

## Kondisi Optimum hidrolisis Hidrolisis Menggunakan Asam Sitrat pada *Gracilaria* sp. dengan Metode Response Surface Methodology (RSM) untuk Produksi Biosugar

### *Optimal conditions for Citric Acid Hydrolysis of Gracilaria sp. Using Response Surface Methodology (RSM) for Biosugar Production*

Devi Wulansari<sup>1,2\*</sup>, Eko Nurcahya Dewi<sup>1</sup>, Tri Winarni Agustini<sup>1</sup>, Putut Har Riyadi<sup>1</sup>, dan Romauli Juliana Napitupulu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universitas Diponegoro, Jalan Prof. Soedarto No.13 Tembalang, Kota Semarang, 50275, Indonesia

<sup>2</sup>Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang, Jalan Lingkar Tanjungpura Kabupaten Karawang, 41315, Indonesia

\*Korespondensi penulis : dev.wulansari@poltekkpkarawang.ac.id

#### ABSTRAK

*Biosugar* merupakan salah satu sumber nutrisi untuk fermentasi. *Gracilaria* sp. diketahui sebagai biomassa dengan kandungan polisakarida yang tinggi sehingga berpotensi untuk menghasilkan *biosugar*. *Biosugar* dapat diperoleh dari proses hidrolisis dengan katalisator asam, salah satunya asam sitrat. Penelitian ini ditujukan untuk mengidentifikasi kondisi optimum dari konsentrasi asam sitrat dan durasi hidrolisis dalam proses produksi *biosugar* dari *Gracilaria* sp. yang dihidrolisis menggunakan asam sitrat. Pendekatan dalam penelitian ini menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan model *Box Behken*. Variabel yang diuji yaitu waktu hidrolisis (10-20 menit), konsentrasi asam sitrat (0,05-1 N), dan massa *Gracilaria* sp. yang digunakan (1-3 g). Respon hidrolisis yang diamati meliputi kadar gula reduksi dan pH, sedangkan evaluasi bahan baku meliputi kandungan proksimat, komponen fitokimia dan pengamatan mikroskopik. Model yang direkomendasikan dalam RSM adalah model 2FI (*Two-Factor Interaction*) dengan hasil optimal yang direkomendasikan dengan menggunakan konsentrasi asam sitrat 0,584 N, jumlah substrat 3,0 g dan waktu hidrolisis 20 menit. Validasi model menggunakan pengujian triplikat pada kondisi hidrolisis optimum yang direkomendasikan, menunjukkan hasil kadar gula reduksi sebesar 16,34 mg/mL dan pH hidrolisat sebesar 1,96. Hasil uji proksimat menunjukkan *Gracilaria* sp. mengandung karbohidrat sebesar 42,01-71,87 %, protein 3,26-6,03%, lemak 0,13-0,19%, kadar abu 4,66-35,15% dan kadar air 17,25-19,45%. Komponen fitokimia yang terdeteksi pada *Gracilaria* sp. sebelum hidrolisis meliputi alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, fenolik, steroid dan terpenoid, sedangkan setelah proses hidrolisis terdeteksi alkaloid, saponin, steroid dan terpenoid. Model matematis pada respon kadar gula reduksi telah valid, namun perlu dievaluasi lebih lanjut untuk mendapatkan nilai pH yang memenuhi kriteria.

**KATA KUNCI:** hidrolisis, asam sitrat, *biosugar*, rumput laut merah

#### ABSTRACT

*Biosugar* is a potential nutritional source for fermentation process. *Gracilaria* sp. is known for its high polysaccharide content, making it promising biomass for *biosugar* production. *Biosugar* can be obtained from the hydrolysis process using acid catalysts, one of which is citric acid. The study aimed to optimize the concentration of citric acid and hydrolysis duration for *biosugar* production from *Gracilaria* sp. using citric acid as the hydrolyzing agent. The experimental design was based on *Response Surface Methodology* (RSM) with *Box Behken* model. The independent variables examined were hydrolysis time (10 and 20 minutes), citric acid concentration (0.05 to 1 N), and the biomass of *Gracilaria* sp. used (1 to 3 g). The responses observed were reducing sugar concentration and pH of the hydrolysate, while the raw material was evaluated through proximate analysis, phytochemical screening and microscopic observations. The recommended model from RSM was the 2FI (*Two-Factor Interaction*) model, with optimal achieved at 0.584 N citric acid, 3.0 g of substrate and a hydrolysis time of 20 minutes. Model validation through triplicate testing under optimal hydrolysis conditions, yielded a reducing sugar concentration of 16.34 mg/mL and a hydrolysate pH of 1.96. The proximate analysis revealed that *Gracilaria* sp. contained carbohydrate ranging from 42.01-71.87%, protein 3.26-6.03%, fat 0.13-0.19%, ash 4.66-35.15% and moisture content 17.25-19.45%. Phytochemical screening detected alkaloids, tannins, flavonoids, saponins, phenolics, steroids and terpenoids in the raw biomass, whereas only alkaloids, saponins, steroids and terpenoids remained after hydrolysis. The mathematical model for reducing sugar concentration was validated, but further optimization is needed to achieve desirable pH levels.

**KEYWORDS:** hydrolysis, citric acid, *biosugar*, red seaweed

## PENDAHULUAN

Rumput laut (*seaweed*) merupakan salah satu biomassa dari laut yang dikenal karena kandungan karbohidratnya yang tinggi (Prita et al., 2021). Indonesia termasuk dalam negara dengan produktivitas rumput laut yang tinggi di dunia, dengan komoditas ekspor utama didominasi oleh kelompok agarofit jenis *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp. dan *Gelidiella* sp. (Zaenab et al., 2020), kelompok karaginoFit jenis *Eucheuma* sp., serta kelompok alginofit jenis *Sargassum* sp., *Laminaria* sp., *Asscophyllum* sp. dan *Macrocystis* sp. *Gracilaria verrucosa* merupakan salah satu contoh spesies dari genus Gracilariaceae yang mudah ditemukan karena bersifat *euryhaline*, yakni mudah tumbuh pada rentang salinitas yang luas (Waluyo et al., 2019). *G. verrucosa* memiliki kandungan karbohidrat lebih dari 60% (Fadhullah et al., 2022) dan rendemen agar sekitar 46% (Waluyo et al., 2019).

Kandungan karbohidrat pada *Gracilaria* sp. sebagian besar merupakan polisakarida kompleks seperti selulosa, hemiselulosa, serta hidrokoloid yang sulit untuk dicerna oleh manusia (Sasadara et al., 2022; Albuquerque et al., 2021). Selain itu, *Gracilaria* sp. juga memiliki kandungan senyawa fitokimia yang diketahui bermanfaat bagi kesehatan seperti saponin, steroid, fenol hidrokuinon, flavonoid, tanin, dan alkaloid (Luringunusa et al., 2023; Insani et al., 2022). Kandungan polisakarida yang tinggi berpotensi untuk produksi *biosugar*, yaitu bentuk sakarida yang lebih sederhana dan dapat dicerna seperti disakarida dan monosakarida. *Biosugar* dapat bermanfaat sebagai substrat yang kaya nutrisi untuk produk fermentasi seperti *bioethanol* (Albuquerque et al., 2021) atau diproses lebih lanjut menjadi gula cair seperti sirup glukosa atau fruktosa. Proses perebusan sederhana *Gracilaria* sp. dapat meningkatkan kadar glukosa dan menurunkan kadar serat pangan tidak larut (Sasadara et al., 2022).

*Biosugar* dari biomassa rumput laut dapat dihasilkan melalui berbagai metode, salah satunya adalah proses hidrolisis dengan menggunakan katalis asam, baik asam anorganik maupun asam organik. Hidrolisis menggunakan katalisator asam biasanya dijumpai pada pembuatan gula *invert* (Suwarno et al., 2015), dekstrin (Yusra et al., 2020) oligosakarida dan sakarida sederhana lain (Sasongko et al., 2019). Secara umum, jenis asam organik yang banyak dipakai oleh industri makanan dan minuman adalah asam sitrat dan asam tartrat. Keuntungan penggunaan asam sitrat adalah ekonomis dan relatif lebih aman digunakan karena

asam sitrat termasuk kategori *Generally Recognized as Safe* (GRAS) oleh *Food and Drug Administration* (FDA) (Firdaus & Azara, 2022; Salsabila & Meylani, 2024). Pada hidrolisis rumput laut, penggunaan katalisator asam pada hidrolisis juga bertujuan untuk memecah struktur kaku dari bahan lignoselulosa (Tassakka et al., 2021). Meskipun demikian, penggunaan konsentrasi asam dan lama waktu pemanasan merupakan hal yang penting pada hidrolisis asam, sehingga perlu dilakukan optimasi untuk menghasilkan kadar gula yang optimal. Lama waktu pemanasan meningkatkan jumlah molekul asam yang bereaksi dengan molekul karbohidrat sehingga dapat meningkatkan kadar gula yang terbentuk (Artati et al., 2012). Penggunaan konsentrasi asam yang tinggi atau berlebihan dapat menyebabkan penurunan kadar gula reduksi yang disebabkan oleh kelebihan jumlah katalis asam selama proses hidrolisis (Fajri et al., 2023). Kelebihan jumlah katalis asam dapat menyebabkan nilai pH larutan hidrolisis menjadi rendah. Pada pembuatan produk gula seperti sirup glukosa, fruktosa, dan gula semut, nilai pH larutan gula yang rendah menyebabkan gula sulit mengental atau mengkristal dan menyebabkan mutu produk yang dihasilkan menjadi rendah (Wilberta et al., 2021), oleh karena itu nilai derajat pH pada hasil hidrolisis perlu diperhatikan sebelum *biosugar* yang dihasilkan dapat diolah lebih lanjut.

Metode RSM dapat digunakan untuk optimasi kondisi hidrolisis menggunakan katalisator asam. Metode RSM merupakan kumpulan metode statistika yang melibatkan beberapa faktor dalam mempengaruhi respon yang ditetapkan. Prediksi matematis pada metode RSM memungkinkan menggunakan jumlah percobaan yang relatif rendah sehingga meningkatkan efisiensi penelitian, sekaligus dapat menjelaskan kondisi proses kimia atau biokimia yang optimal (Nurmiah et al., 2013). Penggunaan asam organik sebagai katalisator untuk hidrolisis polisakarida pada rumput laut (biomassa) menjadi *biosugar*, terutama asam sitrat, belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi hidrolisis *Gracilaria* sp. yang optimal untuk menghasilkan *biosugar* dengan asam sitrat sebagai katalis. Respon pada model RSM yang ditetapkan meliputi kadar gula reduksi dan derajat keasaman (pH) *biosugar*. Kandungan proksimat bahan baku yang dievaluasi pada kondisi sebelum dan sesudah *pre-treatment* berupa pencucian dan penjemuran, sedangkan skrining fitokimia secara kualitatif dan pengamatan mikroskopik dilakukan pada kondisi sebelum dan sesudah proses hidrolisis.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput laut *Gracilaria* sp. yang diperoleh dari wilayah pesisir utara Kecamatan Tirtajaya Kabupaten Karawang Provinsi Jawa Barat. Bahan kimia yang digunakan meliputi asam sitrat (*food grade*) produksi dari PT Gunacipta Multirasa Tangerang, glukosa (Sigma Aldrich), reagen Benedict, natrium bikarbonat, CaO, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> (Merck), NaCl, HCl, amil alkohol, serbuk magnesium. Peralatan yang digunakan antara lain spektrofotometer UV-Vis (Biochrom, Germany), pH meter (Hanna Instrument, Italia), mikroskop binokuler (Celestron Labs CB2000CF), *hot plate stirrer*, corong Buchner, termometer, *waterbath*, erlenmeyer dan alat gelas lainnya.

### Metode

#### Penyiapan bahan baku

Rumput laut *Gracilaria* sp. diperoleh dari pembudidaya dalam keadaan kering kemudian dilakukan proses sortir berdasarkan warna dan kotoran yang terlihat secara visual. Tahap awal preparasi dilakukan dengan membersihkan rumput laut dari pengotor fisik kemudian dicuci dengan air yang mengalir hingga bersih. Selanjutnya, dilakukan proses perendaman dengan larutan kapur (CaO jenuh) selama kurang lebih 12 jam hingga aroma khas berkurang, kemudian dikeringkan hingga berubah warna menjadi putih atau hijau transparan (Sasadara et al., 2022).

#### Proses hidrolisis dengan katalisator asam sitrat

Hidrolisis asam encer (sakarifikasi) dilakukan dengan katalisator asam sitrat yang ditambahkan pada serbuk kering *Gracilaria* sp. Prosedur hidrolisis mengacu pada Kim et al. (2015) dengan modifikasi jenis asam dan konsentrasi asam. Hidrolisis dilakukan diatas *hot plate* dengan menggunakan tabung Erlenmeyer 250 mL (volume kerja 100 mL). Kondisi hidrolisis asam meliputi waktu reaksi 10 hingga 20 menit pada suhu 100 ° C, dengan konsentrasi asam dan jumlah rumput laut sesuai dengan desain aktual pada model *Box Behken*, disertai dengan pengadukan konstan. Setelah reaksi hidrolisis selesai, residu disaring, kemudian filtrat disentrifugasi pada 1.000 rpm selama 10 menit. Filtrat cair hidrolisat dikumpulkan untuk tahap

pengujian selanjutnya, sedangkan residu hidrolisis berupa ampas fragmen rumput laut *Gracilaria* sp. diamati secara mikroskopik mengacu pada Riswanti et al. (2013). Residu hidrolisis yang diamati meliputi residu hidrolisis yakni *Run 2* dan *Run 9* (Tabel 1) pada waktu reaksi 10 menit dan 20 menit dengan konsentrasi asam dan jumlah rumput laut yang sama.

### Proksimat

Pengujian proksimat yang dilakukan mencakup penentuan kadar abu, kadar air, kadar lemak, kadar protein serta kadar karbohidrat dengan mengacu pada AOAC (1990). Penetapan kadar karbohidrat dihitung menggunakan metode *by difference* dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Karbohidrat (\%)} = 100\% - (\% \text{ protein} + \% \text{ lemak} + \% \text{ abu} + \% \text{ air})$$

### Kadar gula pereduksi

Penentuan kadar gula pereduksi dilakukan menggunakan metode Benedict yang dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Standar yang digunakan sebagai pembanding gula pereduksi adalah glukosa. Sampel hidrolisat dan larutan standar glukosa (dengan konsentrasi 100; 200; 300; 400; dan 500 ppm) direaksikan dengan reagen Benedict dengan rasio 1:10. Campuran kemudian dipanaskan pada penangas air (*waterbath*) pada suhu 80 °C selama 30 menit. Setelah pemanasan selesai, larutan didinginkan hingga mencapai suhu kamar, kemudian dihomogenkan. Pengukuran absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm (Mansuit et al., 2015).

### pH

Pengukuran pH pada sampel hidrolisat menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi sebelum digunakan. Kalibrasi alat dilakukan dengan menggunakan larutan *buffer* pH 4 dan pH 7, yang sesuai kisaran pH hidrolisat. Proses pengukuran nilai pH sampel, dilakukan dengan mencelupkan elektroda pH meter dalam 10 mL sampel, dan nilai pH ditampilkan secara langsung oleh alat.

### Uji fitokimia

Uji fitokimia dalam penelitian ini meliputi uji kandungan flavonoid, tannin, dan steroid/triterpenoid secara kualitatif menggunakan pereaksi kimia mengacu pada Balamurugan et al., (2019).

### Uji flavonoid

Sampel ditambah serbuk Mg dan amil alkohol kemudian dicampur hingga homogen. Campuran direaksikan dengan HCl 2 N secara hati-hati melalui dinding tabung. Sampel yang mengandung *flavonoid* akan membentuk warna jingga hingga merah pada lapisan amil alkohol.

### Uji steroid/triterpenoid

Sampel ditambah asam asetat anhidrat kemudian direaksikan dengan  $H_2SO_4$  pekat secara hati-hati melalui dinding cawan porselen. Sampel yang mengandung *steroid* akan terbentuk warna hijau, sedangkan *triterpenoid* akan membentuk warna merah.

### Uji tannin

Sampel direaksikan dengan larutan NaCl 10% dan larutan gelatin 0,5%. Sampel yang mengandung *tannin* akan membentuk endapan putih.

### Uji saponin

Sampel ditambahkan akuadest panas kemudian dikocok secara vertikal selama 10 detik. Adanya kandungan *saponin* ditunjukkan oleh terbentuknya buih yang bertahan selama 10 menit (Ih et al., 2018).

### Uji fenolik

Sampel direaksikan dengan  $FeCl_3$  5%. Sampel yang mengandung senyawa *fenolik* akan membentuk warna biru kehitaman (Lisi, 2017).

### Uji alkaloid

Reaksi *dragendorff* : Sampel ditambah dengan  $H_2SO_4$  2N membentuk endapan merah bata menunjukkan adanya alkaloid (Marjoni, 2016).

### Analisis data

Variabel bebas yang ditetapkan pada penelitian ini meliputi konsentrasi asam sitrat, jumlah *Gracilaria* sp, dan lama waktu hidrolisis, sedangkan variabel terikat meliputi kadar gula reduksi dan pH. Data yang dikumpulkan dan dianalisis menggunakan *software* Design Expert versi 13 dengan model Box Behken. Model statistik menggunakan model yang disarankan oleh RSM yaitu *2 Factor Interaction* (2FI). Kriteria optimasi yang ditetapkan meliputi kadar gula pereduksi maksimal dan nilai pH maksimal (pH tertinggi).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

*Gracilaria* sp. dikenal sebagai bahan baku ekstraksi agar, yang merupakan fitokoloid khas yang banyak ditemukan di spesies ganggang merah, memiliki beragam bentuk pertumbuhan seperti ragam bentuk *thallus*, sebagian besar berbentuk silindris hingga pipih lebar (Torres et al., 2019). *Gracilaria* sp. diketahui memiliki dinding sel yang kaku berbasis selulosa dan terdiri dari berbagai polisakarida kompleks yang dapat dipecah menjadi gula yang lebih sederhana yang dapat dikonversi lebih lanjut menjadi etanol melalui fermentasi (Kumar et al., 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Sa'diyah dan Anugerah (2018) menunjukkan bahwa *Gracilaria* sp. memiliki kandungan selulosa tertinggi sebesar 19,7%. Tingginya kandungan selulosa ini mengindikasikan potensi *Gracilaria* sp sebagai bahan baku untuk menghasilkan bioetanol melalui proses hidrolisis. Meskipun demikian, kadar selulosa pada rumput laut dapat bervariasi tergantung pada jenisnya, perlakuan pascapanen, teknik budidaya, serta daerah budidaya.

### Proksimat

Rumput laut *Gracilaria* sp. yang diperoleh dari pembudidaya rumput laut dalam keadaan kering dan masih tinggi pengotor. Proses *pre-treatment* yang dilakukan berupa pencucian berulang dan penjemuran hingga kering. Hal ini terbukti mampu meningkatkan rendemen karbohidrat sekaligus menurunkan kadar pengotor (*impurities*) sebagaimana ditunjukkan dalam Tabel 1. Hal ini mengindikasikan tingginya pengotor yang terdapat pada bahan baku. Tingginya pengotor juga dilaporkan pada penelitian (Waluyo et al., 2019), bahwa kandungan zat pengotor (*impurities*) yang terdapat di Kecamatan Tirtajaya Kabupaten Karawang relatif tinggi yakni sebesar 8,44%. Material pengotor seperti sedimen dari tambak/ areal budidaya yang melekat pada rumput laut dapat dihitung sebagai kadar abu. Selain itu, perlakuan penjemuran dapat menyebabkan perubahan warna *Gracilaria* sp. dari semula berwarna merah keunguan menjadi kekuningan atau pucat (Gambar 1)

Perlakuan *pre-treatment* pada *Gracilaria* sp. merupakan proses pendahuluan yang penting untuk mendapatkan nilai karbohidrat yang tinggi, karena karbohidrat merupakan substrat yang akan dihidrolisis menjadi *biosugar*. Komponen proksimat lain yang meningkat adalah kadar protein dan kadar



lemak (Tabel 1). Kadar protein pada *Gracilaria* sp mengalami peningkatan setelah melalui proses *pre-treatment*, yaitu sebesar 2,77%. Kadar lemak pada *Gracilaria* sp. relatif rendah yaitu kurang dari 0,2% baik sebelum maupun setelah melalui *pre-treatment*. Hasil ini sejalan dengan penelitian Setiawati (2022) dimana kadar protein dan lemak rata-rata pada *G. verrucosa* sebesar 8,27% dan 0,42% secara berturut-turut, setelah melewati proses pencucian dan penjemuran. Kadar air pada kedua kelompok baik bahan baku maupun kelompok *pre-treatment* cukup tinggi. Persyaratan kadar air menurut SNI 2690:2015 tentang rumput laut kering adalah maksimal 12%. Meskipun demikian, kadar air tidak mempengaruhi kualitas rumput laut (Waluyo et al., 2019), namun dapat mengurangi jumlah rendemen nilai karbohidrat yang diperoleh dari metode *by difference*. Terjadinya peningkatan kadar karbohidrat (*by difference*), protein dan lemak sejalan dengan menurunnya kadar air dan kadar abu. Oleh karena itu, untuk memaksimalkan rendemen karbohidrat, nilai kadar air dan kadar abu perlu dikendalikan hingga memenuhi syarat SNI.

### Optimasi Kondisi Hidrolisis dengan RSM

Pada proses hidrolisis dengan katalisator asam atau sakarifikasi, terdapat berbagai faktor yang dapat mempengaruhi hasil hidrolisis. Percobaan hidrolisis dalam penelitian ini menggunakan kombinasi 3 (tiga) variabel, yaitu jumlah substrat (*Gracilaria* sp.), konsentrasi asam sitrat, dan lama waktu hidrolisis. Berdasarkan kombinasi faktor-faktor tersebut, dihasilkan 13 kali percobaan (*run*), kemudian ditentukan nilai pH dan kadar gula reduksinya. Hasil pengukuran nilai pH dan gula pereduksi dari masing-masing percobaan disajikan pada Tabel 2.

### Pengaruh kondisi optimasi terhadap kadar gula reduksi biosugar

Optimasi kondisi hidrolisis yang melibatkan tiga faktor dianalisis dengan menggunakan metode *Box Behken*. Model analisis yang disarankan oleh RSM adalah 2FI. Keterlibatan faktor konsentrasi asam sitrat, waktu hidrolisis dan jumlah substrat terhadap kadar gula reduksi dengan kriteria maksimal,



Gambar 1. Kenampakan *Gracilaria* sp. (a) setelah pencucian dan penjemuran (b) serbuk *Gracilaria* sp.

Figure 1. Appearance of *Gracilaria* sp. (a) after washing and drying (b) *Gracilaria* sp. powder

Tabel 1. Kandungan Proksimat pada bahan baku *Gracilaria* sp.

Table 1. Proximat content of *Gracilaria* sp. (raw material)

Parameter/Parameter	<i>Gracilaria</i> sp./ <i>Gracilaria</i> sp.	
	Sebelum diproses/ <i>Before pre-treatment</i>	Setelah diproses/ <i>After pre-treatment</i>
Kadar abu/ <i>ash</i> (%)	35.15±2.35	4.66±0.29
Kadar lemak/ <i>crude fat</i> (%)	0.13±0.01	0.19±0.02
Kadar protein/ <i>proteins</i> (%)	3.26±0.62	6.03±0.17
Kadar air/ <i>moisture</i> (%)	19.45±1.34	17.25±0.51
Kadar karbohidrat/ <i>carbohydrate</i> (%)*	42.01±3.07	71.87±0.40

Keterangan/Note: (\*) melalui perbedaan/*by difference*

Tabel 2. Hasil pengamatan nilai pH dan kadar gula reduksi *biosugar* menggunakan rancangan model *Box Behken*

Table 2. Result of pH value and reduction sugar content using actual design of Box Behken modelling

Run	Jumlah <i>Gracilaria</i> sp./Amount of <i>Gracilaria</i> sp. (g)	Konsentrasi asam/ Acid concentration (N)	Waktu hidrolisis/ Hydrolysis time (menit/minutes)	pH (unit)	Kadar gula reduksi/ Reduction sugar content (mg/mL)
1	3	0.525	10	2.07	6.3
2	1	0.525	10	2.1	4.75
3	3	1	15	1.89	14.14
4	1	0.05	15	2.86	5.31
5	1	1	15	1.91	7.97
6	2	0.05	10	2.7	4.8
7	2	1	10	1.66	5.91
8	3	0.525	20	2.02	15.31
9	1	0.525	20	2.98	6.48
10	2	1	20	1.6	13.85
11	2	0.05	20	2.68	5.95
12	3	0.05	15	3.06	6.25
13	2	0.525	15	2.03	8.75

disajikan dalam persamaan model matematis berikut:

$$\text{Kadar gula reduksi} = 13,064 - 4,719X - 11,079Y - 0,608Z + 2,753 XY + 0,364 XZ + 0,715 YZ$$

Keterangan:

X = Konsentrasi substrat

Y = Konsentrasi asam

Z = Waktu hidrolisis

Keakuratan model matematis pada kadar gula pereduksi dan nilai pH ditunjukkan melalui nilai  $R^2$  pada Tabel 3 dan Tabel 4 secara berurutan. Nilai koefisien determinasi pada produksi gula reduksi adalah 0,9782 yang menunjukkan bahwa 97,82% dari total variasi rendemen gula reduksi telah terwakili dalam model. Berdasarkan kriteria pH dan gula reduksi maksimal, terdapat 35 titik solusi yang ditemukan. Solusi dengan nilai *desirability* tertinggi sebesar 0,743 direkomendasikan dengan menggunakan jumlah *Gracilaria* sp. sebanyak 3 g, konsentrasi asam sitrat sebesar 0,584 N dan waktu hidrolisis selama 20 menit.

Validasi terhadap model matematis dilakukan dengan uji eksperimental pada titik solusi terbaik yang disarankan secara triplikat. Hasil pengujian menunjukkan nilai rata-rata kadar gula reduksi sebesar  $16,34 \pm 0,79$  mg/mL dengan nilai *p-value* pada faktor X, Y dan Z sebesar 0,0002; 0,0001; dan 0,0001 secara berturut-turut. Nilai *p-value* pada ke-

tiga faktor kurang dari 0,05 menunjukkan bahwa model matematis tersebut telah sesuai.

Hal tersebut menunjukkan bahwa lama waktu hidrolisis, konsentrasi asam sitrat dan jumlah rumput laut yang digunakan berpengaruh terhadap jumlah gula pereduksi yang dihasilkan. Penelitian Sasadara et al. (2022) menyatakan bahwa proses perebusan pada *Gracilaria* sp. dapat meningkatkan kadar glukosa secara signifikan dan menurunkan kadar serat total. Semakin lama waktu perebusan dapat meningkatkan reaksi hidrolisis. Panas pada perebusan mampu memecah karbohidrat menjadi gula yang lebih sederhana. Kandungan gula pereduksi meningkat seiring dengan naiknya konsentrasi katalis asam dan lamanya waktu perlakuan panas. Peningkatan konsentrasi larutan asam yang digunakan, maka akan mempercepat pemutusan ikatan antara molekul karbohidrat atau polisakarida dengan air, sehingga dapat mempercepat pembentukan molekul sakarida yang sederhana (Fajri et al., 2023).

Data yang disajikan pada Tabel 3 merupakan hasil dari respon kadar gula reduksi terhadap faktor hidrolisis, dapat dilihat bahwa nilai *F-value* dari model penelitian yang direkomendasikan adalah 44,80 yang menunjukkan bahwa model tersebut signifikan. Hal ini didukung dengan nilai *P-value* sebesar 0,0001, yang menunjukkan probabilitas sebesar 0,01% bahwa nilai *F-value* tersebut muncul

diakibatkan karena adanya *noise*. Nilai *P-value* yang lebih kecil dari 0.05 maka menunjukkan bahwa model dinyatakan signifikan. Nilai  $R^2$  sebesar 0,9782 berada dalam rentang yang wajar dengan perbedaan antara *predicted*  $R^2$  dan *adjusted*  $R^2$  kurang dari 0,2.

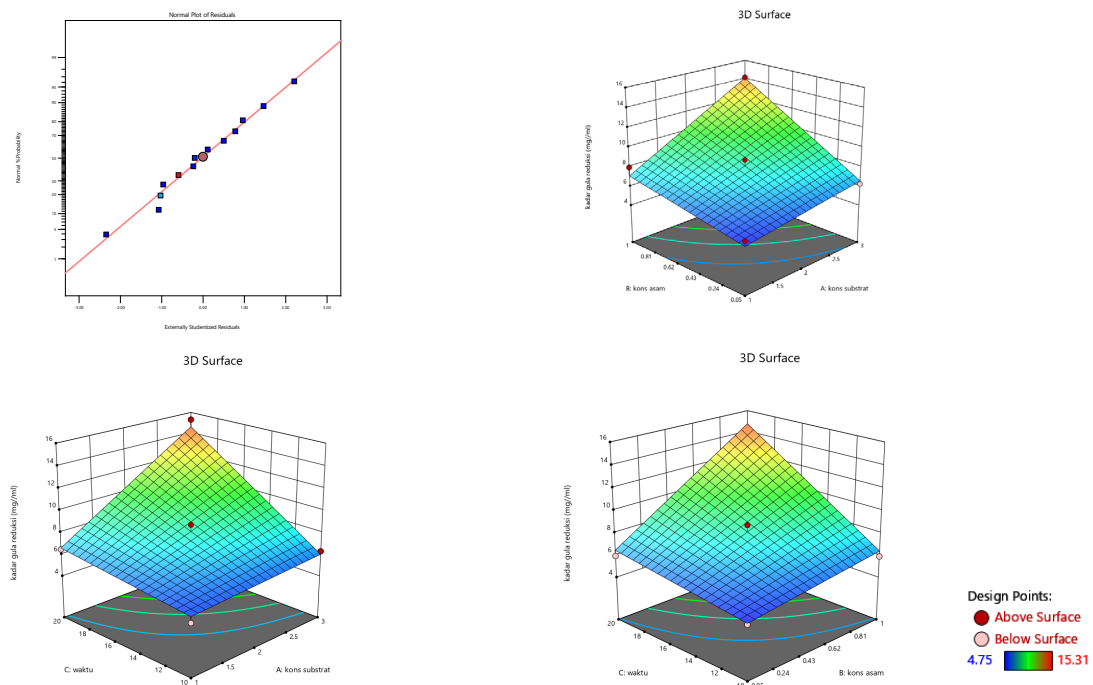
Temuan dalam penelitian ini sejalan dengan hasil studi yang dilakukan oleh Artati et al. (2012), yang melaporkan bahwa peningkatan asam yang dipakai pada proses hidrolisis berbading linier

dengan peningkatan glukosa yang dihasilkan. Kecepatan reaksi pada hidrolisis asam tergantung pada jumlah  $H^+$  pada asam. Ion  $H^+$  akan berikatan dengan ion  $OH^-$  pada air untuk membentuk gula pereduksi. Pada kelompok gula reduksi tertinggi (Tabel 2), selain penggunaan konsentrasi asam tinggi (1N) hidrolisis juga didukung dengan lama waktu hidrolisis yang lebih lama (20 menit) sehingga kadar gula pereduksi semakin meningkat secara signifikan. Data Gambar 2 dan 3 menunjukkan

Tabel 3. Hasil ANOVA pada kadar gula pereduksi *biosugar*

Table 3. ANOVA results on the test of reducing sugar content of biosugar

Sumber/Source	Jumlah Kuadrat/Sum of Squares	df	Rata-rata Kuadrat/Mean Square	Nilai F/ F-value	Nilai p/ p-value	Keterangan/ Note	$R^2$
<b>Model</b>	166.83	6	27.80	44.80	0.0001	<b>signifikan/ significant</b>	<b>0.9782</b>
A-kons substrat/A – substrate concentration	38.24	1	38.24	61.61	0.0002		
B-kons asam/B – acid concentration	47.82	1	47.82	77.06	0.0001		
C-waktu/C – time	49.15	1	49.15	79.20	0.0001		
Residual	3.72	6	0.6206				
Total Cor/Cor Total	170.55	12					



Gambar 2. Plot normal sisa dan grafik permukaan 3D korelasi antara konsentrasi asam, jumlah substrat, waktu hidrolisis dan kadar gula pereduksi

Figure 2. Normal plot of residual and 3D surface graph of correlation between acid concentration, substrate amount, hydrolysis time and reducing sugar content

optimalisasi kondisi hidrolisis dalam bentuk 3D. Warna merah menunjukkan tingkat gula reduksi dan pH yang paling optimal (nilai *desirability* tinggi).

#### Pengaruh kondisi optimasi terhadap pH biosugar

Proses hidrolisis dengan asam sitrat dapat mempengaruhi hasil pH hidrolisis. Keterlibatan faktor konsentrasi asam sitrat, waktu hidrolisis dan jumlah substrat terhadap nilai pH dengan kriteria maksimal, disajikan dalam persamaan model matematis berikut:

$$\text{pH} = 2,27 - 0,1013X - 0,53Y + 0,0938Z$$

Keterangan:

X = Konsentrasi substrat

Y = Konsentrasi asam

Z = Waktu hidrolisis

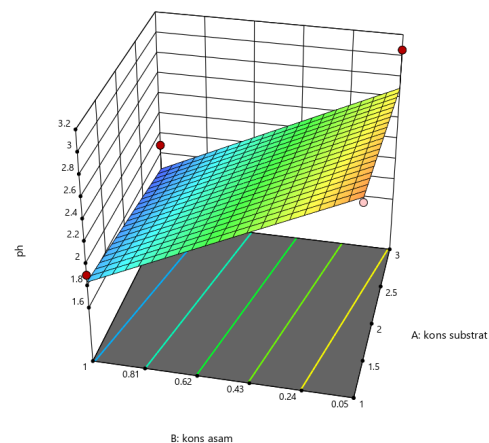
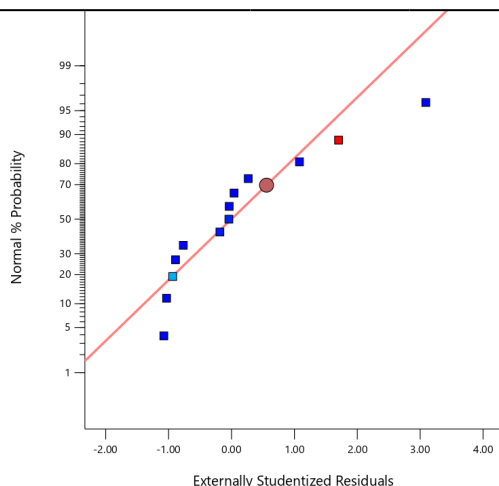
Data Tabel 4 menunjukkan hasil respon pH terhadap kombinasi faktor hidrolisis. Dapat dilihat bahwa nilai *F-value* dari model penelitian yang direkomendasikan adalah 10,09 menunjukkan bahwa model tersebut signifikan. Terdapat kemungkinan 0,31% bahwa nilai *F-value* tersebut disebabkan karena adanya *noise*. Nilai *P-value* yang lebih kecil dari 0.0500 menunjukkan bahwa model yang digunakan bersifat signifikan.

Pada hasil validasi nilai pH diperoleh nilai rata-rata pengukuran pH sebesar  $1,97 \pm 0,28$  dengan nilai *P-value* pada faktor X, Y dan Z sebesar 0,3357; 0,0005; dan 0,3709 secara berturut-turut. Nilai *P-value* lebih besar dari 0,05 pada faktor X dan Z menunjukkan bahwa model matematis belum sesuai. Oleh karena itu, perlu dilakukan evaluasi terhadap model dan eksperimen lebih lanjut terkait respon pH sesuai dengan kriteria.

Tabel 4. Hasil ANOVA pada nilai pH biosugar

Table 4. ANOVA results on the pH value test of biosugar

Sumber/Source	Jumlah Kuadrat/ Sum of Squares	df	Rata-rata Kuadrat/ Mean Square	Nilai F/ F-value	Nilai p/ p-value	Keterangan/ Note	R <sup>2</sup>
<b>Model</b>	2.40	3	0.7998	10.09	0.0031	<b>signifikan/ significant</b>	0.7708
A-jumlah rumput laut/A – seaweed quantity	0.0820	1	0.0820	1.03	0.3357		
B-kons asam/B – acid concentration	2.25	1	2.25	28.34	0.0005		
C-waktu/ C – time	0.0703	1	0.0703	0.8868	0.3709		
<b>Residual</b>	0.7136	9	0.0793				
<b>Total Cor/Cor Total</b>	3.11	12					



Gambar 3. Plot normal residual dan grafik permukaan 3D dari korelasi antara konsentrasi asam, jumlah substrat dan nilai pH

Figure 3. Normal Plot of Residuals and 3D surface graph of correlation between acid concentration, substrate amount and pH value



Asam sitrat berfungsi sebagai katalisator yang mampu memecah polisakarida menjadi molekul gula sederhana seperti oligosakarida dan monosakarida (Zaenab, 2020). Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama durasi hidrolisis, maka semakin besar peluang konversi polisakarida menjadi gula sederhana, sehingga nilai pH akan meningkat. Penelitian lain yakni penelitian Suwarno et al. (2015) menunjukkan bahwa kondisi optimum proses hidrolisis gula inversi yang menggunakan asam organik berlangsung pada pH 2,0. Penelitian tersebut juga menyatakan bahwa jenis asam tidak berpengaruh terhadap laju reaksi pada pH yang sama, baik asam organik maupun asam anorganik. Konsentrasi asam berkaitan dengan nilai pH larutan. Konsentrasi asam berpengaruh langsung pada nilai pH, dimana semakin rendah pH larutan maka semakin besar konstanta laju reaksi. Hal ini akan mempercepat proses reaksi hidrolisis dan meningkatkan produksi *biosugar* (Suwarno et al., 2015; Legahati, 2020).

Berdasarkan persamaan model yang telah diperoleh, untuk menghasilkan kadar gula reduksi dan rentang pH maksimal sesuai dengan kriteria penelitian, maka kondisi hidrolisis yang disarankan adalah pada konsentrasi asam 0,584 N dengan jumlah substrat 3 g dan waktu hidrolisis 20 menit. Hasil validasi pada masing-masing respon menunjukkan bahwa kondisi hidrolisis yang disarankan sudah sesuai untuk memperoleh kadar gula reduksi yang optimal, namun perlu dievaluasi lebih lanjut untuk mendapatkan nilai pH yang sesuai dengan kriteria.

### Komponen Fitokimia

Selain diketahui sebagai sumber polisakarida (agar) yang tinggi, *Gracilaria* sp. juga mengandung senyawa fitokimia. *Gracilaria* sp. mengandung

flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, dan memproduksi *polyunsaturated fatty acids* (PUFA) (Susanto et al., 2021; Rusli et al., 2016). Senyawa fitokimia pada penelitian ini dideteksi secara kualitatif menggunakan pereaksi kimia, dengan hasil yang tercantum pada Tabel 5. Kandungan fitokimia yang terdeteksi pada *Gracilaria* sp. dapat bervariasi sesuai dengan pelarut (*solvent*) yang digunakan pada saat ekstraksi untuk pengujian. Penelitian Rusli et al. (2016) menunjukkan *Gracilaria* sp. yang diekstraksi menggunakan pelarut metanol memiliki komponen fitokimia yang lebih banyak dibandingkan menggunakan pelarut etanol dan aseton. Hal ini disebabkan derajat kepolaran pelarut berpengaruh terhadap jenis kepolaran senyawa yang ditarik. Pada penelitian ini digunakan air sebagai pelarut untuk uji fitokimia, dimana air diketahui sebagai pelarut *universal* yang dapat menarik berbagai jenis senyawa fitokimia (Matoke et al., 2024).

Pada Tabel 5 terdapat perbedaan komponen fitokimia pada rumput laut dengan hasil hidrolisis dengan asam sitrat 0,05 N dan 1 N. Penurunan komponen yang terdeteksi diduga terkait dengan suhu hidrolisis dan konsentrasi asam sitrat yang digunakan. Panas yang tinggi dapat merusak senyawa fitokimia yang tidak stabil (*thermolabil*) seperti fenol-fenolik, flavonoid (Amanto et al., 2020) dan tanin (Handayani et al., 2018). Perbedaan komponen yang terdeteksi juga diduga disebabkan karena rendahnya konsentrasi kandungan yang terdapat dalam larutan hidrolisat *Gracilaria* sp. sehingga sulit untuk dideteksi menggunakan uji kualitatif dengan pereaksi.

### Pengamatan Mikroskopik Residu Hidrolisis

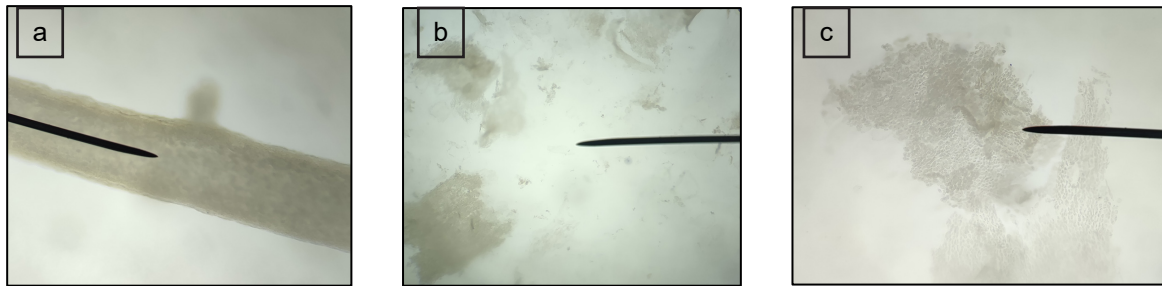
Pengamatan mikroskopik *thallus Gracilaria* sp. sebelum dihidrolisis pada perbesaran 100x menunjukkan kondisi penampakan sel korteks

Tabel 5. Komponen fitokimia pada *Gracilaria* sp.

Table 5. Phytochemical compound of *Gracilaria* sp.

Senyawa/ Bioactive compounds	A	B	C
Flavonoid/Flavonoids	+	-	-
Alkaloid/Alkaloids	+	+	+
Fenolik/Phenolics	+	-	-
Tanin/Tanin	+	-	-
Saponin/Saponin	+	+	-
Steroid-Triterpenoid/Steroids-Triterpenoids	+	+	-

Keterangan/Note: (A) Rumput laut/seaweed; (B) Hidrolisis asam sitrat 0,05 N/hydrolysis by acid citric 0,05N; (C) Hidrolisis asam sitrat 1 N/ hydrolysis by acid citric 1N; (+) terdeteksi/detected; (-) tidak terdeteksi/not detected



Gambar 4. Kenampakan mikroskopik *thallus Gracilaria* sp. sebelum dan sesudah hidrolisis (a) sebelum hidrolisis (b) hidrolisis 10 menit (c) hidrolisis 20 menit

Figure 4. Microscopic appearance of *Gracilaria* sp. before and after hydrolysis (a) before hydrolysis (b) 10 mins hydrolysis (c) 20 mins hydrolysis

masih teratur dan bentuknya dapat diamati dengan jelas serta sel epidermis terlihat tebal (Gambar 4). Setelah dihidrolisis selama 10 menit, pengamatan 100x pada residu/ampas hidrolisis dengan asam sitrat 1N, terlihat fragmentasi pada *thallus* namun pada beberapa fragmen tersebut sel epidermis masih terlihat tebal. Pada hidrolisis selama 20 menit, fragmen residu rata-rata berukuran lebih kecil dan tipis. Pada perbesaran 1000x, lapisan epidermis pada sebagian besar fragmen tidak nampak.

Menurut Riswanti et al. (2013) kandungan agar dapat diamati dari diameter epidermisnya. Semakin tebal diameter epidermis berkorelasi positif dengan banyaknya kandungan agar. Kehadiran asam pada proses hidrolisis asam mampu merusak epidermis *thallus Gracilaria* sp.. Asam sitrat dengan konsentrasi tinggi dapat bersifat korosif sehingga mampu melunakkan dan menghancurkan sel epidermis *thallus Gracilaria* sp. Selain itu, hancurnya dinding sel rumput laut selama proses pemasakan dengan air dapat mengakibatkan perpindahan komponen polisakarida sehingga banyak komponen karbohidrat yang larut ke dalam pelarut yang digunakan (Tama et al., 2012). Peningkatan jumlah karbohidrat yang larut dapat meningkatkan kadar gula reduksi disebabkan oleh semakin banyak karbohidrat yang dihidrolisis oleh asam sitrat. Komposisi struktural *Gracilaria* sp. yang rendah lignin dan hemiselulosa memungkinkan untuk hidrolisis menggunakan asam organik seperti asam sitrat atau asam lain yang konsentrasinya relatif rendah (Albuquerque et al., 2021).

## KESIMPULAN

*Gracilaria* sp. telah dikenal sebagai sumber polisakarida yang dapat dikonversi menjadi gula pereduksi, yang diketahui memiliki manfaat yang luas sebagai substrat fermentasi yang penting. Faktor waktu hidrolisis, konsentrasi asam sitrat dan

jumlah rumput laut yang digunakan berkorelasi positif secara signifikan terhadap peningkatan kadar gula reduksi yang dihasilkan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, untuk menghasilkan *biosugar* yang optimal, dapat dilakukan proses *pre-treatment* dahulu terhadap bahan baku *Gracilaria* sp. dari petani/pembudidaya. Hasil pemodelan RSM terhadap kadar gula reduksi dan pH *biosugar* menunjukkan kondisi optimum pada konsentrasi asam 0,584 N dengan jumlah rumput laut sebanyak 3 g dan waktu hidrolisis selama 20 menit. Penelitian ini telah menunjukkan potensi produksi gula reduksi dari *Gracilaria* sp., namun perlu ditingkatkan lebih lanjut dengan faktor dan parameter yang lebih luas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Tim penulis mengucapkan ucapan terima kasih dan apresiasi kepada Pusat Pendidikan Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan atas dukungan yang diberikan untuk terlaksananya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albuquerque, J. C. S., Araújo, M. L. H., Rocha, M. V. P., de Souza, B. W. S., de Castro, G. M. C., Cordeiro, E. M. S., Silva, J. de S., & Benevides, N. M. B. (2021). Acid hydrolysis conditions for the production of fine chemicals from *Gracilaria birdiae* alga biomass. *Algal Research*, 53(October 2020). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102139>
- Amanto, B. S., Aprilia, T. N., & Nursiwi, A. (2020). Pengaruh lama blanching dan rumus petikan daun terhadap karakteristik fisik, kimia, serta sensoris teh daun tin (*Ficus carica*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.20961/jthp.v12i1.36436>
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis of The Association Official Analytical Chemistery International* No Title (W. Horwitz (ed.); 17th ed.).

- Artati, E. K., W.H. Irvina, F., & Fatimah. (2012). Pengaruh jenis dan konsentrasi asam terhadap kinetika reaksi hidrolisis pelepah pisang (*Musa paradisiaca* L.). *Ekulilibrium*, 11(2), 73–77. <https://doi.org/10.20961/ekulilibrium.v11i2.2216>
- Balamurugan, V., Sheerin, F. M. A., & Velurajan, S. (2019). A guide to phytochemical analysis. *International Journal of Advance Research And Innovative*, 30(January), 736. [www.ijariie.com](http://www.ijariie.com)
- Fadhlullah, M., Prasetyati, S. B., Pudoli, I., & Lo, C. (2022). Preliminary economic potential evaluation of seaweed gracilaria sp. biomass waste as bioindustry feedstock through a biorefinery approach: A case study in Karawang, Indonesia. *3BIO: Journal of Biological Science, Technology and Management*, 4(1), 42–53. <https://doi.org/10.5614/3bio.2022.4.1.6>
- Fajri, M. S., Pratama, M. A. S., & Utami, L. I. (2023). Produksi gula cair dengan proses hidrolisis asam dengan bahan pati singkong. *Chempro*, 3(1), 58–64. <https://doi.org/10.33005/chempro.v3i1.157>
- Firdaus, A. S., & Azara, R. (2022). Pengaruh penambahan bahan penstabil (cmc) dan asam sitrat pada sari buah jambu merah (*Psidium guajava* L.). *Procedia of Engineering and Life Science*, 2(2), 2–7.
- Handayani, P. A., Ramadani, N. S., & Kartika, D. (2018). Pemungutan tanin propagul mangrove (*Rhizophora mucronata*) dengan pelarut etanol dan aquades sebagai zat warna alami menggunakan metode Microwave Assisted Extraction. *Jurnal Kompetensi Teknik*, 10(1), 22–27.
- Ih, H., Fajriaty, I., Wijaya, T., & Hafizh, M. (2018). The potential ethnomedicine plant of *Impatiens balsamina* leaves from Pontianak, West Kalimantan, Indonesia for wound healing. *Nusantara Bioscience*, 10(1), 58–64.
- Insani, A. N., Hafiludin, H., & Chandra, A. B. (2022). Pemanfaatan ekstrak *Gracilaria* sp. dari perairan Pamekasan sebagai antioksidan. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan Dan Perikanan*, 3(1), 16–25. <https://doi.org/10.21107/juvenil.v3i1.14783>
- Kim, S. W., Hong, C. H., Jeon, S. W., & Shin, H. J. (2015). High-yield production of biosugars from *Gracilaria verrucosa* by acid and enzymatic hydrolysis processes. *Bioresource Technology*, 196, 634–641. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.016>
- Kumar, S., Gupta, R., Kumar, G., Sahoo, D., & Kuhad, R. C. (2013). Bioethanol production from *Gracilaria verrucosa*, a red alga, in a biorefinery approach. *Bioresource Technology*, 135, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.120>
- Legahati, N. (2020). Pengaruh Variasi Daya Ultrasonic Assisted Acid Hydrolysis (Uaah) Dan Konsentrasi Asam Sitrat Pada Hidrolisis Polisakarida Menjadi Produk Oligosakarida Berbahan Biji *Salacca zalacca*. Institut Teknologi Kalimantan.
- Lisi, A. K. (2017). Uji fitokimia dan aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol bunga soyogik (*Saurauia bracteosa* DC.). *Pharmacon UNSRAT*, 6(1), 160–401.
- Luringunusa, E., Sanger, G., Sumilat, D. A., Montolalu, R. I., Damongilala, L. J., & Dotulong, V. (2023). qualitative phytochemical analysis of *Gracilaria verrucosa* from North Sulawesi waters. *Jurnal Ilmiah PLATAX*, 11(2), 551–563. <https://doi.org/10.35800/jip.v11i2.48777>
- Mansuit, H., Samsuri, M. D. C., Sipaut, C. S., Yee, C. F., Yasir, S. M., & Mansa, R. (2015). Effect of varying acid hydrolysis condition in *Gracilaria* sp. fermentation using Sasad. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 78(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/78/1/012004>
- Marjoni, R. (2016). *Dasar-dasar fitokimia untuk Diploma III Farmasi*. Jakarta: Trans info media.
- Matoke, M., Hutabarat, L., Samosir, A., & Sinaga, R. (2024). Ekstraktif beberapa jenis daun bambu. *MARSEGU: Jurnal Sains Dan Teknologi*, 1(1), 49–58.
- Nurmiah, S., Syarief, R., Sukarno, S., Peranginangin, R., & Nurtama, B. (2013). Aplikasi response surface methodology pada optimalisasi kondisi proses pengolahan Alkali Treated Cottonii (ATC). *JPB Kelautan Dan Perikanan*, 8(1), 9–22.
- Prita, A. W., Mangkurat, R. S. B., & Mahardika, A. (2021). Potensi rumput laut indonesia sebagai sumber serat pangan alami. *Science Technology and Management Journal*, 1(2), 41–46. <https://doi.org/10.53416/stmj.v1i2.17>
- Riswanti, H. F., Alamsjah, M. A., & Agustono, A. (2013). Pengaruh medium yang tercemar organoklorin (endosulfan) terhadap kandungan agar dan morfologi thallus *Gracilaria verrucosa*. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 5(1), 55–60.
- Rusli, A., Metusalach, M., Tahir, M. M., Salengke, S., & Syamsuar, S. (2016). Analysis of bioactive compounds of *Caulerpa racemosa*, *Sargassum* sp. and *Gracilaria verrucosa* using different solvents. *Jurnal Teknologi*, 78(4–2), 15–19. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8146>
- Sa'diyah, A., & Anugerah, D. S. . (2018). Potensi rumput laut *Gracilaria* sp. sebagai alternatif biomassa studi kasus di kawasan Tambak Tanjungsari, Kecamatan Jabon, Sidoarjo. *Seminar Nasional Inovasi Dan Aplikasi Teknologi Industri*, 1(1), 279–284.
- Salsabila, N. A. S., & Meylani, C. P. (2024). Proses produksi asam sitrat melalui fermentasi: metode dan strategi. *CP, Journal of Integrative Natural Science* 2024, 1(1), 10–18. <https://ejournal.unsika.ac.id/index.php/JoINS>
- Sasadara, M. M. V., Pooja, N. A. K. P., & Putri, N. M. R. (2022). Pengaruh proses pengolahan terhadap kadar glukosa dan serat total rumput laut bulung sangu (*Gracilaria* sp.). *Jasintek*, 4(1), 7–13.
- Sasongko, A., Lumbantobing, D. F. H., & Rifani, A. (2019). Pemanfaatan limbah kulit singkong untuk produksi oligosakarida melalui hidrolisis kimiawi. *JST (Jurnal Sains Terapan)*, 5(1). <https://doi.org/10.32487/jst.v5i1.586>
- Setiawati, D. E. (2022). *Studi komposisi proksimat, mineral, asam lemak dan asam amino rumput laut merah Gracilaria verrucosa dari tambak budidaya di Desa Laikang Kabupaten Takalar*. Universitas Hasanuddin.
- Susanto, N. S., Prasetyaningsih, A., & Madyaningrana, K. (2021). potency of local *Gracilaria* sp. extract as an

- antibacterial against skin disease pathogen. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 9(8), 215–222. <https://doi.org/10.36347/sajb.2021.v09i08.006>
- Suwarno, S., Ratnani, R. D., & Hartati, I. (2015). Proses pembuatan gula invert dari sukrosa dengan katalis asam sitrat, asam tartrat dan asam klorida. *Inovasi Teknik Kimia*, 11(2), 99–103.
- Tama, C., Dewi, E. N., & Ibrahim, R. (2012). Pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Saintek Perikanan Vol.*, 8(1), 1–6.
- Tassakka, A. C. M. A. R., Sulfahri, S., Djawad, M. I., Kasmianti, K., & Zaenab, S. (2021). Biosugar production from marine algae *Kappaphycus alvarezii* by acid hydrolysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 860(1), 0–5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/860/1/012078>
- Torres, P., Santos, J. P., Chow, F., & dos Santos, D. Y. A. C. (2019). A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Research*, 37(July 2018), 288–306. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.12.009>
- Waluyo, W., Permadi, A., Fanni, N. A., & Soedrijanto, A. (2019). Analisis kualitas rumput laut *Gracilaria verrucosa* di Tambak Kabupaten Karawang, Jawa Barat. *Grouper*, 10(1), 32. <https://doi.org/10.30736/grouper.v10i1.50>
- Wilberta, N., Sonya, N. T., & Lydia, S. H. R. (2021). Analisis kandungan gula reduksi pada gula semut dari nira aren yang dipengaruhi pH dan kadar air. *BIOEDUKASI Jurnal Pendidikan Biologi*, 12(1), 101–108.
- Yusra, S., Pranoto, Y., Anwar, C., & Hidayat, C. (2020). Hidrolisis pati dari batang kelapa sawit dengan kombinasi perlakuan asam sitrat dan steam explosion terhadap sifat fisiko kimia dekstrin. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 9(1), 9. <https://doi.org/10.17728/jatp.6273>
- Zaenab, S. (2020). *Produksi biosugar dari rumput laut Kappaphycus alvarezii melalui metode hidrolisis menggunakan Trichoderma harzianum dan fermentasi menggunakan Saccharomycopsis fibuligera*. Universitas Hasanuddin.
- Zaenab, S., Tassakka, A. C. M. A. R., Sulfahri, & Kasmianti. (2020). Utilization of double fungal treatment by *Trichoderma harzianum* and *Saccharomycopsis fibuligera* to produce biosugar from red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 575(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/575/1/012015>