

The Growth of *Botryococcus braunii* Microalgae as a Lipid Producer in a Mixed Medium of Coconut Water and Seawater

Bintoro Rudi Saputro^{1,*}, Endang Kusdiyantini¹, Hermin Pancasakti Kusumaningrum²

¹Biochemistry Laboratory, Biology Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University

²Genetics Laboratory, Biology Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Tembalang, Semarang – 50275, Telephone (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

Corresponding author's email: ikhwansolehdanseangat@gmail.com

ABSTRACT

Energy needs in fuel sector tend to increase for supporting human life. Green microalgae (Chlorophyceae) can be used as an alternative solutions for bioenergy. *Botryococcus braunii* is lipid producer microalgae which can be processed further into biodiesel. Microalgae growth medium such as Walne can be substituted with coconut water that reducing economical cost. This research aims to determine the growth of *B. braunii* using coconut water and its effect on lipid production. The experiment conducted into five treatments of coconut water consist of P₀ (0%), P₁ (10%), P₂ (7.5%), P₃ (5%), and P₄ (2.5%) for five days incubation and three repetitive step. Microalgae growth was calculated according to cell count using hemocytometer. The results showed that 2.5% coconut water substitution exhibited the best growth rate and lipid production, i.e. the amount of 547 cells / ml and produced lipid level according to these treatment increased 179% comparing with control.

Keywords: Growth, Botryococcus braunii, Lipid, Coconut water, Seawater.

ABSTRAK

Kebutuhan energi sebagai penunjang kehidupan manusia di sektor bahan bakar semakin meningkat. Solusi alternatif berupa penggunaan *biorenewable* sebagai bioenergi yang berbahan baku dari mikroalga hijau (*Chlorophyceae*). *Botryococcus braunii* mampu menghasilkan lipid dalam jumlah banyak yang kemudian dapat diolah menjadi biodiesel. Medium untuk pertumbuhan mikroalga, seperti pupuk Walne dapat diganti dengan menggunakan air kelapa karena lebih ekonomis. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pertumbuhan dan kadar lipid yang dihasilkan *B. braunii*. Konsentrasi air kelapa yang diberikan dalam campuran medium tersebut adalah P₀ (0%), P₁ (10%), P₂ (7.5%), P₃ (5%), dan P₄ (2.5%) yang ditumbuhkan selama lima hari dengan tiga kali pengulangan. Pertumbuhan ditentukan dengan menghitung jumlah sel menggunakan *haemocytometer*. Hasil menunjukkan bahwa pertumbuhan dan produksi lipid yang paling baik terdapat pada perlakuan dengan konsentrasi air kelapa 2,5%, yaitu jumlah sel 547/ml dan jumlah kenaikan kadar lipid sebanyak 179% dibandingkan dengan kontrol.

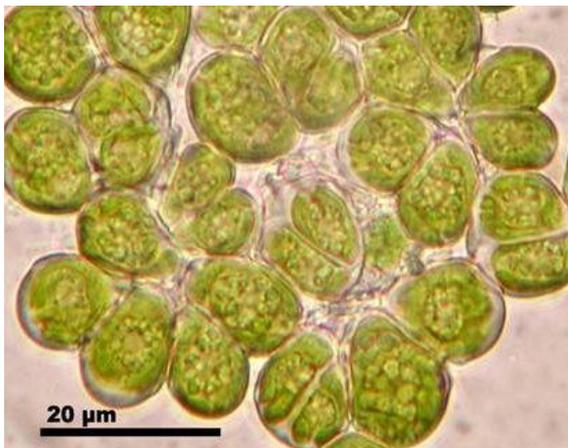
Kata kunci: Pertumbuhan, Botryococcus braunii, Lipid, Air Kelapa, Air Laut.

Pendahuluan

Kebutuhan energi tidak lepas dari jumlah ketersediaan sumbernya di alam. Salah satu sumber energi yang sering digunakan yaitu berupa bahan

bakar. Bahan bakar yang penggunaannya dapat diperbarui dan mengurangi cemaran udara disebut *biorenewable*. Berdasarkan sifatnya yang *renewable* dapat digolongkan sebagai bioenergi. Bioenergi

terbagi menjadi dua jenis, yaitu bioenergi modern dan bioenergi tradisional (lama). Bioenergi modern diantaranya ialah bioetanol, biodiesel, biogas, PPO (*pure plant oil*) atau SVO (*straight vegetable oil*), sedangkan bioenergi tradisional (lama) contohnya kayu bakar [1]. Bioenergi modern berupa biodiesel dapat dihasilkan dari mikroorganisme fotosintetik, contohnya mikroalga. Mikroalga menurut Mata [2] merupakan mikroorganisme fotosintetik prokariotik atau eukariotik yang pertumbuhannya sangat produktif dan dapat mengungguli tanaman lain seperti kelapa sawit, jarak, jagung sebagai sumber biodiesel. Mikroalga yang dapat diolah menjadi biodiesel salah satunya adalah *Botryococcus braunii* (Gambar 1)



Gambar 1. *Botryococcus braunii* [3]

B. braunii merupakan mikroalga sel tunggal berwarna hijau dan banyak ditemukan di perairan danau, tambak, ataupun perairan payau sampai laut [4]. Kandungan klorofil *B. braunii* mencapai $\pm 1,5\%$ - $2,8\%$ terdiri dari klorofil a, b, c yang akan terlihat berwarna hijau-coklat kekuningan [5]. *B. braunii* memiliki inti sel dengan ukuran ± 15 - $20 \mu\text{m}$ dan berkoloni, bersifat non-motil dan setiap pergerakannya sangat dipengaruhi oleh arus perairan [5]. Menurut Singh [6] komposisi dari *B. braunii* seperti diperlihatkan pada Tabel 1, terdiri dari klorofil a, karotenoid, protein, karbohidrat, dan kadar lipid.

Tabel 1. Komposisi senyawa dalam *B. braunii*.

Strain	Komposisi				
	Klorofil a	Karotenoid	Protein	Karbohidrat	Lipid
<i>B. braunii</i>	0,4	1,2	17,8	18,9	61,4

Penggunaan Air Kelapa sebagai media campuran sebagai pengganti dari pupuk komersil yang harganya kurang ekonomis dan sebagai tambahan nutrisi yang pada medium campuran antara Air Kelapa dan Air Laut. Air kelapa di Indonesia cukup berlimpah, lebih dari 1 sampai 900 juta liter per tahun. Air kelapa mengandung sejumlah zat gizi, yaitu protein 0,2%, lemak 0,15%, karbohidrat 7,27%, gula, vitamin, elektrolit dan hormon pertumbuhan [7]. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan optimasi pertumbuhan *B. braunii*, yang juga akan membantu menghasilkan kandungan lipid dalam jumlah yang banyak. Mikroalga yang memiliki komponen asam lemak lebih dari 40% saja yang dapat diekstraksi dan diubah menjadi minyak [8].

Cara Kerja

Pembuatan Medium

Kultur murni mikroalga *B. braunii* berasal dari BBPBAP (Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau) Jepara. Medium yang digunakan ialah medium campuran antara air laut dan air kelapa dengan perbandingan 1:1. Air laut yang digunakan sebagai media terlebih dahulu disterilkan dengan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan sebesar 15 Psi (121°C) untuk menghindari kontaminasi dan adanya mikroorganisme lain yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga. Air Laut yang sudah steril kemudian dituang ke dalam erlenmeyer menggunakan corong yang sudah diberikan kertas saring agar tidak ada endapan atau material lain yang ikut terbawa, kemudian erlenmeyer ditutup rapat.

Pembuatan Inokulum/Starter

Mikroalga *B. braunii* ditumbuhkan dalam wadah botol mineral dengan volume 600 ml yang tertutup rapat dan terjaga kondisinya dari kontaminan. Medium yang digunakan untuk inokulasi mempunyai komposisi yang terdiri dari Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Sr^{2+} , dan

I. Medium yang ditambahkan disetiap botolnya sebanyak 200 mikrolite setiap dua hari sekali.

Pertumbuhan Mikroalga pada Medium Perlakuan

Inokulasi mikroalga sebanyak 100 ml dilakukan dengan cara menumbuhkannya pada medium campuran. Air kelapa sebanyak 10%, 7,5%, 5%, dan 2,5% yang masing-masing dicampur dengan air laut hingga mencapai volume 100 ml kemudian digojok agar homogen. Pertumbuhan diamati setiap 24 jam sekali selama 5 hari untuk melihat laju pertumbuhan selnya. Perhitungan jumlah sel mikroalga menggunakan Haemocytometer. Faktor lain yang diukur adalah derajat keasaman (pH), oksigen terlarut (mg/l), salinitas (per mil/‰), suhu (°C), cahaya (cd/m²), dan kadar CO₂ (%).

Perhitungan Jumlah Sel Mikroalga

Perhitungan jumlah sel dilakukan setiap 24 jam sekali dimulai dari hari ke-1 hingga hari ke-5. Penghitungan jumlah sel mikroalga dilakukan dibawah mikroskop dengan menggunakan Haemocytometer, dengan rumus sebagai berikut [9]:

$$\frac{\text{Jumlah sel}}{\text{mL}} = \frac{\text{jumlah total sel dalam 4 blok}}{\text{total blok (= 4)}} \times 10000$$

Apabila kepadatan sel sulit dihitung karena kepadatan tinggi, maka dihitung menggunakan rumus [9]:

$$\frac{\text{Jumlah sel}}{\text{mL}} = \text{jumlah total sel dalam 4 bagian} \times 4 \times 10000$$

Penentuan Kadar Lipid (Analisis Kadar Lemak AOAC 1990)

Penentuan kadar lipid *B. braunii* didasarkan pada metode Soxhlet. Adapun prosedurnya adalah memanaskan labu lemak dalam oven sampai beratnya konstan, kemudian menimbang ± 2 gr sampel dalam kertas saring selanjutnya dimasukkan dalam selubung lemak. Memasukkan 150 ml kloroform sebagai pelarut lemak kedalam labu lemak kemudian memasangnya pada alat ekstraksi lemak. Langkah selanjutnya adalah memasukkan lemak yang berisi sampel ke dalam labu soxhlet dan diusahakan terendam dalam pelarut lemak, lalu merefluksi lemak pada suhu 60 °C selama 8 jam. Evaporasi campuran

lemak dan kloroform dengan menggunakan rotary evaporator sampai kering. Setelah itu memasukkan labu lemak dan lemak ke dalam oven pada suhu 105 °C selama ± 1 jam untuk menghilangkan sisa kloroform, dan mendinginkan dalam desikator selama 30 menit. Labu lemak berisi lemak kemudian ditimbang dengan perhitungan berikut:

$$\text{Persen ekstrak eter} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W₁ = Berat sampel (gr)

W₂ = Berat labu lemak (gr)

W₃ = Berat labu lemak + ekstrak lemak (gr)

Variabel Penelitian

Variabel Penelitian terbagi menjadi 2 bagian, yaitu Variabel terikat dan Variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan dan kadar lipid. Variabel bebas terdiri dari Air Kelapa dan Air Laut.

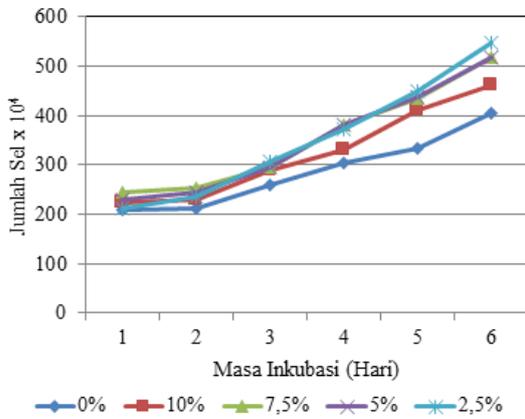
Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode analisis sidik ragam dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada taraf signifikan 5% dan olah data menggunakan *IBM SPSS Statistics 21*.

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Botryococcus braunii

Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: suhu, pH, iluminasi cahaya, oksigen terlarut, CO₂, salinitas, aerasi, dan nutrisi. Air kelapa pada penelitian ini digunakan sebagai pengganti pupuk untuk sumber nutrisi bagi mikroalga. Pertumbuhan *B. braunii* selama 6 hari disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pertumbuhan *B. braunii* pada Medium Campuran Air Kelapa dan Air Laut

Tabel 2. Rerata Jumlah Sel *B. braunii* pada Medium Campuran Air Kelapa dan Air Laut selama 5 Hari.

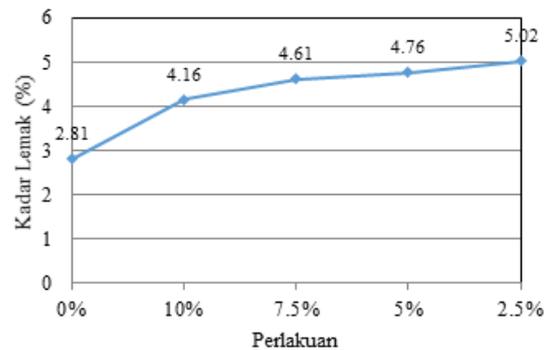
Waktu Inkubasi (hari)	Air Kelapa				
	0%	10%	7,5%	5%	2,5%
$t_{(0)}$	208	223	245	230	210
1	212	231	252	245	234
2	259	288	295	295	308
3	302	329	382	380	372
4	334	410	436	437	450
5	404	463	517	517	547

Hasil dari semua perlakuan menunjukkan pertumbuhan jumlah sel dari $t_{(0)}$ sampai $t_{(5)}$, tetapi jika dibandingkan secara keseluruhan maka pertumbuhan yang paling rendah berada pada perlakuan 0% dan pertumbuhan yang paling tinggi berada pada perlakuan 2,5%. Perbandingan lainnya yaitu pertumbuhan pada perlakuan 10% lebih rendah dari 7,5%, dan perlakuan 7,5% sama dengan perlakuan 5%, kemudian perlakuan pada 2,5% pertumbuhan sel lebih tinggi dibanding dengan perlakuan 5%. Hal ini disebabkan karena produksi biomassa dan kandungan dari mikroalga dipengaruhi oleh komposisi nutrisi dan konsentrasi nutriennya. Menurut Hirayama [10] pada penelitiannya juga disebutkan bahwa pada media yang memiliki unsur hara yang terlalu tinggi akan menyebabkan pertumbuhan mikroalga

terhambat karena mikroalga tersebut memerlukan waktu yang lebih lama untuk beradaptasi, yaitu fase untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya yang media kultivasinya diberi konsentrasi air kelapa. Keadaan ini diperkuat juga oleh Hastuti [11], dalam penelitiannya yang menyatakan jika air kelapa diberikan dalam jumlah berlebih kedalam media maka akan bersifat toksik yang dapat menghambat pertumbuhan, karena dengan timbulnya racun tersebut aktivitas ataupun proses-proses metabolisme sel secara langsung juga akan ikut terganggu.

Produksi Lipid *Botryococcus braunii*

Produksi lipid pada mikroalga *B. braunii* yang ditumbuhkan dengan media campuran air kelapa dan air laut disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kadar Lipid yang dihasilkan mikroalga *B. braunii* setelah inkubasi 5 hari

Lipid yang dihasilkan dari *B. braunii* yang dikultivasi selama 6 hari pada perlakuan dengan konsentrasi air kelapa 0% memiliki kuantitas paling rendah, yakni hanya 2,81% kandungan lipid, kemudian diikuti oleh perlakuan dengan konsentrasi air kelapa 10% yaitu 4,16% kandungan lipid, lalu dengan konsentrasi air kelapa 7,5% menghasilkan lipid sebanyak 4,61%, kemudian lipid yang dihasilkan dengan konsentrasi air kelapa 5% sebanyak 4,76%, kuantitasnya sedikit lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan 7,5%, dan pada perlakuan 2,5% konsentrasi air kelapa menghasilkan lipid paling tinggi yaitu sebanyak 5,02%. Lipid yang dihasilkan dari perlakuan diatas sangat bervariasi, hal ini disebabkan kandungan nutrisi yang terdapat dalam air kelapa memiliki peran yang sangat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga.

Hasil penelitian ini masih rendah dibandingkan penelitian Borowitzka [12] dan Banerjee [13], kandungan minyak biomassa kering dari mikroalga jenis *B. braunii* adalah 44,5%. Mikroalga dalam proses pertumbuhan sel ataupun untuk sintesis komponen organik sel dan bertahan hidup sangat bergantung pada nutrisi yang dibutuhkan. Menurut Prabowo [14], penambahan nutrisi ke dalam media kultivasi mikroalga salah satu hal yang mempunyai pengaruh terhadap kuantitas biomassa yang dikultivasi. Penyebab hasil lipid yang berbeda-beda tersebut juga dapat dikarenakan jumlah konsentrasi air kelapa yang diberikan juga bervariasi. Faradilla [15] menyatakan bahwa mikroalga tidak mampu mencerna unsur hara yang berlebih, sehingga menurunkan daya cerna dan memungkinkan produksi dari metabolit yang toksik. Hal ini mengakibatkan pertumbuhan mikroalga terhambat dan biomassa yang dihasilkan juga rendah.

Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan dan Produksi Lipid *Botryococcus braunii*

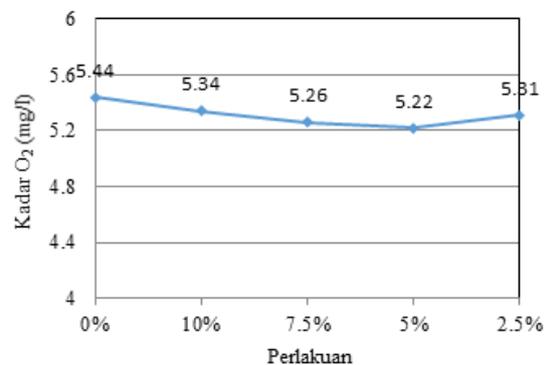
Suhu merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Mikroalga memiliki nilai toleransi suhu yang berbeda-beda. Suhu (Tabel 3) yang terdapat pada setiap perlakuan memiliki perbedaan yang sangat tipis, misal pada 0%, 7,5%, dan 2,5% memiliki nilai suhu yang sama yaitu 28°C, kemudian pada 10% dan 5% juga memiliki nilai suhu yang sama yaitu 28,5°C. Rata-rata nilai suhu penelitian ini berkisar 28°C. Suhu ini masih baik untuk pertumbuhan mikroalga *B. braunii*.

Tabel 3. Suhu Kultivasi Mikroalga *Botryococcus braunii* selama inkubasi 5 hari

Perlakuan	Komposisi Media		Suhu (°C)
	Air Laut (ml)	Air Kelapa (ml)	
0%	100	0	28
10%	90	10	28,5
7,5%	92,5	7,5	28
5%	95	5	28,5
2,5%	97,5	2,5	28

Menurut Shimamura [16] mikroalga ini menunjukkan pertumbuhan yang baik pada kisaran suhu 15°C - 35°C. Berdasarkan dari penelitian ini, maka suhu yang dipergunakan masih memenuhi syarat untuk proses kultivasi mikroalga *B. braunii* karena masih berada diantara suhu yang direkomendasikan.

Kadar Oksigen (O₂) / *Dissolve Oxygen* merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Penelitian ini menunjukkan kadar oksigen terlarut dalam air yang berbeda-beda. Perbedaan kadar oksigen terlarut dalam air pada setiap perlakuan tidak begitu besar. Kadar oksigen terlarut (Gambar 4) pada 0% memiliki nilai 5,44 mg/l, kemudian pada 10% memiliki nilai DO sebesar 5,34 mg/l, lalu pada 7,5% nilai DO 5,26 mg/l, selanjutnya pada 5% nilai DO 5,22 mg/l, dan pada 2,5% nilai DO sebesar 5,31 mg/l. Nilai DO yang berbeda-beda disebabkan oleh sel yang tidak motil sehingga distribusi aerasi tidak merata, maka oksigen yang diterima tidak sama. Berbeda dengan kadar CO₂ yang terlarut, jumlah ideal yang dibutuhkan oleh mikroalga hanya 1% [17].

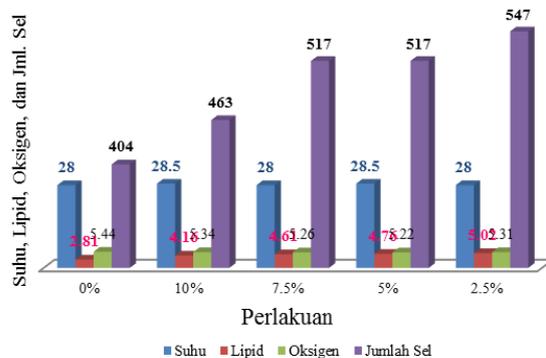


Gambar 4. Oksigen terlarut pada Kultivasi *B. braunii* setelah inkubasi 5 hari.

Cahaya merupakan faktor pendukung bagi pertumbuhan mikroalga *B. braunii*, karena mikroalga ini melakukan fotosintesis. Cahaya yang digunakan selama penelitian ini berasal dari pencahayaan lampu neon dengan daya listrik 40 watt yang memiliki nilai iluminasi cahaya sebesar 570 cd/m². Faktor lain yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga adalah pH medium. Air Laut memiliki pH sebesar 7, angka ini merupakan angka pH yang normal dan ideal, kemudian pada Air Kelapa yang digunakan sebagai

medium memiliki pH sebesar 5, lalu pH murni dari *B. braunii* yang digunakan sebesar 7, dan pH inokulum selama inkubasi 5 hari sebesar 7-8. Hasil data yang telah didapat secara keseluruhan menunjukkan bahwa pertumbuhan paling baik terdapat pada perlakuan 2,5% dan lipid yang dihasilkan dengan jumlah yang paling banyak berada pada perlakuan 2,5%.

Korelasi/hubungan antara suhu, lipid dan O₂ yang disajikan pada Gambar 5 berkaitan dengan faktor-faktor yang mempengaruhi mikroalga dalam proses pertumbuhan dan produksi lipid yang dihasilkannya. Suhu, mikroalga jika berada pada suhu optimum maka akan menjadikan metabolisme mikroalga berjalan dengan baik, begitu juga dengan oksigen terlarut dalam air. Fabregas [18] menjelaskan, bahwa faktor lingkungan memiliki pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan, perkembangan, dan produksi lipid. Produksi lipid juga sangat dipengaruhi oleh jenis mikroalga karena tidak semua mikroalga memproduksi lipid dalam jumlah yang sama. Menurut Derenne [19] produksi lipid pada mikroalga sangatlah beragam tidak hanya berdasarkan strain namun juga karena kondisi lingkungan.



Gambar 5. Korelasi Suhu, Lipid, Oksigen, dan Pertumbuhan *B. braunii* yang ditumbuhkan pada medium campuran.

Berdasarkan hasil penelitian memperlihatkan bahwa pertumbuhan tertinggi terjadi pada penambahan konsentrasi air kelapa 2,5%. Hal ini dikarenakan mikroalga akan mengalami pertumbuhan yang baik jika kebutuhan nutriennya terpenuhi dalam jumlah yang cukup. Hasil tersebut juga didukung oleh produksi lipid tertinggi pada media dengan konsentrasi yang sama. Kandungan air kelapa yang

lebih tinggi justru menurunkan produksi lipid walaupun pertumbuhan *B. braunii* masih tetap berlangsung. Casadeval [20] menyatakan bahwa pembentukan lipid mulai terjadi pada awal fase eksponensial pertumbuhan *B. braunii* dan berhenti ketika memasuki akhir fase stasioner dengan pembentukan lipid paling banyak fase eksponensial.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa pertumbuhan *Botryococcus braunii* paling optimum pada media dengan campuran Air Kelapa 2,5% tetapi tidak berpengaruh signifikan pada faktor pertumbuhan, namun demikian kadar lipid yang dihasilkan meningkat sebesar 179% dibandingkan kontrol.

Daftar Pustaka

- [1] Hambali, E., Mujdalifah, S., Tambunan, A.H., Pattiwiri, A.W. and Hendroko, R., (2007), *Teknologi bioenergi*, AgroMedia Pustaka, Jakarta.
- [2] Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S., (2010), Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14 1 217-232.
- [3] Bica, A.,(2010), Morphological, Biochemical and Molecular Markers in Identification of Highly Hydrocarbon Producing Strains of *Botryococcus Braunii*, in: Faculty of Biology and Geology, Babeş-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania.
- [4] Metzger, P. and Largeau, C., (2005), *Botryococcus braunii*: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids, *Appl Microbiol Biotechnol*, 66 5 486-496.
- [5] Kabinawa, I.N.K., (2008), Biodiesel energi terbarukan dari mikroalga, *Warta Pertamina*, 9 31-35.
- [6] Singh, Y. and Kumar, H.D., (1992), Lipid and hydrocarbon production by *Botryococcus* spp. under nitrogen limitation and anaerobiosis, *World J Microbiol Biotechnol*, 8 2 121-124.
- [7] Warisno, (2004), *Mudah & Praktis Membuat Nata de Coco*, AgroMedia, Jakarta.
- [8] Sobari, R., Susanto, A.B., Susilaningsih, D. and Rahma, D.Y., (2013), Kandungan Lipid

Journal homepage: <http://ejournal.undip.ac.id/index.php/sm>

- Beberapa Jenis Sianobakteria Laut Sebagai Bahan Sumber Penghasil Biodiesel, *Journal of Marine Research*, 2 1 112-119.
- [9] Martosudarmo, B. and Wulani, I., (1990), *Petunjuk Pemeliharaan Kultur Murni Dan Massal Mikroalga*, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara.
- [10] Hirayama, K., (1996), Effects of Bacterial Coexistence on the Growth of a Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*, *Fisheries Science*, 62 1 40-43.
- [11] Hastuti, D.S. and Handajani, H., (2001), *Budidaya Pakan Alami*, Fakultas Peternakan-Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- [12] Borowitzka, M.A., (1988), *Fats, oils and hydrocarbons*, Cambridge University Press, Cambridge.
- [13] Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. and Banerjee, U.C., (2002), *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals, *Critical Reviews in Biotechnology*, 22 3 245-279.
- [14] Prabowo, D.A., (2009), Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella* sp. pada Skala Laboratorium.
- [15] Anita, F. and Asmi, R.J., (2011), Pemanfaatan Air Limbah Pabrik Pupuk Kadar Amonia Tinggi sebagai Media Kultur Mikroalga untuk Perolehan Sumber Minyak Nabati sebagai Bahan Bakar Biodiesel, in, Diponegoro University, Semarang.
- [16] Shimamura, R., Watanabe, S., Sakakura, Y., Shiho, M., Kaya, K. and Watanabe, M.M., (2012), Development of *Botryococcus* Seed Culture System for Future Mass Culture, *Procedia Environmental Sciences*, 15 80-89.
- [17] Kojima, E. and Zhang, K., (1999), Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87 6 811-815.
- [18] Fabregas, J., Herrero, C., Abalde, J. and Cabezas, B., (1985), Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations, *Aquaculture*, 50 1 1-11.
- [19] Derenne, S., Metzger, P., Largeau, C., Van Berge, P., Gatellier, J., Damste, J., De Leeuw, J. and Berkaloff, C., (1992), Similar morphological and chemical variations of in Ordovician sediments and cultured *Botryococcus braunii* as a response to changes in salinity, *Organic Geochemistry*, 19 299-313.
- [20] Casadevall, E., Dif, D., Largeau, C., Gudin, C., Chaumont, D. and Desanti, O., (1985), Studies on batch and continuous cultures of *Botryococcus braunii*: hydrocarbon production in relation to physiological state, cell ultrastructure, and phosphate nutrition, *Biotechnology and Bioengineering*, 27 3 286-295.