

HIDROLISIS BIOMASSA MIKROALGA *Porphyridium cruentum* MENGUNAKAN ASAM (H₂SO₄ dan HNO₃) DALAM PRODUKSI BIOETANOL

Ni Wayan Sri Agustini¹ dan Nadhil Febrian²

¹) Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong, Bogor 16911
²) Sekolah Tinggi Teknologi Industri Farmasi
Jl. Kumbang No. 23 Bogor 16151, Indonesia

E-mail: wayan_sa2002@yahoo.com

Received : 15 Januari 2018; revised : 26 Februari 2018; accepted : 28 Maret 2018

ABSTRAK

HIDROLISIS BIOMASSA MIKROALGA *Porphyridium cruentum* MENGGUNAKAN ASAM (H₂SO₄ dan HNO₃) DALAM PRODUKSI BIOETANOL. *Porphyridium cruentum* ada salah satu jenis mikroalga uniseluler dari kelas Rhodophyceae yang memiliki karbohidrat. Kandungan karbohidratnya yang tinggi, sehingga mikroalga ini berpotensi sebagai sumber bioetanol. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui proses hidrolisis biomassa *P. cruentum* menggunakan asam untuk menghasilkan bioetanol. Biomassa *P. cruentum* dihidrolisis dengan menggunakan 2 jenis asam yaitu HNO₃ dan H₂SO₄. Variasi konsentrasi asam yang digunakan adalah 1%; 2% dan 3%, pada suhu 100 °C selama 60 menit. Fermentasi dilakukan selama 5 hari dengan menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*. Analisis karbohidrat menggunakan metoda fenol sulfat, gula pereduksi menggunakan metoda DNS, sedangkan analisis kadar etanol menggunakan *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Hasil dari studi ini, kandungan karbohidrat *P. cruentum* diperoleh sebesar 22,82%. Semakin tinggi konsentrasi asam yang digunakan, semakin tinggi pula kadar gula reduksi yang diperoleh. Kadar etanol dari biomassa yang dihidrolisis menggunakan H₂SO₄ maksimum dicapai pada konsentrasi 1% H₂SO₄ yaitu 34,5% dan dicapai pada hari ke-4, sedangkan biomassa yang dihidrolisis dengan HNO₃ maksimum dicapai pada konsentrasi 2% yaitu sebesar 14,83% pada hari ke-2. Penggunaan konsentrasi asam yang rendah dapat mengurangi efek negatif terhadap lingkungan. Mikroalga *P. cruentum* yang mengandung karbohidrat 22,82% dapat dijadikan sebagai salah satu bahan baku untuk menghasilkan bioetanol yang berkelanjutan.

Kata kunci : *Porphyridium cruentum*, Hidrolisis asam, Etanol

ABSTRACT

HYDROLYSIS OF MICROALGAE *Porphyridium cruentum* USING H₂SO₄ AND HNO₃ FOR BIOETHANOL PRODUCTION. *Porphyridium cruentum* is a unicellular microalgae from the Rhodophyceae, which has a high carbohydrate content (22% - 40%) and thus has the potential as a source of bioethanol. The aim of this study is to characterize the hydrolysis process of *P. cruentum* using acid for bioethanol production. Biomass of *P. cruentum* was hydrolyzed using 2 types of acids namely HNO₃ and H₂SO₄. The acid concentrations were 1%; 2% and 3%, at a temperature of 100 °C for 60 min. Fermentation was carried out for 5 days using *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate was analyzed using phenol sulphate method, reducing sugar was analyzed using the DNS method, while ethanol content was analyzed using *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. The results showed that the carbohydrate content was about 22.82%. The reduced sugar content obtained was proportional to the acid concentration. Maximum ethanol of 34.5% was obtained on hydrolyzed medium with 1% H₂SO₄ on the fourth day, and 1% HNO₃ of 14.83% on the second day. The use of low acid concentrations can reduce the negative effects on the environment. *P. cruentum* containing 22.82% carbohydrates could be used as a potential raw materials to produce sustainable bioethanol.

Key words : *Porphyridium cruentum*, Hydrolysis acid, Ethanol

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan tumbuhan air berukuran mikroskopik yang memiliki senyawa bioaktif sehingga berpotensi besar untuk dikembangkan menjadi sumber pakan, pangan, farmasi, kesehatan dan sumber energi. Pada saat ini, pemanfaatan mikroalga difokuskan dalam bidang akuakultur sebagai pakan alami untuk larva ikan dan udang pada kegiatan budidaya. Seiring dengan berkembangnya ilmu pengetahuan, penelitian-penelitian terbaru mikroalga dapat juga digunakan sebagai salah satu kandidat bahan baku penghasil biofuel dan bioetanol (Brown 2002).

Penggunaan mikroalga untuk produksi biofuel generasi ketiga memiliki banyak keunggulan. Mikroalga memiliki kemampuan tumbuh dengan cepat, tidak memerlukan area yang luas untuk kegiatan produksi, kemampuan tumbuh di bawah beberapa kondisi, termasuk di air limbah; mengurangi kebutuhan akan air dan input sumber daya lainnya; tidak memerlukan lahan subur untuk proses budidayanya, tidak berkompetisi dengan bahan pangan dan mikroalga mengandung karbohidrat yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku bioetanol (de Farias Silva dan Bertuccio 2016; Widjaja 2009).

Kandungan karbohidrat pada mikroalga berbeda-beda, tergantung pada spesies dan kondisi lingkungan hidupnya (G. Markou *et al.* 2013). Karbohidrat mikroalga terdapat pada lapisan dinding sel dalam dan lapisan dinding sel luar. Dinding sel luar mengandung polisakarida seperti pektin dan alginat, sedangkan lapisan dinding sel dalam sebagian besar mengandung selulosa, hemiselulosa dan bahan lainnya. Oleh karena itu, mikroalga dianggap sebagai bahan baku untuk produksi bioetanol. Salah satu mikroalga yang memiliki kandungan karbohidrat yang cukup tinggi adalah *P. cruentum*. *P. cruentum* memiliki kandungan kadar karbohidrat 22% - 40%. Oleh karena itu, *P. cruentum* diharapkan dapat sebagai alternatif bahan baku untuk produksi bioetanol (Kwangdinata, Raya, dan Zakir 2014).

Proses produksi bioetanol dari biomassa melalui beberapa tahapan yaitu preparasi bahan baku, hidrolisis dan fermentasi. Ketiadaan lignin dalam sel mikroalga menyebabkan preparasi bahan dan proses hidrolisis menjadi lebih mudah (Harun dan Danquah 2011; Assadad, Utomo, dan Sari 2010). Beberapa metode hidrolisis telah dikembangkan dan digunakan untuk hidrolisis karbohidrat biomassa. Metode yang paling umum untuk hidrolisis karbohidrat adalah dengan menggunakan enzim. Namun, hidrolisis dengan menggunakan asam atau basa kuat juga dapat dilakukan (Tasi *et al.* 2009). Keterbatasan penggunaan karbohidrat yang bersumber dari mikroalga untuk produksi bioetanol adalah ragi (*yeast*). Ragi hanya dapat

memfermentasi gula-gula sederhana, seperti glukosa, fruktosa dan lain-lain, sehingga, sebelum dimanfaatkan sebagai media fermentasi, karbohidrat mikroalga (polimer gula) pertama-tama harus dihidrolisis terlebih dahulu agar menjadi gula sederhana (Talebnaia, Karakashev, dan Angelidaki 2010).

Dinding sel mikroalga tidak memiliki lignin seperti biomassa lainnya (jerami, kayu, tanda kosong kelapa sawit, dan rerumputan) (Ho *et al.* 2013; Assadad, Utomo, dan Sari 2010). Oleh karena itu, proses hidrolisis biomassa dengan menggunakan asam merupakan suatu hal yang tepat (Assadad, Utomo, dan Sari 2010). Hasil penelitian Monavari, Galbe, and Zacchi (2009), hidrolisis dengan menggunakan asam menghasilkan glukosa sekitar 94,2%. Setelah proses hidrolisis selulosa atau karbohidrat menjadi gula sederhana, tahap selanjutnya adalah melakukan proses fermentasi. Fermentasi ini dapat dilakukan dalam kondisi anaerob atau tanpa oksigen.

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses fermentasi untuk menghasilkan etanol adalah pH, suhu, dan jenis mikroba yang digunakan (Dien, Cotta, dan Jeffries 2003). Umumnya, untuk produksi bioetanol digunakan jenis mikroba *Saccharomyces cerevisiae* karena mikroba ini diketahui dapat mengkonversi glukosa menjadi bioetanol dengan baik dan tahan terhadap temperatur yang tinggi (Minarni, Ismuyanto, dan Sutrisno 2013).

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, maka studi ini bertujuan untuk mengkaji penggunaan biomassa mikroalga *P. cruentum* yang dihidrolisis dengan 2 jenis asam H_2SO_4 dan HNO_3 yang selanjutnya digunakan sebagai substrat untuk proses fermentasi dengan menggunakan kapang *Saccharomyces cerevisiae*. Etanol yang terbentuk diukur kadarnya dengan menggunakan HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mikroalga merah *Porphyridium cruentum* dan *Saccharomyces cerevisiae* merupakan kultur koleksi Laboratorium Mikroalga Air Tawar Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong. Media pertumbuhan mikroalga *P. cruentum* menggunakan media Johnson yang terdiri dari (g/L): 0,5 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,5 $MgCl_2$; 0,2 $CaCl_2$; 0,5 KNO_3 ; 0,035 KH_2PO_4 ; 0,045 $NaHCO_3$; 27 $NaCl$; Larutan Mikronutrien (1 ml/L); dan Larutan Fe-EDTA (1 ml/L). Media pertumbuhan *S. cerevisiae* menggunakan media: *PDA (Potato Dextrose Agar)* 3,9 (g/ml); *yeast extract* 0,3%; dan *pepton* 0,5%. Pereaksi analisis karbohidrat dan gula pereduksi: fenol 5%;

H₂SO₄ pekat; pereaksi DNS (NaOH; KNaC₄H₄O₆; Na₂S₂O₅; DNS); dan Glukosa.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometer UV-VIS (Hitachi U-3900H), sentrifuse (Hitachi CT6EL), Botol kultur (Schoot-duran), mikroskop (Nikon-Japan), Autoklaf (TOMY ES-315), mikropipet ukuran 1000 µl dan 5000 µl (Gilson), *laminar air flow* (Esco Class II BSC), *magnetic stirrer* (Thermolyne), oven tipe T 6200 (Haraeus Instrument), *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)* Shimadzu LC 20A.

Metode

Kultivasi *P. cruentum*.

P. cruentum dikultivasi dalam media Johnson pada botol kaca berkapasitas 2000 ml dengan intensitas cahaya 3000 lux menggunakan lampu neon 40 watt dan sistem aerasi secara terus menerus menggunakan *blower*. Kepadatan sel *P. cruentum* diukur menggunakan metode Turbidimetri dengan mengukur nilai *Optical Density (OD)* pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 680 nm. Setelah mencapai fase logaritmik, kultur dipanen dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, biomassa dikeringkan pada oven dengan suhu 50 °C.

Penentuan Kadar Karbohidrat (Gula Total) Biomasa *P. cruentum* (Dubois et al. 1956)

Analisis karbohidrat dengan menggunakan metoda Fenol-sulfuric acid. Sebanyak 10 mg biomassa kering *P. cruentum* ditambah 0,5 ml fenol 5% dan 2,5 ml H₂SO₄ pekat lalu dikocok dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 30 menit. Pengukuran sampel dilakukan secara triplo dan diukur absorbannya pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 490 nm. Kadar karbohidrat dihitung dengan memplotkan nilai absorbansi yang diperoleh pada standar baku glukosa yang telah dibuat.

Analisis Gula Reduksi

Pengukuran gula reduksi menggunakan metoda *3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)*. Sebanyak 1 ml sampel ditambah 1 ml reagen DNS, kemudian dicampur dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Pengukuran gula reduksi dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 540 nm. Penentuan kadar gula reduksi berdasarkan kurva standar glukosa.

Hidrolisis Biomassa *P. cruentum*

Hidrolisis biomassa *P. cruentum* menggunakan 2 jenis asam yaitu H₂SO₄ dan HNO₃ dengan konsentrasi masing-masing 1%;

2%; 3%. Sebanyak ± 5 gram biomassa *P. cruentum* dihidrolisis pada suhu 100 °C selama 60 menit. Setelah itu, hidrolisat disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Biomassa (endapan) dibuang sedangkan supernatan (hidrolisat) diambil dan dipisahkan.

Pembuatan Media Inokulum *S. cerevisiae*

Pembuatan media inokulum dengan komposisi (g/L): pepton 0,7 g dan ekstrak yeast 0,36 g. Media disterilkan, didinginkan lalu ditambahkan stok kultur murni *S. cerevisiae* dengan perbandingan 1:5. Kemudian dikocok dengan *shaker* selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah 48 jam, media inokulum digunakan untuk fermentasi.

Fermentasi

Supernatan hasil hidrolisis (hidrolisat) Keasamannya diatur pada pH 4-5 dengan penambahan NaOH 10%. Setelah itu, hidrolisat ditambahkan nutrisi yang terdiri dari (g/L): NH₄SO₄ 2; K₂HPO₄ 1; KH₂PO₄ 1; ZnSO₄ 0,2; MgSO₄ 0,2; dan *Yeast extract* 2. Kemudian, hidrolisat disteril menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Sebanyak 10% *S. cerevisiae* ditambahkan ke dalam masing-masing 100 ml hidrolisat yang sudah steril. Setelah itu, dilakukan inkubasi selama 5 hari pada suhu ruang dan dikocok menggunakan *shaker*.

Analisis Bioetanol Menggunakan HPLC

Instrumen yang digunakan adalah Shimadzu SPD-20A, kolom C18 (Brige) ukuran 4,6 mm x 150 mm dengan fase gerak asetonitril. Langkah kerja yang dilakukan meliputi :

- Larutan standar etanol dengan konsentrasi 48%, 24%, dan 12% digunakan sebagai pembanding sampel uji pada HPLC.
- Sampel yang akan diuji disaring menggunakan *syringe filter* 0,45 µm lalu dimasukkan ke dalam *Vidal HPLC* kemudian disonifikasi selama 10 menit. Asetonitril dan akuades disaring dengan menggunakan *syringe filter* 0,45 µm, kemudian disonifikasi selama 10 menit.
- Uji Linieritas
 - Diambil larutan standar etanol 48%, 24%, dan 12% yang sudah dibuat sebelumnya.
 - Masukkan ke dalam injektor, lalu dijalankan alat CKKT, dicatat luas puncak yang muncul.
 - Hitung regresi linier dari larutan standar etanol tersebut, untuk menghitung kandungan etanol yang terdapat pada sampel uji.
- Penetapan kadar bioetanol dari Mikroalga *P. cruentum* dihitung dengan menggunakan persamaan garis yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi larutan baku etanol dengan luas puncak.

HASIL DAN PEMBAHASAN

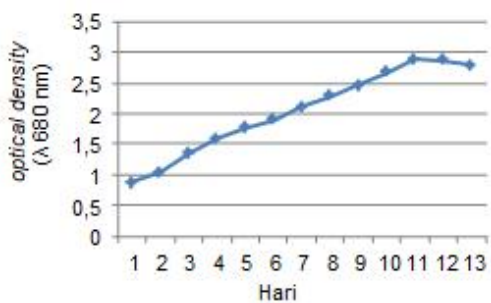
Pertumbuhan Mikroalga *P. cruentum*

Pertumbuhan dan perkembangan sel mikroalga *P. cruentum* diamati setiap hari hingga mencapai fase logaritmik. Sel *P. cruentum* berbentuk *uniselluler* dan mengeluarkan senyawa *mucilago* (polisakarida sulfat) ke dalam medium. Senyawa ini dapat mengikat satu sel dengan sel lainnya, sehingga bila dilihat di bawah mikroskop selnya terlihat berkoloni. Oleh karena itu, pengamatan kepadatan sel dilakukan dengan metoda Turbidimetri pada panjang gelombang 680 nm. Hasil pengukuran kepadatan sel *P. cruentum* dapat dilihat pada Gambar 1.

Pertumbuhan mikroorganismenya lebih ditunjukkan oleh adanya peningkatan jumlah mikroorganismenya dan bukan peningkatan ukuran sel individu (Pratiwi 2008). Pertumbuhan *P. cruentum* dalam media Johnson ditandai dengan adanya perubahan warna dan peningkatan nilai *optical density* 680 nm.

Berdasarkan hasil pengamatan selama 13 hari masa kultivasi terlihat bahwa pertambahan jumlah sel *P. cruentum* terlihat terus meningkat seiring bertambahnya waktu kultivasi, hal ini ditandai dengan meningkatnya nilai serapan yang didapat (Gambar 1). Setelah 24 jam masa kultivasi kepadatan sel *P. cruentum* terus meningkat hingga hari ke-10 dan pada saat itu sel *P. cruentum* memasuki fase logaritmik dengan nilai serapan sebesar 2,882 pada panjang gelombang 680 nm. Pada hari ke-10, pertumbuhan sel mulai melambat, pada saat ini sel mengalami fase stasioner. Pada fase ini terjadi keseimbangan antara jumlah sel yang mati dan yang hidup, karena adanya keterbatasan nutrisi dan cahaya yang masuk ke dalam kultur (*self shading*) (Becker 1994).

Pemanenan biomassa *P. cruentum* dilakukan pada saat sel mengalami fase logaritmik akhir yaitu hari ke-9. Hal ini karena, pada saat itu produksi karbohidrat yang merupakan metabolit primer dan digunakan bahan baku untuk produksi bioetanol mencapai produksi yang optimal.



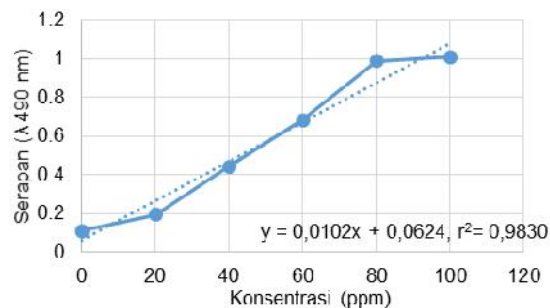
Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *P. cruentum*

Kandungan Karbohidrat (Gula Total) *P. cruentum*

Metoda yang digunakan untuk kadar karbohidrat biomassa *P. cruentum* dilakukan dengan metode fenol-sulfat (Dubois *et al.* 1956), metode ini juga disebut dengan metode TS (*Total Sugar*), yaitu dengan cara penambahan fenol 5% dan asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Fenol digunakan untuk mendeteksi gula sederhana dan dengan asam sulfat (H_2SO_4) pekat akan menghasilkan warna jingga kekuningan. Penentuan kadar karbohidrat (gula total) *P. cruentum* didasarkan pada regresi linier baku standar glukosa (Gambar 2).

Berdasarkan hasil pengukuran serapan baku standar glukosa yang telah diperoleh dapat dihitung persamaan regresinya, yaitu $y = 0,0102x + 0,0624$ dengan nilai $r^2 = 0,9830$. Kadar karbohidrat dari biomassa *P. cruentum* yang dikultivasi dalam medium Johnson dan dipanen setelah 9 hari masa kultivasi sebesar 22,82%. Menurut Borowitzka and Borowitzka (1988), kadar karbohidrat *P. cruentum* berkisar 22% - 40%, sedangkan menurut Milano *et al.* (2016), karbohidrat yang terkandung dalam sel *P. cruentum* sebesar 40% - 57%. Perbedaan kadar karbohidrat ini dimungkinkan faktor nutrisi dan kondisi lingkungan saat kultivasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Becker (1994) yang mengemukakan bahwa ketersediaan unsur nitrogen dan fosfor sebagai salah satu unsur nutrisi, suhu, intensitas cahaya, pH medium, suplai CO_2 dapat mempengaruhi kualitas nutrisi dalam biomassa mikroalga.

Kandungan karbohidrat (gula total) pada mikroalga berbeda-beda, tergantung pada spesies dan kondisi lingkungan hidupnya. Karbohidrat pada mikroalga terletak pada dinding sel dalam bentuk selulosa dan di plastid dalam bentuk pati sebagai cadangan utama gula (Velazquez-Lucio *et al.* 2018). Sekitar 4% - 7% dalam bentuk selulosa dan sekitar 51% - 60% dalam bentuk gula netral non selulosa (Widjaja 2009). Menurut Chen *et al.* (2013), dinding sel mikroalga terdiri dari polisakarida tertentu, seperti selulosa, pektin, agar, dan alginat, yang isinya berbeda diantara spesies.



Gambar 2. Kurva Baku Standar Glukosa dengan Metode Fenol-Sulfat

Simon-Bercovitch, Bar-Zvi, dan Arad (1999) mengemukakan dinding sel mikroalga merah *Porphyridium* sp. terdiri dari polisakarida amorf kompleks (6-7 × 106 Da). Polisakarida terdiri dari xilosa, glukosa, dan galaktosa sebagai gula utama, serta beberapa gula kecil, protein, sulfat, dan asam glukuronat.

Hidrolisis

Proses hidrolisis pada studi ini menggunakan asam anorganik H₂SO₄ dan HNO₃ dengan variasi konsentrasi (1%, 2%, 3%). *S. cerevisiae* yang digunakan pada studi ini hanya mampu memanfaatkan gula-gula sederhana (monosakarida) sebagai media pertumbuhannya, sehingga sebelum digunakan sebagai media fermentasi, karbohidrat dalam biomassa mikroalga (polimer gula) harus dihidrolisis terlebih dahulu agar menjadi gula sederhana (Talebna, Karakashev, and Angelidaki 2010).

Penggunaan variasi asam yang rendah bertujuan menghindari efek negatif yang ditimbulkan terhadap lingkungan. Proses hidrolisis dalam penelitian dilakukan pada suhu 100 °C selama 60 menit, suhu yang lebih tinggi akan mempermudah dekomposisi gula sederhana (Osvaldo, Panca, dan Faizal 2012). Hasil proses hidrolisis biomassa menggunakan H₂SO₄ dan HNO₃ dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan studi ini, terlihat perbedaan warna antara biomasa yang dihidrolisis menggunakan H₂SO₄ dan HNO₃. Biomasa yang dihidrolisis dengan menggunakan H₂SO₄ sampel berubah menjadi warna coklat kehitaman, hal ini dikarenakan H₂SO₄ sebagai agen dehidrasi dapat menyerap kandungan air (H dan O) dalam suatu bahan yang mengandung karbohidrat, maka penambahan H₂SO₄ pekat akan menyebabkan karbohidrat terdehidrasi (Judoamidjojo, Sa'id, dan Hartoto 1989). Sedangkan hasil hidrolisis dengan menggunakan HNO₃ sampel berubah menjadi warna kekuningan dan keruh serta biomassa mengambang naik ke atas permukaan, hal ini dimungkinkan pada saat di dalam air, HNO₃ terdisosiasi menjadi ion-ionnya, yaitu ion nitrat dan ion hidronium sehingga membentuk warna kuning hingga jingga (Dogra 1990).



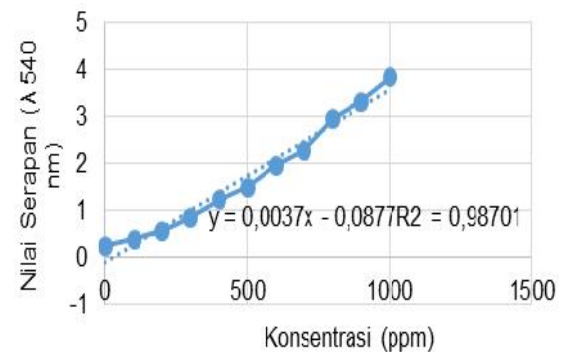
Gambar 3. Hasil hidrolisis biomassa *P. cruentum* menggunakan (A) H₂SO₄ dan (B) HNO₃

Kadar Gula Reduksi Biomassa *P.cruentum* yang dihidrolisis dengan H₂SO₄ dan HNO₃

Proses hidrolisis pada studi ini menggunakan 2 jenis asam dengan berbagai konsentrasi. Penggunaan asam karena sel mikroalga tidak memiliki lignin sehingga penggunaan asam merupakan suatu hal yang tepat untuk hidrolisis biomassa mikroalga (Assadad, Utomo, dan Sari 2010). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Girio *et al.* (2010), menunjukkan bahwa penggunaan asam dapat menghasilkan glukosa sekitar 70% - 95%. (de Farias Silva dan Bertucco 2016) menyatakan bahwa hidrolisis biomasa mikroalga dengan menggunakan asam H₂SO₄ lebih efisien dibandingkan menggunakan enzim (amilase dan selulase).

Ketersediaan gula reduksi dalam medium fermentasi merupakan salah satu unsur penting bagi pertumbuhan *S. cerevisiae* sebagai sumber karbon untuk menghasilkan bioetanol. Pada studi ini, penentuan gula reduksi dengan menggunakan metoda DNS. DNS merupakan senyawa somatis yang akan bereaksi dengan gula reduksi maupun komponen pereduksi lainnya untuk membentuk *3-amino-5-nitrosalicylic acid*. Bila terdapat gula reduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula reduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan yang dapat diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 540 nm. Penentuan kadar gula reduksi dihitung berdasarkan hasil persamaan regresi linier kurva baku glukosa $y = 0,0037x + 0,0877$ dengan nilai $r^2 = 0,98701$ (Gambar 4).

Kadar gula reduksi yang diperoleh pada studi ini menunjukkan bahwa, semakin tinggi konsentrasi asam yang digunakan, semakin tinggi pula kadar gula reduksinya (Gambar 5). Hal ini sesuai dengan studi Fontana *et al.* (2001), yang menyatakan bahwa semakin tinggi kekuatan asam, semakin tinggi glukosa yang dihasilkan.

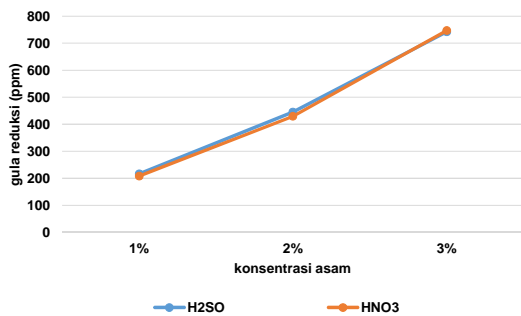


Gambar 4. Kurva baku standar glukosa untuk penentuan gula pereduksi

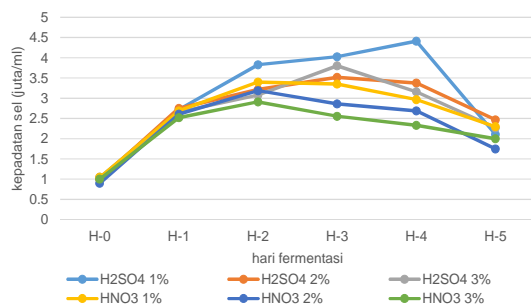
Kadar gula reduksi dari biomasa yang dihidrolisis dengan HNO_3 lebih tinggi, jika dibandingkan dengan menggunakan H_2SO_4 . Pada medium yang dihidrolisis dengan konsentrasi 3% HNO_3 diperoleh kadar gula pereduksi sebesar 747,15 ppm, sedangkan pada medium yang dihidrolisis dengan 3% H_2SO_4 sebesar 717,45 ppm (Gambar 5). Hasil ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Giorgos *et al.* (2013), bahwa gula reduksi dari biomasa *Arthospira platensis* yang dihidrolisis dengan HNO_3 lebih tinggi daripada dengan H_2SO_4 dan HCl .

Pertumbuhan Sel *S. cerevisiae* Selama Fermentasi

Fermentasi merupakan proses pengubahan glukosa menjadi bioetanol melalui jalur metabolismenya yang berlangsung secara anaerob. Pada penelitian ini fermentasi menggunakan *S. cerevisiae*, karena ragi ini mampu memfermentasi berbagai jenis gula dalam memproduksi etanol, dibandingkan dengan mikroorganisme lain. Pola pertumbuhan *S. cerevisiae* selama 5 hari, proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 5. Kadar gula reduksi biomasa *P. cruentum* yang dihidrolisis dengan H_2SO_4 dan HNO_3



Gambar 6. Grafik Jumlah Sel *S. cerevisiae* selama 5 hari fermentasi

Pada semua medium fermentasi, glukosa dikonsumsi hampir setengahnya setelah 24 jam. Hal ini secara visual terlihat kekeruhan warna kultur meningkat. Kekeruhan ini dimungkinkan sebagai akibat dari perubahan fisiologis dalam sel dan/atau asimilasi substrat sekunder (sukrosa, fruktosa, dan lain-lain) (Scholz, Riley, dan Cuello 2013).

Pada Gambar 6, tampak pertumbuhan sel *S. cerevisiae* pada hidrolisat menggunakan HNO_3 lebih rendah dibandingkan H_2SO_4 . Kepadatan sel tertinggi pada medium yang dihidrolisis HNO_3 ditunjukkan pada medium 1% HNO_3 yaitu $3,38 \cdot 10^6$ sel/ml yang terjadi pada hari ke-2, sedangkan yang dihidrolisis dengan H_2SO_4 ditunjukkan pada medium 2% H_2SO_4 yaitu $4,41 \cdot 10^6$ sel/ml yang terjadi pada hari ke-4.

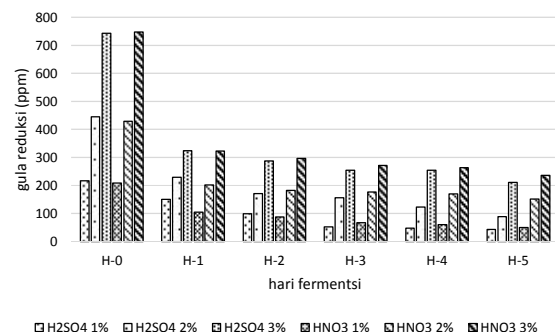
Kadar Gula Reduksi Selama Fermentasi

Kadar gula reduksi dapat dijadikan indikator yang menunjukkan berjalannya proses fermentasi. Pada Gambar 5 terlihat, selama proses fermentasi terjadi penurunan kadar gula pereduksi dalam substrat, hal ini karena gula reduksi digunakan oleh kapang *S. cerevisiae* sebagai sumber karbon untuk membentuk energi selama pertumbuhannya (Gambar 7).

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 7, terlihat kadar gula reduksi mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Penurunan kadar gula reduksi diikuti oleh peningkatan jumlah sel *S. cerevisiae* yang menandakan adanya aktivitas *S. cerevisiae* memanfaatkan gula sebagai sumber energi. Penurunan kadar gula reduksi terbesar dapat dilihat pada sampel hidrosilat yang dihidrolisis menggunakan H_2SO_4 1% dan HNO_3 1%.

Kadar Karbohidrat Selama Proses Fermentasi

Kadar karbohidrat selama proses fermentasi dapat dilihat pada Gambar 8.



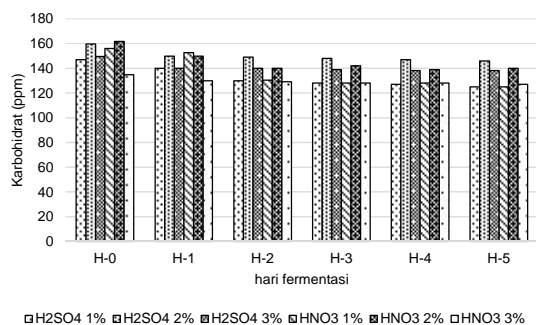
Gambar 7. Kadar gula reduksi substrat fermentasi yang dihidrolisis dengan asam HNO_3 dan H_2SO_4 selama 5 hari masa fermentasi

Berdasarkan studi ini, setelah dilakukan fermentasi selama 5 hari, ternyata kandungan karbohidrat (total gula) masih terdapat pada semua medium fermentasi, hingga hari ke lima kandungan karbohidrat yang masih terdapat pada medium fermentasi sekitar 125-146 ppm (H_2SO_4) dan 125-140 ppm (HNO_3). Hal ini menunjukkan bahwa karbohidrat yang terkandung dalam biomassa *P. cruentum* tidak dapat terurai sempurna menjadi monosakarida. Hal ini menyebabkan terhambatnya proses fermentasi dalam pembentukan etanol. Diketahui bahwa *S. cerevisiae*, hanya dapat memanfaatkan gula-gula sederhana (monosakarida).

Berdasarkan studi ini, agar fermentasi berjalan optimal, maka harus dilakukan penelitian lebih lanjut tentang proses hidrolisis dari biomasa *P. cruentum*. Kemungkinan yang dapat dilakukan adalah sakarifikasi dengan menggunakan enzim atau kombinasi antara hidrolisis dengan asam dilanjutkan sakarifikasi dengan enzim. Sebagai pertimbangan menurut (Alvira *et al.* 2010), mengemukakan sampai saat ini komposisi dan karakterisasi secara terperinci karbohidrat dari beberapa spesies mikroalga belum banyak yang diketahui (Alvira *et al.* 2010). Komposisi dinding sel mikroalga tidak jelas dan dinding sel karbohidrat berbeda dari tanaman, sehingga penggunaan enzim dalam proses sakarifikasi perlu dilakukan pengujian. Untuk memverifikasi degradasi enzimatik pada dinding sel mikroalga, berbagai jenis enzim yang dapat digunakan adalah pektinase, selulase, amilase, xilanase, β -glukosidase, lisozim, sulfatase, kitinase, dan pektoliase (Gerken, Donohoe, dan Knoshaug 2013).

Kadar Etanol Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Tahap awal analisis ini dengan pembuatan larutan standar etanol menggunakan konsentrasi 48%, 24%, dan 12% yang bertujuan untuk pembandingan sampel pada uji KCKT. Pengukuran standar baku etanol juga bertujuan untuk mengetahui waktu retensi kadar etanol.



Gambar 8. Grafik Kadar Karbohidrat Selama Proses Fermentasi

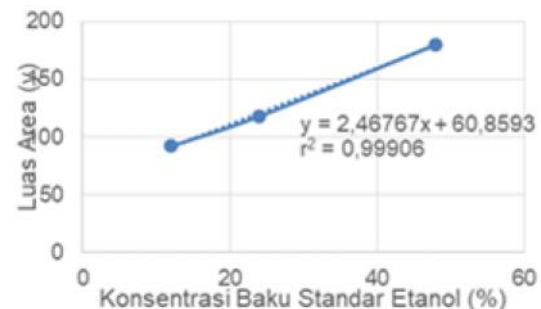
Hasil pengukuran larutan standar baku etanol dapat dilihat pada Gambar 9. Hasil perhitungan persamaan regresi kurva menggunakan 3 larutan baku dengan konsentrasi berbeda lalu dibuat kurva kalibrasi dengan konsentrasi (%) sebagai sumbu X dan luas area sebagai sumbu Y, diperoleh persamaan garis $y = 60.85931 + 2.46767x$, dengan koefisien relasi (r) sebesar 0,99906.

Berdasarkan persamaan regresi yang telah dibuat, pada Gambar 10 terlihat kadar etanol tertinggi dicapai pada medium fermentasi H_2SO_4 1% yang terjadi pada hari ke-4 yaitu 34,58%, sedangkan pada biomassa yang dihidrolisis dengan HNO_3 2% optimum dicapai pada hari ke-2 yaitu sebesar 14,83%.

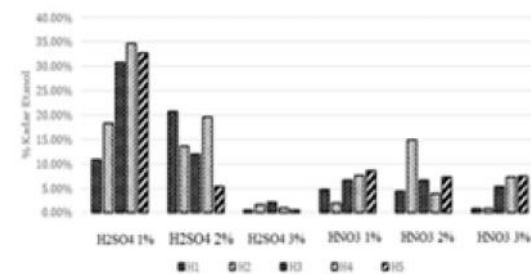
Pada studi ini, ternyata peningkatan dan penurunan kadar etanol dipengaruhi oleh pertumbuhan *S. cerevisiae* serta kadar gula pereduksi yang terkandung pada medium fermentasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada hari kedua merupakan fase peningkatan pertumbuhan sel *S. cerevisiae* yang disebut dengan fase log, dimana fase ini menghasilkan metabolit primer. Metabolit primer *S. cerevisiae* diantaranya etanol, aseton, asam laktat dan butanol.

Nilai pH Selama Fermentasi

Besarnya kadar etanol yang dihasilkan dari proses fermentasi tidak dapat ditentukan



Gambar 9. Kurva larutan standar etanol

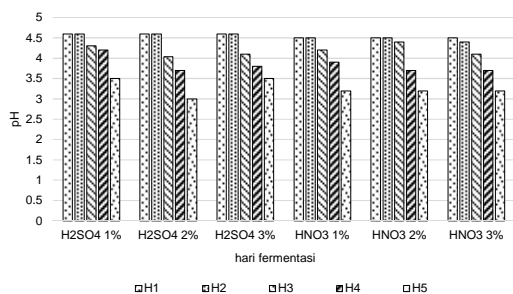


Gambar 10. Kadar etanol selama 5 hari fermentasi

hanya berdasarkan konsentrasi gula yang dihasilkan tetapi dapat dipengaruhi juga oleh banyak faktor, diantaranya yaitu suhu, waktu fermentasi, penambahan nutrisi dan pH.

Selama berlangsungnya proses fermentasi, pH media cenderung mengalami perubahan, hingga menjadi lebih asam yaitu 3,2-3,5 pada hari ke-5 fermentasi (Gambar 11). Nilai pH optimum pada studi ini adalah pH 4,2 untuk fermentasi dengan menggunakan 1% H₂SO₄ yang terjadi pada hari ke-4 dan pH 4,5 untuk fermentasi menggunakan 1% HNO₃. Menurut (Zamora 2009), perubahan pH disebabkan oleh adanya asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat dan asam piruvat yang terbentuk selama proses fermentasi, sedangkan asam-asam lainnya seperti asam butirat hanya sedikit berpengaruh dalam penurunan pH (Mohd-Zaki *et al.* 2016). Menurut (Judoamidjojo, Sa'id, dan Hartoto 1989), kecenderungan media fermentasi semakin asam disebabkan amonia yang digunakan sel khamir sebagai sumber nitrogen diubah menjadi NH₄⁺. Molekul NH₄⁺ akan menggabungkan diri ke dalam sel sebagai R-NH₃. Dalam proses ini H⁺ ditinggalkan dalam media, sehingga semakin lama waktu fermentasi semakin rendah pH media.

Tingkat keasaman medium semakin menurun menyebabkan proses fermentasi mulai berjalan kurang efektif yang dapat mempengaruhi pembentukan hasil samping, seperti asam asetat. Beberapa pendapat hasil studi dilaporkan bahwa pH optimum *S. cerevisiae* untuk produksi bioetanol dengan menggunakan bahan molase yaitu pH 5,3 (Hoda *et al.* 2010) dan menurut Mukhtar *et al.* (2010) pH optimum khamir pH 4,6 sampai dengan pH 4,8.



Gambar 11. pH medium selama proses fermentasi

KESIMPULAN

Proses hidrolisis menggunakan 1% H₂SO₄ dapat dijadikan salah satu alternatif degradasi karbohidrat biomassa *P. cruentum*. Mikroalga *P. cruentum* yang mengandung karbohidrat 22,82% dapat dijadikan sebagai salah satu bahan baku untuk menghasilkan bioetanol yang berkelanjutan.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, dan M.J. Negro. 2010. "Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review." *Bioresource Technology* 101 (13): 4851–61. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2009.11.093>.
- Assad, L., B.S.B. Utomo, dan R.N. Sari. 2010. "Pemanfaatan Mikroalga Sebagai Bahan Baku Bioetanol." *Squalen* 5 (2): 51–58.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Edited by S.J. Baddiley, N.H. Carey, I.J. Higgins, and W.G. Potter. New York: Cambridge University Press.
- Borowitzka, M.A., dan L.J. Borowitzka. 1988. *Microalgal Biotechnology*. New York: Cambridge University Press. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.280470214>.
- Brown, M.R. 2002. "Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture." In *Avances En Nutricion Acuicola*, edited by L. E. Cruz-Suarez, D. Ricque-Marie, M. Tapia-Salazar, M.G. Gaxiola-Cortes, and N. Simoes. Vol. VI. Mexico. <https://doi.org/10.5772/30576>.
- Chen, Chun-Yen, Xin-Qing Zhao, Hong-Wei Yen, Shih-Hsin Ho, Chieh-Lun Cheng, and Feng-Wu Bai. 2013. "Microalgae-Based Carbohydrates for Biofuel Production." *Biochemical Engineering Journal* 78 (September): 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2013.03.006>.
- Dien, B. S., M. A. Cotta, dan T. W. Jeffries. 2003. "Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status." *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (3): 258–66. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1444-y>.

- Dogra, S.K. 1990. *Kimia Fisika Dan Soal-Soal*. Jakarta: UI Press.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, dan F. Smith. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–56. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.
- Farias Silva, C.E. de, dan A. Bertucco. 2016. "Bioethanol from Microalgae and Cyanobacteria: A Review and Technological Outlook." *Process Biochemistry* 51 (11): 1833–42. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.02.016>.
- Fontana, J.D., M. Passos, M. Baron, S.V. Mendes, dan L.P. Ramos. 2001. "Cassava Starch Maltodextrinization/Monomerization Through Thermopressurized Aqueous Phosphoric Acid Hydrolysis." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91–93 (1–9): 469–78. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:469>.
- Gerken, H.G., B. Donohoe, dan E.P. Knoshaug. 2013. "Enzymatic Cell Wall Degradation of Chlorella Vulgaris and Other Microalgae for Biofuels Production." *Planta* 237 (1): 239–53. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1765-0>.
- Gírio, F. M., C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik. 2010. "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review." *Bioresource Technology* 101 (13): 4775–4800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>.
- Harun, R., dan M.K. Danquah. 2011. "Enzymatic Hydrolysis of Microalgal Biomass for Bioethanol Production." *Chemical Engineering Journal* 168 (3): 1079–84. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2011.01.088>.
- Ho, Shih-Hsin, Shu-Wen Huang, Chun-Yen Chen, dan T. Hasunuma. 2013. "Characterization and Optimization of Carbohydrate Production from an Indigenous Microalga Chlorella Vulgaris FSP-E." *Bioresource Technology* 135 (May): 157–65. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.10.100>.
- Hoda, S., N. Ghasem, R. Sirous, dan S. Mazyar. 2010. "Optimal Growth of Saccharomyces Cerevisiae (PTCC 24860) on Pretreated Molasses for Ethanol Production: Application of Response Surface Methodology." *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly* 16 (2): 199–206. <https://doi.org/10.2298/ciceq100201029s>.
- Judoamidjojo, R.M., E.G. Sa'id, dan L. Hartoto. 1989. *Biokonversi*. Bogor: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Dirjen Dikti, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
- Kwangdinata, R., I. Raya, dan M. Zakir. 2014. "Production of Biodiesel from Lipid of Porphyridium Cruentum through Ultrasonic Method." *ISRN Renewable Energy* 2014: 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/107278>.
- Markou, G., I. Angelidaki, E. Nerantzis, dan D. Georgakakis. 2013. "Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of Arthrospira (Spirulina) Platensis." *Energies* 6 (8): 3937–50. <https://doi.org/10.3390/en6083937>.
- Markou, G., I. Angelidaki, E. Nerantzis, dan D. Georgakakis. 2013. "Bioethanol Production by Carbohydrate-Enriched Biomass of Arthrospira (Spirulina) Platensis." *Energies* 6 (8): 3937–50. <https://doi.org/10.3390/en6083937>.
- Milano, J., H.C.n Ong, H.H. Masjuki, W.T. Chong, M.K. Lam, P.K. Loh, dan V. Vellayan. 2016. "Microalgae Biofuels as an Alternative to Fossil Fuel for Power Generation." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58 (May): 180–97. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2015.12.150>.
- Minarni, N., B. Ismuyanto, dan S. Sutrisno. 2013. "Pembuatan Bioetanol Dengan Bantuan Saccharomyces Cerevisiae Dari Glukosa Hasil Hirólisis Biji Durian (Durio Zibethinus)." *Jurnal Ilmu Kimia Universitas Brawijaya* 1 (1): pp.36-42. <http://kimia.studentjournal.ub.ac.id/index.php/jikub/article/view/76>.
- Mohd-Zaki, Z., J.R. Bastidas-Oyanedel, Y. Lu, R. Hoelzle, S. Pratt, F.R. Slater, dan D.J. Batstone. 2016. "Influence of PH Regulation Mode in Glucose Fermentation on Product Selection and Process Stability." *Microorganisms* 4 (1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010002>.
- Monavari, S., M. Galbe, dan G. Zacchi. 2009. "The Influence of Solid/Liquid Separation Techniques on the Sugar Yield in Two-Step Dilute Acid Hydrolysis of Softwood Followed by Enzymatic Hydrolysis." *Biotechnology for Biofuels* 2: 1–9. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-6>.
- Mukhtar, K., M. Asgher, S. Afghan, K. Hussain, dan S. Zia-Ul-Hussnain. 2010. "Comparative Study on Two Commercial Strains of Saccharomyces Cerevisiae for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 2–7. <https://doi.org/10.1155/2010/419586>.
- Oswaldo, Z.S., P.S. Panca, dan M. Faizal. 2012. "Pengaruh Konsentrasi Asam Dan Waktu Pada Proses Hidrolisis Dan Fermentasi

- Pembuatan Bioetanol Dari Alang-Alang.” *Jurnal Teknik Kimia* 18 (2): 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2011.02.026>.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Scholz, M.J., M.R. Riley, dan J.L. Cuello. 2013. “Acid Hydrolysis and Fermentation of Microalgal Starches to Ethanol by the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Biomass and Bioenergy* 48 (January): 59–65. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2012.10.026>.
- Simon-Bercovitch, B., D. Bar-Zvi, dan S.M. Arad. 1999. “Cell-Wall Formation during the Cell Cycle of *Prorhodidium* Sp. (Rhodophyta).” *Journal of Phycology* 35 (1): 78–83. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3510078.x>.
- Talebna, F., D. Karakashev, dan I. Angelidaki. 2010. “Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation.” *Bioresource Technology* 101 (13): 4744–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.080>.
- Tasi, M.B., B.V. Konstantinovi, M.L. Lazi, dan V.B. Veljkovi. 2009. “The Acid Hydrolysis of Potato Tuber Mash in Bioethanol Production.” *Biochemical Engineering Journal* 43 (2): 208–11. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2008.09.019>.
- Velazquez-Lucio, Jesús, Rosa M. Rodríguez-Jasso, Luciane M. Colla, Aide Sáenz-Galindo, Daniela E. Cervantes-Cisneros, Cristóbal N. Aguilar, Bruno D. Fernandes, dan Héctor A. Ruiz. 2018. “Microalgal Biomass Pretreatment for Bioethanol Production: A Review.” *Biofuel Research Journal* 5 (1): 780–91. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>.
- Widjaja, A. 2009. “Lipid Production from Microalgae as a Promising Candidate for Biodiesel Production.” *MAKARA Journal of Technology Series* 13 (1): 47–51. <http://journal.ui.ac.id/index.php/technology/article/view/496/492>.
- Zamora, F. 2009. “Biochemistry of Alcoholic Fermentation.” In *Wine Chemistry and Biotechnology*, edited by M.V. Moreno-Aribas and M.C. Polo. New York: Springer Science-Business Media.