

## Pretreatment *Spirulina platensis* Residue untuk Produksi Bioetanol

### Pretreatment of *Spirulina platensis* Residue for Bioethanol Production

Heni Anggorowati<sup>a\*</sup>, Indriana Lestari<sup>a</sup>, Arief Budiman<sup>b</sup> and Yano Surya Pradana<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Industri, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Yogyakarta, Jl. SWK 104 (Lingkar Utara) Condongcatur, Sleman, Yogyakarta 55283, Indonesia

<sup>b</sup>Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Gadjah Mada, Jl. Grafika No.2 Kampus UGM, Yogyakarta 55281, Indonesia

#### Artikel histori :

Diterima 1 Maret 2021  
Diterima dalam revisi 19 Maret 2021  
Diterima 19 April 2021  
Online 26 April 2021

**ABSTRAK:** Pemerintah Indonesia berusaha untuk mengurangi penggunaan bahan bakar fosil dengan mendorong adanya transisi ke sumber energi terbarukan. Bioetanol merupakan salah satu alternatif energi terbarukan yang mampu mengurangi penggunaan bensin di sektor transportasi. Bioetanol dapat diproduksi dari *spirulina platensis residu* (SPR) yang masih mengandung karbohidrat yang tinggi. Untuk memaksimalkan perolehan *bioethanol* diperlukan proses *pretreatment* yang sesuai untuk memecah dinding sel SPR sehingga diperoleh glukosa yang siap difermentasi. Pada penelitian ini dilakukan tiga metode *pretreatment* yaitu ultrasonikasi, *autoclave* dan enzimatis. *Pretreatment* dengan ultrasonikasi dilakukan dengan *ultasonicator batch* 40 kHz selama 30 menit dan menghasilkan glukosa sebesar 147,1154 ppm. Sedangkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 30 menit menghasilkan glukosa sebesar 21.15385 ppm. *Pretreatment* enzimatis dilakukan dengan menggunakan kombinasi enzim  $\alpha$ -amylase dan amyloglucosidase (1:0; 0,75: 0,25; 0,5:0,5; 0,25:0,75 dan 0:1) pada suhu 40 °C selama 180 menit. *Yield* glukosa maksimum diperoleh pada penggunaan enzim  $\alpha$ -amylase: amyloglucosidase = 0,25: 0,75 yaitu sebesar 33,15%.

**Kata Kunci:** *spirulina platensis residu*, ultrasonikasi, *autoclave*,  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase

**ABSTRACT:** The Indonesian government is trying to reduce the use of fossil fuels by encouraging a transition to renewable energy sources. Bioethanol is one of the renewable energy alternatives that can reduce the use of gasoline in the transportation sector. Bioethanol can be produced from *spirulina plantesis residue* (SPR) which still contains high carbohydrates. In order to maximize the yield of bioethanol, a suitable *pretreatment* process is needed to break down the SPR cell walls in order to obtain glucose which is ready for fermentation. In this study, three *pretreatment* methods were carried out, namely ultrasonication, autoclave and enzymatic. *Pretreatment* by ultrasonication was carried out with a *ultasonicator batch* of 40 kHz for 30 minutes and resulted in glucose at 147,1154 ppm. While *pretreatment* with an autoclave at a temperature of 121 °C for 30 minutes produces glucose of 21.15385 ppm. Enzymatic *pretreatment* was performed using a combination of  $\alpha$ -amylase and amyloglucosidase enzymes (1: 0; 0.75: 0.25; 0.5: 0.5; 0.25: 0.75 and 0: 1) at 40 °C during 180 minutes. The maximum glucose yield was obtained by using the enzyme  $\alpha$ -amylase: amyloglucosidase = 0.25: 0.75, which was 33.15%.

**Keywords:** *spirulina platensis residue*, ultrasonication, autoclave,  $\alpha$ -amylase, amyloglucosidase

#### 1. Pendahuluan

Dalam *Nationally Determined Contribution* (NDC) Indonesia berkomitmen untuk menurunkan emisi gas rumah kaca sebesar 29% pada tahun 2030. Oleh karena itu, pemerintah Indonesia saat ini sedang fokus untuk menekan emisi dari penggunaan bahan bakar minyak (BBM). Salah satu rekomendasi BAPENAS 88 kebijakan rendah karbon untuk dilaksanakan periode 2020 – 2045 adalah mendorong

transisi ke sumber energi terbarukan (EBT) (Sugiyono et al. 2019). Bioetanol merupakan alternatif bahan bakar yang menjanjikan untuk menggantikan bensin di sektor transportasi (Robak and Balcerak, 2018)

Bioetanol dapat diproduksi dari biomassa yang mengandung karbohidrat dalam bentuk pati maupun selulosa (Rodrigues et al., 2015). Salah satu biomassa yang mengandung karbohidrat adalah mikroalga. Mikroalga merupakan biomassa yang dinding sel nya sebagian besar

\*Corresponding Author:  
Email: heni.anggorowati@upnyk.ac.id

terdiri dari karbohidrat yang dapat dikonversi menjadi glukosa sehingga dapat difermentasi menjadi bioetanol (Michelon et al., 2019). Mikroalga setelah diekstrak lipidnya akan menyisakan residu yang masih mengandung karbohidrat (Jamilatun et al., 2019). Mikroalga jenis *spirulina platensis* dalam kondisi kering mengandung karbohidrat 56,56% (Rempel et al., 2018) dari hasil kultivasi yang dilakukan oleh Magro et al (2017), sedangkan *spirulina platensis residue* (SPR) masih mengandung karbohidrat sebesar 38,51% (Jamilatun et al, 2017) sehingga berpotensi sebagai bahan baku bioetanol.

Karbohidrat di dalam mikroalga berupa selulosa yang terdapat pada dinding sel dan pati yang terdapat pada plastida (Velazquez et al., 2018). Karena terletak di dalam dinding sel maka konversi karbohidrat menjadi glukosa yang dapat difermentasi menjadi sangat lambat oleh karena itu diperlukan *pretreatment* yang bertujuan untuk memperluas bidang kontak dan melemahkan dinding sel sehingga mempermudah akses enzim pada saat proses hidrolisis (Eldalatony et al, 2015). Hammann (2019) melaporkan ada berbagai macam proses *pretreatment* yang dapat dilakukan untuk memecah dinding sel mikroalga diantaranya adalah secara kimia (*acid* dan *alkali*), biologi (enzim) serta *pretreatment* secara fisika (ultrasonikasi, *microwave*, *autoclave*). Efektifitas metode *pretreatment* yang digunakan akan berbeda terhadap jenis mikroalga yang berbeda.

*Pretreatment* enzimatis merupakan metode yang paling menjanjikan dibandingkan metode *pretreatment* yang lainnya (Liang et al., 2012; Demuez et al., 2015). Pada metode *pretreatment* ini, beberapa jenis enzim seperti *amylase*, *sellulase*, dan *amyloglucosidase* dapat digunakan untuk menghidrolisis dinding sel polisakarida (Shokrkar et al, 2017; Velazquez-Lucio et al, 2018). Choi et al (2010) menggunakan enzim  *$\alpha$ -amylase* dan *amiloglucosidase* untuk melakukan *pretreatment* terhadap mikroalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Enzim  *$\alpha$ -amylase* dan *amiloglucosidase* juga berhasil menghidrolisa pati sorgum merah menjadi glukosa (Permanasari et al, 2018).

Selain *pretreatment* enzimatis, proses *pretreatment* ultrasonikasi terhadap mikroalga juga sering digunakan karena memiliki beberapa keuntungan di antaranya: mengurangi waktu ekstraksi, *solvent* yang dibutuhkan hanya sedikit, menghasilkan *yield* yang lebih tinggi dan dapat dilakukan pada suhu rendah (Luque-Garcia and Leque de Castro, 2003; Lee and Shah, 2012; Wang and Waller, 2006). Penggunaan metode *pretreatment* ultrasonikasi terhadap mikroalga dapat mengekstrak komponen karbohidrat terutama glukosa sehingga akan mempermudah proses fermentasi menghasilkan bioethanol (Jeon et al., 2013). Selain *pretreatment* enzimatis dan ultrasonikasi, *pretreatment* dengan *autoclave* juga dapat dipertimbangkan. Debiagi et al (2020) melaporkan bahwa proses *pretreatment* dengan *autoclave* mampu merilis *glucose*, *xylose* dan beberapa monosakarida dari kulit gandum.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode *pretreatment* dengan ultrasonikasi dan *autoclave* serta penggunaan enzim ganda ( *$\alpha$ -amylase* dan

*amiloglucosidase*) terhadap proses hidrolisis SPR, sehingga akan diketahui mana yang lebih efisien untuk membuka dinding sel SPR sehingga dihasilkan glukosa yang tinggi yang selanjutnya dapat dikonversi menjadi bioetanol melalui proses fermentasi.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1. Bahan

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Spirulina platensis residue* (SPR) yang diperoleh dari hasil ekstraksi *Spirulina platensis* (SP) Nogotirto Algae Park Yogyakarta Indonesia. Enzim  *$\alpha$ -amylase* dan *amiloglucosidase* yang diperoleh dari *novozymes*, serta reagensia *Nelson*, reagensia *arsenomolybdat*, dan larutan buffer asetat pH 4,8.

### 2.2. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah sonicator batch dan *autoclave* untuk *pretreatment*, rangkaian untuk hidrolisis yang terdiri dari *hot plate magnetic stirrer*, labu leher dua dan termometer, serta *centrifuge* yang digunakan untuk memisahkan sampel padat dan cair setelah proses hidrolisis.

### 2.3. Metode

#### 2.3.1. Pretreatment ultrasonikasi dan autoclave

Sampel SPR sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam 200 mL larutan buffer asetat pH 4,8 kemudian dilakukan *pretreatment* menggunakan ultrasonicator batch selama 30 menit, frekuensi 40 KHz dan *pretreatment* dengan *autoclave* selama 30 menit, suhu 121 °C

#### 2.3.2. Pretreatment enzimatis

Sebanyak 2 gram sampel SPR dimasukkan ke dalam 200 mL larutan buffer asetat pH 4,8. Kemudian ditambahkan 1% enzim  *$\alpha$ -amylase* dan *amiloglucosidase* dengan variasi 1:0 ; 0,25:0,75 ; 0,5:0,5 ; 0,75:0,25 ; 0:1 v/v. Selama hidrolisis suhu dijaga konstan 40 °C dan kecepatan pengadukan 750 rpm.

### 2.4. Analisa

Setelah proses hidrolisis, sampel kemudian direndam dalam air suhu 90 °C selama 10 menit untuk menghentikan aktivitas enzim. Setelah dingin sampel dipisahkan padatan dan cairannya dengan *centrifuge*. Filtrat yang diperoleh kemudian dianalisis gula reduksinya dengan metode Nelson Somoygi dan HPLC untuk mengetahui jenis gula reduksinya. Sedangkan residu yang telah dikeringkan dianalisis morfologinya dengan menggunakan scanning electron microscope (SEM).

## 3. Hasil dan Pembahasan

*Pretreatment* yang dilakukan pada penelitian ini adalah 3 macam yaitu *pretreatment* secara mekanik dengan ultrasonikasi, *pretreatment* secara *thermal* dengan *autoclave* serta *pretreatment* secara enzimatis dengan

variasi penggunaan 2 enzim yaitu enzim  $\alpha$ -amylase dan amiloglucosidase. Tujuan utama dari proses *pretreatment* adalah untuk memecah karbohidrat yang terdapat di dalam sel mikroalga menjadi monomer glukosa yang selanjutnya dapat difermentasi menjadi bioetanol.

### 3.1 Pretreatment ultrasonikasi

Ultrasonikasi merupakan salah satu metode *cell disruption* secara fisika yang tujuan utamanya adalah mengekstraksi karbohidrat di dalam mikroalga. Selama proses sonikasi, mikroalga terkena gelombang tinggi ultrasonik sehingga tercipta gelembung kecil kavitasi di sekitar sel. Gelembung tersebut hancur dan mengeluarkan gelombang kejut yang menyebabkan karbohidrat siap untuk proses hidrolisis (Hammann, 2019).

Untuk mengetahui pengaruh *pretreatment* ultrasonikasi, sampel SPR dalam larutan *buffer acetat* pH 4,8 dimasukkan ke dalam *ultrasonic batch* dengan frekuensi 40 kHz selama 30 menit. Hasil analisa glukosa dengan metode Nelson Somoygi dapat dilihat pada **Tabel 1**. Sebanyak 147.1154 ppm glukosa diperoleh setelah dilakukan ultrasonikasi selama 30 menit. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan Halim et al, 2012 yaitu menggunakan metode ultrasonikasi dengan frekuensi 40 kHz selama 25 menit untuk megekstrak karbohidrat dalam *Chlorococcum* sp. Sedangkan Ferreira et al. (2016) berhasil mengekstrak karbohidrat dalam *C. vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, dan *S. obliquus* menggunakan metode ultrasonikasi.

Untuk mengetahui pengaruh *pretreatment* ultrasonikasi terhadap morfologi SPR maka digunakan analisis *scanning electron microscope* (SEM) seperti yang terlihat pada **Gambar 1**.

Dari **Gambar 1b** dapat dilihat morfologi permukaan sel setelah *pretreatment* ultrasonikasi terjadi kerusakan pada permukaan sel dibandingkan dengan tanpa *pretreatment* seperti yang terlihat pada **Gambar 1a**.

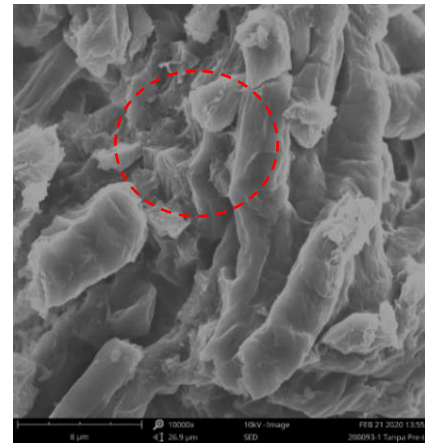
**Tabel 1.** Pengaruh *Pretreatment*

<i>Pretreatment</i>	Konsentrasi glukosa (mg/L)
Tanpa <i>Pretreatment</i>	0
Ultrasonikasi	147.1154
<i>Autoclave</i>	21.15385

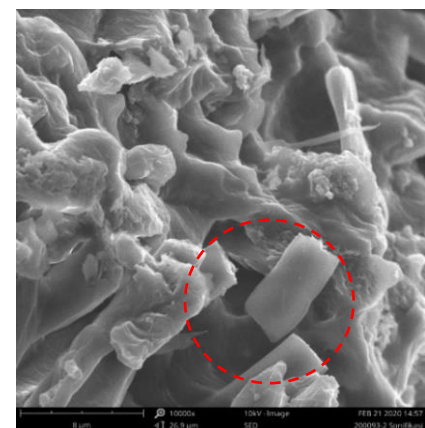
### 3.2 Pretreatment autoclave

*Autoclave* merupakan proses *pretreatment* yang memanfaatkan uap panas bertekanan tinggi sehingga dapat menyebabkan dinding sel mikroalga pecah dan melepaskan komponen intraselulernya (Hammann, 2019).

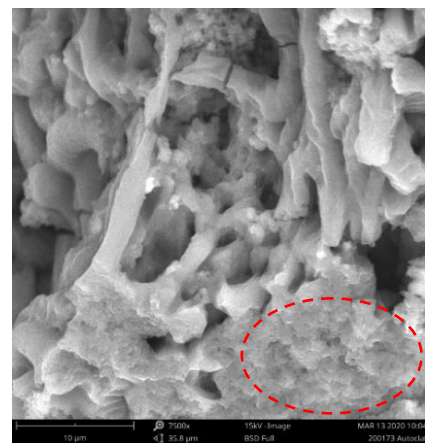
**Gambar 1c** menunjukkan hasil SEM dari sampel yang telah dilakukan *pretreatment* dengan *autoclave* terlihat terjadi aglomerisasi sehingga menghalangi masuknya solvent, hal ini sesuai dengan jumlah glukosa yang dihasilkan dengan *pretreatment autoclave* yang terdapat pada **Tabel 1**.



(a)



(b)



(c)

**Gambar 1.** Hasil SEM (*Scanning Electron Microscope*) pada (a) SPR tanpa *pretreatment*; (b) SPR setelah *pretreatment* ultrasonikasi; (c) SPR setelah *pretreatment autoclave*

*Pretreatment autoclave* terhadap jenis mikroalga yang berbeda efektifitasnya akan bervariasi karena memiliki struktur sel yang berbeda (Miranda et al., 2012). Oleh karena itu *pretreatment autoclave* harus dikombinasikan dengan metode lain seperti hidrolisis enzimatis (Hammann, 2019).

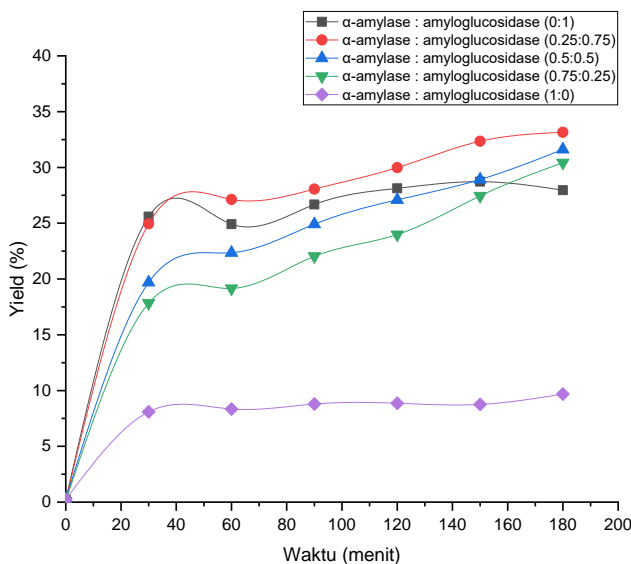
### 3.3 Pretreatment enzimatis

Karbohidrat dalam mikroalga sebagian besar terdiri dari selulosa dan pati. Selulosa tersusun dari monomer – monomer glukosa yang dihubungkan oleh ikatan  $\beta$ -1,4 glukosida sedangkan pati dihubungkan oleh ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6 glukosida.

Enzim amiloglukosidase dapat menghidrolisis pati sedangkan enzim *amylase* akan menghidrolisis selulosa. Oleh sebab itu enzim  $\alpha$ -*amylase* dan *amyloglucosidase* sering digunakan untuk menghidrolisis selulose dan pati yang terdapat di dalam mikroalga (Van zyl et al., 2012)

Enzim  $\alpha$ -*amylase* akan menghidrolisa pati menjadi disakarida sedangkan *amyloglucosidase* akan menghidrolisis lanjut menjadi monomer glukosa (Al Abdallah et al., 2016). Menurut Rempel et al (2019) hidrolisis *spirulina platensis* dengan menggunakan kombinasi enzim  $\alpha$ -*amylase* dan *amyloglucosidase* mampu menkonversi pati menjadi glukosa dengan *yield* 82%.

Pengaruh perbandingan enzim  $\alpha$ -*amylase* dan *amyloglucosidase* yang digunakan terhadap *yield* glukosa dapat dilihat pada **Gambar 2**. *Yield* glukosa maksimum yaitu 33,15 % diperoleh pada variasi penggunaan enzim  $\alpha$ -*amylase* : *amyloglucosidase* dengan perbandingan 0,25 : 0,75. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Hargono et al (2018) yang melakukan hidrolisa pati singkong menggunakan enzim  $\alpha$ -*amylase* : *amyloglucosidase* = 1 : 3 dan menghasilkan gula reduksi sebesar 93,45 g/L. Hasil terendah dengan *yield* sebesar 9,7 % diperoleh pada penggunaan enzim  $\alpha$ -*amylase* : *amyloglucosidase* = 1 : 0 atau hanya menggunakan enzim  $\alpha$ -*amylase* saja. Shokrkar dan Ebrahimi (2018) juga melaporkan *yield* glukosa sebesar 5,7 % diperoleh pada penggunaan enzim  $\alpha$ -*amylase* tanpa adanya penambahan enzim *amyloglucosidase*. Hal ini menunjukkan bahwa enzim  $\alpha$ -*amylase* hanya memecah ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosida.

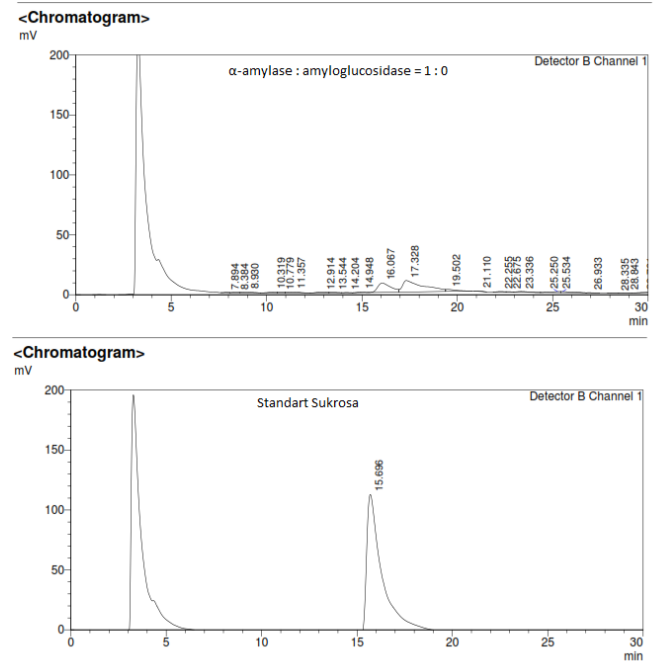


**Gambar 2.** *Yield* glukosa hasil hidrolisis SPR dengan variasi enzim

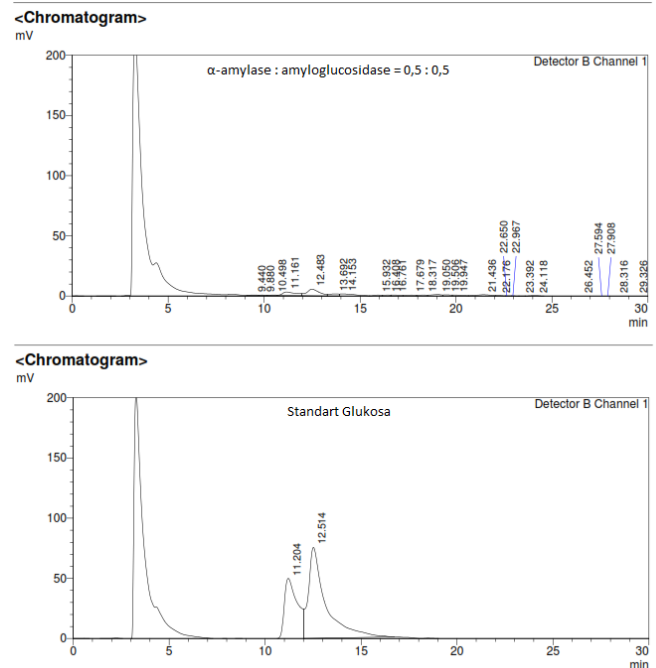
Untuk mengetahui selektifitas pengaruh enzim terhadap jenis gula reduksi yang dihasilkan, maka sampel dilakukan

uji HPLC (*high performance liquid chromatography*) dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3, 4 dan 5.

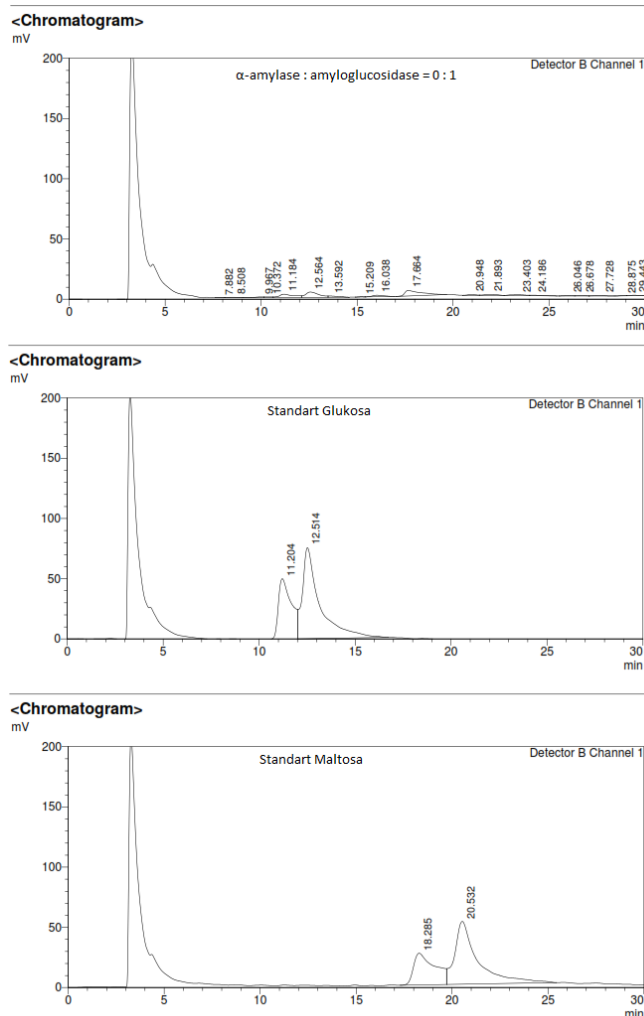
Gambar 3 menunjukkan *chromatogram* HPLC dari sampel dengan variasi penggunaan enzim  $\alpha$ -*amylase*: *amyloglucosidase* = 1 : 0 terlihat adanya *spectra* pada *retention time* 14,948 – 17,328 yang identik dengan *spectra* dari standar sukrosa.



**Gambar 3.** Hasil analisa HPLC sampel dengan perbandingan enzim  $\alpha$ -*amylase* : *amyloglucosidase* = 1:0



**Gambar 4.** Hasil analisa HPLC sampel dengan perbandingan enzim  $\alpha$ -*amylase* : *amyloglucosidase* = 0,5 : 0,5



**Gambar 5.** Hasil analisa HPLC sampel dengan perbandingan enzim  $\alpha$ -amylase : amyloglucosidase = 0 : 1

Untuk *chromatogram* sampel dengan penggunaan enzim  $\alpha$ -amylase : amyloglucosidase = 0,5 : 0,5 terdapat *spectra* pada *retention time* 12,483 yang identik dengan *spectra* dari standart glukosa (Gambar 4). Sedangkan untuk sampel dengan penggunaan enzim  $\alpha$ -amylase : amyloglucosidase = 0 : 1 dapat dilihat pada Gambar 5. Dengan penggunaan enzim amyloglucosidase terdapat *spectra* pada *retention time* pada kisaran 11, 12, serta 17-20 yang identik dengan *spectra* glukosa dan maltosa. Dari analisa HPLC ini dapat disimpulkan bahwa enzim  $\alpha$ -amylase akan cenderung menghasilkan disakarida karena enzim ini hanya menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosida sedangkan enzim amyloglucosidase akan menghasilkan glukosa dan maltosa karena mampu menghidrolisis ikatan  $\alpha$ -1,4 dan  $\alpha$ -1,6 glikosida.

#### 4. Kesimpulan

*Pretreatment* terhadap SPR untuk memecah dinding sel agar siap untuk proses fermentasi menjadi bioetanol yang paling efektif adalah menggunakan enzim dengan

perbandingan  $\alpha$ -amylase : amyloglucosidase = 0,25 : 0,75 yang dapat menghasilkan *yield* glukosa sebesar 33,15%. *Pretreatment* dengan ultrasonikasi juga dapat membantu memecah dinding sel SPR, namun kurang efektif karena hanya sehingga perlu dikombinasikan dengan *pretreatment* secara enzimatik.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, Q., Nixon, B.T., and Fortwendel, J.R., 2016. The enzymatic conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in Energy Research*. Vol 4. No 36. 1-15
- Choi, S.P., Nguyen, M.T., Sim, S.J., 2010. Enzymatic pretreatment of chlamydomonas reinhardtii biomass for ethanol production. *Bioresource Technology*. Vol 101. No 14. 5330-5336.
- Debiagi, F., Madeira, T.B., Nixdorf, S.L., and Mali., S., 2020. Pretreatment efficiency using autoclave high pressure steam and ultrasonication in sugar production from liquid hydrolysates and access to the residual solid fractions of wheat bran and oat hulls. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol 190. 166-181.
- Demuez, M., Mahdy, A., Tomas-Pejo, E., Gonzalez-Fernandez, C., Ballesteros, M., 2015. Enzymatic cell disruption of microalgae biomass in biorefinery process. *Biotechnol Bioeng*. Vol 112. No 10. 1955-1966
- Eldalaton, M.M., Kabra., A.N., Hwang, J.H., Govindwar, S.P., Kim, K.H., Kim, H., Jeon, B.H., 2015. Pretreatment of microalgal biomass for enhanced recovery/extraction of reducing sugar and proteins. *Bioprocess Biosyst Eng*. Vol 39. 95-103.
- Ferreira, A.F., Dias, A.P.S., Silva, C.M., dan Costa, M., 2016. Effect of low frequency ultrasound on microalgae solvent extraction : analysis of product, energy consumption and emissions. *Alga Research*. Vol 14. 9-16.
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2012. Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*. Vol 19. 116-121.
- Hammann, W.R., 2019. Method development and optimization for the recovery of carbohydrates from a microalga species of chlorella vulgaris by combined physical and chemical pretreatments. Thesis. University of North Dakota
- Hargono, H., Kumoro, A.C., Jos, B., 2018. Studi kinetika hidrolisis enzimatis pati singkong: pengaruh perbandingan alfa-amilase dan glukoamilase terhadap gula reduksi. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*. F1. 1-7.
- Jamilatun, S., Budhijanto, B., Rochmadi, R., Budiman, A., 2017. Thermal decomposition and kinetics studies of pyrolysis of spirulina platensis residue. *Int Journal of Renewable Energy Development (IJRED)*. Vol 6. No 3. 193-201.
- Jamilatun, S., Budiman, A., Anggorowati, H., Yuliestyan, A., Pradana, Y.S., Budhijanto, B., Rochmadi, R., 2019.

- Ex-situ catalytic upgrading of spirulina platensis residue oil using silica alumina catalyst. *International Journal of Renewable Energy Research (IJRER)*. Vol 9. No 4. 1733-1740
- Jeon, B.H., Choi, J.A., Kim, H.C., Hwang, J.H., Al Abou-Shanab, R., Dempsey, B.A., Regan, J.M., and Kim, J.R., 2013. Ultrasonic disintegration of microalgal biomass and consequent improvement of bioaccessibility/bioavailability in microbial fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. Vol 6. No 37. 1-9.
- Lee, S., and Shah, Y.T., 2012. *Biofuel and bioenergy : processes and technologies*. CRC Press. London. England.
- Liang, K., Zhang, Q., Cong, W., 2012. Enzyme assisted aqueous extraction of lipid from microalgae. *Journal of Agriculture and food Chemistry*. Vol 60. No 47. 11771-11776.
- Luque-Garcia, J.L., and Luque de Castro, M.D., 2003. Ultrasound : a powerfull tool for leaching. *Trend in Analitical Chem*. Vol 22. 41-47.
- Magro, F.G., Margarites, A.C., Reinehr, C.O., Gonçalves, G.C., Grazieli Rodigheri, G., Costa, J.A.V., Colla, L.M., 2017. Spirulina platensis biomass composition is influenced by the light availability and harvest phase in raceway ponds. *Environ. Technol*. Vol 22, 1–10.
- Michelon, W., Pirolli, M., Mezzari, M.P., Soares, H.M., and Busi da Silva, M.L., 2019. Residual sugar from microalgae biomass harvested from phycoremediation of swine wastewater digestate. *Water Science & Technology*. Vol 79. No 11. 2203-2210
- Miranda, J.R., Passarinho, P.c., and Gouveia, L., 2012. Pre-treatment optimization of scenedesmus obliquus microalga for bioethanol production. *Bioresource Technology*. Vol 104. 342-348.
- Permanasari, A.R., Yulistiani, F., Purnama, R.W., Widjaja, T., and Gunawan, S., 2018. *IOP Conference Series : Eart and Enviromental Science*. 160. 1-6.
- Rempel, A., Machado, T., Treichel, H., Colla, E., Margarites, A.C., and Colla, L.M., 2018. Saccharification of spirulina platensis biomass using free and immobilized amylolytic enzymes. *Bioresource Technology*. Vol 263. 163-171
- Rempel, A., Sossella, F., Margarites, A., Astolfi, A., Steinmetz, R., Kunz, A., Treichel, H., Colla, L., 2019. Bioethanol from Spirulina platensis biomass and the use of residuals to produce biomethane: An energy efficient approach. *Bioresource Technology*. Vol 288. 121588. 10.1016/j.biortech.2019.121588.
- Robak, K., and Balcerek, M., 2018. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology & Biotechnology*. Vol 56. No 2. 174-187
- Rodrigues, C.S., Villela, H.D.M., Martins, A.P., Marques, L.G., Colepicolo, P., and Tonon, A.P., 2015. Micoalgae for economic applications : advantages and perspectives for bioethanol. *Journal of Experimental Botany*. Vol 66 No 14. 4097-4108.
- Shokrkar, H., Ebrahimi, S., Zamani, M., 2017. Bioethanol production from acidic and enzymatic hydrolysates of mixed microalgae culture. *Fuel*. Vol 200. 380-386.
- Shokrkar, H., and Ebrahimi, S., 2018. Synergism of cellulase and amylolytic enzymes in the hydrolysis of microalgal carbohydrates. *Biofuel, Bioproduct & Biorefining*. Vol 12. No 5. 749-755.
- Sugiyono, A., Anindhita, Fitriana, I., Wahid, L.M.A., Adiarso., 2019. Dampak peningkatan pemanfaatan energi baru terbarukan terhadap perekonomian nasional. *BPPT*. pp 2
- Van Zyl, W.H., Bloom, M., and Viktor, M.J., 2012. Engineering yeasts for raw starch conversion. *Appl Microbial Biotechnology*. Vol 95. 1377-1388.
- Velazquez-Lucio, J., Rodriguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Saenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D.E., Aguilar, C.N., Fernandes, B.D., and Ruiz, H.A., 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal*. Vol 17. 780-791
- Wang, L., and Waller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Science Technology*. Vol 17. 300-312.