

## Produksi glukosa dari mikroalga *Chlorella*, sp. melalui hidrolisis oleh enzim *cellulase*

### *Sugar production from microalgae Chlorella*, sp. via hidrolisis by cellulase enzyme

Pilandari Lembono<sup>1</sup>, Mei-Jywann Syu<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Calvin Institute of Technology, Jakarta - Indonesia

<sup>2</sup>National Cheng Kung University, Tainan - Taiwan

\*Email: [syumj@mail.ncku.edu.tw](mailto:syumj@mail.ncku.edu.tw)

#### Abstrak

Bioetanol sebagai *renewable energy* dapat diproduksi dari glukosa. Glukosa untuk bioetanol dapat diproduksi dari beberapa sumber, generasi pertama adalah dari bahan pangan berupa pati, gula tebu hanya saja menyebabkan kenaikan harga bahan mentah karena bersaing dengan produk pangan. Generasi kedua adalah dari biomassa lignoselulosa seperti serbuk gergaji, pupuk, rumput yang sulit untuk diproses karena kandungan lignin yang tinggi sehingga menyebabkan biaya proses yang tinggi. Alternatif sumber glukosa adalah dari mikroalga yang memiliki produktivitas biomassa yang tinggi dan kandungan selulosa yang potensial untuk dikonversi menjadi glukosa. Selulosa dalam biomassa dapat dikonversi menjadi glukosa dengan reaksi hidrolisis enzimatis menggunakan enzim *cellulase*. Penelitian ini bertujuan menentukan parameter-parameter optimal dalam mengkonversi selulosa menjadi glukosa, antara lain konsentrasi enzim, temperatur, dan waktu reaksi. Biomassa diperoleh dari kultivasi mikroalga *Chlorella*, sp. dalam media bernutrisi, dengan aliran gas karbon dioksida dan radiasi sinar UV. Reaksi hidrolisis dilakukan dengan variasi konsentrasi enzim *cellulase* 1,25 – 5 mg/ml, temperatur reaksi 40-70 °C, dan waktu reaksi 8 – 60 jam. Uji kandungan glukosa dilakukan menggunakan reagen DNS dan pembacaan absorbansi oleh Spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi glukosa yang tertinggi sebesar 3,07 g/L diperoleh pada reaksi hidrolisis dengan konsentrasi enzim *cellulase* 5 mg/ml, temperatur reaksi 55 °C, dan waktu reaksi 58 jam.

**Kata Kunci:** *Chlorella* sp., reaksi hidrolisis, enzim *cellulase*, glukosa

#### Abstract

Bioethanol, as a renewable energy source, can be produced from glucose. Glucose for bioethanol can be obtained from several sources. The first generation is derived from food sources such as starch and sugarcane, which can lead to an increase in raw material prices due to competition with food products. The second generation is derived from lignocellulosic biomass such as sawdust, manure, and grass, which are difficult to process due to their high lignin content, resulting in high processing costs. An alternative source of glucose is microalgae, which have high biomass productivity and potential cellulose content that can be converted into glucose. Cellulose in biomass can be converted into glucose through enzymatic hydrolysis using cellulase enzymes. This study aims to determine the optimal parameters for converting cellulose into glucose. The biomass was obtained from the cultivation of *Chlorella* sp. microalgae in nutrient media, with carbon dioxide gas flow and UV radiation. Hydrolysis reactions were performed with variations in cellulase enzyme concentration (1.25 - 5 mg/ml), reaction temperature (40 - 70°C), and reaction time (8 - 60 hours). Glucose content was measured using DNS reagent and absorbance readings by UV-Vis Spectrophotometer. The results showed that the highest glucose concentration of 3.07 g/L was obtained in the hydrolysis reaction with a cellulase enzyme concentration of 5 mg/ml, reaction temperature of 55°C, and reaction time of 58 hours.

**Keywords:** *Chlorella* sp., hydrolysis reaction, cellulase enzyme, glucose

## 1. PENDAHULUAN

*Biofuel* yang umum digunakan adalah bioetanol dan biodiesel, terutama bioetanol yang dapat diproduksi dari suplai biomassa yang melimpah yang mengandung pati dan selulosa (Chandel, dkk., 2018). Berdasarkan sumbernya, bioetanol dikategorikan menjadi tiga tipe: generasi pertama adalah bioetanol dari pati atau gula tebu. Pada generasi ini, proses hidrolisis lebih sederhana tetapi harga bahan mentah lebih mahal karena berkompetisi dengan suplai bahan pangan. Generasi kedua adalah bioetanol dari biomassa lignoselulosa seperti: sisa panen, serbuk gergaji kayu, pupuk, dan rumput. Bioetanol tipe ini memiliki perolehan yang rendah karena kandungan lignin dalam biomassa sangat sulit untuk didegradasi maupun difermentasi (Nigam dan Singh, 2010). Hal ini menyebabkan bioetanol tipe ini memerlukan konsentrasi enzim yang tinggi dan berujung pada mahalnya biaya pemrosesan (Chandel, dkk. 2018).

Generasi ketiga adalah produksi etanol dari alga, yang diprediksi dapat mengatasi kekurangan pada generasi pertama dan kedua (Vasic, dkk., 2021). Salah satu jenis mikroalga adalah *Chlorella*, sp. dengan kandungan pati dan glikogen yang tinggi, lebih dari 50 % berat kering dan mengandung selulosa (Arad dan Levy-Ontman, 2013). Selulosa dalam biomassa dapat dikonversi menjadi glukosa dengan reaksi hidrolisis enzimatis, dimana glukosa kemudian dapat digunakan untuk memproduksi etanol (Jugwanth, dkk., 2020).

Beberapa faktor seperti jenis-jenis mikroalga yang luas, jumlah yang besar, kandungan karbohidrat dan pati, dinding sel yang tipis, dan laju fotosintesis yang tinggi telah meningkatkan observasi pemanfaatan biomassa alga untuk pembuatan etanol (Tsarpali, dkk., 2021).

Informasi taksonomi menunjukkan terdapat 300.000 jenis mikroalga, tetapi hanya sekitar 30.000 jenis yang mampu beradaptasi dalam lingkungan yang ekstrim (kadar garam, temperatur, nutrisi, dan lain-lain (Low, dkk., 2014).

Mikroalga yang paling banyak dikenal dan digunakan adalah *Spirulina*, kemudian *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, dan *Haematococcus pluvialis* (Reshma, dkk., 2021). Biomassa mikroalga dapat memproduksi rentang produk yang luas, meliputi klorofil, karotenoid, karbohidrat, lemak, protein, asam nukleat, dan *nutraceutical* (Mutanda, dkk., 2020).

### 1.1 Kultivasi Mikroalga

Mikroalga memiliki laju reproduksi yang sangat cepat, dapat melipatgandakan biomassa dalam waktu 24 jam, bahkan dalam fasa pertumbuhan eksponensial dapat berlipat ganda dalam 3,5 jam (Rubio, 2002). *Chlorella*, sp. adalah salah satu jenis alga hijau yang memiliki laju perkembangbiakan yang cepat. Mikroalga dapat

dikultivasi dalam media air tawar maupun air laut (Becker, 1994).

Nutrisi yang diperlukan oleh mikroalga untuk pertumbuhan sama dengan tumbuhan lain, yaitu nitrogen dan fosforus dalam jumlah sekitar 10-20 % dari biomassa alga. Makronutrien yang lain adalah karbon, sulfur, kalium, dan magnesium. Unsur lain yang diperlukan dalam jumlah sedikit adalah besi dan mangan, dan unsur esensial lain yang diperlukan dalam jumlah sangat sedikit adalah *cobalt*, *zinc*, tembaga, boron, *molybdenum* (Nagao, dkk., 2019). EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) ditambahkan untuk meningkatkan kelarutan unsur-unsur tersebut. Beberapa senyawa lain seperti vitamin, hormon, dan komponen organik ditambahkan sebagai faktor pemicu pertumbuhan.

Media kultur untuk alga dapat dibuat secara sintetis, dari air yang ditambahkan mineral-mineral maupun buangan limbah cair (Becker, 1994). Pada umumnya, untuk mikroalga laut menggunakan air laut yang ditambahkan nitrat komersial dan fosfat dan beberapa nutrient mikro (Molina, dkk., 1999). Air laut merupakan pilihan media yang baik karena dapat meningkatkan output produk, misalnya meningkatkan kandungan lipid dan senyawa-senyawa lain di dalam biomassa mikroalga (Chandrasekhar, dkk., 2022). Selain itu juga menurunkan biaya produksi apabila menggunakan air laut sesungguhnya.

Alga mengkonversi air dan CO<sub>2</sub> dari lingkungan menjadi biomassa melalui proses fotosintesis dengan menggunakan cahaya sebagai sumber energi dan CO<sub>2</sub> sebagai sumber karbon (Bhattacharya dan Goswami, 2020). Mikroalga biasa dikembangkan di bak/kolam terbuka pada pengembangan skala besar karena biayanya murah, tetapi rentan terhadap kontaminasi. Sebagai alternatif dapat digunakan fotobioreaktor, yaitu reaktor yang disinari cahaya (Barten, dkk., 2021). Sumber cahaya dan intensitas cahaya memberikan dampak yang relevan terhadap laju fotosintesis dan laju pertumbuhan alga (Aravantinou dan Manariotis, 2016).

Nutrisi yang esensial (N, P, K) dan kondisi kultivasi seperti pH (6-8), temperatur (20-30 °C), oksigen, suplai cahaya, CO<sub>2</sub>, merupakan hal yang dibutuhkan mikroalga seperti tumbuhan pada umumnya (Nagao, dkk., 2019). Mikroalga mampu menyerap gas CO<sub>2</sub> secara efektif karena memiliki efektifitas fotosintesis yang lebih besar 20 % dibandingkan tanaman lain seperti minyak bunga matahari, minyak kedelai dan kanola (Xu, dkk., 2021). Kandungan karbondioksida di udara sangat rendah (0,03 %) dan kelarutan di dalam air yang sangat rendah (1,45 g/L pada 25 °C, 100 kPa) menyebabkan pembiakan alga pada salinitas yang rendah dan pH netral memerlukan suplai gas CO<sub>2</sub> tambahan untuk mempercepat laju pertumbuhan. Pengadukan yang intensif juga dapat meningkatkan penyerapan gas CO<sub>2</sub> dari udara ke media kultivasi.

Pertumbuhan mikroalga memerlukan rentang pH yang optimal. pH Media kultivasi yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah dapat menyebabkan laju pertumbuhan yang rendah dan fasa lag yang panjang (Kim, dkk., 2009). *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada pH 7-9 memiliki laju pertumbuhan yang konstan dan mencapai pertumbuhan terbaik pada pH 7. Sementara *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada pH 5 dan 10 tidak menunjukkan laju pertumbuhan yang baik, sebaliknya menunjukkan fasa lag yang panjang (Kim, dkk., 2009). Penelitian lain menunjukkan *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada pH 7,5 menunjukkan konsentrasi alga dan klorofil yang lebih tinggi dari pH 9,5 karena pH 9,5 menurunkan pengikatan alga terhadap CO<sub>2</sub> bebas (Azov, Y., 1982).

Jumlah energi cahaya yang diterima dan disimpan oleh sel mempengaruhi pengikatan CO<sub>2</sub>, produktivitas biomassa, dan pertumbuhan sel. Mikroalga yang dikultivasi dengan penyinaran cahaya yang terbatas akan memanfaatkan karbon untuk mensintesis asam amino dan komponen sel lainnya, sementara dalam penyinaran cahaya yang sampai jenuh, akan terjadi pembentukan gula dan pati (Zak, dkk., 2001). Sementara penyinaran cahaya yang berlebihan akan menyebabkan fotoinhibisi atau terhambatnya fotosintesis (Molina, dkk., 1999).

Pada umumnya mikroalga mengandung protein (6-52 %), lemak (7-23 %), dan karbohidrat (5-23 %) tergantung species masing-masing (Brown, dkk., 1997). Karbohidrat terdapat dalam lebih dari setengah berat kering biomassa mikroalga dan sebagai struktur molekul biomassa pada umumnya (Arad dan Levy-Ontman, 2013). Karbohidrat tersebut tersimpan sebagai cadangan, sebagian besar dalam dinding sel sebagai selulosa, pektin, polisakarida. Sekalipun begitu kandungan pati dan selulosa juga dapat bervariasi tergantung jenis alga. Sebagian besar karbohidrat dari alga berada dalam bentuk pati dan selulosa yang sangat potensial untuk produksi bioetanol (Maia, dkk., 2020).

Kandungan selulosa di dalam alga air tawar (termasuk *Chlorella*, sp.) sekitar 7 % dengan kandungan lignin yang lebih rendah, yaitu 1,5 %. Sementara kandungan selulosa dalam alga air laut sekitar 6 % (Ververis, dkk., 2007). Kandungan selulosa di dalam rumput laut merah *Gelidium amansii* (makroalga) lebih tinggi, sekitar 15-25 % dalam bentuk fibrin (Yoon, dkk., 2010). Kandungan lignin yang rendah di dalam mikroalga dapat menyederhanakan proses hidrolisis dengan cara menghilangkan proses *pretreatment* untuk menghilangkan lignin. Lignin sangat sulit untuk didegradasi secara biologis dan tidak dapat difermentasi (Yoon, dkk., 2010).

## 1.2 Reaksi Hidrolisis oleh Enzim *Cellulase*

Biomassa dari agrikultur pada umumnya diproses awal dengan bantuan enzim, ragi, asam,

maupun basa untuk mengkonversi pati menjadi glukosa (Chandrasekhar, dkk., 2022). Hidrolisis enzimatik memiliki beberapa keunggulan dibandingkan hidrolisis oleh asam dalam hal: perolehan glukosa lebih tinggi dan hidrolisis dapat dilakukan pada temperatur rendah. Hal ini tidak menyebabkan korosi pada peralatan reaksi sehingga biaya utilitas jauh lebih rendah dibandingkan hidrolisis dalam kondisi asam atau basa (Taherzadeh dan Karini, 2008).

Enzim *cellulase* dapat dihasilkan dari bakteri dan jamur untuk melakukan hidrolisis material lignoselulosa. Tetapi bakteri anaerob memerlukan kondisi pertumbuhan anaerob dan laju pertumbuhan yang rendah sehingga riset untuk produksi *cellulase* komersial menggunakan jamur (Duff and Murray, 1996). Beberapa jamur yang memproduksi enzim *cellulase* antara lain: *Sclerotium rolfisii*, *P. chrysosporium*, spesies *Aspergillus*, *Schizophyllum*, *Penicillium*, dan *Trichoderma*. *Trichoderma sp* adalah jenis yang paling banyak dipelajari untuk menghasilkan enzim *cellulase* (Duff dan Murray, 1996). Enzim *cellulase* mentah dapat diperoleh dari jamur genus *Trichoderma* yang mampu mendegradasi dinding sel tumbuhan (Rosyida, dkk., 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Puspawati, dkk. (2015) melakukan reaksi hidrolisis glukosa oleh enzim *cellulase* dari *Trichoderma sp* pada temperatur 40-50 °C, pada biomassa rumput laut 10 gram dan konsentrasi enzim *cellulase* 1-2,73 mg/ml selama 24 jam menunjukkan hasil yang terbaik pada konsentrasi 1 mg/ml, 50 °C selama 12 jam. Hal ini disebabkan mold dari jenis *Trichoderma sp* tidak dapat tahan pada temperatur yang terlalu tinggi.

Konsentrasi enzim *cellulase* dapat ditingkatkan untuk menaikkan laju reaksi dan meningkatkan perolehan glukosa, tetapi akan meningkatkan biaya proses secara signifikan karena harga enzim *cellulase* yang mahal (Liu, dkk. 2019). Pada konsentrasi substrat yang rendah, laju dan perolehan reaksi hidrolisis akan meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi substrat (Cheung and Anderson, 1997). Tetapi pada konsentrasi substrat yang tinggi dapat terjadi inhibisi oleh substrat yang menurunkan laju reaksi hidrolisis, dan besarnya inhibisi dipengaruhi oleh rasio antara substrat dan enzim (Penner and Liaw, 1994).

Substrat, aktivitas enzim *cellulase*, kondisi reaksi (temperatur, pH, dan parameter lain) mempengaruhi hasil reaksi hidrolisis selulosa. Karena itu penelitian ini bertujuan menentukan kondisi proses yang optimal, antara lain temperatur, waktu reaksi, dan konsentrasi enzim untuk menghasilkan perolehan glukosa tertinggi.

## 2. METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1. Media Kultivasi

Mikroalga *Chlorella*, sp. dikultivasi pada media cair selama 7 hari kemudian diperbarui setiap minggu. Media cair yang digunakan adalah media *Walne*. Media yang digunakan ditampilkan dalam Tabel 1 sampai Tabel 4.

**Tabel 1.** Komposisi media kultivasi *Chlorella*, sp.

Komposisi	Jumlah (ml)
Larutan Nutrien	1
Larutan Vitamin	0,1
Larutan Urea	1
Air laut steril	1000
Buffer KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> dan K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1 M, pH 8.0	5

**Tabel 2.** Komposisi larutan nutrien (volume satu liter)

Senyawa	Jumlah (g)
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,3
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O/MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,36
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6
EDTA	45
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
Larutan TMS	1 ml*

**Tabel 3.** Komposisi *trace metal solution* (tms) volume seratur mililiter

Senyawa	Jumlah (g)
ZnCl <sub>2</sub>	2,1
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,9
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2

**Tabel 4.** Komposisi larutan vitamin (volume seratus mililiter)

Senyawa	Jumlah (mg)
Cyanocobalamin	10
Thiamine	10
Biotin	200

Larutan Urea dibuat dari 100 gram urea yang dilarutkan dalam satu liter air demineralisasi. Air untuk pembuatan *stock solutions* (larutan TMS, larutan nutrient, larutan urea, larutan vitamin) harus diproses terlebih dahulu. Sebanyak 20 liter air hasil reverse osmosis ditambahkan 0,4 ml NaOCl, kemudian diaduk selama 12 jam, setelah itu ditambahkan 0,4 gram Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dan diaduk selama 5-10 menit.

Semua *stock solutions* kecuali larutan vitamin disterilisasi pada 121 °C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit kemudian didinginkan sampai temperatur ruang.

Vitamin tidak disterilisasi karena temperatur yang sangat tinggi dapat mendegradasi senyawa organik dalam larutan vitamin. Karena itu larutan vitamin disaring menggunakan pori 20 mikron di dalam ruang steril untuk menghilangkan kontaminan. Larutan nutrien dan TMS disimpan pada temperatur ruang, sementara larutan vitamin dan larutan urea disimpan pada suhu 4 °C.

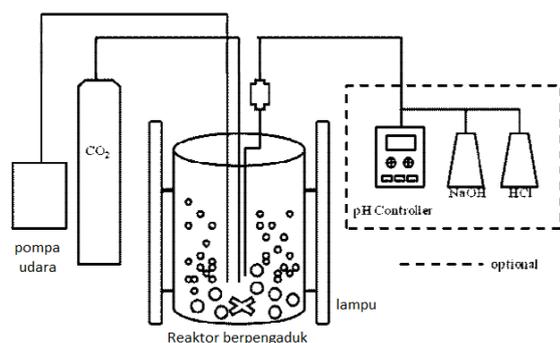
Air laut buatan dibuat dengan menambahkan 33,3 gram garam laut ke dalam satu liter air demineralisasi (RO). Kemudian difiltrasi secara vakum lalu disterilisasi pada 121 °C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit, kemudian didinginkan sampai temperatur ruang.

Buffer pH 8,0 disiapkan dengan mencampur K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (masing-masing 0,1 M) dengan rasio volume 8:1. Buffer ditambahkan di awal pembuatan media untuk menjaga pH di rentang 7,5–8,0. Di tengah-tengah proses kultivasi apabila pH turun sampai di bawah 7,5, Larutan NaOH 0,1 M ditambahkan sebanyak 0,5 – 1 ml. Semua larutan tersebut (NaOH, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) juga disterilisasi pada 121 °C, 1,2 kg/cm<sup>2</sup> selama 20 menit dan didinginkan sampai temperatur ruang.

### 2.2. Kultivasi Mikroalga *Chlorella*, sp

Mikroalga yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari kultivasi beberapa batch. Kultivasi dilakukan pada bioreaktor berukuran 1 – 2,5 L dimana mikroalga *Chlorella*, sp. dengan kandungan 20 % volume dimasukkan ke dalam media kultur yang telah disterilisasi. Selama kultivasi, reaktor disuplai oleh aliran gas CO<sub>2</sub>, dengan laju alir 1 L/menit per 1 liter larutan, dan intensitas cahaya sebesar 100-250 μmol/m<sup>2</sup>.s. Intensitas tersebut diperoleh dari 2 buah lampu neon dengan daya masing-masing 18 W dipasang menghadap reaktor (gambar peralatan kultivasi mikroalga ditunjukkan pada Gambar 1). Reaktor kemudian diaduk secara kontinyu pada kecepatan 120-300 rpm untuk menghasilkan homogenasi udara di dalam reaktor. Temperatur dalam reaktor dipertahankan pada 25 °C. Larutan NaOH ditambahkan secara berkala setiap 24 jam untuk menjaga kestabilan pH pada rentang 7,5 - 8, dengan penambahan NaOH sebesar 0,5 – 1 ml. Kultivasi dilakukan selama 13 – 25 hari.

Proses prekultivasi dilakukan mendahului kultivasi mikroalga, dengan menambahkan 20-30 % volume *Chlorella*, sp. ke dalam larutan media 1 liter. Proses memasukkan mikroalga ke dalam media kultur dilakukan dalam kondisi steril (di *sterile chamber*), kemudian diperbarui setiap 7 hari dengan cara memindahkan 20-30 % volume prekultivasi ke dalam media kultur yang baru.



Gambar 1. Peralatan kultivasi mikroalga

### 2.3. Reaksi Hidrolisis Selulosa oleh Enzim *Cellulase*

Reaksi hidrolisis dilakukan dengan mereaksikan *Chlorella*, sp. dengan enzim *cellulase* dari *Trichoderma longibrachiatum* (Sigma) pada pH 6,0 pada beberapa variasi suhu (50 – 70 °C) dan waktu (8 - 72 jam). Biomass mikroalga disiapkan dari 5 ml konsentrat yang disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Larutan buffer fosfat pH 6,0 dibuat dengan mencampur 0,1 M  $K_2HPO_4$  dan 0,1 M  $KH_2PO_4$  dengan rasio volume 2:25.

Enzim *cellulase* ditambahkan ke dalam 2 ml larutan buffer fosfat, diaduk sampai homogen, kemudian dicampur dengan mikroalga di dalam tabung reaksi dalam kondisi tertutup. Reaksi hidrolisis dilakukan pada *waterbath* dengan kecepatan putaran 200 rpm. Hasil reaksi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan alga dari cairan, kemudian lapisan atas (cairan) dipisahkan dan dilakukan analisa kandungan glukosa menggunakan reagen DNS.

Jumlah enzim *cellulase* divariasikan dari 2,5 – 10 mg dalam 2 ml larutan buffer fosfat pH 6,0, sehingga rentang konsentrasi enzim menjadi 1,25 – 5 mg/ml.

### 2.4. Metode Analisa

Analisa yang dilakukan dalam penelitian ini adalah konsentrasi glukosa hasil reaksi hidrolisis. Konsentrasi glukosa yang dihasilkan dianalisa menggunakan metode DNS (Miller, 1959). Kurva kalibrasi larutan standar glukosa dibuat pada konsentrasi 1 sampai 10 g/L glukosa dengan menggunakan glukosa anhidrat yang dilarutkan dalam air demin. Sebanyak 0,3 ml reagen DNS ditambahkan ke dalam 0,1 ml larutan glukosa di dalam tabung reaksi, kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu air mendidih (menggunakan *waterbath*), kemudian didinginkan seketika dengan mengalirkan air keran sampai mencapai temperatur ruang. Kemudian 18 ml air demin ditambahkan ke larutan yang telah dingin. Pendinginan sampai suhu ruang sangat penting karena akan mempengaruhi

pembacaan absorbansi. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500 nm.

Prosedur yang sama digunakan untuk blanko berupa air demin untuk mendapatkan pengukuran absorbansi pada titik nol. Dari kurva kalibrasi akan diperoleh korelasi antara konsentrasi glukosa (ordinat) terhadap absorbansi (absis). Korelasi tersebut kemudian digunakan untuk mengukur konsentrasi glukosa pada sampel hasil reaksi. Pengukuran sampel hasil reaksi dilakukan dengan metode yang sama dengan larutan standar. Reagen DNS yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Komposisi reagen DNS

Komposisi	Konsentrasi % (b/v)
Asam Dinitrosalisilat	1
NaOH	1
Rochelle salt	20
Fenol	0,2
Sodium sulfat	0,05

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Perolehan reaksi hidrolisis dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, temperatur reaksi, dan waktu reaksi. Pada awalnya reaksi hidrolisis dilakukan dengan menggunakan 15 mg/ml enzim *cellulase* (30 mg enzim dalam 2 ml larutan buffer pH 6,0) selama 8 jam, pada temperatur 60 °C dan 70 °C. Hasil penelitian ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Perbandingan reaksi hidrolisis pada temperatur 60 °C dan 70 °C

T(°C)	Glukosa (g/L)
60	6,18
70	3,29

Hasil penelitian menunjukkan glukosa yang dihasilkan lebih tinggi pada temperatur 60 °C (Tabel 6). Hal ini disebabkan  *mold* dari jenis *Trichoderma* sp tidak dapat tahan pada temperatur yang terlalu tinggi sehingga aktivitas hidrolisis menurun pada suhu 70 °C, ditunjukkan dengan konsentrasi glukosa yang menurun (Puspawati, dkk., 2015). Pada umumnya semakin tinggi temperatur, reaksi akan semakin cepat, tetapi temperatur yang terlalu tinggi dapat menyebabkan enzim *cellulase* terdenaturasi sehingga laju reaksi hidrolisis menurun (Han, dkk. 2012). Selain itu, reaksi hidrolisis sendiri bersifat eksotermik, yang dapat menyebabkan kenaikan temperatur reaksi hidrolisis. Hasil ini menjadi acuan untuk variasi berikutnya, dimana reaksi dilakukan pada temperatur di bawah 60 °C.

Jumlah enzim *cellulase* kemudian divariasikan antara 1,25 – 5 mg/ml (2,5 – 10 mg enzim *cellulase* dalam 2 ml larutan *buffer fosfat*). Dengan penurunan jumlah enzim, secara teoritis glukosa yang

dihasilkan akan berkurang. Sebagai konsekuensinya, waktu reaksi dinaikkan sampai 24 jam untuk meningkatkan produk glukosa. Hasil dari variasi tersebut ditunjukkan pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Perolehan glukosa pada variasi konsentrasi enzim *cellulase*

Cellulase (mg/ml)	Waktu reaksi (jam)	Glukosa (g/L)	Glukosa (g/g alga)
1,25	12	1,08	0,1
1,25	16	1,08	0,1
2,5	8	1,65	0,15
2,5	12	1,71	0,16
2,5	16	1,58	0,14
5	12	2,19	0,2
5	16	2,34	0,21
5	24	2,69	0,25

Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi enzim, perolehan glukosa semakin tinggi, karena aktivitas hidrolisis semakin tinggi. Pada konsentrasi enzim 1,25 mg/ml tidak terjadi perubahan glukosa baik pada reaksi 12 jam maupun 16 jam, sama-sama menghasilkan glukosa sebesar 1,08 g/L. Hal ini menunjukkan konsentrasi enzim pada jumlah tersebut tidak mencukupi untuk melakukan reaksi hidrolisis.

Pada konsentrasi enzim 2,5 mg/ml, konsentrasi glukosa hanya naik sedikit dari 1,65 g/L menjadi 1,71 g/L. Ketika waktu reaksi dinaikkan dari 12 ke 16 jam, dan bahkan konsentrasi glukosa turun menjadi 1,58 g/L setelah 16 jam reaksi. Hal ini juga menunjukkan konsentrasi enzim masih belum mencukupi untuk mengkonversi selulosa menjadi glukosa.

Pada konsentrasi enzim yang lebih tinggi, yaitu 5 mg/ml, konsentrasi glukosa yang dihasilkan menunjukkan tren kenaikan yang konsisten bahkan masih meningkat setelah 24 jam reaksi. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang terbaik dari rentang 1,25 – 5 mg/ml untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis sehingga perolehan produk terus meningkat selama 24 jam reaksi.

Dari perbandingan hasil pada Tabel 6 dan 7 dapat dilihat, dengan menggunakan 15 mg/ml enzim *cellulase*, glukosa yang dihasilkan cukup tinggi yaitu sebesar 6,18 g/L, sementara pada konsentrasi enzim 5 mg/ml hanya sebesar 2,69 g/L. Tetapi apabila mempertimbangkan skala industri, konsumsi enzim yang terlalu tinggi dapat menaikkan biaya produksi secara signifikan, sehingga dipikirkan untuk mengurangi jumlah enzim *cellulase*.

Karena itu variasi berikutnya kemudian dieksplorasi lebih lanjut untuk konsentrasi enzim 5 mg/ml dengan waktu reaksi 24 – 72 jam, pada

beberapa variasi temperatur: 50 °C, 55 °C, 60 °C. Hasil ditunjukkan pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Perolehan glukosa pada konsentrasi enzim *cellulase* 5 mg/ml

Waktu Reaksi (jam)	Glukosa (g/L)		
	50 °C	55 °C	60 °C
24	1,83	1,97	1,27
36	1,91	-	1,31
48	-	2,91	1,47
54	2,3	2,06	-
56	-	2,58	-
58	-	3,07	-
60	2,12	2,36	1,33
72	2,15	-	-

Pada reaksi dengan temperatur 60 °C, konsentrasi glukosa masih meningkat selama 24 sampai 48 jam reaksi kemudian menurun pada jam ke-60. Hal ini menunjukkan bahwa pada temperatur tersebut reaksi hidrolisis tidak dapat dilakukan untuk waktu reaksi yang lama karena temperatur yang tinggi menghambat aktivitas enzim *cellulase* (Puspawati, dkk., 2015). Pada temperatur 50 °C, dilakukan reaksi dengan durasi antara 48–60 jam, hasil terbaik diperoleh setelah 54 jam reaksi dengan perolehan glukosa sebesar 2,3 g/L.

Reaksi hidrolisis pada temperatur 55 °C menghasilkan perolehan glukosa yang tertinggi dibandingkan pada temperatur 50 °C dan 60 °C. Hasil tersebut dijabarkan secara terperinci pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Perolehan glukosa pada konsentrasi enzim 5 mg/ml dan temperatur reaksi 55 °C

Waktu reaksi (jam)	Glukosa (g/L)	Glukosa per massa alga (g/g)
24	1,97	0,16
48	2,91	0,23
56	2,58	0,21
58	3,07	0,25
60	2,36	0,19

Konsentrasi glukosa meningkat seiring naiknya waktu reaksi, dimana hasil maksimal ditunjukkan pada waktu reaksi 58 jam, kemudian menurun setelah 60 jam. Hal ini dapat disebabkan oleh 2 hal. Pertama, konsentrasi glukosa hasil reaksi setelah 60 jam menghambat aktivitas enzim sehingga menurunkan perolehan glukosa. Kedua, konsentrasi substrat sangat rendah setelah 60 jam, sehingga glukosa hasil hidrolisis dikonsumsi oleh enzim *cellulase* sebagai sumber karbon. Hal yang sama ditunjukkan oleh hasil penelitian Ashriyani (2009). Ashriyani (2009) yang mempelajari pembuatan bioetanol dari hidrolisis rumput laut

*Euclima cottonii* menggunakan enzim *cellulase*, menunjukkan trend perolehan yang sama. Proses hidrolisis menghasilkan glukosa terus meningkat sampai 48 jam kemudian menurun.

Konsentrasi glukosa yang tertinggi pada reaksi hidrolisis dengan temperatur 55 °C diperoleh setelah 58 jam reaksi hidrolisis, yaitu 3,07 g/L, dengan rasio glukosa/alga sebesar 0,25.

Penelitian serupa dilakukan oleh Puspawati dkk (2015), dimana reaksi hidrolisis glukosa oleh enzim *cellulase* dari *Trichoderma* sp pada biomassa rumput laut 10 g dan konsentrasi enzim *cellulase* 1–2,73 mg/ml memberikan hasil yang maksimal pada temperatur 50 °C pada pH 5 selama 12 jam. Penelitian lain yang melakukan reaksi hidrolisis pada batang gandum dengan enzim *cellulase* dari *Penicillium waksmanii* memperoleh hasil glukosa tertinggi pada kondisi temperatur 55 °C, pH 5,0 selama waktu reaksi 30 jam (Han, dkk., 2012). Temperatur optimal untuk reaksi hidrolisis dengan enzim *cellulase* dapat berbeda-beda bergantung pada sumber enzim *cellulase* tersebut.

Gambar 2 dan 3 menunjukkan kondisi mikroalga sebelum dan sesudah dilakukan reaksi hidrolisis.



**Gambar 2.** Kondisi mikroalga sebelum reaksi hidrolisis



**Gambar 3.** Kondisi mikroalga setelah reaksi hidrolisis

Hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi enzim, semakin tinggi perolehan glukosa. Pada skala industri, semakin tinggi konsentrasi enzim *cellulase* akan menyebabkan kenaikan biaya operasional yang juga semakin tinggi, sehingga perlu ditentukan optimasi rasio antara jumlah enzim dengan biomassa (mikroalga) yang terendah yang mampu menghasilkan produk reaksi yang tertinggi.

#### 4. KESIMPULAN

Mikroalga dengan kandungan selulosa di dalamnya merupakan sumber yang potensial untuk menghasilkan glukosa. Selulosa dalam biomassa dapat dikonversi menjadi glukosa dengan reaksi hidrolisis enzimatik, dimana glukosa kemudian dapat digunakan untuk memproduksi etanol. Reaksi

hidrolisis dalam penelitian ini dilakukan pada 5 ml konsentrat biomassa *Chlorella*, sp. dengan variasi-variasi konsentrasi enzim *cellulase* 1,25 – 5 mg/ml, temperatur reaksi 40-70 °C, dan waktu reaksi 8 – 60 jam.

Reaksi hidrolisis terbaik yang menghasilkan konsentrasi glukosa yang tertinggi sebesar 3,07 g/L diperoleh pada konsentrasi enzim *cellulase* 5 mg/ml, temperatur reaksi 55 °C, dan waktu reaksi 58 jam.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Prof. Syu Mei Jywann yang telah membimbing penelitian dan menyediakan semua fasilitas di Laboratorium Biomaterials and Biosensors, National Cheng Kung University, Taiwan. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Wu Wen-Teng, Prof. Lee Wen-Chien untuk bimbingan dan saran selama penelitian.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Arad, S. and Levy-Ontman, O., 2013. Sulfated polysaccharides in the cell wall of red microalgae, in: Thomas, S., Durand, D., Chassenieux, C. and Jyotishkumar, P. (Eds.), Handbook of Biopolymer-Based Materials: From Blends and Composites to Gels and Complex Networks, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 351–370.
- Aravantinou, A.F., Manariotis, I.D., 2016. Effect of operating conditions on *Chlorococcum* sp. growth and lipid production. *J. Environ. Chem. Eng.*, 4(1): 1217–1223.
- Ashriyani, A. 2009. Pembuatan Bioetanol Dari Substrat Makroalga Genus *Euclima* dan *Gracilaria*. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
- Azov, Y., 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6): 1300–1306.
- Barten, R., Djohan, Y., Evers, W., Wijffels, R., Barbosa, M. 2021. Towards industrial production of microalgae without temperature control: The effect of diel temperature fluctuations on microalgal physiology. *Journal of Biotechnology* 336(1): 56-63.
- Becker, E.W. (1994) *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bhattacharya, M. and Goswami, S., 2020. Microalgae – A green multi-product biorefinery for future industrial prospects. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 25: 101580.
- Brown, M., Jeffrey, S., Volkman, J. and Dunstan, G., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquac.*, 151(1-4): 315-331.

- Chandel, A.K., Garlapati, V. K., Singh, A.K., Antunes, F.A.P., Silva, S.S. 2018. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*, 264(1): 370-381.
- Chandrasekhar, K., Raj, T., Ramanaiah, S., Kumar, G., Banu, J., Varjani, S., Sharma, Pandey, A., Kumar, S. and Kim, S., 2022. Algae biorefinery: A promising approach to promote microalgae industry and waste utilization. *J. Biotechnol.*, 345: 1-16.
- Cheung, S. and Anderson, B., 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresour. Technol.*, 59(1): 81-96.
- Duff, S. and Murray, W., 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresour. Technol.*, 55(1): 1-33.
- Han, L., Feng, J., Zhang, S., Ma, Z., Wang, Y., Zhang, X. 2012. Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 43(1): 53-61.
- Huang, X. and Penner, M., 1991. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11): 2096-2100.
- Jugwanth, Y., Sukai, Y.S., Kana, E.B.G. 2019. Valorization of sugarcane bagasse for bioethanol production through simultaneous saccharification and fermentation: Optimization and kinetic studies. *Fuel*, 262:116552.
- Kim, J., Lee, J. Y., Keener, T. 2009. Growth kinetic study of *Chlorella vulgaris*. Department of Chemical and Materials Engineering, University of Cincinnati.
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Wobbe, L., Schlüter, A., Kruse, O., Mussgnug, J.H., 2016. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. *J. Biotechnol.*, 234(1): 7-26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.015>
- Liu, C.G., Xiao, Y., Xia, X.X., Zhao, X.Q., Peng, L.C., Srinophakun, P., Bai, F.W. 2019. Cellulosic ethanol production: Progress, Challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances*, vol. 37(3): 491-504.
- Low, S., Ong, S. and Ng, H., 2014. Biodiesel production by microalgae cultivated using permeate from membrane bioreactors in continuous system. *Water Sci. Technol.*, 69(9): 1813-1819.
- Maia, J., Cardoso, J., Mastrantonio, D., Bierhals, C., Moreira, J., Costa, J. and Morais, M., 2020. Microalgae starch: A promising raw material for the bioethanol production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165: 2739-2749.
- Molina Grima, E., Fernández, F., García Camacho, F. and Chisti, Y., 1999. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.*, 70(1-3): 231-247.
- Mutanda, T., Naidoo, D., Bwapwa, J.K., Anandraj, A., 2020. Biotechnological applications of microalgal oleaginous compounds: current trends on microalgal bioprocessing of products. *Front. Energy Res.*, 8(1): 299.
- Nagao, R., Ueno, Y., Akita, F., Suzuki, T., Dohmae, N., Akimoto, S., Shen, J.R., 2019. Biochemical characterization of photosystem I complexes having different subunit compositions of fucoxanthin chlorophyll cyanin the diatom *Chaetoceros gracilis*. *Photosynth. Res.*, 140(1): 141-149.
- Nigam and Singh, A., 2011. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37(1): 52-68.
- Penner, M. H., Liaw, E.-T., 1994. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma cellulose*. In: Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., (Eds.), *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. American Chemical Society, Washington, DC., pp. 363-371.
- Puspawati, S., Wagimana, Ainuri, M., Nugraha, D.A., Haslianti. 2015. The Production of Bioethanol Fermentation Substrate from *Eucheuma cottonii* Seaweed through Hydrolysis by Cellulose Enzyme, *ICoA Agriculture and Agricultural Science Procedia*, vol. 3, pp: 200 – 205.
- Ren, Q., Wang, Y., Lin, Y., Zhen, Z., Cui, Y. and Qin, S., 2021. The extremely large chloroplast genome of the green alga *Haematococcus pluvialis*: Genome structure, and comparative analysis. *Algal Research*, 56: 102308.
- Reshma, R., Chitra Devi, K., Dinesh Kumar, S., Santhanam, Perumal, Krishnaveni, N., Begum, A., Pragnya, M., Arthikha, R., Dhanalakshmi, B., Kim, M.K., 2021. Enhancement of pigments production in the green microalga *Dunaliella salina* (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresour. Technol. Rep.*, 14: 100672.
- Rosyida, V., Indrianingsih, A., Maryana, R. and Wahono, S., 2015. Effect of Temperature and Fermentation Time of Crude *Cellulase* Production by *Trichoderma Reesei* on Straw Substrate. *Energy Procedia*, 65: 368-371.
- Rubio, F., Camacho, F., Sevilla, J., Chisti, Y. and Grima, E., 2002. A mechanistic model of photosynthesis in microalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, 81(4): 459-473.

- Taherzadeh, M. and Karimi, K., 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(9): 1621-1651.
- Tsarpali, M., Arora, N., Kuhn, J.N., Philippidis, G.P., 2021. Lipid-extracted algae as a source of biomaterials for algae biorefineries. *Algal Res.* 57(1): 102354. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102354>.
- Vasic, K., Knez, Z., Maja, L., 2021. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules.*, 26(3): 753.
- Ververis, C., Georghiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D., Santas, R. and Corleti, V., 2007. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresour. Technol.*, 98(2): 296-301.
- Xu, K., Zou, X., Chang, W., Qu, Y. and Li, Y., 2021. Microalgae harvesting technique using ballasted flotation: A review. *Separation and Purification Technology*, 276: 119439.
- Yoon, J., Kim, Y., Kim, S., Ryu, H., Choi, J., Kim, G. and Shin, M., 2010. Production of Polysaccharides and Corresponding Sugars from Red Seaweed. *Advanced Materials Research*, 93-94: 463-466.
- Zak, E., Norling, B., Maitra, R., Huang, F., Andersson, B. and Pakrasi, H., 2001. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occur in plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23): 13443-13448.