

## POTENSI MINYAK MIKROALGA DAN KHAMIR SEBAGAI SUMBER ASAM LEMAK ESENSIAL

### POTENTIAL OF MICROALGAE AND YEAST OILS AS NEW SOURCES FOR ESSENTIAL FATTY ACIDS

Erika Rozana<sup>1</sup>, Sri Haryani Anwar<sup>1)\*</sup>, dan Muhammad Ikhsan Sulaiman<sup>1</sup>

Program Studi Teknologi Hasil Peranian, Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala  
Banda Aceh 23111, Indonesia  
Email: [sri.haryani@unsyiah.ac.id](mailto:sri.haryani@unsyiah.ac.id)

Makalah: Diterima 9 April 2021; Diperbaiki 7 November 2021; Disetujui 20 November 2021

#### ABSTRACT

Edible oils as essential fatty acids sources, such as linolenic acid, eicosapentaenoic acid, and docosahexaenoic acid, are commonly extracted from plants and seafoods, particularly fish. The production of fish oil has several drawbacks, including overfishing issues, mercury contamination, and unpleasant smell of fish. Oil production from plants requires extensive land used, long harvest time, and high operational costs. Single-cell oils from microorganisms are the solution to overcome these problems. Therefore, this study aimed to explore the potential of microorganisms, i.e. microalga and yeast, which had previously been isolated from mangrove forests in Aceh Province, Indonesia, as sources of essential fatty acids. Two types of microorganisms used were *Thraustochytrium multirudimentale* and *Rhodotorula mucilaginosa*. The results showed that the highest amount of oil was extracted from yeast ( $17.04 \pm 0.78$  mg/g), while microalga produced  $4.50 \pm 0.49$  mg/g only. Based on correlation analysis, the optical density (OD) and biomass, had good correlation with  $r = 0.990$ . The spectra of FT-IR analysis from microalga and yeast oils proved that both contained C=O groups which identified as esters of fatty acids and C=C groups identified as unsaturated fatty acids. *Thraustochytrium multirudimentale* and *Rhodotorula mucilaginosa* are potential as single-cell oil sources containing essential fatty acids.

Keywords: essential oil, fatty acids, microalgae, omega-3, single-cell oil, yeast

#### ABSTRAK

Minyak esensial dengan kandungan asam-asam lemak yang penting, seperti asam linoleat, asam linolenat, asam dokosaheksanoat dan asam eikosapentanoat, dapat diekstrak dari sumber nabati dan *seafood*, khususnya ikan. Namun produksi minyak ikan seringkali terkendala oleh isu *overfishing*, pencemaran ikan oleh logam berat dan bau amis ikan yang tidak dapat disembunyikan. Ekstraksi minyak esensial dari tumbuhan membutuhkan waktu panen yang lama, lahan yang luas serta biaya operasional yang mahal. Mikroorganisme dapat mengatasi berbagai masalah tersebut karena dapat menghasilkan minyak dengan kandungan asam lemak esensial. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi mikroorganisme sebagai sumber minyak esensial. Penelitian ini menggunakan dua jenis mikroorganisme yaitu mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale* dan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* yang sebelumnya telah diisolasi dari hutan mangrove di Provinsi Aceh-Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa khamir menghasilkan rendemen minyak tertinggi yaitu  $17,04 \pm 0,78$  mg/g sedangkan rendemen minyak mikroalga hanya sebesar  $4,50 \pm 0,49$  mg/g. Hasil analisis juga membuktikan bahwa biomassa dan densitas optis kultur memiliki korelasi yang baik ( $r = 0,990$ ). Analisis FT-IR menunjukkan bahwa kedua jenis minyak mikroorganisme yang dihasilkan memiliki gugus C=O yang diidentifikasi sebagai ester dari asam lemak dan gugus C=C yang mencirikan adanya asam lemak dengan ikatan rangkap atau tidak jenuh. Kedua jenis mikroorganisme, yaitu mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale* dan khamir *Rhodotorula mucilaginosa* sangat potensial sebagai penghasil minyak esensial dengan kandungan asam-asam lemak yang penting bagi kesehatan.

Kata kunci: asam lemak esensial, khamir, mikroalga, minyak mikroorganisme, omega-3

#### PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara yang memiliki potensi sumber daya bahari yang berlimpah. Salah satu kekayaan sumber daya perairan yang dimiliki adalah kawasan hutan mangrove. Ekosistem mangrove yang kaya akan bahan organik memiliki peranan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan makhluk hidup disekitarnya. Salah satu makhluk hidup yang tumbuh dikawasan hutan mangrove

adalah mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan makhluk hidup yang berpotensi untuk dikembangkan karena ketersediaannya di alam yang berlimpah.

Sejumlah mikroorganisme memiliki peranan besar dalam berbagai proses industri seperti industri kosmetik, pangan, farmasi serta biodiesel. Mikroorganisme dalam pemanfaatannya terus dikembangkan karena dapat diekstrak untuk diambil senyawa-senyawa penting seperti karbohidrat, protein, zat warna dan minyak. Telah banyak

\*Penulis Korespondensi

dilakukan penelitian yang membuktikan bahwa minyak mikroorganisme mengandung asam lemak esensial dan berperan penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tubuh manusia. Mikroorganisme yang banyak dimanfaatkan untuk diekstrak minyaknya adalah khamir (*yeast*), jamur (*fungi*) dan mikroalga.

Asam linoleat, asam linolenat, asam dokosaheksanoat (DHA) dan asam eikosapentanoat (EPA) merupakan asam-asam lemak esensial yang sangat penting bagi perkembangan janin dan membantu penyembuhan berbagai macam penyakit seperti *rheumatoid arthritis*, jantung, dan memperbaiki sistem metabolisme tubuh. Selain itu, asam-asam lemak ini dapat membantu melancarkan sirkulasi darah, pembentukan sel dan menghambat pertumbuhan sel kanker (D'Eliseo dan Velloti, 2016). Asam-asam lemak ini disebut esensial karena tidak dapat diproduksi oleh tubuh dan hanya dapat diperoleh dari konsumsi makanan sehari-hari. Beberapa jenis asam lemak esensial yang tergolong dalam omega-3 dan omega-6 diketahui juga memiliki manfaat yang baik untuk kesehatan jantung, mencegah stroke dan menurunkan resiko terkena kanker (Xu dan Qian, 2014).

Sejauh ini sumber asam-asam lemak omega-3 dan omega-6 banyak ditemukan pada ikan dan tumbuhan. Namun, ekstraksi minyak dari ikan sebagai sumber asam lemak memiliki beberapa kekurangan. Pertama, produksi minyak dari ikan dapat mengakibatkan terjadinya eksploitasi ikan secara besar-besaran sehingga mempengaruhi stabilitas pasar. Kedua, produksi asam lemak esensial tidak dilakukan oleh ikan akan tetapi berasal dari sumber makanannya yang memiliki kandungan asam lemak esensial tersebut (Barra *et al.*, 2017). Ketiga, minyak ikan berpotensi terkontaminasi dengan logam sehingga dapat membahayakan kesehatan konsumen (Sun *et al.*, 2018). Selain itu, sumber asam lemak tidak jenuh lainnya yang berasal dari tumbuhan juga membutuhkan waktu panen yang lama, lahan yang luas dan resiko gagal panen yang tinggi.

Pertumbuhan mikroorganisme yang baik dapat menghasilkan biomassa dengan kandungan asam lemak yang mirip dengan minyak ikan (Santigosa *et al.*, 2021) dan minyak nabati. Selain itu, beberapa jenis mikroorganisme juga dilaporkan memiliki kemampuan untuk mengakumulasi minyak dengan kandungan asam lemak esensial yang tinggi dalam waktu yang singkat (Cerone dan Smith, 2021). Mikroalga dan khamir adalah jenis mikroorganisme yang menarik untuk dikembangkan. Mikroalga dan khamir merupakan sumber bahan baku yang inovatif dan ramah lingkungan yang dapat terus dikembangkan potensinya seiring dengan perkembangan bioteknologi. Kemampuan mikroalga dan khamir dalam menghasilkan senyawa metabolit yang bernilai secara terbarukan dan berkelanjutan diharapkan dapat membantu memecahkan masalah

sumber-sumber penghasil asam lemak esensial selain ikan.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa mikroalga dari jenis *Thraustochyrid* berhasil mengakumulasi minyak sampai dengan 55% dari berat biomassa kering (Patel *et al.*, 2020). Selain itu mikroalga *Schizochytrium* mampu mengakumulasi minyak mencapai 49-67% dari berat biomassa kering (Chang *et al.*, 2013). Kandungan minyak yang tinggi diduga dapat membantu menghasilkan kandungan asam lemak esensial yang lebih banyak. Mikroalga *Thraustochytrids* dilaporkan memiliki kandungan omega-3 yaitu 1,43-29,67% dan omega-6 sebesar 0,03-0,1% (Jaritkhuan dan Suanjit, 2018). Mikroorganisme lainnya dari strain khamir seperti *Rhodotorula* juga dapat menghasilkan minyak. Penelitian yang dilakukan oleh Maza *et al.* (2020) menunjukkan bahwa *R. mucilaginosa* menghasilkan minyak sebanyak 9-48,9% dari berat biomassa kering. Peneliti lain melaporkan bahwa khamir *R. mucilaginosa* dapat menghasilkan omega-3 sebanyak 0,4-0,5% dan omega-6 sebesar 0,4% (Pereira *et al.*, 2019).

Oleh karena potensinya yang begitu menjanjikan, maka penelitian ini dilakukan untuk mengeksplor kemampuan mikroorganisme khususnya mikroalga dan khamir untuk menghasilkan minyak dengan kandungan asam-asam lemak esensial. Mikroorganisme yang digunakan telah diisolasi dari perairan hutan mangrove di Provinsi Aceh berdasarkan hasil penelitian Anwar *et al.* (2013). Kedua isolat ini telah diidentifikasi secara morfologi dan genetik dan diketahui sebagai mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale* dan khamir *Rhodotorula mucilaginosa*.

Penelitian ini terdiri atas 2 tahapan yaitu tahap pertama merupakan tahap penyegaran kembali kultur mikroalga dan khamir pada media padat. Setelah sel-sel kultur dewasa kemudian dilanjutkan dengan kultivasi pada media cair untuk melihat pertumbuhan optimum. Tahap kedua dilakukan untuk menganalisis perolehan biomassa dan minyak yang dihasilkan oleh mikroorganisme, yaitu minyak mikroalga dan minyak khamir.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kultur mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale* dan khamir (*yeast*) *Rhodotorula mucilaginosa*, yang diisolasi dari perairan hutan bakau, air laut alami, air destilasi, antibiotik, *yeast extract* (Merck), pepton (Himedia), glukosa (Himedia), agar (Merck), Heksan (Merck p.a). Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas ukur, pipet ukur, erlenmeyer 250 mL, ose, spatula, timbangan analitik, *autoclave*, inkubator, *shaker*

*incubator*, *rotary vacuum evaporator*, sentrifuse, *biosafety cabinet*, refraktometer, spektrofotometer, rangkaian alat sokhlet, dan instrumen FT-IR (IRPrestige-21 Shimadzu).

#### Metode

##### **Pembuatan Media Padat YPG (*yeast extract peptone glucose*)**

Media pertumbuhan menggunakan larutan YPG sebanyak 1000 mL yang ditambahkan agar. Bahan pembuatan media ditimbang masing-masing sebanyak 0,1% *yeast extract*, 1% pepton, 0,2% glukosa, 1,3% agar. Pembuatan media padat dilakukan dengan mensuspensikan bahan-bahan dalam 1 L air laut alami 15 ppt. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm. Setelah media disterilisasi, ditunggu hingga suhu media turun  $\pm 40^\circ\text{C}$  untuk penuangan media. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk melihat ada atau tidaknya kontaminasi pada media sebelum proses inokulasi.

##### **Pembuatan Media Cair YPG (*Yeast Extract Peptone Glucose*)**

Bahan pembuatan media cair ditimbang masing-masing sebanyak 0,1% *yeast extract*, 0,1 % pepton, 1% glukosa. Pembuatan media cair dilakukan dengan mensuspensikan media YPG dan 1 L air laut alami 15 ppt ke dalam gelas *beaker* berukuran 1000 mL. Media kemudian dituangkan ke dalam 10 buah erlenmeyer masing-masing sebanyak 100 mL menggunakan gelas ukur. Erlenmeyer ditutup menggunakan kapas berbalut kasa dan *aluminium foil* lalu dibungkus menggunakan plastik *wrap*. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 2 atm. Kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk melihat ada atau tidaknya kontaminasi pada media sebelum inokulasi.

##### **Penyegaran Kultur Mikroorganisme**

*Thraustochytrium multirudimentale* dan *Rhodotorula mucilaginosa* yang digunakan adalah kultur murni yang diisolasi dari perairan hutan mangrove di Provinsi Aceh dan telah diisolasi secara morfologi dan genetik (Anwar *et al.*, 2021). Kultur ditumbuhkan pada media padat YPG. Ose dipijarkan diatas nyala bunsen kemudian diangin-anginkan, kemudian diambil sebanyak 1 koloni tunggal untuk digoreskan pada media padat YPG dengan membentuk 3 kuadran. Selanjutnya pinggiran cawan petri dibungkus dengan plastik *wrap*. Media kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam.

##### **Pembuatan Starter**

Kultur mikroorganisme (baik mikroalga atau khamir) yang telah berumur 2 hari pada media padat YPG diambil sebanyak 2 gores koloni (3 mm x 10 mm) menggunakan ose dan diinokulasikan ke dalam 100 mL media cair. Selanjutnya kultur diinkubasi

menggunakan *shaker incubator* pada suhu 25°C selama 48 jam.

##### **Pertumbuhan Optimum**

Starter kultur yang telah berumur 48 jam selanjutnya diinokulasikan pada media cair pertumbuhan optimum. Penambahan starter dilakukan sebanyak 10% dalam setiap 100 mL media cair pertumbuhan optimum. Selanjutnya media kultur diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada suhu 25°C selama 8 hari dengan penyinaran lampu neon 2000 lux.

##### **Analisis Densitas Optis (Li *et al.*, 2008)**

Kultivasi mikroorganisme pada media cair untuk pertumbuhan dan menghasilkan biomasa dilakukan selama 8 hari. Selama masa kultivasi tersebut, dilakukan pengukuran densitas optis kultur setiap 2 hari sekali menggunakan spektrofotometer. Sampel media cair yang mengandung biomassa sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam kuvet kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Penggunaan panjang gelombang 600 nm dianggap optimal untuk mengukur kekeruhan larutan yang berwarna kuning hingga kecoklatan. Hasil pengukuran absorbansi dicatat sebagai OD<sub>undil</sub>. Pada sampel dengan nilai OD<sub>>0,4</sub> harus diencerkan terlebih dahulu menggunakan teknik pengenceran bertingkat. Sampel hasil pengenceran selanjutnya diukur kembali absorbansinya dan hasilnya dicatat sebagai OD<sub>dil</sub>. Pengukuran OD<sub>dil</sub> dilakukan sebanyak 2 kali ulangan (duplo) lalu hasil pembacaan dikalikan dengan faktor pengenceran dan dicatat hasilnya sebagai OD<sub>corr</sub>. Data yang digunakan pada penelitian ini adalah nilai rata-rata OD<sub>corr</sub>.

##### **Pemanenan Biomassa**

Kultur yang sudah berusia 8 hari selanjutnya dipanen menggunakan teknik pemanenan sentrifugasi. Pemanenan biomassa dilakukan pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pembilasan menggunakan 50 mL akuades lalu disentrifugasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa basah kemudian diletakkan di dalam cawan petri. Perolehan biomassa basah kemudian dikeringkan menggunakan oven pengering pada suhu 50°C selama 12 jam untuk menjadi biomassa kering. Biomassa yang sudah dikeringkan selanjutnya ditimbang dan dikonversikan dalam bentuk gram/L.

##### **Ekstraksi Minyak**

Biomassa kering diekstrak menggunakan metode sokhletasi. Sebanyak 10 g biomassa kering diekstraksi menggunakan 100 mL pelarut n-heksana. Sokhletasi berlangsung selama 6 jam dengan suhu 70°C. Hasil ekstraksi dan pelarut dipisahkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan kecepatan 60 rpm pada suhu 70°C. Minyak yang

diperoleh selanjutnya ditimbang dan dicatat hasilnya dalam bentuk mg/g biomassa kering.

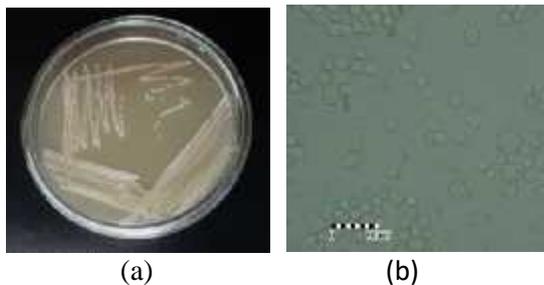
### Analisis Komposisi Minyak dengan FT-IR (Fourier Transform Infrared) Spektroskopi

Analisis gugus-gugus penting yang mencirikan asam-asam lemak pada minyak mikroalga dan minyak khamir dilakukan dengan instrumen FT-IR spektroskopi (IRPrestige-21 Shimadzu). Sampel dimasukkan hingga memenuhi seluruh permukaan plat. Selanjutnya plat dimasukkan ke dalam holder pada alat, lalu diukur menggunakan instrumen FT-IR. Pengujian dilakukan pada panjang bilangan gelombang 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Morfologi Mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale*

*Thraustochytrids* pada awalnya diklasifikasikan sebagai protozoa dan fungi. Pengkajian lebih dalam telah dilakukan sebelumnya untuk menunjukkan bahwa *Thraustochytrids* merupakan salah satu mikroorganisme yang dikategorikan sebagai mikroalga (Cavalier-smith, 1994). Pendugaan bahwa *Thraustochytrids* adalah fungi disebabkan adanya kemiripan mitokondria, flagela dan spora yang dihasilkan (Raghukumar, 2002). Penampakan koloni mikroalga *T. multirudimentale* pada media padat yang ditumbuhkan pada petri dish dan sel mikroalga dibawah mikroskop cahaya, dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Penampakan koloni dan sel mikroalga *T. multirudimentale* (pembesaran 100x)

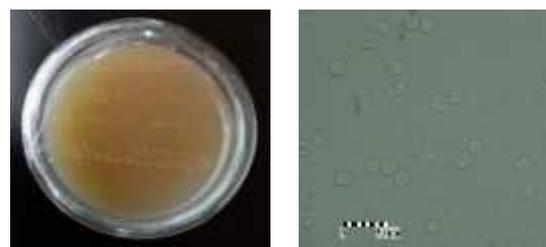
Pengamatan morfologi secara visual pada media padat diketahui bahwa mikroalga *T. multirudimentale* yang ditumbuhkan memiliki bentuk koloni bulat dan berwarna putih. Pertumbuhan koloni *T. multirudimentale* berada di atas permukaan medium dengan bentuk pinggiran yang rata serta permukaan koloni yang licin dan elevasi berbentuk *convex*. Ciri-ciri morfologi ini mirip dengan hasil pengamatan Unagul *et al.* (2017) yang menyebutkan ciri morfologi serupa pada pertumbuhan *Thraustochytrid* di media padat yaitu koloni bulat

bertepian rata berwarna krim pucat dengan tekstur sedikit berlendir.

Pada pengamatan mikroskopis menggunakan mikroskop cahaya (*light microscope*) diketahui bahwa mikroalga *T. multirudimentale* memiliki sel berwarna kehijauan berbentuk bulat dengan ukuran sel berkisar antara 1-20  $\mu\text{m}$ . Berbeda dari penelitian yang dilakukan oleh Jaseera *et al.* (2019) dalam penelitiannya yang melaporkan bahwa sel *Thraustochytrid* memiliki ukuran yang lebih besar berkisar 10-20  $\mu\text{m}$ . Perbedaan ukuran sel dapat terjadi karena sel memiliki ukuran yang berbeda pada setiap fase pertumbuhannya. Sel pada fase amoboid umumnya berukuran 1-5  $\mu\text{m}$  dan dapat terus tumbuh hingga berukuran 30  $\mu\text{m}$  pada fase eksponensial dan stasioner (Yokoyama *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis membuktikan bahwa kultur mikroalga *T. multirudimentale* yang ditumbuhkan adalah kultur murni yang telah homogen (*axenic*).

### Morfologi Khamir *Rhodotorula mucilaginosa*

Khamir merupakan mikroorganisme yang paling beragam jenisnya dan memiliki pengaruh besar pada suatu ekosistem. Khamir diketahui dapat hidup pada lingkungan ekstrim seperti perairan dengan salinitas yang tinggi maupun rendah (Silva *et al.*, 2003) bahkan dengan kondisi suhu yang ekstrim (Lane dan Morrissey, 2010; Redónet *et al.*, 2011). Beberapa strain khamir kini telah dikembangkan untuk pemanfaatannya dalam bidang bioteknologi. Perkembangan khamir terlihat meningkat secara signifikan pada aplikasinya dalam bidang bioteknologi seperti industri makanan, industri farmasi, kosmetik, dan juga pada proses bioremediasi lingkungan. Salah satu spesies khamir yang menarik untuk dikembangkan adalah *Rhodotorula mucilaginosa* karena khamir ini dilaporkan dapat mengakumulasi asam-asam lemak esensial dalam jumlah tinggi didalam sel-selnya (Saenge *et al.* 2011). Selain itu, *R. mucilaginosa* juga memiliki tingkat pertumbuhan yang cepat pada kondisi pertumbuhan optimum sehingga jumlah biomassa yang dihasilkan juga tinggi (Li *et al.*, 2007). Bentuk koloni dan sel khamir *Rhodotorula mucilaginosa* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bentuk koloni dan sel khamir *Rhodotorula mucilaginosa* (pembesaran 100x)

Pengamatan koloni *Rhodotorula mucilaginosa* pada media padat menunjukkan bahwa koloni berbentuk bulat berwarna oranye. Permukaan koloni licin, membentuk elevasi *convex* dan pinggiran koloni yang rata. *R. mucilaginosa* memiliki bentuk sel yang bulat dengan variasi ukuran sel berdiameter 5-30  $\mu\text{m}$ . Lau *et al.* (2018) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa *R. mucilaginosa* yang ditumbuhkan pada media PDA (*potato dextrose agar*) juga memiliki ciri koloni yang serupa. Pertumbuhan *R. mucilaginosa* pada media PDA menghasilkan koloni berbentuk bulat, berwarna oranye atau merah muda, berlendir dan tidak memiliki hifa. Selain itu, pada pengamatan mikroskopis juga ditemukan bahwa *R. mucilaginosa* bereproduksi secara aseksual melalui pertunasan.

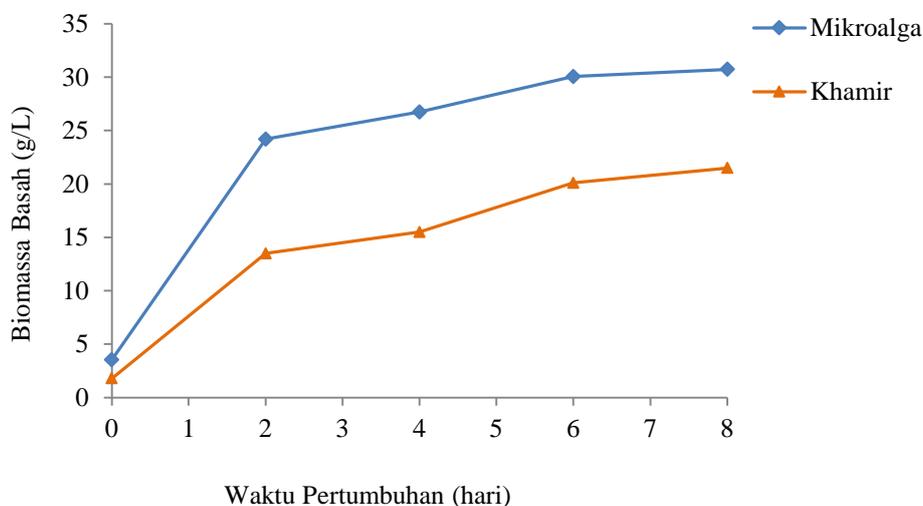
### Biomassa Mikroorganisme

Biomassa dapat didefinisikan sebagai material organik yang terbarukan karena bersumber dari berbagai variasi bahan organik yang tersedia di alam. Mikroorganisme adalah salah satu sumber penghasil biomassa yang paling potensial. Mikroorganisme memiliki kemampuan mensintesis beberapa komponen penting seperti minyak di dalam sel yang akan diakumulasikan sebagai biomassa (Aratboni *et al.*, 2019). Perolehan biomassa basah pada mikroalga *T.*

*multirudimentale* dan khamir *R. mucilaginosa* selama masa pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 3.

Biomassa mikroalga dan khamir pada penelitian ini diperoleh melalui proses sentrifugasi media cair yang mengandung biomassa setelah hari ke-8 pertumbuhan. Endapan pada tabung sentrifus dicuci dengan aquades dan dipisahkan. Biomassa basah yang dihasilkan selama masa pertumbuhan mikroalga dan khamir menunjukkan peningkatan. Mikroalga menghasilkan biomassa basah lebih banyak dan mencapai 30,8 g/L dibandingkan dengan khamir yang hanya menghasilkan biomassa basah sebesar 21,5 g/L pada hari ke-8 (Gambar 3). Akumulasi biomassa yang dihasilkan oleh mikroalga dan khamir selanjutnya dikeringkan sehingga diperoleh biomassa kering. Perolehan biomassa kering selama masa pertumbuhan disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa perolehan biomassa basah (seperti yang dapat dilihat pada Gambar 3) sejalan dengan perolehan biomassa kering. Mikroalga *T. multirudimentale* menghasilkan biomassa kering yang terus meningkat sejak awal pertumbuhan hingga hari ke-8 dan berjumlah lebih tinggi dibandingkan biomassa khamir *R. mucilaginosa*.



Gambar 3. Perolehan biomassa basah dari mikroalga dan khamir selama masa pertumbuhan

Tabel 1. Perolehan biomassa kering selama masa pertumbuhan

Hari	Biomassa Kering (g/L)	
	Mikroalga	Khamir
0	0,75±0,07	0,55±0,07
2	2,90±0,57	1,55±0,21
4	4,65±0,35	3,15±0,21
6	7,25±0,78	3,55±0,07
8	8,90±0,57	4,20±0,28

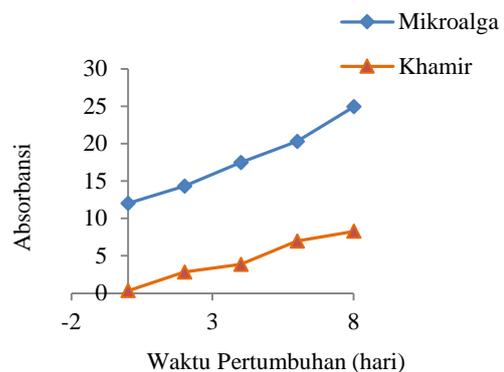
Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Anwar *et al.* (2018) menghasilkan rendemen biomassa kering mikroalga yang lebih rendah jika dibandingkan dengan rendemen pada penelitian ini. Pada kondisi optimum pertumbuhan 9 hari, Anwar *et al.* (2018) melaporkan, diperoleh 4,41 g/L biomassa kering jika sumber nitrogen yang digunakan adalah monosodium glutamat (MSG). Jumlah biomassa kering yang dihasilkan sedikit lebih rendah (4,22 g/L) pada saat sumber nitrogen berupa *yeast extract*. Penurunan jumlah biomassa yang signifikan juga dilaporkan jika sumber nitrogen yang digunakan adalah sodium nitrat (2,58 g/L).

Perbedaan perolehan biomassa mikroalga dapat terjadi karena adanya perbedaan kondisi pertumbuhan. Mikroalga adalah mikroorganisme fototrof yang membutuhkan cahaya untuk menghasilkan energi pada reaksi fotosintesis (Lehmuskero *et al.*, 2018). Pemberian intensitas cahaya sebanyak 2000 lux pada penelitian ini diduga menghasilkan biomassa mikroalga yang lebih tinggi dari penelitian Anwar *et al.* (2018). Sebelumnya, Mata *et al.*, (2012) juga menyebutkan bahwa mikroalga dengan intensitas cahaya 12.000 lux dapat menghasilkan 0,9 g/L biomassa kering selama 9 hari masa pertumbuhan. Hasil perolehan biomassa pada penelitian Mata *et al.* (2012) tersebut jauh lebih sedikit jika dibandingkan dengan biomassa pada penelitian ini. Pemberian intensitas cahaya yang terlalu tinggi juga dapat menghambat pertumbuhan sel karena klorofil mengalami kerusakan akibat foto-oksidasi (Liao *et al.*, 2018) dan juga menyebabkan *overheating* pada permukaan media (Huang *et al.*, 2017). Agar pertumbuhan lebih optimal, Pal *et al.* (2013) menyarankan pemberian intensitas cahaya sebesar 1000 lux pada pertumbuhan menggunakan tabung erlenmeyer dan 5000-10.000 lux untuk pertumbuhan dalam skala besar.

Selain itu, pada penelitian ini dapat dilihat bahwa produktivitas biomassa mikroalga jauh lebih tinggi dibandingkan dengan khamir. Hal ini diduga akibat adanya perbedaan kondisi metabolisme pada mikroorganisme. Dalam pertumbuhannya, mikroalga memerlukan CO<sub>2</sub> untuk proses fotosintesis. Penelitian Norbawa *et al.* (2013) membuktikan aerasi CO<sub>2</sub> memungkinkan mikroalga lebih cepat untuk melakukan proses fotosintesis, sehingga ketersediaan nutrisi pada fase pertumbuhan selanjutnya (fase eksponensial) masih terpenuhi. Nutrisi tersebut kemudian dimanfaatkan untuk meningkatkan kelimpahan sel sehingga akumulasi biomassa mikroalga meningkat. Selain itu, rendahnya produktivitas khamir dalam menghasilkan biomassa diduga karena adanya kondisi pertumbuhan khamir dalam kondisi anaerob dan menyebabkan terjadinya proses fermentasi pada medium. Hasil samping proses fermentasi dapat menghambat laju pertumbuhan dan pembelahan sel-sel khamir (Richmond, 2003).

### Densitas Optis Kultur

Densitas optis dari kultur cair merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mengukur pertumbuhan sel mikroorganisme saat pertumbuhan. Pertumbuhan sel mikroorganisme pada media cair dapat diindikasikan dengan adanya peningkatan nilai densitas optis kultur (Myers *et al.*, 2013). Pengukuran nilai densitas optis dapat dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi yang dihasilkan dari medium pertumbuhan mikroorganisme menggunakan spektrofotometer (Alam *et al.*, 2018). Densitas optis kultur cair dari mikroalga dan khamir selama masa pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 4.



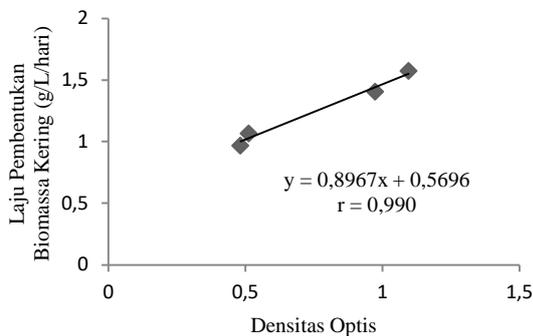
Gambar 4. Densitas optis kultur mikroalga dan khamir selama masa pertumbuhan

Gambar 4 menunjukkan bahwa kedua jenis mikroorganisme mengalami peningkatan nilai densitas optis. Mikroalga mengalami pertumbuhan yang lebih signifikan dibandingkan dengan khamir selama masa inkubasi. Perbedaan densitas optis pada kedua jenis mikroorganisme diduga dapat terjadi akibat adanya perbedaan ukuran sel dari kedua mikroorganisme ini. Koch dan Ehrenfeld (1968) menyebutkan bahwa bentuk dan ukuran sel dapat berpengaruh pada nilai densitas optis. Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Stevenson *et al.* (2016) juga membuktikan pengukuran densitas optis bakteri dan khamir dapat menunjukkan hasil berbeda pada setiap fase pertumbuhan. Pertumbuhan yang optimal memungkinkan mikroorganisme memiliki diameter sel yang besar. Ukuran diameter sel yang besar dapat menyebabkan penyerapan cahaya oleh sel lebih besar sehingga meningkatkan nilai absorbansi saat pengukuran (Zamani dan Muhaemin, 2016).

### Korelasi Biomassa dan Densitas Optis Mikroorganisme

Laju pertumbuhan dan produktivitas mikroorganisme dalam memproduksi biomassa dapat diproyeksikan melalui analisis densitas optis mikroorganisme. Hubungan linear keduanya diterjemahkan menggunakan diagram pencar sehingga diperoleh model persamaan. Keeratan hubungan antara produktivitas biomassa dan densitas

optis kultur dapat diketahui melalui analisis korelasi. Hasil analisis korelasi biomassa kering dan densitas optis kultur mikroorganisme dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Analisis korelasi biomassa kering dan densitas optis kultur mikroorganisme

Hasil analisis korelasi antara biomassa dan densitas optis kultur menunjukkan bahwa adanya hubungan yang erat diantara keduanya. Biomassa yang dihasilkan oleh mikroorganisme berkorelasi secara positif terhadap densitas optis kultur dengan nilai korelasi 0,990. Berdasarkan hal ini dapat diketahui bahwa semakin banyak biomassa yang dihasilkan oleh mikroalga dan khamir selama periode kultivasi pada media cair, maka akan meningkat pula nilai densitas optis kultur yang terukur melalui spektrofotometer.

### Minyak Mikroorganisme

Minyak mikroorganisme atau sering disebut dengan istilah *single-cell oil*, semakin intensif untuk diteliti. Saat ini telah banyak ditemukan mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk memproduksi minyak di dalam sel-sel mikroorganisme tersebut. Namun, kondisi pertumbuhan, nutrisi dan faktor-faktor penunjang lainnya juga merupakan hal penting yang perlu diperhatikan dalam membantu meningkatkan produktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan minyak. Mikroorganisme seperti mikroalga dan khamir merupakan mikroorganisme yang memiliki kemampuan mengakumulasi minyak dengan baik di dalam sel-selnya. Hasil ekstraksi minyak mikroorganisme yang dihasilkan penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 memperlihatkan rendemen dan karakteristik fisik minyak yang dihasilkan oleh kedua

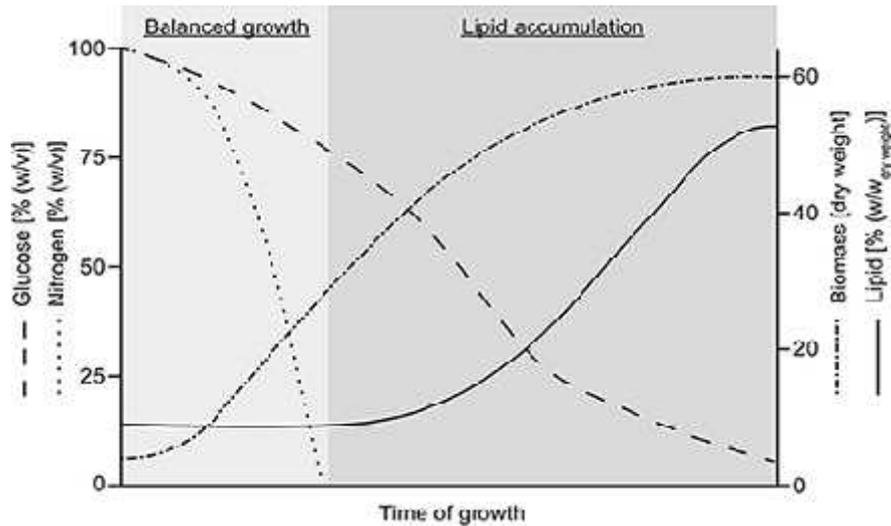
Tabel 2. Hasil ekstraksi minyak mikroorganisme

Mikroorganisme	Yield Minyak (mg/g)	Karakteristik Fisik Minyak
Mikroalga <i>T. multirudimentale</i>	4,50±0,49	- Berbentuk cair - Berwarna kuning kehijauan
Khamir <i>R. mucilaginosa</i>	17,04±0,78	- Berbentuk cair - Berwarna kuning oranye

mikroorganisme pada penelitian ini. Biomassa kering yang diperoleh setelah 8 hari masa kultivasi selanjutnya diekstrak minyaknya menggunakan metode Sokhletasi. Produksi minyak tertinggi dihasilkan oleh khamir dengan jumlah 17,04 mg/g, sedangkan pada mikroalga produksi minyaknya jauh lebih rendah yaitu hanya 4,50 mg/g. Adanya perbedaan jumlah minyak yang cukup signifikan ini dapat terjadi karena setiap mikroorganisme memiliki mekanisme pertumbuhan yang berbeda. Mikroalga memproduksi biomassa melalui proses fotosintesis (Masojídek *et al.*, 2021) sedangkan khamir menghasilkan biomassa melalui proses biokimia seperti fermentasi (Andrade *et al.*, 2020). Perubahan metabolisme juga dapat terjadi jika mikroorganisme kekurangan nutrisi yang berupa nitrogen, karbon dan fosfor serta paparan cahaya, aerasi dan kemiripan kondisi tumbuh dengan habitat aslinya.

Kandungan nutrisi sangat berpengaruh terhadap proses akumulasi lipid di dalam sel-sel mikroorganisme. Secara teori, jumlah ketersediaan nutrisi seperti glukosa dan nitrogen serta hubungannya dengan produksi biomassa dan minyak di dalam sel-sel mikroorganisme, dapat dilihat pada Gambar 6.

Berdasarkan Gambar 6 tersebut dapat diketahui bahwa nitrogen bersama-sama dengan glukosa merupakan nutrisi yang dibutuhkan diawal masa pertumbuhan. Secara teori, nitrogen lebih cepat diserap selama periode awal pertumbuhan mikroorganisme dan akan habis kira-kira pada sepertiga bagian awal dalam periode kultivasi. Sementara itu, glukosa sebagai sumber karbon diserap lebih lambat selama periode pertumbuhan. Sel-sel mikroorganisme sudah mulai menghasilkan biomassa sejak awal pertumbuhan dan terus meningkat hingga dapat terakumulasi sebanyak 60% sampai sumber glukosa habis. Sebaliknya, minyak atau lipid didalam sel-sel mikroorganisme mulai diproduksi kurang dari 10% dan stabil diawal masa pertumbuhan. Akumulasi lipid mulai meningkat beberapa saat setelah nitrogen habis yaitu saat tidak tersedia lagi sumber N bagi pembelahan sel-sel mikroorganisme. Jumlah lipid maksimum yang dapat dihasilkan adalah ± 53% pada akhir masa kultivasi (Wynn dan Retledge, 2005). Pemberian nitrogen yang sesuai juga dapat membantu meningkatkan laju pertumbuhan sel mikroorganisme karena nutrisi untuk pertumbuhan sel terpenuhi



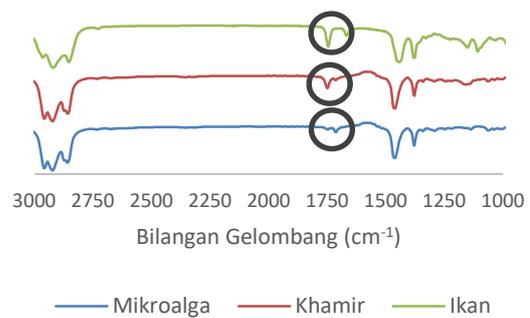
Gambar 6. Grafik ketersediaan nutrisi pada medium pertumbuhan (Wynn dan Retledge, 2005)

Hendrawan *et al.* (2017) dalam penelitiannya membuktikan bahwa perolehan minyak yang diproduksi mikroorganisme pada fase stasioner lebih tinggi dibandingkan dengan fase logaritmik. Dalam penelitian ini laju pertumbuhan sel mikroalga yang tinggi pada medium diproyeksikan dengan nilai OD yang terus meningkat hingga hari ke-8. Diduga pertumbuhan sel mikroalga yang aktif dapat menunda fase stasioner, yang menyebabkan produksi minyak pada mikroalga menjadi rendah.

Berbeda pada khamir, kondisi pertumbuhan yang lambat pada khamir *R. mucilaginosa* diduga diakibatkan adanya penurunan sumber nitrogen pada media pertumbuhan. Selain itu, terbentuknya hasil samping berupa senyawa metabolit juga dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada medium (Zhao *et al.*, 2012). Namun, agar dapat terus bertahan hidup, khamir *R. mucilaginosa* mulai mengkonversikan karbon menjadi lipid sehingga produktivitas minyak khamir *R. mucilaginosa* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan mikroalga *T. multirudimentale* (Xenopoulos *et al.*, 2020).

### Analisis Minyak Mikroorganisme dengan FT-IR Spektroskopi

Analisis FTIR pada penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi gugus fungsi yang terkandung di dalam minyak mikroorganisme yaitu minyak mikroalga dan minyak khamir. Selain itu, dilakukan juga analisis FTIR terhadap minyak ikan (yang ada dipasaran) sebagai pembandingan dari kedua minyak mikroorganisme karena minyak ikan memiliki kandungan asam lemak tidak jenuh sehingga dapat menjadi parameter untuk mendeteksi gugus fungsi dari minyak mikroalga dan khamir. Hasil analisis FTIR pada minyak mikroalga, khamir dan ikan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Analisis FTIR Minyak Mikroorganisme dan Minyak Ikan

Minyak merupakan senyawa yang terbentuk dari proses esterifikasi dari komponen utamanya yaitu asam-asam lemak dan gliserol. Berdasarkan Gambar 7 dapat terlihat bahwa hasil analisis spektra pada minyak mikroalga dan khamir sangat mirip dan tidak jauh berbeda. Hal ini disebabkan keduanya memiliki komposisi dan karakteristik umum dari minyak yang sama. Hasil analisis gugus fungsi pada minyak mikroorganisme dan minyak ikan dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil pembacaan menunjukkan bahwa minyak mikroalga pada bilangan gelombang 1647  $\text{cm}^{-1}$  dan pada khamir 1651  $\text{cm}^{-1}$  terdapat renggangan gugus C=C yang teridentifikasi sebagai alkena dari asam lemak tidak jenuh. Selanjutnya minyak mikroalga pada panjang gelombang 1747  $\text{cm}^{-1}$  dan pada khamir 1751  $\text{cm}^{-1}$  terdapat renggangan gugus C=O yang diidentifikasi sebagai ester dari trigliserida dan asam lemak. Ikatan rangkap yang terdapat pada daerah serapan ini mengindikasikan bahwa kedua jenis minyak memiliki kandungan asam lemak tak jenuh (Dali *et al.*, 2017).

Tabel 3. Hasil analisis gugus fungsi pada minyak mikroorganisme dan minyak ikan

Sumber Penghasil Minyak	Gugus Fungsi		
	Bilangan Gelombang $\text{cm}^{-1}$		
	C=C (Alkena)	C=O (Ester)	C-H (Alkana)
Mikroalga	1647	1747	2858
Khamir	1651	1751	2858
Ikan	1666	1745	2858

Selanjutnya pada masing-masing minyak mikroorganisme ditemukan adanya renggangan pada bilangan gelombang 2824, 2858 dan 2958  $\text{cm}^{-1}$  yang mengindikasikan adanya gugus metil dari lipid. Vongsvivut *et al.* (2013) juga melakukan analisis FT-IR pada minyak mikroalga dan khamir. Berdasarkan hasil analisis tersebut diketahui bahwa terdapat renggangan pada bilangan gelombang 1743 yang juga teridentifikasi sebagai ester dari asam lemak dan gugus metil pada rentang bilangan gelombang 2872-2960  $\text{cm}^{-1}$ .

Hasil analisis FT-IR menunjukkan bahwa minyak mikroalga, khamir dan ikan sama-sama memiliki gugus fungsi alkena yang diidentifikasi sebagai asam lemak tidak jenuh. Namun, hasil pembacaan menunjukkan bahwa masing-masing minyak memiliki intensitas yang berbeda pada daerah serapan yang sama. Hasil penelitian ini hampir serupa dengan hasil penelitian sebelumnya yang juga dilaporkan oleh Haryani *et al.* (2017) bahwa daerah serapan untuk gugus C=O pada mikroalga *T. Multirudimentale* memiliki intensitas yang lebih rendah dibandingkan dengan minyak ikan dan khamir *R. mucilaginosa*. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya dimana Vongsvivut *et al.* (2012) juga telah melakukan analisis FTIR terhadap minyak ikan, yang menunjukkan bahwa minyak khamir *R. mucilaginosa* memiliki persamaan dengan minyak ikan pada daerah serapan dan intensitas serapannya dibandingkan dengan minyak mikroalga *T. multirudimentale*.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Perbedaan jenis mikroorganisme menghasilkan rendemen biomassa dan minyak yang berbeda. Densitas optis kultur mikroalga dan khamir berkorelasi positif terhadap biomassa basah dan kering yang dihasilkan ( $r = 0,990$ ). Khamir menghasilkan rendemen minyak tertinggi yaitu 17,04±0,78 mg/g sedangkan rendemen minyak mikroalga hanya sebesar 4,50±0,49 mg/g. Hasil analisis FT-IR terhadap kedua jenis minyak mikroorganisme ini menunjukkan bahwa kedua jenis minyak memiliki gugus C=O sebagai ester asam lemak dan C=C yang teridentifikasi sebagai alkena dari asam lemak tidak jenuh. Kedua jenis mikroorganisme yaitu mikroalga *Thraustochytrium multirudimentale* dan khamir *Rhodotorula*

*Mucilaginosa* sangat berpotensi menghasilkan minyak dengan kandungan asam lemak esensial.

### Saran

Berdasarkan hasil penelitian, sebaiknya pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan optimasi pertumbuhan dan analisis lebih lanjut pada kedua jenis mikroorganisme.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adarme-Vega TC, Thomas HSR, Schenk PM. 2014. Towards sustainable sources for omega-3 fatty acids production. *Curr Opin Biotechnol.* 26: 14-18.
- Alam, M, Jayanth JK, Daniel JW, Egan HD, Abbas K. 2018. A portable sensor for cell optical density measurement in microfluidic chips. *Measurement and Control.* 51(8): 213-222.
- Andrade APC, Silva, HI, Pinto GAS. 2020. Yeast biomass production with potential for biological control: process strategies for increasing yield. *Res. Soc. Dev.* 9(4): 1-16.
- Anwar SH, Rinanda, T, Ramadhani, R. 2021. Phylogeny analysis of omega-3 fatty acids producing microalgae isolated from mangrove area in Banda Aceh Indonesia based on 18S rDNA gene. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Science.* 667-012082.
- Anwar SH, Harzaki, S, Sulaiman, M I, Rinanda, T. 2018. Utilization of different nitrogen sources for the growth of microalgae isolated from mangrove leaves in Banda Aceh—Indonesia. *IOP Conf Ser.: Earth Environ. Science.* 207-012049.
- Anwar SH, Sulaiman, MI, Rohaya, S, Safriani, N. 2013. Isolation and identification of microalgae as omega-3 sources from mangrove area in Aceh Province. *Proc of The Annual Int Conf, Syiah Kuala University - Life Sci Eng Chapter, 3.*
- Aratboni HA, Rafiei N, Garcia GR, AlemzadehA, Morones RJR. 2019. Biomass and lipid induction strategies in microalgae for biofuel production and other applications. *Microbial Cell Factories.* 18(178): 1-17.
- Barra M, Rivera AL, Cruzat F, Maureira NP, Saldia GRR. The marine fungi *Rhodotorula sp.* (strain cnyc4007) as a potential feed source for fish larvae nutrition. *Marin Drugs.* 15(12): 369.

- Cavalier-Smith T, Allsopp MTEP, Chao EE. 1994. *Thraustochytrids* are chromist not Fungi: 18s rRNA signatures of Heterokonta. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 346(1318):387–97.
- Cerone M and Smith TK. 2021. A brief journey into the history of and future sources and uses of fatty acids. *Front Nutr*. 8:570401.
- Chang G, Luo Z, Gu S, Wu Q, Chang M, Wang X. 2013. Fatty acid shifts and metabolic activity changes of *Schizochytrium sp. S31* cultured on glycerol. *Bioresour Technol*. 142: 255–260.
- D’Eliseo D dan Velotti F. 2016. Omega-3 fatty acids and cancer cell cytotoxicity: implications for multi-targeted cancer therapy. *Journal Clinical Medicine*. 5(2):15
- Dali S, Firdaus, Rusman HJ. 2017. Produksi DAG dari virgin coconut oil melalui reaksi transesterifikasi menggunakan enzim lipase dedak padi (*Oriza sativa L*) spesifik C18-20 terimobilisasi karbon aktif sebagai biokatalis. *Indonesia Journal Chemical Research*. 5(1): 37-46.
- Haryani S, Dewi Y, dan Novia ME. 2017. Optimization of condition for the growth of microalgae and characterization of fatty acid using FTIR spectroscopy. Laporan Akhir Penelitian Berbasis H-Index Scopus. Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Universitas Syiah Kuala.
- Jaritkhuan S dan Suanjit S. 2018. Species diversity and polyunsaturated fatty acid content of thraustochytrids from fallen mangrove leaves in Chon Buri province, Thailand. *Agriculture and Natura*. 52(1):24-32.
- Jaseera KV, KaladharanP, Vijayan KK, Sandhya SV, Antony ML, Pradeep MA. 2019. Isolation and phylogenetic identification of heterotrophic thraustochytrids from mangrove habitats along the southwest coast of India and prospecting their PUFA accumulation. *Journal Appliend Phycol*. 31: 1057–1068.
- Koch AL dan Ehrenfeld E. 1968. The size and shape of bacteria by light scattering measurements. *Biochim Biophys Acta*. 165(2): 262–273.
- Lane MM dan Morrissey JP. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. *Fungal Biology Reviews* . 24(1): 17–26.
- Lau WX, Octavio CZ, Cirilo NH, Mizuno K, Zayn A, Abdullah MO, Toh SH, Lihan S. 2018. Production of pigments by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malaysian Journal Microbiol*. 14(4): 344-350.
- Lehmuskero A, Chauton MS, dan Boström T. 2018. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecular-scale optical processes. *Progress in Oceanography*. 168: 43-56.
- Li Y, Horsman M, Wang B, Wu N. 2008. Effect of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiol Biotechnol*. 81(4):629-36
- Li Y, Zhao Z, (Kent), Bai F. 2007. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technol*. 41(3): 312–317.
- Liao Q, Chang HX, FuQ, HuangY, Xia A, Zhu X, Zhong N. 2018. Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresource Technology*. 250: 583–590.
- Masojídek J, Rangelová K, Lakatos GE, Silva BAM, Torzillo G. 2021. Variables governing photosynthesis and growth in microalgae mass cultures. *Processes*. 9: 820.
- Mata TM, Melo AC, Simoes M, Caetano NS. 2012. Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 107: 151-158.
- Maza DD, Viñarta SC, Su Y, Guillamón JM, Aybar MJ. 2020. Growth and lipid production of *Rhodotorula glutinis* r4, in comparison to other oleaginous yeast. *Journal Biotechnol*. 310: 21-31.
- Myers A, Brandon SC, Wayne RC. 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*. 6(4): 2-15.
- Norbawa P, Yudiati E, dan Widianingsih. 2013. Pengaruh perbedaan periode aerasi karbondioksida terhadap laju pertumbuhan dan kadar total lipid pada kultur *Nannochloropsis oculata*. *Journal Marine Research*. 2(3): 6-14.
- Pal SW, Singh NK, dan Azam K. 2013. Evaluation of Relationship between Light Intensity (Lux) and Growth of *Chaetoceros muelleri*. *Journal Oceanography and Marine Science*. 1(3):1-4.
- Patel A, Liefeldt S, Rova U, Christakopoulos P, Matsakas L. 2020. Co-production of DHA and squalene by *Thraustochytrid* from forest biomass. *Scientific Reports*. 10(10): 1-12.
- Pereira RN, Silveira JM, Burkert JFM, Ores JC, Burkert CAV. 2019. Simultaneous lipid and carotenoid production by stepwise fed-batch cultivation of *Rhodotorula mucilaginosa* with crude glycerol. *Brazilian Journal Chemical Engineering*. 36(3): 1099-1108.

- Raghukumar S. 2002. Ecology of the marine protists, the *Labyrinthulomycetes* (*Thraustochytrids* and *Labyrinthulids*). *European Journal of Protistology*. 38: 127–145.
- Ratledge C. 2013. Microbial oils: an introductory overview of current status and future prospects. *Journal OCL*. 20(6): 1-7.
- Redón M, Guillamón JM, Mas A, Rozès N. 2011. Effect of growth temperature on yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature. *European Food Research and Technology*. 232(3): 517–527.
- Saenge C, Cheirsilp B, Suksaroge TT, Bourtoom T. 2011. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochemistry*. 46(1): 210–218.
- Silva GM dan Lucas C. 2003. Physiological studies on long-term adaptation to salt stress in the extremely halotolerant yeast *Candida versatilis* CBS 4019 (syn. *C. halophila*). *FEMS Yeast Res*. 3(3): 247–260
- Sun SX, Hua X, Deng M, Zhang YY, Li YN, Wu Z, Du ZY. 2018. Tracking pollutants in dietary fish oil: From ocean to table. *Environmental Pollution* 240: 733–744.
- Stevenson K, Alexander FM, Ivan BNC, Peter SS, Teuta P. 2016. General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*. 6:38828 : 1-7.
- Santigosa E, Brambilla F, dan Milanese L. 2021. Microalgae oil as an effective alternative source of EPA and DHA for gilthead seabream (*Sparus aurata*) aquaculture. *Animals*. 11: 1-17.
- Unagul P, Suetrong S, Preedanon S, Klayuban A, Gundool W, Suriyachadkun C, Sakayaroj J. 2017. Isolation of fatty acid profiles and cryopreservation of marine *Thraustochytrids* from mangrove habitats in Thailand. *Botanica Marina*. 60(4): 363–379.
- Vongsvivut J, Heraud P, Gupta A, Puri M, McNaughton D, Barrow CJ. 2012. Quantitative determination of fatty acid composition in micro-encapsulated fish-oil supplements using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Food Chemical*. 135: 603-609.
- Vongsvivut J, Heraud P, Gupta A, Puri M, McNaughton D, Barrow CJ. 2013. FTIR microspectroscopy for rapid screening and monitoring of polyunsaturated fatty acid production in commercially valuable marine yeasts and protists. *Analyst*. 138(20): 6016–6031.
- Wynn JP dan Ratledge C. 2005. *Microbial Production of Oils and Fat*. Boca Raton: CRC Press.
- Xenopoulos E, Giannikakis I, Chatzifragkou A, Koutinas A, Papanikolaou S. 2020. Lipid production by yeasts growing on commercial xylose in submerged cultures with process water being partially replaced by olive mill wastewaters. *Processes*. 8(7):819
- Xu Y dan Qian SY. 2014. Anti-cancer activities of 6 polyunsaturated fatty acids. *Biomed Journal*. 37(3):112-119.
- Yokoyama R, Salleh B, dan Honda D. 2007. Taxonomic rearrangement of the genus *Ulkenia* sensu lato based on morphology, chemotaxonomical characteristics, and 18S rRNA gene phylogeny (*Thraustochytriaceae*, *Labyrinthulomycetes*): emendation for *Ulkenia* and erection of *Botryochytrium*, *Parietichytrium*, and *Sicyoidochytrium* gen. *Mycoscience*. 48(6): 329–341.
- Zamani NP dan Muhaemin M. 2016. Penggunaan spektrofotometer sebagai pendeteksi kepadatan sel mikroalga laut. *Maspari Journal*. 8(1):39–48.
- Zhao X, Peng F, Du W, Liu C, Liu D. 2012. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35(6): 993–1004.