

Pengaruh Gas CO₂ Terhadap Pertumbuhan, Kandungan Asam Lemak, Lipid, dan Karotenoid Total *Chlorella emersonii*

Rahmatika Yani¹, Abdi Dharma¹, dan Yetria Rilda^{1*}

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Andalas; e-mail: 1920412003_rahmatika@student.unand.ac.id

ABSTRAK

Karbon dioksida (CO₂) yang berasal dari kegiatan industri, merupakan salah satu penyebab gas rumah kaca yang berkontribusi terhadap pemanasan global. Belakangan ini mikroalga banyak diminati karena kemampuannya dalam biofiksasi CO₂, sebagai sumber karbon pada proses fotosintesis. Mikroalga memiliki potensi untuk mengurangi emisi CO₂, serta biomassa yang dihasilkan dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku obat, maupun bahan baku biodiesel. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek paparan gas CO₂ tinggi terhadap kandungan karotenoid dan lipid mikroalga *Chlorella emersonii*. Waktu pemaparan CO₂ 99,90% dilakukan setiap 5; 10; 15; 20 menit per hari selama 28 hari. Biomassa yang dihasilkan, diekstrak karotenoid total dan lipid total yang diukur menggunakan analisis spektrofotometri dan gravimetri. Lipid diesterifikasi dengan metode modifikasi metanol-HCl-transesterifikasi dan dikarakterisasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, stres lingkungan yang disebabkan paparan gas CO₂ selama 10 menit, menurunkan biomassa sebesar 45,17%, disertai peningkatan lipid dan kandungan asam lemak sebesar 52,31% dan 73,42%, dengan kandungan karotenoid total optimal 8,54 µg/mL. Budidaya *Chlorella emersonii* merupakan solusi yang efisien dan berkelanjutan untuk mengatasi masalah cemaran gas CO₂, efek stres yang dihasilkan dapat menjadi strategi untuk meningkatkan kandungan karotenoid, lipid dan asam lemak yang berpotensi untuk biodiesel.

Kata kunci: Fiksasi CO₂, *Chlorella emersonii*, profil asam lemak

ABSTRACT

Carbon dioxide (CO₂) from industrial activity, is one of the most important greenhouse gasses contributing to global warming. Recently, microalgae have gained a lot of interest due to their ability to utilize CO₂ as a carbon source for photosynthesis. Microalgae have the potential to reduce CO₂ emissions, and biomass produced can be used as medicine materials and biodiesel feedstock. The aim of this research was to analyze the effect of exposure to high CO₂ gas on the carotenoid and lipid content of the microalgae *Chlorella emersonii*. CO₂ 99,90% gas exposure times were observed for 5; 10; 15; 20 minutes per day for as long as 28 days. Biomassa was produced, extracted for total carotenoid and total lipid, measured using a spectrophotometer and gravimetric analysis. Lipid was esterified by a modified methanol-HCl-transesterification method and characterized using *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). The results showed that due to environmental stress with CO₂ gas in 10 minutes of exposure, the decrease in biomass was 45,17%, accompanied by increased lipid and fatty acid content levels of 52,31% and 73,42%, with carotenoid content optimal at 8,54 µg/mL. Cultivation of *Chlorella emersonii* is an efficient and sustainable solution to reduce CO₂ pollution, the effects of stress provide a strategy to increase carotenoid, lipid, and fatty acid content which have the potential for biodiesel.

Keywords: CO₂ fixation, *Chlorella emersonii*, fatty acid profile

Citation: Yani, R., Dharma, A., dan Rilda, Y. (2023). Pengaruh Gas CO₂ Terhadap Pertumbuhan, Kandungan Asam Lemak, Lipid, dan Karotenoid Total *Chlorella Emersonii*. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 21(2), 245-250, doi:10.14710/jil.21.2.245-250

1. Pendahuluan

Statistical Review of World Energy (2020) melaporkan bahwa, pada tahun 2009-2019 di Indonesia, terjadi peningkatan emisi gas CO₂ dari 388.3 juta ton menjadi 632.1 juta ton, oleh emisi industri, seperti industri energi, industri batubara, dan minyak (BP, 2020). Hal ini menjadi permasalahan terkait Indonesia berkomitmen untuk menurunkan emisi CO₂ sebesar 26% atau 0,767 Gton CO₂e (Pemerintahan Republik Indonesia, 2010). Oleh

karena itu, dibutuhkan pengembangan teknologi fiksasi CO₂ untuk mewujudkan komitmen tersebut. Mengangkat dari permasalahan ini, Teknologi yang tengah dikembangkan sebagai agen biofiksasi CO₂ yakni menggunakan mikroalga (Razzak et al., 2017). Mikroalga dapat memfiksasi CO₂ tanpa memerlukan lahan yang luas, ramah lingkungan serta 10-50 kali lebih efisien dibandingkan tumbuhan tingkat tinggi (Adamczyk et al., 2016).

Pada penelitian ini, digunakan mikroalga jenis *Chlorella emersonii* sebagai agen biofiksasi CO₂, karena spesies *Chlorella* toleran terhadap CO₂ tinggi (Ramalingam Dineshkumar & Sen, 2020). *Chlorella emersonii* yang dikultivasi dengan konsentrasi CO₂ tinggi, dapat dimanfaatkan sebagai agen bioremediasi dari industri-industri penghasil emisi gas CO₂ seperti, industri energi, minyak, dan gas. Selain untuk bioremediasi, kultivasi dengan gas CO₂ tinggi juga dapat menginduksi metabolit primer seperti lipid (Dineshkumar *et al.*, 2015; Adamczyk *et al.*, 2016) dan metabolit sekunder seperti karotenoid (Dineshkumar *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2018) yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku energi alternatif berupa biodiesel (Sun *et al.*, 2018), serta bahan farmasi untuk antioksidan (Gong and Bassi, 2016; Sun *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018)

2. Metode

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, Spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys 20*), vortex mixer (*VELP Scientifica ZX3*), oven, neraca analitik (Kern), autoklaf (*GEA YX-18LDJ*), sentrifuge mikro (*Hettich*), pH meter (*Hanna*), mikroskop cahaya (*Olympus BX40*), GC-MS (*QP2010 Shimadzu Ultra*), dan peralatan gelas lainnya.

Bahan penelitian yang digunakan sebagai berikut, *Chlorella emersonii* yang diisolasi dari kolam Universitas Andalas Padang dan didapatkan dari budidaya di Laboratorium Biokimia Universitas Andalas Padang (Perdana *et al.*, 2021), tabung gas CO₂ (99,90%), medium *Bold's Basal* (BBM) yang mengandung KH₂PO₄, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄. 7H₂O, NaNO₃, K₂HPO₄, NaCl, Na₂EDTA.2H₂O, KOH, FeSO₄.7H₂O, Trace Metal H₃BO₃, MnCl₂. 4H₂O, ZnSO₄.7H₂O, Na₂MOD₄.2H₂O, CuSO₄.5H₂O, Co(NO₃)₂.6H₂O, metanol p.a, HCl, kloroform dan *n*-heksana (Merck).

2.1. Morfologi dan kultivasi *Chlorella emersonii* dengan gas CO₂

Mikroalga *Chlorella emersonii* diamati morfologinya sebelum diinokulasi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Kemudian, disiapkan inokulum *Chlorella emersonii* dengan nilai absorbansi awal ± 0.1. Gas CO₂ dialirkan kedalam inokulum *Chlorella emersonii* dengan laju alir 1 L/min dan variasi waktu pemaparan 5, 10, 15, 20 menit. Pemaparan gas CO₂ diberikan setiap 24 jam sekali, diukur kurva pertumbuhan menggunakan spektrofotometer UV/Vis pada panjang gelombang 680 nm (Jawa *et al.*, 2014). Laju spesifik pertumbuhan mikroalga dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Kawaroe *et al.*, 2009):

$$K = 3.22 \frac{\log \frac{N_t}{N_0}}{T_t - T_p}$$

Keterangan:

N_t = kepadatan mikroalga pada waktu t
N₀ = kepadatan mikroalga awal

3,22 = konstanta
T_t = waktu awal
T_p = waktu pengamatan.

2.2. Penentuan Kandungan Karotenoid Total *Chlorella emersonii*

Penentuan karotenoid total dilakukan menggunakan metode Lichtenthaler (1987). Biomassa kering ditimbang sebanyak 0,015 g. Kemudian, ditambahkan 5 mL metanol dan diinkubasi pada suhu 49 °C. Ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm, supernatan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 470, 652, dan 665 nm. Hasil absorbansi dihitung kandungan klorofil a, klorofil b, dan total karotenoid dengan persamaan berikut (Jiang *et al.*, 2018) :

$$\text{Klorofil a } (\mu\text{g/mL}) = 16,72 A_{665} - 9,16 A_{652}$$

$$\text{Klorofil b } (\mu\text{g/mL}) = 34,09 A_{652} - 15,28 A_{665}$$

$$\text{Karotenoid } (\mu\text{g/mL}) = \frac{1000 A_{470} - 1,63 \text{ klorofil a} - \text{klorofil b}}{221}$$

2.3. Penentuan Kandungan Lipid Total dan Profil Asam Lemak *Chlorella emersonii*

Kandungan lipid total diekstrak dengan metode Bligh and Dyer, (1959). Biomassa kering ditimbang sebanyak 0.02 g, ditambahkan pelarut metanol:kloroform:air (2:1:1), divortex mixer dan disentrifuse dengan kecepatan 2500 rpm. Penambahan kloroform dilanjutkan hingga terbentuk 2 fasa. Fasa atas dibuang dan fasa bawah (lipid) kembali diekstrak dengan kloroform hingga semua lipid terekstrak. Pelarut diuapkan dan ekstrak lipid ditimbang hingga mencapai berat konstan. Perhitungan persentase lipid didasarkan pada rumus berikut (Perdana *et al.*, 2021).

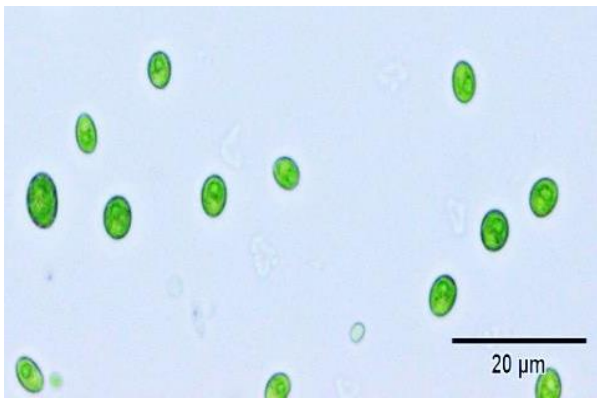
$$\% \text{ Lipid} = \frac{\text{Berat Lipid Sampel (gram)} \times 100\%}{\text{Berat Biomassa Sampel (gram)}}$$

Ekstrak lipid kering, diesterifikasi dengan metode modifikasi *methanolic-HCl-transesterification*, dengan penambahan pelarut metanol:HCl:kloroform (10:1:1). Kemudian ekstrak diinkubasi pada suhu 90°C selama 2 jam, didinginkan pada suhu ruang dan ditambahkan 1 mL aquades. Asam lemak metil ester diekstrak dengan 2 mL hexane:chloroform (4:1), divortex mixer dan diambil lapisan atas. Ekstrak diinjeksikan pada GC-MS dengan spesifikasi suhu kolom 50°C, suhu injeksi 250°C, tekanan 119,3 kPa, Laju alir 60 mL / menit, waktu mulai pada 2,00 menit, waktu berakhir 60,54 menit, mulai m/z 40.00, dan akhir m/z 500.00 (Cavonius *et al.*, 2014).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Morfologi dan kultivasi *Chlorella emersonii* dengan gas CO₂

Uji morfologi dilakukan guna mengidentifikasi mikroalga yang akan dikultur apakah sudah berisikan koloni mikroalga *Chlorella emersonii* murni dan tidak terkontaminasi dengan mikroalga lainnya. Hasil pengujian diperoleh bahwa, isolat yang digunakan merupakan satu jenis isolat mikroalga *Chlorella emersonii* dan tidak ada kontaminasi dengan mikroalga lainnya, bentuk morfologi *Chlorella emersonii* divisualisasikan berbentuk bulat, berwarna hijau dengan ukuran 6 µm yang ditunjukkan pada mikroskop cahaya perbesaran 400 kali (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan penelitian Perdana *et al.* (2021) yang melaporkan bahwa, ukuran sel mikroalga *Chlorella emersonii* yang diisolasi di kolam air tawar Universitas Andalas Padang yakni sebesar 5-7µm (Perdana *et al.*, 2021).



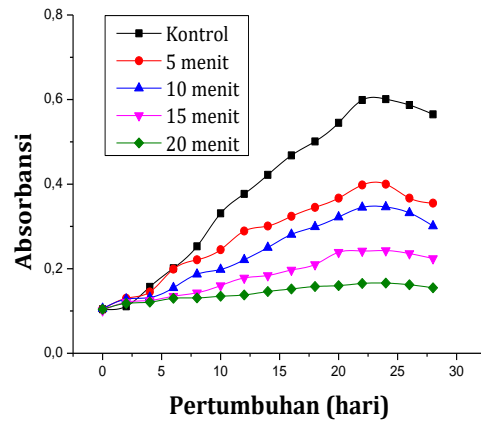
Gambar 1. Morfologi *Chlorella emersonii* perbesaran 400 kali

Pemaparan gas CO₂ 99,90% pada kultur *Chlorella emersonii* pada penelitian ini, diperoleh kurva pertumbuhan, semakin lama pemaparan gas CO₂ pada kultur, maka semakin terhambat pertumbuhan *Chlorella emersonii* (Gambar 2). Penelitian Kativu (2011) melaporkan bahwa, penambahan konsentrasi CO₂ yang berbeda yakni, 5%, 10%, 25%, 50%, dan 100% pada kultur mikroalga air tawar *Desmodesmus sp* dengan waktu pemaparan selama 24 jam, menghasilkan penurunan biomassa seiring pertambahan konsentrasi (Kativu, 2011).

Penurunan biomassa ini terjadi akibat penurunan pH media kultur setelah penambahan gas CO₂. Kativu (2011) melaporkan bahwa, ketika ditambahkan gas CO₂ murni, pH larutan lebih rendah dari 6, yang menandakan CO₂ dominan dalam larutan. Data hasil penelitian menunjukkan bahwa, terjadi penurunan produktifitas biomassa sebesar 46,50% ketika pH 5.6.

Kativu (2011) melaporkan bahwa, penambahan CO₂ murni dengan pemaparan CO₂ murni selama 24 jam, pada laju alir 10mL/menit, dapat menurunkan pH hingga 5,5, dan menyebabkan penurunan biomassa yang sangat signifikan hingga 55% berkurang dibandingkan kontrol. Penurunan produksi biomassa pada mikroalga air tawar

disebabkan karena, air tawar memiliki kapasitas penyangga yang lemah, sehingga menyebabkan pH dengan cepat menurun akibat penambahan gas CO₂ (Kativu, 2011).



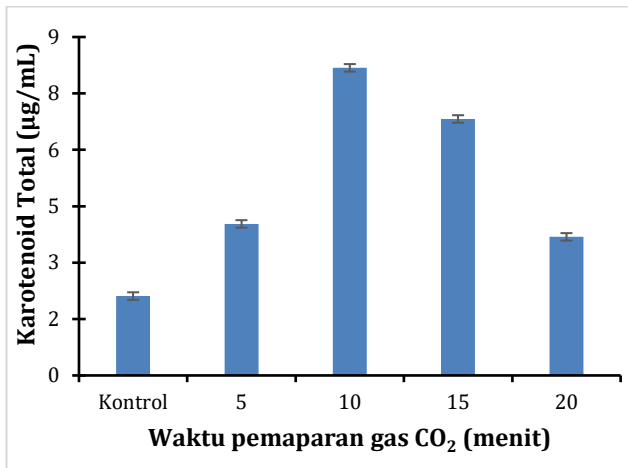
Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Chlorella emersonii* terhadap pemaparan gas CO₂ 99,90%

3.2. Karotenoid Total *Chlorella emersonii*

Kandungan karotenoid total diukur untuk mengetahui, apakah stress lingkungan menggunakan gas CO₂ tinggi dapat ditanggapi dengan baik, atau sebaliknya, mikroalga tidak mampu beradaptasi pada lingkungan stress ekstrem. Pada penelitian ini, dengan pemaparan gas CO₂ 99,90%, jumlah kandungan karotenoid total meningkat pada pemaparan CO₂ selama 5 dan 10 menit, kandungan karotenoid optimal diperoleh pada paparan gas CO₂ selama 10 menit sebesar 8,54 µg/mL. Berdasarkan hasil yang diperoleh, mikroalga *Chlorella emersonii* dapat beradaptasi dengan baik pada lingkungan ekstrem (Gambar 3). Penambahan sumber karbon dengan CO₂ tinggi menyebabkan keadaan yang tidak menguntungkan pada mikroalga, sehingga mikroalga menginduksi metabolit sekunder berupa karotenoid untuk melindungi sel dan bertahan hidup (Sun *et al.*, 2018).

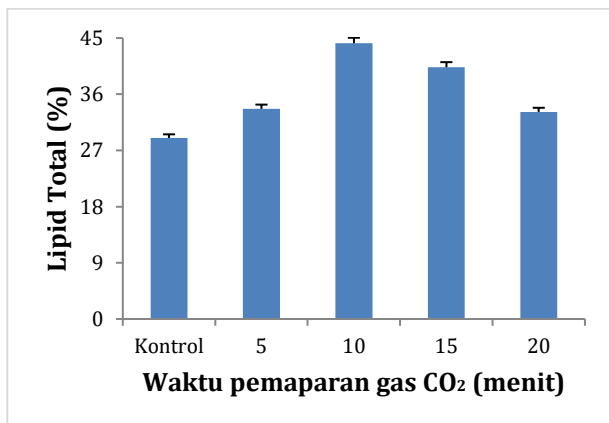
3.4. Lipid Total *Chlorella emersonii*

Penambahan CO₂ dengan konsentrasi tinggi, akan menurunkan pH media kultur dan menyebabkan terjadinya perbedaan gradien H⁺ di dalam dan di luar sel. Pada kondisi ini, penyerapan nutrisi akan terganggu, sehingga terjadi kekurangan nutrisi dalam sel. Maka, untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya, mikroalga membutuhkan energi tinggi dengan cara transpor aktif. Oleh karena itu, pembentukan lipid pada kondisi lingkungan stres lebih disukai dibandingkan pembentukan glukosa, karena lipid dapat menyimpan energi lebih banyak dibandingkan penyimpanan dalam bentuk glukosa. (Zhang dan Liu, 2021; Peng *et al.*, 2020).



Gambar 3. Pengaruh waktu paparan gas CO₂ terhadap kandungan karotenoid total *Chlorella emersonii*.

Berdasarkan teori di atas, hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa, kandungan lipid *Chlorella emersonii* meningkat sebesar 52,31%, dengan produktifitas lipid optimal didapatkan pada paparan gas CO₂ selama 10 menit (Gambar 4).



Gambar 4. Pengaruh waktu paparan gas CO₂ terhadap lipid *Chlorella emersonii*

Lipid terdiri dari asam lemak jenuh (*saturated fatty acid / SFA*) dan asam lemak tak jenuh (*unsaturated fatty acid*). Asam lemak tak jenuh terdiri dari *monounsaturated fatty acid* (MUFA) yang terdiri dari satu ikatan rangkap dan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) yang mengandung lebih dari satu ikatan rangkap. Berdasarkan pengukuran kandungan lipid tertinggi yang dihasilkan dari penelitian ini, didapatkan kandungan *fatty acid* (FA) *Chlorella emersonii* sebesar 73,42%, yang ditunjukkan pada Tabel 1. Hal ini sesuai dengan teori pada tinjauan pustaka, bahwa induksi dengan penambahan sumber karbon dapat meningkatkan produksi *fatty acid* pada mikroalga (Zhu *et al.*, 2016 ; Sun *et al.*, 2018 ; Aratboni *et al.*, 2019).

Tabel 1. Profil *fatty acid* *Chlorella emersonii*

Profile Fatty Acid	Rumus	Kontrol	CO ₂ (10 menit)
Hexadecanoic acid / Palmitic acid	C16 : 0	6.42	9.53
Hexadecanoic acid omega 7	C16 : 1 ω7	2.64	-
Octadecanoic acid / Stearic acid	C18 : 0	3.08	-
Octadecanoic acid Omega 9	C18 : 1 ω9	6.45	3.50
Octadecadienoic acid / Linoleic acid	C18 : 2 ω6	5.49	7.84
Octadecatrienoic acid / Methyl γ-linolenate	C18 : 3 ω3	6.51	3.41
Ethyl Linoleate omega 6	C20 : 2 ω6	2.38	-
Docosanoic acid / Behenic acid	C22 : 0	2.53	-
Hexanedioic acid, dioctyl adipate (DEHA)		-	49.14
Jumlah FA		35.50	73.42
SFA		12.03	58.67
MUFA		9.09	3.50
PUFA		14,38	11.25
Omega 3		6.51	3.41
Omega 6		7.87	7.84
Omega 7		2.64	-
Omega 9		6.45	3.50

Berbagai strain mikroalga dengan penambahan sumber karbon menggunakan gas CO₂, tengah dikembangkan guna mereduksi emisi CO₂ di atmosfer, efek stress yang ditimbulkan dapat bermanfaat untuk meningkatkan lipid pada mikroalga, ditunjukkan pada Tabel 2. Pemanfaatan *Chlorella emersonii*, selain untuk nutraceutical, namun juga berpotensi sebagai bahan baku biodiesel karna kandungan lipid yang tinggi (Perdana *et al.*, 2021).

Tabel 2. Induksi konsentrasi CO₂ optimal dan kandungan lipid total

Strain mikroalga	[CO ₂] (%v/v)	Lipid %	Referensi
<i>Chlorella sp. BTA 9031</i>	3	25	(Aratboni <i>et al.</i> , 2019)
<i>Chlorella vulgaris</i>	30	45.68	(Aratboni <i>et al.</i> , 2019)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3%	53.2	(Aratboni <i>et al.</i> , 2019)
<i>Chlorococcum littorale</i>	5	34	(Zhu <i>et al.</i> , 2016)
<i>S. armatus</i>	2	22.4	(Zhu <i>et al.</i> , 2016)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	50	26	(Tang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Chlorella variabilis</i>	-	22	(Loganathan <i>et al.</i> , 2020)
<i>Chlorella fusca</i>	10	13.3	(Moreira <i>et al.</i> , 2016)
<i>Chlorella emersonii</i>	99.90	73,42	<i>In this study</i>

4. Kesimpulan

Chlorella emersonii mampu beradaptasi dengan CO₂ 99,90%. Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan untuk mengatasi masalah emisi CO₂ di industri, dengan biofiksasi yang ramah lingkungan. Penulis memberi peluang agar peneliti selanjutnya dapat mengaplikasikan mikroalga *C. emersonii* pada industri menghasil emisi CO₂, menggunakan sistem *biorefinery*, yang dapat memanfaatkan karotenoid, lipid dan *fatty acid*, untuk produksi biodiesel, obat-obatan dan nutraceuticals serta berpotensi sebagai biodiesel.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Prof. Yetria Rilda, Bapak Prof. Abdi Dharmas, analis laboratorium biokimia Universitas Andalas, Sekolah Menengah Kimia Analisis Padang, serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penyusunan jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamczyk, M., Lasek, J., & Skawińska, A. (2016). CO₂ Biofixation and Growth Kinetics of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis gaditana*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(7), 1248–1261. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2062-3>
- Aratboni, A., Cell, M., Aratboni, H. A., Rafiei, N., Granados, R. G., & Alemzadeh, A. (2019). Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1228-4>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- BP. (2020). Statistical Review of World Energy, 2020 | 69th Edition. *Bp*, 69, 66. www.bp.com/statisticalreview. <https://www.bp.com/content/dam/bp/business-sites/en/global/corporate/pdfs/energy-economics/statistical-review/bp-stats-review-2020-full-report.pdf>
- Cavonius, L. R., Carlsson, N. G., & Undeland, I. (2014). Quantification of total fatty acids in microalgae: Comparison of extraction and transesterification methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), 7313–7322. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8155-3>
- Dineshkumar, R., Dash, S. K., & Sen, R. (2015). Process integration for microalgal lutein and biodiesel production with concomitant flue gas CO₂ sequestration: a biorefinery model for healthcare, energy and environment. *RSC Advances*, 5(90), 73381–73394. <https://doi.org/10.1039/c5ra09306f>
- Dineshkumar, R., & Sen, R. (2020). A sustainable perspective of microalgal biorefinery for co-production and recovery of high-value carotenoid and biofuel with CO₂ valorization. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(4), 879–897. <https://doi.org/10.1002/bbb.2107>
- Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
- Jawa, I. U., Ridlo, A., & Djunaedi, A. (2014). Kandungan Total Lipid *Chlorella vulgaris* yang Dikultur dalam Media yang Diinjeksi CO₂. *Journal of Materials Processing Technology*, 3(4), 578–585.
- Jesus, P. da C. C. de, Mendes, M. A., Perpétuo, E. A., Basso, T. O., & Nascimento, C. A. O. do. (2021). Extracellular carotenoid production and fatty acids profile of *Parachlorella kessleri* under increased CO₂ concentrations. *Journal of Biotechnology*, 329(June 2020), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.02.004>
- Jiang, L., Zhang, L., Nie, C., & Pei, H. (2018). Lipid productivity in limnetic *Chlorella* is doubled by seawater added with anaerobically digested effluent from kitchen waste. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1064-5>
- Kativu, E. (2011). *Carbon Dioxide Absorption Using Fresh Water Algae and Identifying Potential Uses of Algal Biomass*. 133.
- Kawaroe, M., Prariono, T., Sunuddin, A., Sari, D. W., & Augustine, D. (2009). *specific Growth Rate of Chlorella sp. and Dunaliella sp. According to Different Concentration of Nutrient and Photoperiod*. 1(16), 73–77.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Loganathan, B. G., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2020). Evaluation and interpretation of growth, biomass productivity and lutein content of *Chlorella variabilis* on various media. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(3), 103750. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103750>
- Moreira, J. B., Terra, A. L. M., Costa, J. A. V., & Morais, M. G. (2016). Utilization of CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(3), 691–698. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20160333s20150135>
- Park, H., Kwak, M., Seo, J. W., Ju, J. H., Heo, S. Y., Park, S. M., & Hong, W. K. (2018). Enhanced production of carotenoids using a *Thraustochytrid* microalgal strain containing high levels of docosahexaenoic acid-rich oil. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(9), 1355–1370. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1963-7>
- Pemerintahan Republik Indonesia. (2010). Naskah Akademis Rencana Aksi Nasional Penurunan Emisi Gas Rumah Kaca. *Peraturan Presiden*, 1–162.
- Peng, X., Meng, F., Wang, Y., Yi, X., & Cui, H. (2020). Effect of pH, Temperature, and CO₂ Concentration on Growth and Lipid Accumulation of *Nannochloropsis* sp. MASCC 11. *Journal of Ocean University of China*, 19(5), 1183–1192. <https://doi.org/10.1007/s11802-020-4302-y>
- Perdana, B. A., Dharmas, A., Zakaria, I. J., & Syafrizayanti. (2021). Freshwater pond microalgae for biofuel: Strain isolation, identification, cultivation and fatty acid content. *Biodiversitas*, 22(2), 505–511. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220201>
- Razzak, S. A., Ali, S. A. M., Hossain, M. M., & deLasa, H. (2017). Biological CO₂ fixation with production of microalgae in wastewater – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 76(September 2015), 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.02.038>

- Sun, H., Zhao, W., Mao, X., Li, Y., Wu, T., & Chen, F. (2018). High-value biomass from microalgae production platforms: Strategies and progress based on carbon metabolism and energy conversion. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1225-6>
- Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: A review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1275-9>
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., & Zhong, J. (2011). CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresource Technology*, 102(3), 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>
- Zhang, S., & Liu, Z. (2021). Advances in the biological fixation of carbon dioxide by microalgae. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(6), 1475–1495. <https://doi.org/10.1002/jctb.6714>
- Zhu, L. D., Li, Z. H., & Hiltunen, E. (2016). Strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. *BioMed Research International*, 2016, 7–9. <https://doi.org/10.1155/2016/8792548>