

Pengaruh Pemberian Variasi pH terhadap Produksi Trigliserida Total dan Komposisi Asam Lemak dari *Chlorella Vulgaris* Air Tawar

Rahmadani Wulandari^a, Abdi Dharma^{a*}, Syafrizayanti^a

^aLaboratorium Biokimia, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas

Corresponding Author:
Abdi Dharma
abdipogil@gmail.com

Received: March 2019
Accepted: September 2019
Published: September 2019

© Abdi Dharma et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Chlorella vulgaris is a microalgae that has high lipid content and potential as raw material for biofuel production. This study aims are to determine the effect of pH on growth, lipid production and fatty acid composition of *C. vulgaris* by using Growmore 32-10-10 fertilizer as a culture medium. Microalgae were cultured in medium Growmore 32-10-10 for 10 days. Afterward, pH of medium was varied into pH 5, 7, 8.2 and 9 and continued cultivate for 3 days. *C. vulgaris* cultured at pH 8.2 which is a control pH reached optimum growths. The GC-MS analysis for lipid productivity of *C. vulgaris* was 0.5020 g/L/day and 0.2902 g/L/day for microalgae grew at pH 8.2 and 9, respectively. Cultures at pH 8.2 and 9 produce methyl hexadecanoate, methyl 9-octadecanoate, methyl octadecanoate, methyl 9,12-octadecadienoate, methyl 9,11-octadecadienoate. Additional fatty acid methyl nonadecanoate was also found in *C. vulgaris* grew at pH 9. The low and high pH stress of *C. vulgaris* culture medium did not affect culture growth but altered lipid production and fatty acid composition.

Keywords: *Chlorella vulgaris*; pH stress; lipid; fatty acid

Pendahuluan

Sumber daya alam perairan yang ada di Indonesia sangat kaya dan beragam salah satunya Mikroalga. Kondisi iklim di Indonesia sangat mendukung untuk pertumbuhan Mikroalga, dimana hampir sepanjang tahun matahari menyinari Indonesia. Semua jenis mikroalga memiliki komposisi kimia sel yang terdiri dari protein, karbohidrat, lipid, asam nukleat dan juga mengandung bahan-bahan organik seperti hormon, vitamin, mineral dan juga senyawa metabolit sekunder^[1]. Mikroalga telah lama dikenal sebagai sumber potensial dari biofuel, karena produktivitas biomassa yang tinggi, hasil lipid yang tinggi dan terkait budidaya alga dalam skala besar^[2].

Jenis-jenis mikroalga yang berpotensi sebagai sumber biofuel diantaranya *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sp*, *Cryptocodinium cohnii*, *Cylindrotheca sp.*, *Dunaliella primolecta*, *Nannochloropsis sp.*^{[1],[3],[4]}. *C. vulgaris* merupakan mikroalga yang memiliki kandungan protein, lemak, dan karbohidrat yang cukup tinggi sehingga dapat dimanfaatkan dengan lebih baik. *C. vulgaris* mengandung 51-58 % protein, 12-26 % karbohidrat, 2-22 % lemak, dan 4-6 % asam nukleat. Selain itu *C. vulgaris* mempunyai efisiensi fotosintesis mencapai 8 % dan kandungan klorofilnya mencapai 28,9 g/kg berat biomassa^{[5],[6]}. Kandungan gizi yang terdapat pada *Chlorella, sp* begitu baik maka perlu dilakukan upaya budidaya *Chlorella, sp* dengan cara memanipulasi media hidup,

menggunakan pupuk anorganik^[7]. Pertumbuhan mikroalga dan metabolisme akan terpengaruh oleh perubahan beberapa parameter fisika-kimia seperti cahaya, nutrisi, suhu, salinitas dan pH^[8].

Pada pertumbuhannya, Nutrisi yang diperlukan alga dalam jumlah besar adalah karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, natrium, magnesium, kalsium. Sedangkan unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah relatif sedikit adalah besi, tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), silikon (Si), boron (B), molibdenum (Mo), vanadium (V) dan kobalt (Co)^{[7],[9]}.

Variasi pH dalam media kultur dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan kultur mikroalga antara lain mengubah keseimbangan karbon anorganik, mengubah ketersediaan nutrisi dan mempengaruhi fisiologi sel^{[8],[10]}. Kisaran pH untuk pertumbuhan pada kebanyakan mikroalga antara 7-9^[11]. Mikroalga mengandung minyak nabati yang sangat tinggi bahkan beberapa diantaranya mempunyai kandungan minyak lebih dari 50%. Kandungan minyak nabati yang besar menunjukkan tingginya kandungan asam lemak dalam alga. Semakin banyak kandungan asam lemak, maka semakin besar pula potensi bahan tersebut untuk dapat menghasilkan biodiesel^{[12],[13]}. Asam lemak terdiri dari asam lemak jenuh yang sangat stabil, dan tak jenuh yang memberikan lebih banyak energi pada oksidasi dari asam lemak tak jenuh ganda^[14]. Beberapa jenis asam lemak jenuh dan tidak jenuh dapat dilihat pada Tabel 1. Beberapa mikroalga dapat menumpuk sejumlah besar lipid netral intraseluler, terutama trigliserida (TAG)^{[12],[14]}.

Perubahan pH pada pertumbuhan mikroalga pada umumnya mempengaruhi massa, lipid dan kandungan metabolit primernya. Kandungan biomassa, klorofil, dan jumlah lipid dari sel tunggal sedikit berubah sehubungan dengan adanya perubahan pH yang menghasilkan penurunan dalam kandungan lipid total^[15]. Tujuan dari penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian variasi pH pada medium GrowMore terhadap

pertumbuhan, produktivitas lipid, dan profil asam lemak *C. Vulgaris*.

Metodologi Penelitian

Bahan kimia

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat mikroalga *C. vulgaris*. Medium pupuk GrowMore 32-10-10 (GrowMore Garden CA 90248-2140), Vitamin B1, HCl (Merck), KOH (Merck), Aquades, H₂SO₄ (Merck), NaOH (Merck), n-Heksan (Merck), Methanol (Merck).

Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perlengkapan kultivasi (pompa aqurium (AMARA AA-350), selang (diameter 10 mm), botol kaca 500 mL, plastik, karet), peralatan gelas laboratorium (gelas ukur, labu ukur, gelas piala, batang pengaduk, tabung reaksi, pipet mikro, pipet tetes), neraca teknis (KERN ABJ-NM/ABS-N), autoclave (GEA YX-18LM), spektrofotometri UV-VIS (Thermo Scientific Genesys 20), pH meter (HANNA), oven, GC-MS (Shidmazu Europe – GCMS-QP2010 SE), botol vial, freezer, hotplate, Aluminium foil, Plastik wrap, Mikroskop cahaya dan sentrifuse (HEALTH Centrifuge 12 Hole).

Prosedur penelitian

Pembuatan medium mikroalga C. vulgaris

Medium yang digunakan GrowMore 32-10-10. Medium dibuat sebanyak 0,2 g/L pupuk GrowMore dengan penambahan vitamin B1 0,01 g/L yang sudah disterilkan^[16].

Kultivasi mikroalga C. vulgaris untuk kurva pertumbuhan

Mikroalga *C. vulgaris* dikultur pada medium GrowMore 32-10-10 pada suhu 25°C dalam botol 500 mL yang berisi 300 mL medium dan 150 mL sampel *C. vulgaris* yang telah dikultur selama 10 hari dengan diberikan aerasi. Laju pertumbuhannya diukur dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm. Pengukuran dilakukan setiap hari hingga hari ke-10 pertumbuhan^[17].

Induksi mikroalga *C. vulgaris* dengan variasi pH

Mikroalga *C. vulgaris* yang yang ditumbuhkan untuk laju pertumbuhan dipindahkan pada medium baru. Mikroalga *C. vulgaris* diambil sebanyak 100 mL, dikultivasi selama 10 hari. melihat laju pertumbuhannya pada panjang gelombang 450 nm dan diukur lajunya setiap hari^[17]. Pada hari ke-10 dilakukan variasi pH yaitu pada pH 5, 7, 9, dan pH 8,2 yang merupakan pH pupuk GrowMore 32-10-10. Pemberian variasi pH dilakukan dengan cara menambahkan HCl 10 M untuk suasana asam dan KOH 1 M untuk suasana basa sebanyak beberapa tetes hingga mencapai pH yang diinginkan^[8]. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi selama 10 hari untuk melihat laju pertumbuhannya pada panjang gelombang 450 nm dan diukur lajunya setiap hari.

Pemanenan biomassa mikroalga *C. vulgaris*

Setelah periode kultivasi, dilanjutkan dengan pengambilan biomassa mikroalga *C. vulgaris* dengan teknik pengendapan dan teknik sentrifugasi. Teknik pengendapan dilakukan dengan cara mematikan sistem aerasi lalu diamkan. Pemanenan dengan teknik sentrifugasi dilakukan dengan cara melakukan sentrifugasi mikroalga pada 4000 rpm selama 10 menit. Biomassa basah kemudian dikeringkan anginkan pada suhu kamar^[3].

Penentuan kadar lipid total

Penentuan kadar lipid dilakukan sesuai metode Bligh dan Dyer^[18]. Biomassa kering ditimbang sebanyak 0,1 g lalu dicampurkan dengan 8 mL n-heksan^[18]. Selanjutnya di inkubasi selama 24 jam. Lapisan n-heksan diambil dan dimasukkan kedalam botol vial, lalu ditutup dengan aluminium foil (avo) lalu beri udara dengan memberikan lubang kecil pada avo. Larutan heksan dibiarkan menguap. Proses ekstraksi ini dilakukan berulang kali hingga pelarut berwarna bening. Setelah kering botol ditimbang. Lipid yang didapat dihitung secara gravimetri untuk mendapatkan kadar lipid dan produktivitas lipid^{[19],[20]}. Selanjutnya dilakukan esterifikasi. Lipid yang didapatkan direaksikan dengan penambahan metanol dan katalis H₂SO₄

dengan perbandingan 1:1. Reaksi dilakukan pada suhu 60-70°C dibawah pengadukan selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan instrument GC-MS^[21].

$$\% \text{ Lipid} = \frac{\text{Lipid } (\frac{\text{g}}{\text{L}})}{\text{Biomassa uji } (\frac{\text{g}}{\text{L}})} \times 100 \%$$

$$\text{Produktivitas lipid} = \frac{\text{biomasa } (\frac{\text{g}}{\text{L}}) \times \% \text{ kadar lipid } (\%)}{\text{waktu kultivasi (hari)}}$$

Analisis asam lemak dan metil ester asam lemak dengan GC-MS

Hasil transesterifikasi yang didapat memiliki 2 lapisan yaitu metil ester asam lemak dan gliserol. Metil ester asam lemak berada pada lapisan atas dan gliserol pada lapisan bawah. Lapisan atas diekstraksi dengan n-heksan selanjutnya dianalisis dengan instrumen GC-MS untuk menentukan komposisi asam lemak yang terkandung dalam lipid mikroalga. Asam lemak yang didapatkan diinjeksikan sebanyak 1 µL ke dalam kolom GC-MS dengan kondisi kolom yang digunakan yaitu kolom DB-5 serta gas helium sebagai gas pendorong. Kromatografi gas menggunakan mode injeksi split. Suhu oven kromatografi gas di program dari 70°C dibiarkan konstan selama 1 menit, kemudian dinaikkan hingga 240°C dengan kecepatan 3°C/menit dan suhu injektor pada 260°C. Data dicatat dan dianalisis dengan perangkat lunak GC-MS (Shidmazu Europe – GCMS-QP2010 SE)^[22]

Hasil dan Diskusi

Pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* sebelum dan sesudah pemberian variasi pH

Penentuan waktu pemberian pH dilakukan berdasarkan kurva pertumbuhan dari mikroalga pada Gambar 1. Ada beberapa fase pertumbuhan yang terjadi pada mikroalga^[10]. Fase lag adalah fase adaptasi mikroalga dalam medium baru. Tahap ini terjadi pada hari ke-0 sampai hari ke-2. Fase Eksponensial (fase log) adalah fase kecepatan pertumbuhan mikroalga yang dapat dihitung berdasarkan kenaikan biomassa dan selisih waktu yang dibutuhkan tahap ini terjadi pada hari ke 3-8 dimana terjadi kenaikan pertumbuhan dengan cepat terutama dalam pembentukan metabolit primer.

Tabel 1. Jenis asam lemak pada mikroalga

Nama umum	Nama sistematis
Palmitat (16:0)	n-Heksadekanoat
Stearat (18:0)	n-Oktadekanoat
Arakidat (20:0)	n-Eikosanoat
Lignoserat (24:0)	n-Tetrakosanoat
Palmitoleat (16:1)	sis- Δ^9 -heksadesenoat
Linoleat (18:2)	sis- Δ^9 - Δ^{12} -oktadekadienoat
Linolenat (18:3)	sis- Δ^9 - Δ^{12} - Δ^{15} -oktadekatrionat
Arakidonat (20:4)	sis- Δ^5 - Δ^8 - Δ^{11} - Δ^{14} -eikosatetraenoat

Pada hari ke 9-10 dimana tahap pertumbuhan mikroalga sudah tidak terjadi lagi dengan pesat dan terjadi pertumbuhan mikroalga sudah tidak terjadi lagi dengan pesat dan terjadi pembentukan metabolit sekunder^[10]. Puncak dari tahap pertumbuhan mikroalga ini adalah pada hari ke-10. Fase Log adalah fase penurunan pertumbuhan secara umum dipengaruhi oleh biomassa yang telah mencapai tahap populasi maksimum, tahap ini terjadi pada hari ke-11, maka dari itu peneliti melakukan pemberian variasi pH pada hari ke 10 pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris*. Pemberian variasi pH pada penelitian ini berfungsi untuk melihat pengaruh kondisi pH terhadap pertumbuhan dan produksi lipid pada mikroalga *C. Vulgaris*.

Kenaikan pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* pada pH 7 dan 8,2 terjadi setelah hari ke-12 pertumbuhan sedangkan pada pH 5, dan 9 pertumbuhannya cenderung mengalami kematian yang terlihat pada Gambar 2. Pemanenan dilakukan pada hari ke-13 dikarenakan pada hari berikutnya terjadi penurunan pertumbuhan menuju tahap kematian. Pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* pada pH 8,2 atau pH normal medium GrowMore memiliki pertumbuhan yang tinggi dibandingkan dengan variasi pH lainnya. Pada pH 7 tidak terlalu mempengaruhi pertumbuhannya jika dibandingkan dengan pH normal medium pupuk GrowMore karena menurut literatur mikroalga *C. vulgaris* biasanya dapat tumbuh dengan baik pada pH 7-8^[23]. Pada percobaan ini perubahan pH dari

pH normal medium GrowMore ke pH 7 tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris*. Pada pH 5 dan pH 9 pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* turun sangat tajam. Menurut literatur mikroalga *C. vulgaris* pada medium BBM yang memiliki pH tinggi ataupun rendah mengalami pertumbuhan yang kurang bagus^[24] dan pada medium GrowMore pun didapatkan hasil yang tidak jauh beda. Penggunaan medium GrowMore pada pH yang cocok untuk pertumbuhan mikroalga sama dengan pH pertumbuhan pada medium BBM. Pemberian pH rendah ataupun tinggi dapat memperlambat pertumbuhan.

Biomassa, kadar lipid, produktivitas lipid dari *C. vulgaris*

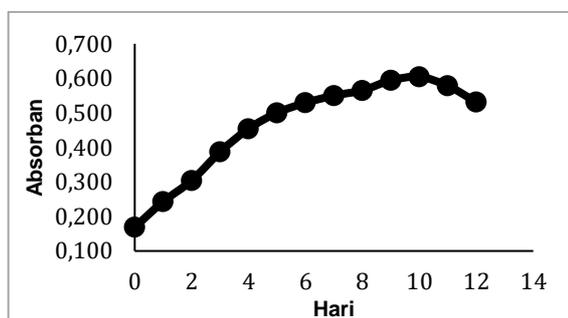
Setelah diketahui pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris*, ditentukan juga jumlah biomassa, kadar lipid dan produktivitas lipid dari mikroalga *C. vulgaris* yang telah ditumbuhkan. Biomassa diambil dari variasi pH mikroalga *C. vulgaris* yang telah dipanen pada hari ke-13. Gambar 3. menunjukkan bahwa biomassa terbanyak didapat pada pH 8,2 yaitu 0,3552 g. Pada pH 7 biomassa yang didapatkan 0,3397 g lebih sedikit dibandingkan pH 8,2 dikarenakan pH 7 tidak terlalu mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* sedangkan pH 5 memiliki biomassa yang tidak terlalu banyak yaitu 0,2794 g biomassa dikarenakan pH pada mikroalga *C. vulgaris* rentan untuk hidup pada pH 5 karena lebih bersifat asam, oleh sebab itu biomassa yang didapatkan sedikit. Pada pH 9 mikroalga *C. vulgaris*

memiliki biomassa sedikit disebabkan karena medium yang terlalu basa sehingga menghambat metabolisme mikroalga *C. vulgaris*^[15].

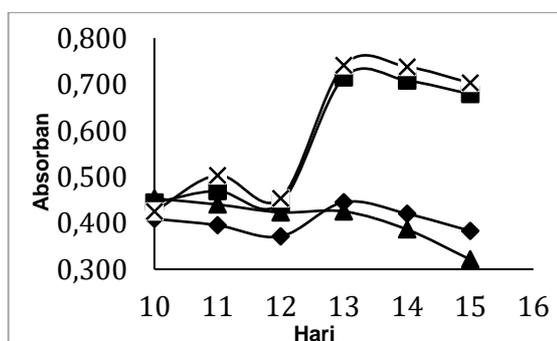
Biomassa mikroalga *C. vulgaris* cenderung naik berdasarkan diagram yaitu dari pH 5 ke pH 8,2 yang merupakan batas pH maksimum pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* dengan medium GrowMore sedangkan biomassa pada pH 9 terjadi penurunan yang signifikan. Biomassa yang didapatkan sebanding dengan kurva pertumbuhan, sehingga pertumbuhan berbanding lurus dengan biomassa. Kandungan lipid yang didapat dihitung secara gravimetri untuk mendapatkan lipid (%) ^{[19],[20]}. Berat lipid dihitung dengan persamaan yang terdapat pada metoda. Pada Gambar 4. Kadar lipid yang didapatkan berturut turut dari yang tertinggi yaitu pada pH kontrol 8,2, pH 9, pH 7, pH 5. Pemberian stress pH pada mikroalga *C.vulgaris* menghasilkan kadar lipid yang berbeda. Jika dibandingkan dengan biomassa

yang didapat, kadar lipid paling tinggi dimiliki oleh pH kontrol 8,2 yang sebanding dengan biomassa yang didapat yaitu sama-sama memiliki nilai yang paling tinggi dibanding dengan tiga sampel yang telah diberi variasi stress pH. Kadar lipid mikroalga *C. vulgaris* cenderung naik berdasarkan diagram yaitu dari pH 5 ke pH 8,2 yang merupakan batas pH maksimum kadar lipid mikroalga *C. vulgaris* dengan medium GrowMore sedangkan kadar lipid pada pH 9 terjadi penurunan.

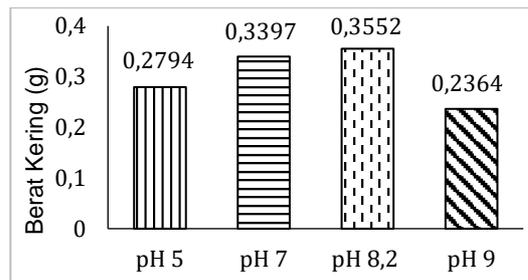
Pada literatur sebelumnya mengatakan bahwa penambahan biomassa dapat meningkatkan kadar lipid^[11]. Jika dibandingkan kadar lipid yang didapat dengan biomasanya yaitu berbanding lurus. Pada penelitian ini kadar produktivitas lipid juga diamati untuk menentukan produktivitas terbaik dari tiga sampel yang diberi perlakuan dan satu sampel pH medium GrowMore 32-10-10. Produktivitas lipid dihitung dengan persamaan yang terdapat pada metoda^[25].



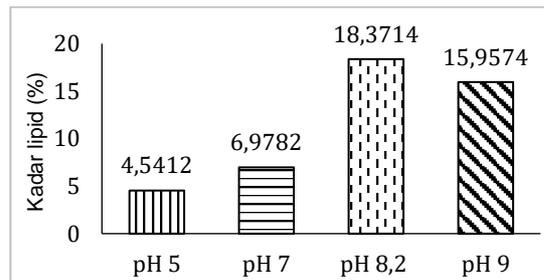
Gambar 1. Kurva pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris*



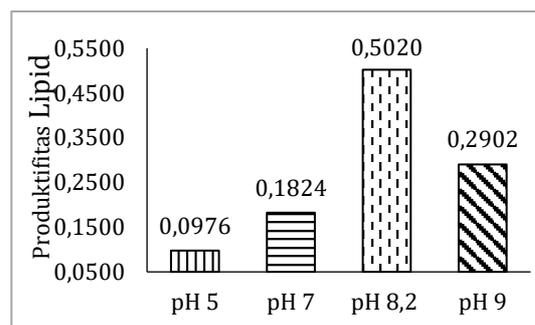
Gambar 2. Kurva pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* setelah penambahan pH pada hari ke-10 (pH 5 ◆ pH 7 ■ pH 8,2 ✕ pH 9 ▲).



Gambar 3. Jumlah berat kering yang didapat mikroalga *C. Vulgaris*



Gambar 4. Kadar lipid pada mikroalga *C. vulgaris*



Gambar 5. Produktivitas lipid pada mikroalga *C. vulgaris* (g/L/hari)

Pada Gambar 5 produktivitas lipid paling tinggi didapatkan pada sampel pH kontrol 8,2 memiliki nilai 0,5020 g/L/hari selanjutnya nilai produktivitas lipid terendah yaitu pada pH 5 dengan nilai 0,0976 g/L/hari. Jenis mikroalga *C.vulgaris* mampu menghasilkan asam lemak jenuh yang tinggi^[25].

Adanya nitrogen dalam medium mikroalga akan meningkatkan lipid seluler dari 20-30% menjadi 60-70%, sehingga produktivitas lipid keseluruhan tidak berubah. Beberapa penelitian sebelumnya mengatakan masalah optimasi faktor-faktor yang berpengaruh telah banyak dilakukan^[24].

Produktivitas lipid mikroalga *C.vulgaris* cenderung naik berdasarkan diagram yaitu dari pH 5 ke pH 8,2 yang merupakan batas pH

maksimum kadar lipid mikroalga *C.vulgaris* dengan medium GrowMore sedangkan produktivitas lipid pada pH 9 terjadi penurunan. Jika dibandingkan produktivitas lipid yang didapat dengan biomasnya dan kadar lipid yaitu berbanding lurus.

Jenis asam lemak dari lipid mikroalga *C.vulgaris*

Proses pengolahan biodiesel dilakukan dengan mereaksikan trigliserida dengan alkohol melalui reaksi transesterifikasi^[26]. Reaksi transesterifikasi yaitu mengubah trigliserida menjadi metil ester^[21]. Hasil lipid dari proses transesterifikasi kemudian dianalisis dengan GC-MS, dari hasil produktivitas lipid yang didapat menunjukkan pH kontrol 8,2 dan pH 9 memiliki jenis asam lemak yang lebih tinggi,

Tabel 2. Jenis asam lemak pada mikroalga

No	pH 9		pH 8,2	
	Metil Ester	% area	Metil Ester	% area
1	Metil Heksadekanoat (C16:0)	58,92	Metil Heksadekanoat (C16:0)	61,25
2	Metil 9, 11-Oktadekadienoat (C18:2)	3,67	Metil 9,12-Oktadekadienoat (C18:2)	21,47
3	Metil 9-Oktadekanoat (C18:1)	7,91	Metil Oktadekanoat (C18:1)	17,27
4	Metil Nonadekanoat (C19:0)	29,49		

oleh karena itu peneliti melakukan analisis GC-MS berdasarkan nilai produktivitas lipid tertinggi. Sehingga hanya ada dua sampel yang akan diuji dan dilihat jenis asam lemaknya. Dari Tabel 2 dapat dilihat asam lemak yang terkandung dalam sampel yang diberikan stress pH 9 memiliki empat asam lemak dan pH kontrol 8,2 memiliki tiga asam lemak. Asam lemak pada stress pH 9 dan pH kontrol 8,2 memiliki metil heksadekanoat, metil 9-oktadekanoat, metil oktadekanoate, metil 9,12-oktadekadienoat, metil 9,11-oktadekadienoat dan yang membedakannya adalah metil nonadekanoat (C19:0) pada pH ke 9. pada pH 9 dikarenakan pH tinggi dapat merangsang produksi asam lemak sehingga memiliki asam lemak yang tinggi^[17]. Dalam kondisi lingkungan yang kurang baik atau stres yang tidak menguntungkan, banyak mikroalga mengubah jalur biosintesis lipid mereka terhadap pembentukan dan akumulasi netral lipid, terutama dalam bentuk TAG yang memungkinkan mikroalga untuk bertahan dalam kondisi yang kurang baik^[27].

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan pH mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris*. Pengaruh pemberian stress pH pada mikroalga *C. vulgaris* menyebabkan penurunan produksi lipid dan menambah komposisi asam lemak yaitu pada kultur pada pH 8,2 menghasilkan metil Heksadekanoat, metil 9,12-oktadekadienoat, metil oktadekanoat, dan pH 9 menghasilkan metil heksadekanoat, metil 9-oktadekanoat, metil 9,11-oktadekadienoat. Asam lemak

tambahan metil nonadekanoat ditemukan hanya pada *C. vulgaris* yang tumbuh pada pH 9.

Daftar Pustaka

1. Kotasthane, T., Potential of Microalgae for Sustainable Biofuel Production Marine Science: Research & Development. **7(2)**: (2017).
2. Laurens, L. M. L. & Wolfrum, E. J., Feasibility of spectroscopic characterization of algal lipids: Chemometric correlation of NIR and FTIR Spectra with exogenous lipids in algal biomass. *Bioenergy Res.*, **4(1)**: 22–35 (2011).
3. Noer Abyor Handayani, D. A., Potensi Mikroalga Sebagai Sumber Biomasa Dan Pengembangan Produk Turunannya. *J. Tek.*, **33(2)**: 58–65 (2012).
4. Rajvanshi, S. & Sharma, M. P., Microalgae: A Potential Source of Biodiesel. *J. Sustain. Bioenergy Syst.*, **2012(September)**: 49–59 (2012).
5. Herdiana, C., Teknik, F. & Sarjana, P., Studi Komparasi Teknik Pemecahan Dinding Sel Pada Ekstraksi Lipid Mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. universitas indonesia, (2011).
6. Epa, K., Dha, D. A. N. & Fortifikasi, U., Kultivasi Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* Sebagai Penghasil Biomassa Kaya EPA dan DHA Untuk Fortifikasi Sosis (SO-FIT). Universitas Hasanuddin, (2013).
7. Chalid, S. Y., Amini, S. & Lestari, S. D., Kultivasi *Chlorella*, sp Pada Media Tumbuh Yang Diperkaya Dengan Pupuk Anorganik Dan Soil Extract. *Valensi*, **1(6)**: 298–304

- (2010).
8. Almutairi, A. W. & Toulubah, H. E., Effect of Salinity and pH on Fatty Acid Profile of The Green Algae *Tetraselmis suecica*. *J. Pet. Environ. Biotechnol.*, **08(03)**: 3–8 (2017).
 9. Amini, S. dan S., Konsentrasi Unsur Hara pada Media dan Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan Pupuk Anorganik Teknis dan Analis. *J. Perikan. (J. Fish. Sci.) VIII, VIII(2)*: 201–206 (2006).
 10. Fachrullah, M. R., Laju Pertumbuhan Mikroalga Penghasil Biofuel Jenis *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. yang Dikultivasi Menggunakan Air Limbah Hasil Penambangan Timah di Pulau Bangka. Institut Pertanian Bogor, (2011).
 11. Sarjana, P., Pertanian, T., Pertanian, F. & Sriwijaya, U., Pengaruh pH, konsentrasi isolat *Chlorella vulgaris* dan waktu pengamatan terhadap tingkat cemaran limbah cair crumb rubber. *J. Din. Penelit. Ind.*, **25(2)**: 97–106 (2014).
 12. Rustan, A. C. & Drevon, C. A., Fatty Acids: Structures and Properties. *Encycl. Life Sci.*, 1–7 (2005). doi:10.1038/npg.els.0003894
 13. Rachmaniah, O., Setyarini, R. D. & Maulida, L., Pemilihan Metode Ekstraksi Minyak Alga dari *Chlorella* sp. dan Prediksinya sebagai Biodiesel. *Semin. Tek. Kim. Soehadi Reksowardojo*, 1–10 (2010).
 14. Spilling, K., Brynjólfssdóttir, Á., Enss, D., Rischer, H. & Svavarsson, H. G., The effect of high pH on structural lipids in diatoms. *J. Appl. Phycol.*, **25(5)**: 1435–1439 (2013).
 15. Huang, Y. T. & Su, C. P., High lipid content and productivity of microalgae cultivating under elevated carbon dioxide. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **11(3)**: 703–710 (2014).
 16. Gobler, C. J., Norman, C., Panzeca, C., Taylor, G. T. & Sañudo-Wilhelmy, S. A., Effect of B-vitamins (B1, B12) and inorganic nutrients on algal bloom dynamics in a coastal ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol.*, **49(2)**: 181–194 (2007).
 17. Al-safaar, A. T., Al-rubiaee, G. H. & Salman, S. K., Effect of pH Condition on the Growth and Lipid Content of Microalgae *Chlorella vulgaris* & *Chroococcus minor*. *Int. J. Sci. Eng. Res.*, **7(11)**: (2016).
 18. Harrison, M. J. G. R. P. V. H. S. T. L., Selection of Direct Transesterification as the Preferred Method for Assay of Fatty Acid Content of Microalgae. *Cent. Bioprocess Eng. Res.*, 1053–1060 (2010). doi:10.1007/s11745-010-3468-2
 19. Sekatresna, W., Dharma, A., Zein, R. & Chaidir, Z., Identification of blue-green algae uncultured *oscillatoria* sp IPOME-4 isolated from local industry effluent with the potential as β -carotene feedstock. *Der Pharma Chem.*, **8(12)**: 110–117 (2016).
 20. Cuellar-Bermudez, S. P., Romero-Ogawa, M. A., Vannela, R., Lai, Y. J. S., Rittmann, B. E. & Parra-Saldivar, R., Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. *Algal Res.*, **12(March)**: 10–16 (2015).
 21. Damayanti, A. & Fitriana, E. A., Sintesis Biodiesel Dari Minyak Mikroalga *Chlorella Vulgaris* Dengan Reaksi Transesterifikasi Menggunakan Katalis Koh. *J. Bahan Alam Terbarukan*, **4(1)**: 14–20 (2015).
 22. Park, W., Yoo, G. & Moon, M., Phytohormone Supplementation Significantly Increases Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* Cultivated for Biodiesel Production. *Biochem Biotechnol.* (2013). doi:10.1007/s12010-013-0386-9
 23. Hadiyanto. & Azim, M., Mikroalga Sumber Pangan & Energi Masa Depan. *CBiore*, **38(1)**: 51–57 (2012).
 24. Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y., Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.*, **31(7)**: 1043–1049 (2009).
 25. Nur, M. M. A., Efek Bikarbonat , Besi , dan Garam terhadap Produktivitas Lipid *Chlorella* sp . yang Diekstrak dengan Metode Osmotic Shock Effect of Bicarbonate , Iron , and Salt , on Lipid Productivity of *Chlorella* sp . Extracted by Osmotic Shock Method. *Eksergi*, **11(02)**: 20–24 (2014).
 26. Dewi, Prima, Putri, T., Usman, T. & Harlia., Transesterifikasi Langsung Mikroalga *Chlorella* sp Dengan Katalis Abu Tandan Kosong Sawit Yang Diimpregnasikan Pada Zeolit. *JKK*, **4(2)**: 37–43 (2015).

27. Griffiths, M. J. & Harrison, S. T. L., Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, **21(5)**: 493–507 (2009).