Bioresourc Technol* 163: 136-142.
- Ometto, F., Quiroga, G., Pšenicka, P., Whittton, R. , Jefferson, B., Villa, R., 2014. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water Res.* 65, 350-361.
- Onumaegbu, C., Mooney, J., Alaswad, A., & Olabi, A. G. 2018. Pre-treatment methods for production of biofuel from microalgae biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 93, 16–26. doi:10.1016/j.rser.2018.04.015.
- Özçimen, Didem, Inan, Benan. 2015. An Overview of Bioethanol Production From Algae. *INTECH*. doi: 10.5772/59305.

- Pacheco, M.M., Hoeltz, M., Moraes, M.S., Schneider, R.C. 2015. Microalgae: cultivation techniques and wastewater phycoremediation. *J Environ Sci Health Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2015;50:585–601.
- Pan X, Niu G, Liu H. Comparison of microwave-assisted extraction and conventional extraction techniques for the extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge*. *Biochem Eng J* 2002;12:71–7. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00039-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00039-6).
- Passos F, Sole M, Garcia J, Ferrer I(2013) Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Appl Energy*, 108:168-175.
- Pawar,S., 2016. Effectiveness mapping of open raceway pond and tubular photobioreactors for sustainable production of microalgae biofuel, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 62 (2016). 640–653, doi:10.1016/j.rser.2016.04.074.
- Picó, Y., 2013. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC, Trends Anal. Chem.* 43, 84-99.
- Pirwitz, K., Rihko-Struckmann, L., Sundmacher, K., 2016. Valorization of the aqueous phase obtained from hydrothermally treated *Dunaliella salina* remnant biomass. *Bioresour. Technol.* 219, 64-71.
- Postma, P.R., Miron, T.L., Olivieri, G., Barbosa, M.J., Wijffels, R.H. , Eppink, M. H.M., 2015. Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresour. Technol.* 184, 297304.
- RFA: Renewable Fuels Association, 2015. Industry Statistics. World Fuel Ethanol Production. USA.
- Rose, R., Rose, C.L., Omi, S.K., Forry, K.R., Durall, D.M., Bigg, W. L., 1991. Starch determination by perchloric acid vs enzymes : evaluating the accuracy and precision of six colorimetric methods. *J. Agric. Food. Chem.* 39(1), 2-11.
- Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Aguedo, M., Kádár, Z., 2015. Hydrothermal pretreatments of macroalgal biomass for biorefineries, in: Prokop, A., Bajpai,

- R.K., Zappi, M.E. (Eds.), Algal biorefineries. Springer International Publishing, pp. 467-491.
- Ruiz, H.A., Rodríguez-Jasso, R.M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., 2013. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: a review. *Renew. Sust. Energy. Rev.* 21, 35-51.
- Scholz, M.J., Weiss, T.L., Jinkerson, R.E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewits, M.C., Gerken, H.G., 2014. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell* . 13(11), 1450-1464.
- Sheng, J., Vannela, R., Rittmann, B.E., 2011. Evaluation of cell-disruption effects of pulsed-electric-field treatment of *Synechocystis* PCC 6803. *Environ. Sci. Technol.* 45(8), 3795-3802.
- Shuping, Z., Yulong, W., Mingde, Y., Chun, L., Junmao, T., 2010. Pyrolysis characteristics and kinetics of the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* using thermogravimetric analyzer. *Bioresour. Technol.* 101(1), 359-365.
- Smichi, N., Messaoudi, Y., Moujahed, N., Gargouri, M., 2016. Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. *Renew. Energy.* 85, 1357-1361.
- Spiden, E. M., Yap, B.H., Hill, D.R., Kentish, S. E., Scales, P.J., Martin, G.J., 2013. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresour. Technol.* 140, 165-171.
- Surendhiran, D., Vijay,M. 2014. Effect of Various Pretreatment for Extracting Intracellular Lipid from *Nannochloropsis oculata* under Nitrogen Replete and Depleted Conditions. *International Scholarly Research Notices.* Hindawi. Article ID 536310.
- Valorization of the aqueous phase obtained from hydrothermally treated *Dunaliella salina* remnant biomass. *Bioresour. Technol.* 219, 64-71.

- Van Der Maarel, M. J. E. C., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., & Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94(2), 137–155. doi:10.1016/S0168-1656 (01)00407-2
- Velasquez, J.A., Ferrando, F., Farriol, X., Salvado, J. 2003. Binderless fiberboard from steam exploded *Miscanthus sinensis*. *Wood Sci Technol* 37: 269–278.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D.E., Aguilar, C.N., Fernandes, B.D., Ruiz, H.A. 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Res. J.* 5(1), 780-791.
- Vieira Costa, J.A, de Moraes, M.G. 2014. An Open Pond System for Microalgal Cultivation” *Biofuels From Algae*, Chapter 1, In Pandey, A., Lee., D, Chisti, Y. Rsoccol, C., (ed.) USA. 2014;pp.1-22.
- Vigania, M., Parisi, C., Rodriguez-Cerezo, E., Barbosam M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M. and Enzing, C. 2014. Food and feed products from microalgae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology* 42 81-92.
- Vorobiev, E., Lebovka, N., 2015. Selective Extraction from Food Plants and Residues by Pulsed Electric Field, in: Chemat, F., Strube, J. (Eds.), *Green extraction of natural products: Theory and practice*, Wiley-VCH., pp. 307-332.
- Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM. Rapid biodiesel production using wet microalgae via microwave irradiation. *Energy Convers Manag* 2014;84:227–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.034>.
- Wang L, Weller CL (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol* 17: 300–312.
- Wang, K., Brown, R.C., Homsy, S., Martinez, L., Sidhu, S.S., 2013. Fast pyrolysis of microalgae remnants

- in a fluidized bed reactor for bio-oil and biochar production. *Bioresour. Technol.* 127, 494-499.
- Winarno, F.G. 1986. *Enzim Pangan dan Gizi*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 155 halaman.
- Xie, Y., Ho, S.H., Chen, C.N.N., Chen, C.Y., Jing, K., Ng, I.S., Chen, J., Chang, J.S., Lu, Y., 2016. Disruption of thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. F51 in high pressure homogenization as a prelude to carotenoids extraction. *Biochem. Eng. J.* 109, 243-251.
- Yang, C., Liu, W., He, Z., Thangavel, S., Wang, L., Zhou, A., Wang, A., 2015. Freezing/thawing pretreatment coupled with biological process of thermophilic *Geobacillus* sp. G1: acceleration on waste activated sludge hydrolysis and acidification. *Bioresour. Technol.* 175, 509-516.
- Yap, B. H.J., Dumsday, G.J., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2015. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresour. Technol.* 184, 280-285.
- Yoo, G., Park, M. S., & Yang, J.-W. 2015. Chemical Pretreatment of Algal Biomass. *Pretreatment of Biomass*, 227–258. doi:10.1016/b978-0-12-800080-9.00012-8.
- Yu, J., 2017. Application of an Ultrafine Shearing Method for the Extraction of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Journal Molecules.* 22(11), 2023; doi:10.3390/molecules22112023
- Zbinden, M.D.A., Sturm, B.S., Nord, R.D., Carey, W.J., Moore, D., Shinogle, H., Stagg-Williams, S.M., 2013. Pulsed electric field (PEF) as an intensification pretreatment for greener solvent lipid extraction from microalgae. *Biotechnol. Bioeng.* 110(6), 1605-1615.
- Zhang, T.Y., Hu, H.Y., Wu, Y.H., Zhuang, L.L., Xu, X.Q., Wang, X.X., Dao, G.H. 2016. Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 60 (2016) 1602–1614, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.02.008>.

- Zheng, Y., Xiao, R., Roberts, M., 2016. Polymer-enhanced enzymatic microalgal cell disruption for lipid and sugar recovery. *Algal Res.* 14, 100-108.
- Zhu, L.D., Hiltunen, E., Antila, E. Zhong, J.J., Yuan, Z.H., Wang, Z.M. 2014. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 30: 1035-1046.

Bahan bakar berbahan baku mikroalga memiliki potensi yang menjanjikan sebagai pengganti bahan bakar fosil, karena sifatnya yang berkelanjutan dan ramah lingkungan. Untuk meningkatkan produksi bahan bakar berbasis mikroalga perlu diupayakan proses *pretreatment* yang dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya metode kimia, *thermal*, fisika dan mekanik. Tujuan dari pretreatment ini adalah untuk mendisrupsi dinding sel mikroalga.

Pada produksi bioetanol dari mikroalga dilakukan menggunakan metode hidrolisis, baik dengan asam ataupun enzim. Hidrolisis asam memiliki keuntungan murah dari segi bahan baku, mudah prosesnya, namun membutuhkan alat yang anti korosi dan perlu proses netralisasi. Sedangkan enzim mahal dari segi bahan baku, namun kondisi operasi sedang, tidak membutuhkan konstruksi alat berbahan khusus, dan tidak menghasilkan limbah. Karbohidrat merupakan sumber utama bioetanol, sehingga kandungannya dalam suatu bahan perlu diukur. Beberapa metode yang digunakan untuk menentukan kuantitatif pati adalah perchloric acid, hydrochloric acid, dan enzymatic, sedangkan penentuan karbohidrat total diantaranya adalah metode kimia, fisika dan HPLC.█

Program Studi Teknik Kimia  
Fakultas Teknik Industri, UPN "Veteran" Yogyakarta  
Jl. SWK 104 Ringroad Utara, Condongcatur,  
Sleman, Yogyakarta

ISBN 978-623-7840-18-3

