

PRODUKSI PELENGKAP NUTRISI DARI MIKROALGA LAUT SPIRULINA PLATENSIS DAN BOTYROCOCCUS BRAUNII

Rita Arbianti*¹, Sri Amini², Tania Surya Utami¹,
Heri Hermansyah¹, Khairul Hadi¹

¹Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia
Kampus UI, Depok 16424

²Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan
Jalan K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta 10260
Email: arbianti@che.ui.ac.id

Abstrak

Salah satu dampak kekurangan asam-asam lemak omega-3 dan omega-6 di Indonesia adalah rendahnya tingkat kesehatan ibu hamil. Pemberian pelengkap nutrisi yang mengandung DHA, EPA dan AA dapat menjadi solusi permasalahan tersebut. Pada umumnya suplemen tersebut diperoleh dari minyak ikan laut, namun sumber ini memiliki beberapa kekurangan yang mempengaruhi kualitas asam lemak yang dihasilkan, sehingga diperlukan pengganti minyak ikan laut sebagai sumber utama DHA, EPA dan AA. Salah satu sumber pelengkap nutrisi yang sangat potensial adalah mikroalga yang dikultivasi secara heterotrof. Pada penelitian ini dilakukan kultivasi mikroalga spesies *Spirulina platensis* dan *Botryococcus braunii* yang dikoleksi oleh Balai Besar Bioteknologi dan Perikanan di Jakarta. Kultivasi masing-masing mikroalga tersebut mula-mula dilakukan secara normal (autotrof), kemudian dikondisikan menjadi heterotrof dengan pemberian glukosa 0,5 g/L. Hasil ekstraksi dengan gelombang mikro menunjukkan bahwa *S. platensis* dan *B. braunii* yang dikultivasi secara heterotrof memiliki kandungan minyak berturut-turut sebesar 5,297 dan 0,173 %-b (berdasarkan biomassa kering). Kandungan DHA, EPA, dan AA dalam minyak dari kedua mikroalga tersebut adalah berturut-turut sebesar 0,006, 0,002, dan 0,001 %-massa relatif terhadap minyak.

Kata kunci: *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, heterotrof, gelombang mikro, mikroalga

Abstract

PRODUCTION OF NUTRITIONAL SUPPLEMENTS FROM SPIRULINA PLATENSIS AND BOTYROCOCCUS BRAUNII MARINE MICROALGAE. The low level of health of pregnant women is one of the results from the deficiency of omega-3 and omega-6 fatty acids in Indonesia. Giving supplement containing DHA, EPA, and AA, can solve the problem. Usually, these nutritional supplements are produced from marine fish oil. However, this source has several deficiencies that influence the quality of the fatty acid produced. Therefore, alternative sources of oil need to be found that can replace fish oil to produce DHA, EPA, and AA. One of the very potential sources is heterotrophic cultivated microalgae. In this study, microalgae from species *Spirulina platensis* and *Botryococcus braunii* collected from Research Center for Marine and Fisheries Product Processing and Biotechnology in Jakarta, were cultivated. Once microalgae is cultivated autotrophically, the culture were transformed to heterotrophic condition by adding 0.5 g/L glucose solution. Results showed that lipid yield from *S.platensis* and *B. braunii* were 5.297 and 0.173 (%-w dry biomass), respectively. Composition of DHA, EPA and AA from *S.platensis* and *B.braunii* oils were 0.006, 0.002, and 0.001 (%-w of lipid), respectively.

Keywords: *Spirulina platensis*, *Botryococcus braunii*, heterotroph, microwave, microalgae

*penulis korespondensi

PENDAHULUAN

Kekurangan asam lemak esensial terutama omega-3 dan omega-6 merupakan salah satu masalah kesehatan daerah miskin dan sulit terjangkau. Asam lemak esensial dalam kategori omega-3 dan 6 yang sangat diperlukan tubuh ialah asam dokosaheksaenoat (DHA), asam eikosapentaenoat (EPA), dan asam arakidonat (AA). Akibat yang ditimbulkan oleh kekurangan DHA, EPA, dan AA dapat langsung terlihat pada tingkat kesehatan ibu hamil dan bayi baru lahir yang rendah. Angka kematian bayi perseribu kelahiran hidup di Indonesia pada tahun 2010 tercatat sebesar 35 (WHO, 2011). Pemberian pelengkap nutrisi DHA, EPA, dan AA dapat membantu meningkatkan tingkat kesehatan ibu hamil, ibu menyusui, serta bayi yang baru lahir, diantaranya dengan meningkatkan kadar hemoglobin, menormalkan usia kehamilan, dan membantu bayi dalam perkembangan otaknya (Perez-Garcia dkk., 2011).

DHA, EPA, dan AA umumnya diperoleh dari minyak ikan laut. Namun, sumber ini memiliki kekurangan-kekurangan, seperti kapabilitas yang rendah untuk mensintesis omega-3 dan 6, kekhawatiran akan persediaan ikan yang menipis dan kontaminasi logam berat, dan dioksin yang dapat membahayakan kesehatan manusia (Guil-Guerrero dkk., 2000), serta sifat asam lemak yang tidak stabil dan berbau. Sumber lain yang potensial ialah mikroalga laut, dimana pada umumnya dikembangkan secara autotrof dan memiliki banyak keterbatasan, seperti membutuhkan lahan yang luas dan jumlah konsentrasi yang diperoleh kecil (Lee, 2004).

Untuk mengatasi kekurangan tersebut, mikroalga dikultivasi secara heterotrof, yaitu dengan menumbuhkannya pada medium dalam kondisi gelap dengan menambahkan senyawa organik sebagai sumber nutrisinya. Namun, tidak semua mikroalga mampu dikultivasi secara heterotrof. Beberapa strain dari spesies *Spirulina*, *Botryococcus braunii* (Tanoi dkk., 2011), *Chlorella*, dan *P. cruentum* (Vazhappilly dan Chen, 1998) dapat dikultivasi secara heterotrof.

Beberapa spesies mikroalga menghasilkan perolehan asam lemak tak jenuh majemuk yang mencakup DHA, EPA, dan AA yang tinggi. Contohnya adalah mikroalga laut *Cryptocodinium cohnii*, yang mampu menghasilkan perolehan DHA sebesar

8 g/L medium kultur (39 %-b dalam minyak, dan 25 %-b dalam biomassa (Swaaf, 2003). Perlakuan kondisi heterotrof pada spesies mikroalga yang diujikan dalam penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh perlakuan tersebut terhadap kuantitas DHA, EPA, dan AA yang terkandung di dalam minyak mikroalga.

Untuk meningkatkan perolehan minyak mikroalga, perlu ditinjau pula metode ekstraksi yang digunakan. Metode ekstraksi minyak yang optimal ialah kombinasi antara perlakuan fisik dan kimia. Salah satu cara yang paling efektif ialah ekstraksi minyak menggunakan pelarut dengan bantuan gelombang mikro. Lee dkk., (2009) telah menggunakan metode ini untuk mengekstrak minyak dari tiga strain mikroalga yaitu *Botryococcus sp*, *Chlorella vulgaris*, dan *Scenedesmus sp*, dibandingkan dengan metode-metode ekstraksi lain yaitu *autoclaving*, *beadbeating*, dan sonikasi. Hasil menunjukkan bahwa metode ekstraksi pelarut dengan bantuan gelombang mikro memiliki efisiensi tertinggi dibandingkan metode lainnya untuk seluruh spesies yang diuji. Efisiensi ekstraksi untuk *Botryococcus sp*, *Chlorella vulgaris*, dan *Scenedesmus sp* berturut-turut adalah 28,6%, 9,9%, dan 10,4%, dengan kondisi proses pada suhu 100 °C dan frekuensi gelombang 2450 MHz, selama 5 menit untuk ukuran sampel sebanyak 0,5 g berat kering.

METODE

Metode dalam penelitian ini mengacu pada metode yang digunakan oleh Liang dkk. (2009) dalam mengkondisikan pertumbuhan mikroalga secara heterotrof, yaitu dimulai dari melakukan kultivasi masing-masing spesies mikroalga secara autotrof pada kondisi cahaya 40 W (setara dengan intensitas cahaya sebesar 2000 lux). Hal ini bertujuan untuk memastikan adanya pertumbuhan saat melakukan kultivasi pertama kali. Setelah dipastikan mikroalga tersebut tumbuh dan memiliki kepadatan sel yang cukup (Gambar 1), maka perlakuan heterotrof dimulai pada kultur, yaitu dengan penambahan glukosa pada kultivasi dan pengkondisian heterotrof pada hari keempat.

Penelitian untuk tiap spesies dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dengan perlakuan yang sama. Kultur menggunakan air laut dengan salinitas 30 ppt dengan volum 2,5 L, medium Conwy (1 mL/L) (Amini, 2004), yang

terdiri dari larutan A yaitu; 1 L aquades, 100 g NaNO₃, 20 g NaH₂PO₄·2H₂O, 0,78 g FeCl₃, 45 g Na-EDTA, 33,6 g H₃BO₃, dan 0,36 g MnCl₂·4H₂O. Dalam 1 L larutan A terdapat 1 mL larutan B, yang terdiri dari: 2,1 g ZnCl₂, 2 g (CoCl₂)·6H₂O, 0,9 g CuSO₄·5H₂O, 10 mL HCl (Merck), dan 100 mL aquades. Pada kondisi heterotrof ditambahkan glukosa (Merck) sebanyak 0,5 g/L, dari volume keseluruhan. Sebelum ditambahkan, glukosa dilarutkan dalam 50 mL aquades. Jumlah glukosa yang ditambahkan mengacu pada kajian yang dilakukan oleh Chojnacka dan Noworyta, (2004) pada spesies *Spirulina platensis*, dalam kondisi heterotrof dengan konsentrasi glukosa sebanyak 0,1 g/L dan 2,5 g/L. Proses terjadinya pertumbuhan dipantau berdasarkan jumlah kepadatan sel per mL, dengan melakukan pengamatan menggunakan mikroskop. Setelah terjadi penurunan kepadatan sel yang signifikan dengan penurunan jumlah sel lebih dari 20% dari pengukuran sebelumnya, maka dilakukan pemanenan.

Pemanenan dilakukan dengan proses pengendapan yang diawali dengan flokulasi menggunakan larutan NaOH 800 ppm, diikuti dengan penyaringan dengan menggunakan kain satin (Puspita, 2010). Untuk spesies *S. platensis*, pemanenan dilakukan dengan penyaringan dengan menggunakan kain satin tanpa diflokulasi terlebih dahulu, karena ukuran selnya lebih besar dibandingkan dengan ukuran pori-pori kain satin tersebut. Setelah biomassa *B. braunii* tersaring, dilanjutkan dengan penetralan NaOH menggunakan asam sitrat (1 g/mL dalam aquades). Air dan garam-garam yang terlarut dipisahkan dari biomassa dengan sentrifugasi menggunakan *Centurion K2015 centrifuge* pada 4000 rpm selama 15 menit. Setelah pemisahan, biomassa dikeringkan dalam oven pada suhu 80 °C untuk mendapatkan biomassa kering (kandungan air sekitar 10 %).

Ekstraksi minyak dari biomassa kering dilakukan dengan menggunakan dua cara yaitu dengan cara sonikasi dan bantuan gelombang mikro (*microwave-assisted extraction* atau MAE) menggunakan pelarut n-heksana dengan konsentrasi 2 mL/g biomassa kering yang telah dihaluskan. Proses ekstraksi sonikasi menggunakan sonikator *Branson 3510* dilakukan selama 45 menit, pada frekuensi 33 kHz, suhu 50 °C. Perlakuan dengan gelombang mikro (Lee dkk., 2009)

dilakukan pada suhu 75 °C dengan menggunakan *microwave* Panasonic yang sudah dimodifikasi dengan menambahkan termokopel digital, pengatur suhu, dan kondenser pada bagian atas. Ekstraksi dilakukan selama 5 menit pada panjang gelombang 2450 MHz. Setelah minyak diperoleh, dilakukan proses transesterifikasi kemudian dianalisis dengan menggunakan GC (Lembaga Penelitian Pasca Panen Bogor) menggunakan metode standar AOAC (Horwitz, 1995), untuk mengetahui kandungan DHA, EPA dan AA pada minyak. Alat GC yang digunakan memiliki spesifikasi; detektor: FID, suhu 250 °C, suhu injektor 200 °C; gas pembawa: N₂ dan H₂, dengan laju alir 20-50 mL/menit; kolom: DEGS, panjang 3 m; suhu kolom terprogram: 150-180 °C/5 °C/menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

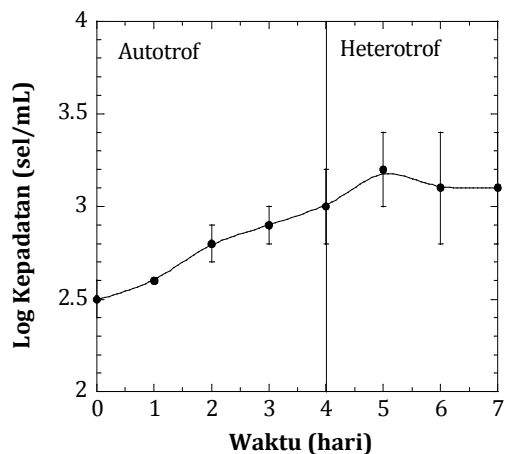
Kultivasi Mikroalga

Penambahan glukosa pada kultivasi dan pengkondisian heterotrof dilakukan pada hari keempat. Data pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

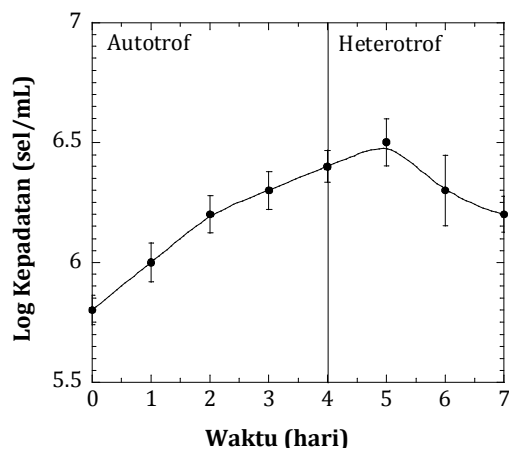
Hasil penelitian dalam tiga kali percobaan ulang menunjukkan bahwa pada kondisi autotrof, pertumbuhan tiap-tiap mikroalga mengalami peningkatan. Memasuki kondisi heterotrof dengan pemberian glukosa maka terjadi penurunan pertumbuhan. Hasil analisis ANOVA satu arah dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan diantara tiga kali ulangan tersebut. Pada hari ketujuh, dilakukan pengambilan seluruh biomassa, kemudian biomassa dikeringkan di dalam oven pada suhu 80 °C. Konsentrasi akhir biomassa mikroalga diakhir kultivasi untuk *S. platensis* dan *B. braunii* berturut-turut sebesar 0,12 g biomassa kering/L medium kultur dan 0,9 g biomassa kering/L medium kultur, dan sama-sama mencapai fasa stasioner pada hari kelima.

Pada beberapa penelitian yang telah dilaporkan, *Spirulina* yang menggunakan medium Zarrouk mengandung glukosa dengan konsentrasi 2,5 g/L dengan periode kultivasi selama 3 hari (72 jam), menunjukkan terjadinya pertumbuhan sel yang diukur dengan satuan konsentrasi biomassa dan mencapai fasa stasioner pada hari kedua dengan konsentrasi 0,67 g/L medium kultur (Chojnacka dan Noworyta, 2004). Pada spesies *B. braunii* dengan volume kultur 200

mL dan konsentrasi glukosa 10 mM, secara kualitatif tampak perbedaan yang signifikan pada morfologi antara autotrof dan heterotrof, dimana pada kondisi heterotrof sel memiliki granula-granula minyak yang lebih besar dibandingkan dengan autotrof yang diamati melalui tampilan fluorescence micrographs (Tanoi dkk., 2011). Selama periode kultivasi 19 hari diperoleh biomassa dengan konsentrasi 0,37 g/L medium kultur.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Spirulina platensis*



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Botryococcus braunii*

Perbedaan hasil antara penelitian ini dengan yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Chojnacka dan Noworyta (2004) dan Tanoi dkk. (2011) dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu perbedaan spesies maupun strain, kondisi lingkungan seperti pengaturan pH selama kultivasi dan suhu, tingkat aksinitas yang berbeda, dimana dalam penelitian ini ini sangat sulit menjaga kultur bebas dari mikroba kompetitor yaitu ciliata

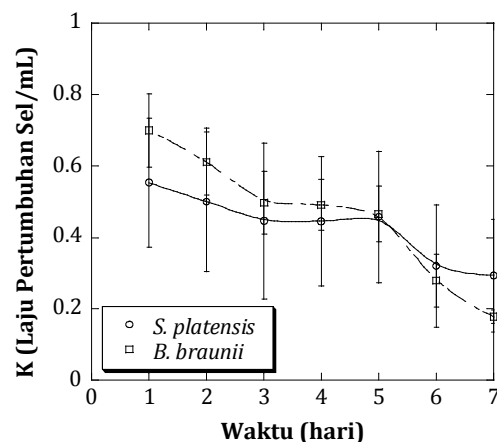
didalam kultur. Sebelum penambahan glukosa berdasarkan pengamatan mikroskop jumlah mikroba tersebut hampir tidak ada, namun setelah penambahan glukosa, jumlah mikroba ciliata yang merupakan organisme kemoheterotrof meningkat, Selain berkompetisi dengan mikroalga dalam mengkonsumsi glukosa, beberapa mikroba ciliata tersebut memangsa mikroalga yang sedang dikultivasi. Pada penelitian yang dilakukan tidak ada perlakuan khusus dalam menjaga pH. Kondisi pH berada pada rentang 7,8–8,1, yakni sama dengan pH air laut dengan salinitas 30 ppt. Pada akhir kultivasi mikroalga kondisi pH berada pada 8,1 dan pada suhu kamar yakni 29 °C.

Laju Pertumbuhan

Dari grafik pertumbuhan spesies mikroalga sebelumnya (Gambar 1 dan 2), dapat diketahui laju pertumbuhannya dengan menggunakan Persamaan (1) (Oh-Hama dan Miyachi, 1992).

$$k = \frac{\log_{10} \frac{N}{N_0}}{t - t_0} \times 3,32 \quad (1)$$

Pada Persamaan (1), N adalah kepadatan sel pada waktu t (sel/mL), N_0 merupakan kepadatan sel awal (sel/mL), t_0 merupakan waktu awal (hari), t adalah waktu (hari), dan 3,32 merupakan nilai konstanta (faktor koreksi), dan diperoleh grafik laju pertumbuhan perharinya sebagaimana yang dapat dilihat pada Gambar 3.

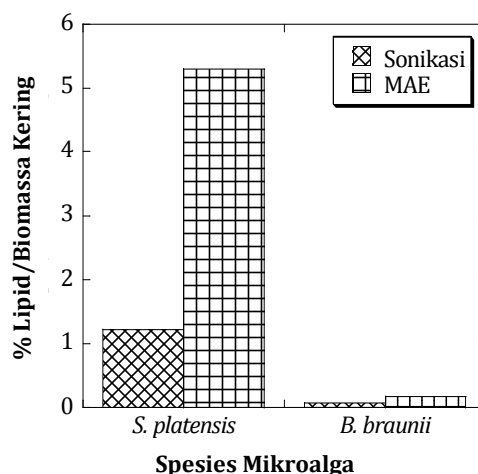


Gambar 3. Laju pertumbuhan mikroalga dengan penambahan glukosa pada hari ke-4

Hasil tersebut menunjukkan bahwa setelah penambahan glukosa pada hari keempat, tiap mikroalga mengalami penurunan laju pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan dengan kondisi autotrof (hari 1, 2, 3, dan 4). Penurunan laju pertumbuhan tersebut mengindikasikan bahwa strain *S. platensis* dan *B. braunii* yang diuji tidak mampu berkembang dalam kondisi heterotrof. Melalui pengamatan dengan mikroskop pada akhir pertumbuhan, struktur sel *S. platensis* terputus-putus menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil, dengan warna yang sudah memucat, sedangkan pada kondisi autotrof strukturnya merupakan filamen-filamen yang memanjang yang berwarna hijau tua. Struktur sel *B. braunii* pada kondisi akhir berbentuk koloni-koloni yang menempel satu sama lain, beberapa sel terlihat rusak dan berwarna pucat, sedangkan pada kondisi autotrof sebelumnya, strukturnya berupa sel-sel individu yang tersebar berwarna hijau cerah. Di akhir kultivasi, pada masing-masing kultur terlihat mikroba kompetitor dari kelas *ciliata* yang aktif berkembang. Secara kualitatif hasil ini mendukung pola penurunan laju pertumbuhan mikroalga tersebut.

Ekstraksi Minyak

Ekstraksi menggunakan metode MAE menghasilkan perolehan lebih tinggi dibanding dengan sonikasi. Hal ini karena penggunaan gelombang dengan frekuensi mikro mengakibatkan terjadinya proses pemanasan yang begitu cepat atau spontan serta menimbulkan tekanan yang dapat merusak dinding sel sehingga komponen seluler keluar dan larut dalam pelarut (Camel, 2001). Untuk metode sonikasi, dalam proses ekstraksinya juga difasilitasi oleh gelombang yang mengakibatkan timbulnya gelembung-gelembung mikro yang akan pecah didekat dinding sel mikroalga yang akan diekstrak, sehingga menyebabkan dinding sel tersebut rusak, dan komponen-komponen seluler akan keluar dan terlarut didalam pelarut (Mercer dan Armenta, 2011). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa efektifitas perusakan dinding sel dengan bantuan gelombang mikro lebih baik dibandingkan dengan metode sonikasi. Perbandingan hasil perolehan ekstraksi minyak mikroalga dengan menggunakan MAE dan sonikasi dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Perolehan rata-rata minyak dalam biomass kering (%-b) dengan metode sonikasi dan bantuan gelombang mikro

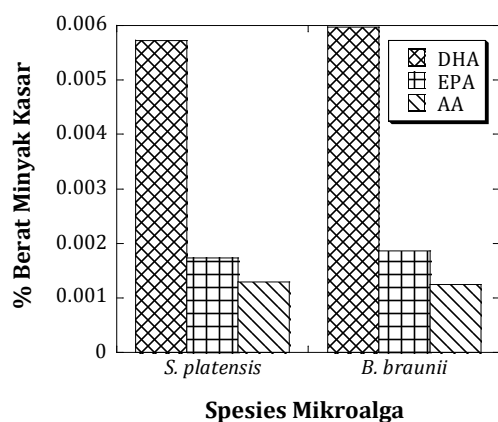
Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Oh dkk. (2009) terhadap *P. cruentum* yang dikultivasi secara heterotrof, dengan ekstraksi menggunakan pelarut CHCl_3 /Metanol diperoleh minyak sebesar 10,9 %-b kering biomassa. Pada penelitian yang dilakukan oleh Xu dkk. (2006) pada spesies *Chlorella protothecoides* yang dikultivasi secara heterotrof dengan penambahan glukosa sebesar 10 g/L sebagai sumber karbon dan periode kultivasi selama 6 hari, dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut n-heksana diperoleh minyak dengan perolehan sebesar 55,2 %-biomassa kering.

Minyak yang diperoleh dengan metode sonikasi pada spesies *S. platensis* dan *B. braunii* berturut-turut yaitu sebesar 1,219 dan 0,076 %-b kering biomassa, sedangkan dengan metode MAE didapatkan nilai yang lebih besar untuk spesies *S. platensis* dan *B. braunii* berturut-turut ialah sebesar 5,297 dan 0,173 %-b kering biomassa. Hasil perolehan minyak dalam penelitian ini jauh lebih kecil dibandingkan dengan yang dilaporkan dalam referensi sebelumnya, hal ini dapat disebabkan oleh umur kultivasi dan metode ekstraksi yang menggunakan pelarut dalam jumlah banyak atau kondisi proses yang tidak disebutkan oleh investigator melainkan hanya menyebutkan pelarut yang digunakan saja.

Analisis DHA, EPA, dan AA dalam Minyak Mikroalga dengan GC

Hasil analisis *Gas Chromatography* (GC) untuk mengetahui kandungan DHA, EPA, dan AA pada minyak mikroalga yang diekstraksi

dengan metode MAE ditampilkan dalam Gambar 5.



Gambar 5. Perbandingan kandungan DHA, EPA, dan AA di dalam minyak dari mikroalga *S. Platensis* dan *B. braunii*

Hasil analisis GC menunjukkan bahwa minyak yang terkandung dalam biomassa *S. platensis* memiliki kandungan DHA, EPA, dan AA berturut-turut 0,006, 0,002, dan 0,001 %-bt minyak. Sementara itu, minyak dari spesies *B. braunii* juga memiliki kandungan DHA, EPA dan AA berturut-turut 0,006, 0,002 dan 0,001 %-b minyak. Penelitian yang dilakukan oleh Amini (2005) pada *S. platensis* yang dikultivasi secara autotrof memiliki perolehan DHA, EPA, dan AA berturut-turut sebesar 0,108, 0,289, dan 0,302 %-b minyak, sedangkan dalam kondisi autotrof *B. braunii* profil kandungan pada minyaknya merupakan hidrokarbon (Tanoi dkk., 2011).

KESIMPULAN

Dengan perlakuan kondisi heterotrof dalam kultivasi *S. platensis* didapatkan jumlah konsentrasi biomassa akhir dan persentasi berat minyak terhadap biomassa berturut-turut sebesar 0,12 g/L dan 5,29%. Kandungan DHA, EPA, dan AA dari hasil kultivasi berturut-turut sebesar 0,006, 0,002, dan 0,001 %-b minyak.

Pada kultivasi *B. braunii* dengan perlakuan heterotrof didapatkan konsentrasi biomassa akhir dan persentasi berat minyak terhadap biomassa berturut-turut sebesar 0,9 g/L dan 0,173%, yang memiliki kandungan DHA, EPA, dan AA sebesar 0,006, 0,002, dan 0,001 %-b minyak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Balai Besar Riset Produk dan Bioteknologi

Kelautan dan Perikanan atas dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Amini, S., *Pengaruh Umur Ganggang Halus Laut Jenis Chlorella sp. dan Dunaliella sp. Terhadap Pigmen Klorofil dan Karotenoid Sebagai Bahan Baku Makanan Kesehatan*, Seminar Nasional Perikanan Indonesia, Jakarta, 2004.

Amini, S., *Skrining Mikroalga Penghasil Kandungan Asam Lemak Omega-3*, Seminar Nasional Perikanan Indonesia, Jakarta, 2005.

Camel, V., Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst*, **2001**, 126(7), 1182-1193.

Chojnacka, K.; Noworyta, A., Evaluation of *Spirulina sp.* growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, **2004**, 34(5), 461-465.

Guil-Guerrero, J. L.; Belarbi, E. H.; Reboloso-Fuentes, M. M., Eicosapentaenoic and arachidonic acids purification from the red microalga *Porphyridium cruentum*, *Bioseparation*, **2000**, 9(5), 299-306.

Horwitz, W., *Official Methods of Analysis of the AOAC International*; AOAC International: Washington, 1995.

Lee, J. Y.; Yoo, C.; Jun, S. Y.; Ahn, C. Y.; Oh, H. M., Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresource Technology*, **2009**, 101(1), S75-S77.

Lee, Y. K., *Handbook of microalgal culture: Algal Nutrition Heterotrophic Carbon Nutrition*; Blackwell Science Ltd.: United Kingdom, 2004; hlm. 116.

WHO, *Level and Trends in Child Mortality*, 2011, http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/20110915_unicef_childmortality/en/ (akses Juni 2012).

Liang, Y.; Sarkany, N.; Cui, Y., Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic

growth condition, *Biotechnology Letters*, **2009**, 31(7), 1043-1049.

Mercer, P.; Armenta, R. E., Developments in oil extraction from microalgae, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **2011**, 113(5), 539-547.

Oh-Hama, T.; Miyachi, S., *Chlorella*, dalam Micro-algal Biotechnology. M. A. Borowitzka dan L. J. Borowitzka, Cambridge University Press: Boston, 1992; hlm. 25.

Oh, S. H.; Han, J. G.; Kim, Y.; Ha, J. H.; Kim, S. S.; Jeong, M. H.; Jeong, H. S.; Kim, N. Y.; Cho, J. S.; Yon, W. B.; Lee, S. Y.; Kang, D. H.; Lee, H. Y., Lipid production in *Porphyridium cruentum* grown under different culture conditions, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2009**, 108(5), 429-434.

Perez-Garcia, O.; Escalante, F. M. E.; de-Bashan, L. E.; Basha, Y., Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products, *Water Research*, **2011**, 45(1), 11-36.

Puspita, T., *Kultivasi dan Ekstraksi Minyak Nabati Mikroalga Laut Jenis Tetraselmis sp*,

dan *Botryococcus braunii Menggunakan Pelarut yang Berbeda*, Skripsi Sarjana, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta, 2010.

Swaaf, M. E. D., *Docosahexaenoic acid production by the marine alga *Cryptocodinium cohnii**, Doctoral Dissertation, Technische Universiteit Delft, 2003, hlm. 135.

Tanoi, T.; Kawachi, M.; Watanabe, M. M., Effects of carbon source on growth and morphology of *Botryococcus braunii*, *Journal of Applied Phycology*, **2011**, 23(1), 25-33.

Vazhappilly, R.; Chen, F., Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid production potential of microalgae and their heterotrophic growth, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **1998**, 75(3), 393-397

Xu, H.; Miao, X.; Wu, Q., High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *Journal of Biotechnology*, **2006**, 126(4), 499-507.