

CULTIVATION OF CHLORELLA SP IN BROILER CHICKEN WASTE MEDIA AND ITS METABOLITE PROFILE BY GC-MS ANALYSIS

Rizky izani, Lany Nurhayati, Devy Susanty *

Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Nusa Bangsa
Jl.KH Sholeh Iskandar Km 4, Tanah Sareal, Bogor 16166, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 Jan 2021,

Accepted 17 Mar 2021

Available online 29 Apr 2021

Keywords:

- ✓ *Chlorella sp*
- ✓ *Medium*
- ✓ *Waste*
- ✓ *chromatography*

*corresponding author:

dvsusanty@gmail.com

Phone: +6283811934630

<https://doi.org/10.31938/jsn.v11i1.290>

ABSTRACT

Broiler Chicken Waste (LTAB) contained Nitrogen, Phosphorus and Potassium. LTAB can be used as an alternative medium for the cultivation of *Chlorella sp.* In this study, *Chlorella sp.* was cultured in LTAB at various concentrations (2,4,6,8, and 10%). Growth of *Chlorella sp.* was measured based on optical density values at a wavelength of 680 nm. Biomass was extracted using chloroform. The extract obtained was identified using Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (GC-MS). LTAB 2% was the best medium for the growth of *Chlorella sp.* (amongst other concentrations). The highest growth rate was on the 10th day. Based on the results of KG-MS, chloroform extract of *Chlorella sp.* cultured on LTAB 2% contained oleic acid, methyl ester and gamma-sitosterol.

ABSTRAK

Kultivasi *Chlorella sp* pada media limbah ayam broiler dan profil metabolitnya dengan analisis GC-MS

Limbah Ternak Ayam Broiler (LTAB) mengandung Nitrogen, Fosfor dan Kalium. LTAB dapat dijadikan media alternatif untuk kultivasi *Chlorella sp.* Pada penelitian ini, *Chlorella sp.* dikultur pada LTAB pada berbagai konsentrasi (2,4,6,8, dan 10%). Pertumbuhan *Chlorella sp.* diukur berdasarkan nilai *optical density* pada panjang gelombang 680 nm. Biomassa diekstrak menggunakan kloroform. Ekstrak yang diperoleh diidentifikasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). LTAB 2% merupakan media terbaik untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* (diantara konsentrasi lainnya). Laju pertumbuhan tertinggi yaitu pada hari ke-10. Berdasarkan hasil KG-MS, ekstrak kloroform *Chlorella sp.* yang dikultur pada LTAB 2% mengandung senyawa asam oleat, metil ester dan gamma-sitosterol.

Kata kunci: *Chlorella sp.*, media, limbah, Kromatografi

PENDAHULUAN

Budidaya ternak saat ini mengalami perkembangan yang begitu pesat, khususnya peternakan ayam broiler. Produksi ayam broiler di daerah kabupaten Bogor dan kota Bogor tahun 2016 mencapai 87.934.335 ton dan 1.583.961 ton (Badan Pusat Statistik Jawa Barat, 2018). Seiring banyaknya kebutuhan produksi peternakan ayam broiler, limbah yang dihasilkan pun besar dan berdampak pada polusi udara sekitar karena

tingginya kadar N dan S. Penelitian sebelumnya pada media Limbah Ternak Ayam Broiler (LTAB) diketahui mengandung 0,08% nitrogen, 0,041% fosfor dan 112,58 mg/L kalium (Susanty *et al.*, 2019) sehingga dapat digunakan sebagai media kultur mikroalga.

Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kemampuan bereproduksi dengan cepat. Dalam waktu 24 jam, satu sel *Chlorella sp.* dapat berkembang menjadi 10.000 sel (Ma'rifatin, 2016). Mikroalga ini banyak digunakan industri



karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan memiliki aktivitas antibakteri (Alwathnani, 2017). Pada umumnya nutrisi utama pada media pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah N dan P (Regista *et al.*, 2017). *Chlorella sp.* mengandung sekitar 50% protein (Mufidah *et al.*, 2017). Hasil penelitian Febtisuhastru (2016) menunjukkan bahwa *Chlorella sp* memiliki kadar lipid yang tinggi. *Chlorella sp.* mengandung berbagai asam lemak. Penelitian Kurnia *et al.* (2018b) menunjukkan asam stearat dan palmitat sebagai asam lemak tertinggi pada *Chlorella sp.* Selain itu, *Chlorella sp.* juga mengandung asam oleat dan asam linoleat (Jazzar *et al.*, 2015).

Sebagian besar senyawa metabolit sekunder dapat diakumulasi dalam sel mikroalga. Jenis senyawa yang terdapat pada *Chlorella sp.* dapat dipengaruhi oleh media pertumbuhannya. Penggunaan media limbah ternak ayam broiler dapat memperkecil biaya kultivasi untuk dapat diaplikasikan pada skala industri. Penelitian untuk mengetahui konsentrasi media limbah yang paling sesuai untuk kultivasi *Chlorella sp.* perlu dilakukan untuk diaplikasikan pada kultivasi selanjutnya. Ekstraksi biomassa *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan pelarut kloroform. Identifikasi senyawa metabolit pada ekstrak dilakukan secara kualitatif dengan instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). Informasi mengenai senyawa metabolit pada ekstrak kloroform *Chlorella sp.* dapat menjadi dasar dalam mengeksplorasi manfaat *Chlorella sp.* yang dikultivasi menggunakan media limbah ternak ayam broiler.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian, yaitu kultur mikroalga *Chlorella sp* (inCC M39) yang diperoleh dari LIPI, Limbah Ternak Ayam Broiler (LTAB) berasal dari daerah Cijeruk, Bogor, pH universal, air suling, dan kloroform (Smart Lab).

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu mortar dan alu, ayakan 0,45 μm , alat-alat gelas dan pipet Mohr (Iwaki), neraca analitik Sartorius (CPA224S), Spektrofotometer UV-VIS (Agilent Cary 60), *shaker waterbath* (Mettler), tabung reaksi, *Haemocytometer* 0,100 mm (Neubauer),

Mikroskop, *hand counter*, Agilent Technologies 7890 *Gas Chromatograph with auto sampler*, *Mass selective detector*, *Chemstation data system*, Kolom HP Ultra *Capillary column* (panjang 30 m x 0,20 mm, LD x 0,11 μm *Film thickness*), gas Helium.

Metode

Persiapan Media Limbah Ternak Ayam Broiler

Kotoran ayam broiler diambil dari peternakan ayam broiler di Cijeruk, Bogor. Setelah terkumpul dikeringkan di bawah sinar matahari dan dihancurkan dengan cara ditumbuk menggunakan mortar. Kotoran tersebut disaring dengan menggunakan ayakan dengan ukuran mesh 0,45 mikron. Kotoran yang telah halus siap untuk digunakan untuk proses selanjutnya. Media disiapkan dengan 5 variasi konsentrasi media, yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10%. Pemilihan variasi media dilakukan berdasarkan kadar N, P dan K pada kotoran ayam (Susanty *et al.*, 2019) dan pada media LTAB 2% (Susanty dan Oksari, 2020) serta kebutuhan nutrisi *Chlorella sp.* yaitu N sekitar 140-700 mg/L dan K sekitar 7,5-1500 mg/L (Meritasari *et al.*, 2012).

Pengukuran Pertumbuhan *Chlorella sp.* dengan *Optical density* (Modifikasi) (Syaichurrozi & Jayanudin 2016)

Chlorella sp. dikultur pada media LTAB dengan kondisi suhu ruang dan intensitas cahaya dari lampu TL (± 3500 lux) dengan penyinaran selama 24 jam. Sebagai perbandingan, pertumbuhan *Chlorella sp.* juga dilihat dengan menggunakan media AF6 (Andersen *et al.*, 2005; Kasai *et al.*, 2009; NIES). Spektrofotometer UV-VIS digunakan untuk mengukur *optical density* (OD) pada λ 680 nm. Nilai OD selama 14 hari digunakan untuk membuat kurva laju pertumbuhan spesifik *Chlorella sp.* Perhitungan *optical density* sebagai berikut:

$$\mu = \frac{\ln(\text{OD}_t) - \ln(\text{OD}_0)}{T_t - T_0}$$

keterangan:

μ = laju pertumbuhan (per hari); OD_t = OD pada T_t ; OD_0 = OD pada T_0 ; T_t = waktu pengamatan/akhir kultivasi; T_0 = waktu awal kultivasi.

Ekstraksi Biomassa *Chlorella sp.* (Modifikasi) (Annamalai *et al.*, 2012)

Biomassa *Chlorella sp.* pada hari ke-14 dikumpulkan dengan cara memisahkan sel

Chlorella sp. dengan media menggunakan sentrifugasi (5000 rpm, 5 menit). Ekstraksi terhadap biomassa *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut kloroform (1:10). Maserasi dilakukan dengan pengadukan menggunakan *shaker* selama 72 jam. Setelah filtrat hasil maserasi diperoleh, endapan diekstraksi kembali hingga diperoleh filtrat jernih. Semua filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan *waterbath shaker* pada suhu dibawah 50 °C. Ekstrak yang diperoleh disimpan pada suhu 4 °C.

Identifikasi Senyawa Metabolit Ekstrak *Chlorella sp.* dengan GC-MS

Senyawa metabolit pada ekstrak kloroform *Chlorella sp.* diidentifikasi dengan GC-MS, dengan kondisi sebagai berikut:

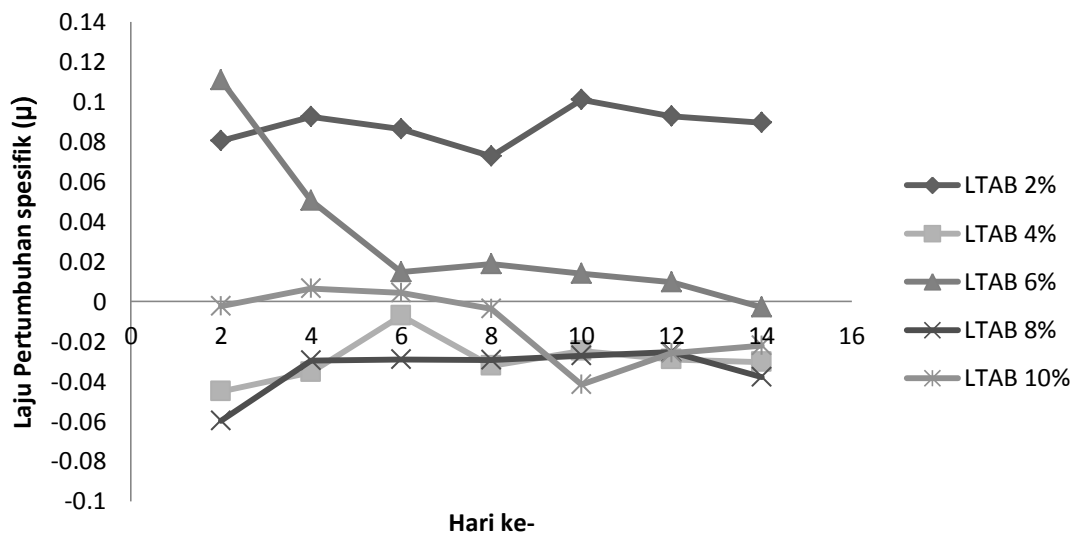
<i>Ionization mode</i>	: <i>Electron impact</i>
<i>Electron energy</i>	: 70 eV
<i>Oven temperature</i>	: <i>Initial temperature at 80 °C hold for 0 minutes, rising at 3 °C/min to 150 °C hold for 1 minute and finally rising 20 °C/min to 280 °C hold for 6 minute.</i>
<i>Injection port temperature</i>	: 250 °C
<i>Ion source temperature</i>	: 230 °C
<i>Quadropole temperature</i>	: 140 °C
<i>Carrier gas</i>	: Helium
<i>Column mode</i>	: <i>Constant flow</i>
<i>Injection volume</i>	: 5 µL
<i>Split</i>	: 8:1

HASIL DAN PEMBAHASAN

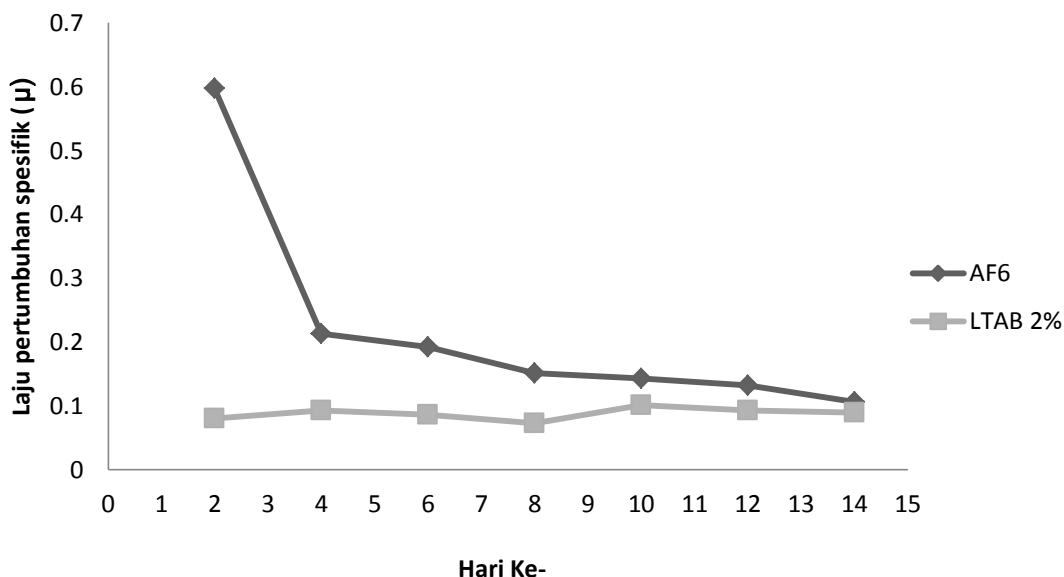
Laju Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Chlorella sp dikultivasi pada media LTAB dengan beberapa variasi konsentrasi (2, 4, 6, 8, dan 10%). Variasi konsentrasi LTAB bertujuan untuk melihat kondisi optimum media LTAB sebagai media tumbuh mikroalga *Chlorella sp.* Kecepatan pertumbuhan sel mikroalga dapat terlihat dari laju pertumbuhannya (Istirokhatun *et al.*, 2017). Laju pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 1.

Chlorella sp. tumbuh dengan baik pada media LTAB dengan konsentrasi 2% (Gambar 1). Hal ini terlihat dari laju pertumbuhannya yang lebih tinggi dibanding *Chlorella sp.* yang tumbuh pada media lain. Laju pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media LTAB 2% meningkat mulai hari ke-8 hingga hari ke-10. Peningkatan laju pertumbuhan akan meningkatkan populasi sel yang terjadi karena sel sedang aktif berkembang biak (Budiarti *et al.*, 2010). Berdasarkan laju pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media LTAB 2%, maka inokulasi *Chlorella sp.* dilakukan menggunakan biakan pada hari ke-10. Hal ini disebabkan fase eksponensial terjadi saat hari ke-10.



Gambar 1. Laju Pertumbuhan Spesifik *Chlorella sp.* pada berbagai variasi konsentrasi media LTAB



Gambar 2. Laju pertumbuhan spesifik *Chlorella sp.* pada media AF6 dengan LTAB 2%

Laju pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media LTAB 4%-6% menunjukkan angka yang lebih rendah. Semakin tingginya konsentrasi media tidak memberikan hasil pertumbuhan yang lebih baik. Pertumbuhan *Chlorella sp* tidak bergantung pada semakin besarnya jumlah nutrisi. Hal ini disebabkan oleh partikulat pada media dengan nutrisi tinggi dapat menghalangi proses fotosintesis pada mikroalga. Semakin tinggi tingkat kenaikan jumlah sel mikroalga juga mempengaruhi kemampuan air dalam melarutkan CO₂, semakin jenuh medium, semakin sulit CO₂ terlarut dalam air (Istirokhatun *et al.*, 2017).

Laju pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media AF6 lebih tinggi dibandingkan media LTAB 2%, namun cenderung melambat (Gambar 2). Penggunaan media AF6 sebagai perbandingan dilakukan berdasarkan kultur awal *Chlorella sp.* yang diperoleh dari LIPI diketahui menggunakan media AF6. Media AF6 merupakan media pertumbuhan dengan kandungan makronutrien, mikronutrien, dan unsur hara yang cukup lengkap dengan komposisi tertentu (Andersen *et al.*, 2005; Kasai *et al.*, 2009; NIES). Penurunan laju pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media AF6 menunjukkan kemampuan untuk berkembang biak yang semakin berkurang. Hal ini dapat disebabkan oleh perbedaan kondisi kultivasi dengan sumber kultur awal ataupun perbedaan kualitas bahan yang digunakan dalam membuat media AF6.

Pada penelitian ini, pemberian cahaya untuk mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan sepanjang hari dengan menggunakan 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas 3000 lux). Pemberian cahaya dengan menggunakan lampu TL bertujuan untuk memberikan energi foton yang dimanfaatkan pada proses reaksi terang fotosintesis. Pada proses fotosintesis, cahaya ditangkap oleh klorofil pada panjang gelombang 400-700 nm. Warna hijau pada kultur mikroalga dapat mengindikasikan banyaknya klorofil pada sel mikroalga tersebut (Ginting *et al.*, 2018).

Suhu dan pH merupakan kondisi yang juga menentukan pertumbuhan mikroalga selain media dan cahaya. Kultivasi *Chlorella sp.* pada penelitian ini dilakukan pada suhu 30°C dan media LTAB dengan pH 8. Menurut Aprilliyanti *et al.* (2016), suhu optimal pertumbuhan *Chlorella sp.* antara rentang 25°C-30°. Kondisi pH yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* yaitu berkisar antara pH 7-9 (Mufidah *et al.*, 2017).

Hasil Identifikasi Senyawa dengan GC-MS

Identifikasi senyawa suatu hasil ekstraksi dapat dilakukan salah satunya menggunakan instrumen *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS). Instrumen ini terdiri dari GC yang memiliki prinsip kerja memisahkan komponen di dalam sampel menjadi senyawa murni berdasarkan kemampuan menguapnya.

Senyawa yang telah diseleksi oleh kolom dikumpulkan dan dibawa keluar kolom dan dideteksi oleh MS. Spektroskopi Massa menghitung bobot molekul dengan rasio (m/z), kemudian disimpan di dalam komputer dan dianalisis (Hussain, 2014).

Identifikasi senyawa metabolit dilakukan terhadap ekstrak *Chlorella sp.* yang dikultivasi pada media LTAB 2% (media yang paling cocok) dan AF6 (sebagai media kaya nutrisi). Ekstrak *Chlorella sp.* yang diidentifikasi merupakan hasil ekstraksi dengan pelarut kloroform. Kloroform merupakan pelarut yang cenderung mengikat komponen non polar. Maligan *et al.* (2015) menyatakan pelarut kloroform mampu mengekstrak 28 senyawa pada mikroalga *Tetraselmis chuii* berdasarkan hasil analisis GC-MS. Golongan senyawa tersebut yaitu asam lemak, alkana, dan diterpenoid.

Senyawa metabolit yang terdapat pada ekstrak kloroform *Chlorella sp.* menunjukkan hasil yang sama antara hasil kultivasi pada media LTAB 2% dan AF6 yaitu asam oleat, metil ester dan gamma-sitosterol (Tabel 1 dan Tabel 2). Penelitian Kurnia *et al.* (2018a) juga menunjukkan keberadaan beberapa asam lemak pada *Chlorella sp.* yaitu asam palmitat, asam linoleat dan asam oleat. Asam oleat merupakan asam lemak tidak jenuh rantai panjang dan terdapat dalam bentuk trigliserida pada minyak nabati dan hewani. Asam oleat merupakan jenis asam lemak terbanyak yang terdapat pada mikroalga dengan berbagai metode ekstraksi (Barqi, 2015).

Menurut Norashikin (2018), keberadaan nitrogen pada media mempengaruhi jumlah asam lemak pada *Chlorella vulgaris*. Pada penelitian tersebut diketahui media *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada media BBM dengan kekurangan nitrogen memiliki kadar asam oleat lebih tinggi. Kultivasi *Chlorella vulgaris* pada media dengan kelebihan nitrogen mengandung lebih banyak asam linoleat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Li *et al.* (2014) yang menunjukkan peningkatan Mono Unsaturated Fatty Acid (MUFA) pada media dengan kekurangan nitrogen dan fosfor.

Ekstrak *Chlorella sp.* yang dikultivasi pada media AF6 menunjukkan adanya asam linoleat. Kumalasari *et al.* (2014) juga mengungkapkan *Chlorella sp.* memiliki senyawa asam 9,12-oktadekadienoat (asam linoleat) yang aktif menghambat bakteri *S. aureus*. Hasil analisis GC-MS juga menunjukkan bahwa kedua ekstrak *Chlorella sp.* mengandung Hexadecanoic acid (asam palmitat) dengan kadar yang hampir sama. Asam palmitat memiliki sifat antibakteri dengan cara merusak struktur dinding sel (Karunia *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil analisis GC-MS terhadap ekstrak *Chlorella sp.* pada penelitian ini, dapat diketahui bahwa penggunaan media LTAB pada kultivasi juga dapat menstimulasi terbentuknya berbagai senyawa metabolit yang berpotensi sebagai antibakteri. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk melihat aktivitas antibakteri dari ekstrak tersebut.

Tabel 1. Senyawa Metabolit pada Ekstrak Kloroform *Chlorella sp.* (Kultivasi pada Media LTAB 2%)

No	Senyawa	RT	Kadar (%)
1	<i>Oleic acid, methyl ester</i>	28,803	18,74
2	<i>Ethyl tridecanoat</i>	28,093	9,07
3	<i>Hexadecanoic acid, Methyl ester</i>	27,548	8,92
4	<i>gamma-Sitosterol</i>	36,967	8,70
5	<i>Ethyl (9Z)-9-Octadecanoate</i>	29,182	6,57
6	<i>9-12-Octadecadienoid acid</i>	29,320	5,68

Tabel 2. Senyawa Metabolit Ekstrak Kloroform *Chlorella sp.* (Kultivasi pada Media AF6)

No	Senyawa	RT	Kadar (%)
1	<i>gamma-Sitosterol</i>	36,981	11,15
2	<i>Hexadecanoic acid, Methyl ester</i>	27,548	9,35
3	<i>11-Octadecenoic acid, methyl ester</i>	28,803	6,15
4	<i>14-Methyl-8-hexadecyn-1-ol</i>	28,803	6,00
6	<i>Oleic Acid</i>	30,272	3,83
7	<i>Linoleic acid, methyl ester</i>	28,759	3,42

KESIMPULAN

Media Limbah Ternak Ayam Broiler (LTAB) dapat digunakan sebagai media tumbuh dengan konsentrasi terbaik untuk pertumbuhan yaitu 2%. Media LTAB 2% berpotensi digunakan selanjutnya sebagai media alternatif pada kultivasi *Chlorella sp*. Berdasarkan analisis GC-MS, ekstrak kloroform *Chlorella sp*. yang dikultur pada media LTAB 2% mengandung senyawa asam oleat, metil ester dan gamma-sitosterol.

DAFTAR PUSTAKA

- Alwathnani, H. dan Perveen, K. (2017). Antibacterial Activity and Morphological Changes in Human Pathogenic Bacteria by Microalgae *Chlorella vulgaris* extracts. *Biomedic Research*. 28(4), 1610-1614.
- Andersen, R.A., Berges, J.A., Harrison, P.J. & Watanabe, M.M. (2005). Recipes For Freshwater And Seawater Media. In: R. A. Andersen Ed.: *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Burlington.
- Annamalai, J., Shanmugam, J. & Nallamuthu, T. (2012). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *International Journal of Current Research and Review*. 4(7), 33-38.
- Aprilliyanti, S., Soeprbowati, T.R. & Yulianto, B. (2016). Hubungan Kelimpahan Mikroalga *Chlorella sp*. dengan Kualitas Lingkungan Perairan pada Skala Semi Masal di BBBPBAP Jepara. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 14, 77-81.
- Badan Pusat Statistik Jawa Barat. (2016). *Produksi Daging Unggas Menurut Kabupaten/Kota dan Jenis Ternak di Provinsi Jawa Barat*. BPS.
- Barqi, W.S. (2015). Pengambilan Minyak Mikroalga *Chlorella sp*. dengan Metode *Microwave Assisted Extraction*. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 4(1), 34-41.
- Budiarti, T., Utomo, N.B.P. & Santosa, A. (2010). Pertumbuhan dan kandungan Nutrisi *Spirulina sp*. pada Fotoperiode yang Berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 9(2), 146-156.
- Febtisuhastrri, A. (2016). *Biomassa dan Kadar Lipid Mikroalga Chlorella sp. pada Kultur Media Alternatif Kotoran Ternak* (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Ginting, N.K., Sedjati, S., Supriyantini, E. & Ridlo, A. (2018). Pengaruh Pencahayaan terhadap Kandungan Pigmen *Tetraselmis chuii* sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Buletin Oseanografi Marina*. 7(2), 91-97.
- Hussain, S.Z., dan Maqbool, K. (2014). GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *Int. J Curr Sci*. 13, 116-126.
- Istirokhatun, T., Aulia, M. & Sudarno. (2017). Potensi *Chlorella sp*. untuk Menyisihkan COD dan Nitrat dalam Limbah Cair Tahu. *Jurnal Presipitasi*. 14(2), 88-96.
- Jazzar, S., Medina, J.Q., Olivares-Carrillo, Carrillo, P.O., Nejjib, M., Marzouki, et al. (2015). Cultivation and In Situ Supercritical Methanol Transesterification of Native Microalgae. *Bioresour Technol*. 190, 281-288.
- Karunia, S.D., Supartono, Sumarni, W. (2017). Analisis Sifat Antibakteri Ekstrak Biji Srikaya (*Annona Squamosa L*) Dengan Pelarut Organik. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 6(1): 56-60.
- Kasai, F., Kawachi, M., Erata, M., Mori, F., Yumoto, K., Sato, M., & Ishimoto, M. (2009). Nies-Collection List Of Straind, 8th Edition, Jpn. *J. Phycol*. 57(1).
- Kumalasari, D., Fasya, A.G., Adi, T.A. & Maunatin, A. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp*. *Alchemy*. 3(2), 163-172.
- Kurnia, D., Asri, R., Dinata, D.I. & Nurachman, Z. (2018a). Analisis Asam Lemak Mikroalga Laut *Chlorella sp*. Pada Medium Modifikasi Dengan Kromatografi Gas Spektrometri Massa (KG-SM). *Journal of Pharmacopolium*. 1(1), 1-8.
- Kurnia, D., Yuliantini, A., Cendana, I.S., & Nurachman, Z. (2018b). Fatty Acid Analysis of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* in Modified Medium Used GC-FID. *J. Phys.: Conf. Ser.* 1338: 1-8.
- Li, Y., Han, F., Xu, H., Mu, J., Chen, D., Feng, B., & Zeng, H. (2014). Potential lipid

- accumulation and growth characteristic of the green alga *Chlorella* with combination cultivation mode of nitrogen (N) and phosphorus (P). *Bioresource Technology*, 174, 24–32.
- Ma'rufatin, A. (2016). Pengaruh Pemanenan Mikroalga (*Chlorella sp.*) secara Kontinyu Terhadap Pertumbuhannya di dalam Fotobioreaktor. *JRL*. 9(1), 19-30.
- Maligan, J.M., Widayanti, V.T. dan Zubaidah, E. (2015). Identifikasi Senyawa Antibakteri Ekstrak Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii* (Kajian Metode Ekstraksi Maserasi, Jenis Pelarut, dan Waktu Ekstraksi). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 3, 195-206.
- Meritasari, D., Mubarak, A.S., Sulmartiwi, L. dan Masithah, E. D. (2012). Pengaruh Pemberian Pupuk Cair Limbah Ikan Lemuru (*Sardinella Sp.*) dengan Dosis yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan *Chlorella Sp.* *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 4(1), 27-32.
- Mufidah, A., Agustono, Sudarno, dan Nindarwi, D.D. (2017). Teknik Kultur *Mikroalga Chlorella sp.* Skala Laboratorium dan Intermediate di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo Jawa Timur. *Journal of Aquaculture and Fish Health*. 7(2), 50-56.
- Norashikin, M. N., Loh, S. H., Aziz, A., & Cha, T. S. (2018). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in *Chlorella vulgaris* using an endogenous omega-3 fatty acid desaturase gene with its promoter. *Algal Research*, 31, 262–275.
- Regista, Ambeng, Litaay, M. dan Umar, M.R. (2017). Pengaruh Pemberian Vermikompos Cair *Lumbricus rubellus* Hoffmeister pada Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.*. *Jurnal Biologi Makasar*. 2(1), 1-8.
- Susanty, D., Oksari, A.A. & Izani, R. (2019). Metabolit Sekunder Pada Ekstrak *Chlorella sp.* Yang Dikultur Pada Media Limbah Ternak Ayam. *Chempublish Journal*. 4(2), 52-61.
- Susanty, D., & Oksari, A.A. (2020). Growth and secondary metabolites content of chloroform extract of *Chlorella sp.* and *Chlorella sorokiniana* cultured on chicken broiler waste media. *Nusantara Bioscience*. 12(1), 28-32.
- Syaichurrozi, I., dan Jayanudin, J. (2016). Potensi Limbah Cair Tahu Sebagai Media Tumbuh *Spiriluna plantesis*. *Jurnal Integrasi Proses*. 6(2), 64-68.