

Kadar Total Lipid Mikroalga *Nannochloropsis oculata* yang dikultur dengan suhu yang berbeda.

Hadi Endrawati dan Ita Riniatsih

PS. Ilmu Kelautan, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan UNDIP. Kampus UNDIP
Tembalang, Semarang.

Abstrak

Sebagai pakan alami *N. oculata* memiliki kandungan lipid cukup tinggi yang dapat dimanfaatkan sebagai alternatif bahan biodiesel sesuai dengan perkembangan kebutuhan energi. Pertumbuhan *N. oculata* sangat tergantung pada suhu, salinitas, pH, dan intensitas cahaya. Tingkat suhu yang berbeda diduga berpengaruh terhadap kadar total lipid yang dihasilkan oleh *Nannochloropsis oculata*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap produksi biomassa dan kadar total lipid pada kultur mikroalga *Nannochloropsis oculata*. Metode penelitian yang digunakan adalah *eksperimental* dengan empat perlakuan suhu yaitu 18 °C, 23 °C, 28 °C, dan 33 °C. Pengamatan yang dilakukan meliputi kepadatan sel, produksi biomassa serta analisa kadar total lipid. Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi rata-rata biomassa tertinggi pada suhu 28 °C ($81,9 \pm 1,67$ mg), sementara rata-rata kadar total lipid terbesar pada suhu 33 °C ($52,62 \pm 4,86$ dw-%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kepadatan sel akan diikuti peningkatan produksi biomassa. Dari hasil penelitian menunjukkan suhu yang baik untuk mendapatkan produksi biomassa dan kadar total lipid optimum pada suhu 18-33 °C.

Kata kunci: *Nannochloropsis oculata*, Suhu, Kadar Total Lipid

Abstract

As a natural feed *N. oculata* has a high lipid content which can be utilized as an alternative material in accordance with the development of biodiesel energy needs. Like other microalgae, growth of *N. oculata* highly dependent on salinity, pH, and light intensity. Optimal temperature affects the maximum growth as well as affecting the levels of total lipids. Different temperature levels thought to affect the levels of total lipids produced by *N. oculata*. This research aims to study the effect of temperature on biomass production and total lipid levels in the culture mikroalga *Nannochloropsis oculata*. The research method used was *eksperimental* with four treatment of temperature there were 18 °C, 23 °C, 28 °C, and 33 °C. The observation made include cell density, environmental parameters, biomass production and total lipid content analysis. The results showed that the average production of the highest biomass at 28 °C (81.9 ± 1.67 mg), while the average total lipid content of the largest at a temperature of 33 °C (52.62 ± 4.86 dw-%). The results showed that the increase in cell density will be followed by an increase in biomass production. From the results showed good temperature for biomass production and total lipid levels at the optimum temperature of 18-33 °C.

Key words: *Nannochloropsis oculata*, Temperature, Total Lipid Content.

Pendahuluan

Mikroalga merupakan organisme mikrokospis dan bersifat autotrof karena memiliki potensi sebagai produktivitas primer di perairan. Sesuai dengan kemajuan teknologi budidaya perikanan *N. oculata* digunakan sebagai pakan alami. Budidaya mikroalga ini sangat menarik karena tingkat pertumbuhannya yang tinggi, mampu menyesuaikan pada kondisi lingkungan yang bervariasi (Brown, 1997). Di dalam budidaya mikroalga *N. oculata*, faktor lingkungan sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga tersebut. Adapun kondisi lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap produksi lipid diantaranya suhu (Lupi *et al.*, 1991).

Selanjutnya *Nannochloropsis* sp merupakan salah satu mikroalga yang banyak dibudidayakan sebagai pakan alami yang mempunyai peranan sangat penting dalam usaha pembenihan ikan, udang, kepiting dan biota laut lainnya. Mikroalga bersel satu ini termasuk ke dalam kelas Eustigmatophyceae (Sleigh, 1989). *N. oculata* mempunyai potensi yang sangat besar untuk bahan baku produksi trigliserida (Campbell, 2008). Pertumbuhan *N. oculata* sangat tergantung pada ketersediaan nutrien, intensitas cahaya, karbondioksida, pH, suhu dan salinitas, seperti halnya mikroalga yang lain.

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang penting untuk mempengaruhi tingkat pertumbuhan dan metabolisme mikroalga. Suhu juga mempengaruhi daya larut gas-gas yang diperlukan untuk fotosintesis, seperti CO₂ dan O₂. Gas-gas ini mudah terlarut pada suhu rendah daripada suhu tinggi, akibatnya laju fotosintesis meningkat pada suhu rendah. Suhu air sangat berperan dalam kultur mikroalga di laboratorium, karena sangat mempengaruhi aktivitas enzim dalam metabolisme sel (Suseno,

1976). Lipid mempunyai peranan yang sangat penting dalam proses metabolisme.

Produksi biomassa yang cepat dengan kadar lipid yang relatif tinggi merupakan keunggulan yang dimiliki oleh mikroalga (Chisti, 2007; Li *et al.*, 2008). *Nannochloropsis* sp merupakan salah satu mikroalga yang memiliki kandungan total lipid yang cukup besar berkisar antara 31-68% dari berat kering (Campbell, 2008; Kawaroe, 2007; Rao *et al.*, 2007). Besarnya kandungan lipid dari *N. oculata* ini membuat para peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang bahan bakar alternatif, yang sebenarnya telah lama dilakukan dari jenis mikroalga *N. oculata*. Biodiesel merupakan salah satu sumber energi alternatif yang dapat dijadikan pilihan. Namun demikian, pengembangan mikroalga sebagai sumber penghasil biodiesel memiliki masalah antara lain biaya produksi biodiesel dari mikroalga yang relatif tinggi (Liang *et al.*, 2009).

Materi dan Metode

Materi Penelitian

Sampel yang digunakan adalah mikroalga jenis *N. oculata* yang diperoleh dari stok murni Laboratorium Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung (BBPBL) sebanyak dua liter dengan kepadatan stok awal 1650×10^4 sel/ml. Selanjutnya dilakukan kultur bertingkat di Laboratorium Basah Marine Science Universitas Diponegoro Teluk Awur Jepara sehingga diperoleh stok kultur sebanyak enam liter.

Alat dan Bahan Penelitian

Air yang digunakan terlebih dahulu di sterilisasi dengan cara mengklorinasi menggunakan kaporit 60 ppm sampai proses sterilisasi selesai (kurang lebih tiga hari). Untuk menghilangkan bau kaporit ditambahkan Na₂S₂O₃ (Natrium Thiosulfat) 30 ppm. Proses selanjutnya adalah dilakukan penyinaran dengan lampu UV selama 1-2

jam untuk mendapatkan media yang benar - benar steril.

Media air laut yang dibutuhkan dalam kultur mikroalga dengan salinitas 30 ppt, dimana *N. oculata* tumbuh baik pada salinitas 30-32 ppt (Fogg, 1987; Converti, 2009). Agar mikroalga dapat tumbuh dengan baik, dibutuhkan sumber nutrisi berupa pupuk yang didapatkan dari BBPBLL yaitu pupuk Conwy.

Metode Penelitian

Metode eksperimental laboratoris dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan serta berapa besar hubungan sebab akibat antara dua faktor atau lebih (Arikunto, 1993). Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan suhu dan 3 kali pengulangan yaitu pada masing-masing suhu 18°, 23°, 28°, dan 33 °C.

Jumlah kepadatan sel dihitung berdasarkan rumus dari Seafdec (1985) dalam Taw (1990) yaitu: Selain menghitung kepadatan sel, biomassa, dan kadar total lipid Pemanenan dilakukan pada waktu *N. oculata* memasuki fase stasioner atau akhir eksponensial.. Fase stasioner dicapai dalam masa pemeliharaan antara 7-10 hari (Anonim, 2007).

Analisis Kadar Total Lipid

1. Analisa kadar lipid dilakukan dengan dengan metode Bethien – Diemar (1963) dalam Hermawan 2004. Perhitungan % berat Total Lipid meliputi :

$$\% \text{ Lipid} = \frac{(A - B)}{C} \times 100 \%$$

Keterangan :

A = berat labu + berat lipid setelah dilakukan ekstrasi (mg)

B = berat labu sebelum dilakukan ekstrasi (mg)

C = berat kering sampel (mg)

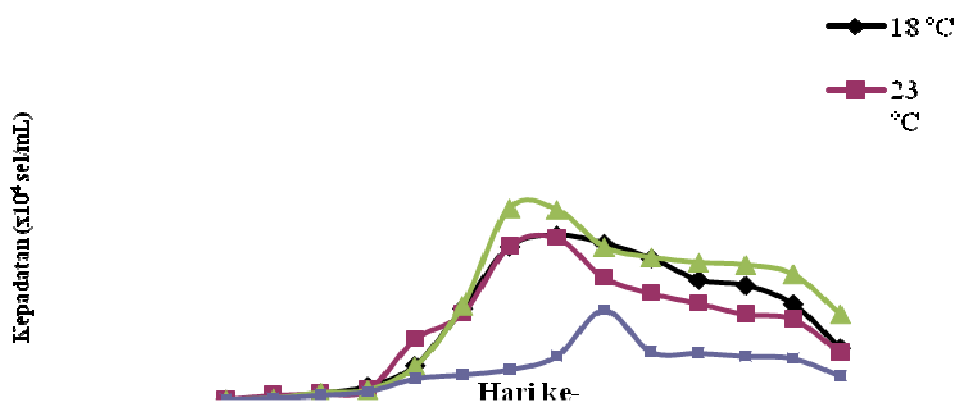
Analisis Data Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh suhu media pemeliharaan *Nannochloropsis oculata* dilakukan analisa stasistik **Anova one-way** Fowler *et al.* (1998). Setelah mendapatkan hasil analisa varian maka dilakukan pengujian dengan uji Tukey HSD yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar variable.

Hasil dan Pembahasan

Kepadatan *Nannochloropsis oculata*

Hasil pengamatan selama 15 hari pemeliharaan, dapat dilihat bahwa pertumbuhan *N. oculata* adalah sebagai berikut (Gambar 1 dan Tabel 1.) pada suhu 18°C, dan 23 °C kepadatan puncak dicapai pada hari ke-7 sebanyak (8453 x 10⁴ sel/mL) dan (8340 x 10⁴ sel/mL), pada suhu 28 °C kepadatan puncak dicapai pada hari ke-6 sebanyak (9777 x 10⁴ sel/mL), dan untuk suhu 33 °C kepadatan puncak dicapai pada hari ke-8 sebanyak (4827 x 10⁴ sel/mL)



Gambar 1. Kepadatan Rata-rata *N. oculata* Pada Masa Kultur Dengan Perlakuan Suhu yang Berbeda.

Tabel 1. Kepadatan *N. Oculata* (Rata-rata \pm SD $\times 10^4$ sel/mL) Pada Berbagai Perlakuan Suhu.

HARI ke-	SUHU (°C)			
	18 °C	23 °C	28 °C	33 °C
To	550 \pm 0	550 \pm 0	550 \pm 0	550 \pm 0
1	615 \pm 25	746 \pm 36	616 \pm 17	618 \pm 30
2	848 \pm 114	820 \pm 6	896 \pm 14	756 \pm 37
3	1176 \pm 151	1005 \pm 66	1011 \pm 21	919 \pm 22
4	2186 \pm 24	3454 \pm 334	2159 \pm 228	1549 \pm 80
5	4928 \pm 145	4687 \pm 426	5079 \pm 167	1728 \pm 149
6	7897 \pm 647	7963 \pm 262	9777 \pm 257	1984 \pm 98
7	8453 \pm 407	8340 \pm 278	9707 \pm 384	2629 \pm 522
8	8057 \pm 623	6430 \pm 447	7910 \pm 717	4827 \pm 742
9	7337 \pm 447	5670 \pm 244	7410 \pm 411	2830 \pm 881
10	6297 \pm 683	5183 \pm 410	7160 \pm 200	2770 \pm 574
11	6033 \pm 653	4650 \pm 269	7043 \pm 182	2617 \pm 295
12	5137 \pm 484	4427 \pm 197	6593 \pm 132	2515 \pm 228
13	3023 \pm 206	2813 \pm 127	4680 \pm 461	1675 \pm 369
14	2150 \pm 255	1983 \pm 203	3070 \pm 426	975 \pm 32
15	989 \pm 137	1016 \pm 215	1343 \pm 264	802 \pm 68

Kondisi lingkungan optimal terpenuhi pada suhu 18, 23 dan 28 °C sehingga kepadatan puncak maksimal tercapai dalam waktu yang minimal. Hal ini tidak terjadi pada suhu 33 °C yang mengalami pertumbuhan sel melambat ditandai dengan kepadatan puncak yang

tidak maksimal. Faktor suhu yang berbeda dengan pemberian nutrisi yang sama ternyata berpengaruh terhadap kepadatan puncak serta waktu penanaman. Hal ini sesuai dengan penelitian Qin (2005) bahwa suhu

berpengaruh terhadap pertumbuhan *B. braunii*.

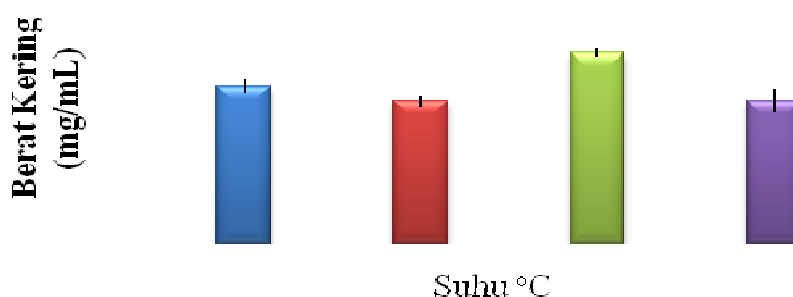
N. oculata dapat tumbuh baik pada kisaran suhu yang optimal 25-30 °C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Fitoplankton ini masih dapat bertahan hidup pada suhu 40 °C tetapi tidak tumbuh normal (Hirata, 1980 dalam Redjeki dan Murtiningsih, 1991). Suhu yang digunakan dalam penelitian ini adalah 18-33 °C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu yang optimum yaitu pada 28 °C akan menghasilkan kepadatan puncak sel yang maksimal pula dengan rentan waktu yang lebih singkat dan pertumbuhan yang maksimal berdampak langsung pada produksi biomassa (berat kering).

Pengaruh Suhu Terhadap Waktu Panen serta Produksi Biomassa N. oculata

Hasil pengamatan terhadap biomassa *N. Oculata* dengan perlakuan perbedaan suhu menunjukkan produksi biomassa terbesar didapatkan pada perlakuan suhu 28 °C dengan berat kering rata-rata 81,9 mg. Pada penelitian ini, akhir fase eksponensial memasuki fase stasioner pada hari ke-7 (suhu 18, 23), pada hari ke-6 (suhu 28 °C) serta hari ke-8 (suhu 33 °C). Hal ini sesuai dengan masa panen mikroalga pada skala laboratorium umumnya yaitu antara 7-10 hari (Anonim, 2007). Penelitian ini menunjukkan perbedaan signifikan antar perlakuan, terjadi pada perlakuan suhu 18°C berbeda signifikan dengan suhu 28°C. Perlakuan suhu 23°C berbeda signifikan dengan perlakuan suhu 28°C. Perlakuan suhu 28°C berbeda signifikan dengan suhu 18, 23, dan 33°C. Pada perlakuan suhu 33°C berbeda signifikan dengan suhu 28°C.

Tabel 2. Produksi Biomassa (mg/ml) yang Dihasilkan *N. oculata* Pada Fase Stasioner Pada Suhu yang Berbeda.

Ulangan	Suhu (°C)			
	18	23	28	33
1	64,3	58,8	80,4	66,4
2	70,3	61,3	81,6	56,5
3	67,8	63,3	83,7	60,8
Rata-rata	67,47	61,13	81,9	61,23
SD	±3,01	±2,25	±1,67	±4,96



Gambar 2. Produksi Rata-rata Biomassa (mg/mL) yang Dihasilkan *N. oculata* Pada Fase Stasioner Pada Suhu yang Berbeda.

Temperatur tinggi melebihi temperatur maksimum akan menyebabkan denaturasi protein dan enzim. Hal ini akan menyebabkan terhentinya metabolisme. Suhu yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan mikroalga dan akan mengalami kematian (Schlegel, 1994). Kisaran optimal suhu untuk pertumbuhan *B. braunii* adalah 25-30 ° C (Lupi *et al*, 1991). Denaturasi dapat diartikan suatu perubahan atau modifikasi terhadap struktur sekunder, tertier dan kuartener molekul protein tanpa terjadinya pemecahan ikatan-ikatan kovalen. Proses denaturasi ada di dalam dinding sel organisme lebih banyak menyimpan asam lemak, yang tidak

terlepas dari pengatur enzim kinase (Los, 2004).

Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Total Lipid

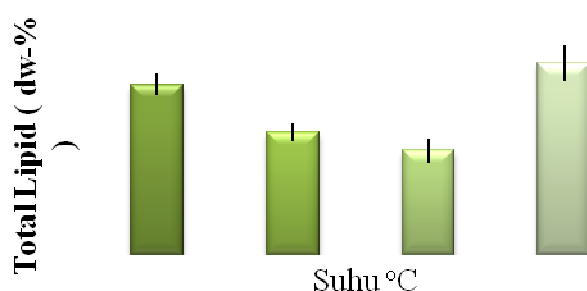
Hasil kadar total lipid *N. oculata* pada kultur skala laboratorium dengan perlakuan suhu yang berbeda disajikan pada (Tabel 3 dan Gambar 3),

Persentase rata-rata kadar total lipid tertinggi tercapai pada perlakuan suhu 33 °C sebesar 52,62 (%-dw), diikuti suhu 18 °C sebesar 46,87 (%-dw), kemudian pada suhu 23 °C sebesar 33,69 (%-dw), dan pada suhu 28 °C sebesar 28,68 (%-dw).

Tabel 3. Kadar Total Lipid (%-dw) yang Dihasilkan *N. oculata* Pada Fase Stasioner Pada Suhu yang Berbeda.

Ulangan	Suhu (°C)			
	18	23	28	33
1	49,30	35,03	28,11	56,17
2	43,67	35,07	32,23	47,08
3	47,64	30,96	25,69	54,61

Keterangan: SD: standar devias



Gambar 3. Total Lipid (%-dw) *N. oculata* Pada Fase Stasioner Pada Suhu yang Berbeda.

Dari hasil analisis varian hasil produksi biomassa *N. Oculata* menunjukkan bahwa F_{hit} (30.649) lebih besar dari F_{tabel} (3,8;5%)

(4.07) atau $P < 0,05$. Nilai tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan suhu, untuk

mengetahui perlakuan mana yang berbeda nyata dilakukan uji lanjutan menggunakan uji Tukey.

Hasil uji Tukey menunjukkan adanya perbedaan nyata pada perlakuan suhu 18 °C dengan suhu 23, dan suhu 28 °C; perlakuan suhu 23 °C dengan suhu 18, dan suhu 33 °C; perlakuan suhu 28 °C dengan suhu 18, dan suhu 33 °C; perlakuan suhu 33 °C dengan suhu 23, dan suhu 28 °C.

Hasil penelitian menunjukkan kadar total lipid *N.Oculata* sebesar 28.68- 52.62 %-dw. Nilai kadar total lipid rata-rata tertinggi diperoleh pada perlakuan suhu 33 °C dengan persentase 52,62 %-dw, dan rata-rata kadar total lipid terendah diperoleh pada perlakuan suhu 28 °C dengan persentase rata-rata yaitu 28,68 %-dw.

Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan tinggi belum tentu menghasilkan kandungan lipid yang tinggi. Pada suhu yang tinggi, pertumbuhan *N. oculata* tidak optimal, keadaan tersebut berbanding terbalik dengan kadar total lipid yang menunjukkan hasil produksi yang optimal (Takagi *et al.* 2000).

Mikroalga dapat tumbuh optimal pada suhu 20-30 °C. Suhu yang tinggi membuat mikroalga cenderung untuk mempertahankan kelangsungan hidup daripada dengan memperbanyak sel (Schenk *et al.*, 2008). Proses adaptasi tersebut dilakukan dengan cara yang dihasilkan digunakan untuk bertahan hidup sehingga pertumbuhan cenderung lambat dan energi tersebut tersimpan dalam jumlah yang besar. Keadaan tersebut tidak terlepas dari faktor jumlah kepadatan pada suhu 33 °C yang relatif lebih kecil, sehingga untuk memperoleh gizi atau nutrisi lebih banyak sangat memungkinkan, kondisi nutrisi yang didapat ini akan digunakan oleh *N. Oculata* sebagai pertumbuhan.

Suhu merupakan salah satu faktor yang mempunyai pengaruh terhadap kadar total lipid (Spolaore *et al.* 2006). Schenk *et al.* (2008) menyatakan mikroalga di alam mengakumulasi lipid pada keadaan tertentu. Pada kondisi tidak optimal mikroalga tetap melakukan fotosintesis dengan bantuan CO₂ dan mengakumulasinya dalam bentuk karbohidrat dan lipid. Mikroalga mengakumulasi total lipid dalam jumlah banyak sampai menemukan lingkungan tumbuh yang baik.

Pada kondisi lingkungan di bawah normal pertumbuhan, mikroalga mampu menyimpan total lipid 10 – 30 % dw. Hal ini disebabkan kurangnya nitrogen sehingga sel berhenti membelah dan mengakumulasi hasil fotosintesis, sehingga sesuai dengan kebutuhan senyawa non nitrogen yang merupakan faktor pembatas kehidupan sel. Chu *et al.* (1982) menyatakan, bahwa karbohidrat meningkat sesuai dengan umur dari mikroalga sejalan dengan berkurangnya nutrient dalam media kultur. Besarnya persentase kadar total lipid pada perlakuan suhu 33 °C (52,62 %-dw) merupakan bukti bahwa perlakuan suhu pada media kultur mempunyai pengaruh terhadap kadar total lipid yang dihasilkan *N. oculata*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa suhu memberi pengaruh pertumbuhan terhadap mikroalga *N. oculata* dengan kepadatan tertinggi sebesar 9777×10^4 sel/ml pada suhu 28 °C. Produksi biomassa tertinggi dicapai pada perlakuan suhu 28 °C yaitu sebesar 81.9 mg/ml. Kadar total lipid tertinggi dicapai pada perlakuan suhu 33 °C yaitu sebesar 52.62 %-dw. Perlakuan suhu pada media pemeliharaan akan mempengaruhi kadar total lipid yang dihasilkan oleh *Nannochloropsis oculata*.

Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti melalui LPPM Undip atas diberikannya kesempatan dengan menandai proyek penelitian ini melalui proyek Hibah Kompetensi Batch 2 dengan no. Kontrak 234/SP2H/PP/DP2M/III/2010, tanggal 01 Maret 2010; Tak lupa disampaikan pula terima kasih kepada Ir. Retno Hartati, MSc dan Ir. Ervia Yudiati, MSc. dan semua pihak yang telah berperan dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2008. Pengaruh Pemberian Konsentrasi Urea yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata*. <www.lib.unair.ac.id> . Diakses pada tanggal 27 Agustus 2010.
- Arikunto, S. 2003. Prosedur Penelitian: Suatu Pendekatan Praktik. PT. Rineka Cipta. Jakarta.
- Becker, E. W. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*, Cambridge: Cambridge University Press.
- Brown, A.C., Knight B.A. dan Conway E. 1969. Hydrocarbon content and its relationship to physiological state in the green alga *B. braunii*. *Phytochemistry* 8,543-547.
- Brown, M.R, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman and G.A Dunstan (1997), "Nutritional Properties Of Microalgae for Mariculture". *Aquaculture*, 151, hal. 315-331
- Campell, M.N. 2008. Biodisel: Algae as renewable source for liquid fuel. *Guelph Engineering journal*. (1): 2-7.
- Chisti, Y. 2007, "Biodiesel From Microalgae", *Biotechnology Advances*, Vol.25, hal. 294-306.
- Chu, F.E., Dupuy, J.L. and Webb, K.L. 1982. Polysaccharide Composition of Five Algae Species Used as Food Larvae of the American Oyster, *Crassostrea virginia*. *Aquaculture*. 29: 241-252.
- Fogg, G.E. 1975. *Algal Cultured and Phytoplankton Ecology*. 2nd ed. The University of Wisconsin Press, Wisconsin.
- Fowler. J., L. Cohen., P. Jarvis. 1998. *Practical Statistic for Field Biology*. Jhon Wiley & Sons Ltd. England UK. Pp. 259
- Hermawan A., 2004. The Protein, Lipids and Fatty Acids contents of *Tetraselmis* sp. with Various culture media. Master of Science (Aquaculture). Major Field : Departement of Aquaculture. Thesis Advisor : Assistant Professor Sunan Patarajinda, M. S. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 71 pages
- Hirata, H., A. Ishak and Y. Shigehisa. 1980. Effect of salinity and temperature on the growth of the marine phytoplankton *Chlorella saccharophila*. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima University* 30: 257-262.
- Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton; Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Kawaroe, M. 2007. The Prospect of Marine Microalgae as Biofuel (Oilgae) for Future Alternative of Energy Source. Proceeding Indonesian Aquaculture 2007, Bali, Indonesia, 30 Juli- 2 Agustus 2007.
- Li, Y., M. Horsman, B. Wang, N. Wu, C.Q. Lan. 2008. Effect of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green algae *Neochloris oleabundans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 : 629-636p.
- Lupi, F.M., H.M.L. Fernandes, I. Sa-Correia, and J.M. Novais. 1991. Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii*

- Kütz. UC 58. *J. Appl. Phycol.* 3, 35-42.
- Rao, R.A., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala, G.A. Ravishankar. 2007. Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technol* 98:560-564.
- Schlegel, Hans. 1994. Mikrobiologi Umum Edisi Keenam. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Shcenk, P. M., R. Skye, R. Thomas Hall, E. Stephens, U. C. Marx, J. H. Mussnug, C. Posten, O. Kruse, and Ben Hankamer. 2008. Second Generation Biofuel : High Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg.* 1 : 20-43.
- Sleigh, M.A. 1989. Adaptations of ciliary systems for the propulsion of water and mucus. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A:359-364.
- Smith PC, Ngothai Y, Nguyen QD, O'Neill BK. Improving the low-temperature properties of biodiesel: methods and consequences. *Renew Energy* 2010;35:1145e51.
- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87-96.
- Takagi M, Watanabe K, Yamaberi K, Yoshida T (2000) Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:112-117.
- Taw, N.D.R. 1990. Petunjuk pemeliharaan kultur murni dan masal mikroalga. Proyek pengembangan budidaya udang: United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations, Us, 32 hlm. (diterjemahkan oleh: Budiono Martosudarmo dan Indah Wulani).