

Laju Pertumbuhan dan Kandungan Lemak *Nannochloropsis* sp. dengan Penambahan Magnesium (Mg) dan Besi (Fe)

Growth Rate and Lipid Content of *Nannochloropsis* sp. with Magnesium (Mg) and Iron (Fe) Augmentation

Herlina Adelina Meria Uli Sagala¹, Setya Indra Padma Putri², Welmar Olfan Basten Barat³

¹ Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang

² Direktorat Jendral Percepatan Pembangunan Daerah Tertinggal

³ Universitas HKBP Nomensen Pematangsiantar

Korespondensi : herlinasagala3392@gmail.com

ABSTRAK

Nutrien seperti magnesium dan besi dan kondisi lingkungan optimum berperan untuk pertumbuhan dan lemak yang dihasilkan oleh *Nannochloropsis* sp. Laju pertumbuhan dan lemak *Nannochloropsis* sp diamati untuk mengetahui pengaruh penambahan konsentrasi magnesium dan besi dalam media kultivasi. Kultivasi *Nannochloropsis* sp menggunakan skala semi massal secara *outdoor* dengan 3 perlakuan yaitu kontrol, magnesium dan besi. Magnesium dan besi ditambahkan dalam media dengan 3 tingkat konsentrasi yaitu 1x, 3x dan 5x dan. Laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp diamati setiap hari dan kandungan lemak diuji dengan metode Mojonnier. Hasil penelitian menunjukkan laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp dengan penambahan magnesium 0.319/hari dan penambahan besi 0.256/hari lebih tinggi dibandingkan kontrol. Sehingga lemak yang dihasilkan menjadi lebih tinggi sebesar 4.16% dan 2.27%. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi magnesium dan besi pada kultivasi *Nannochloropsis* sp meningkatkan laju pertumbuhan sehingga lemak yang dihasilkan menjadi lebih tinggi.

Kata kunci : laju pertumbuhan, proximat, *Nannochloropsis* sp, magnesium, besi

ABSTRACT

Nutrient like magnesium and iron, as well as optimum environmental condition play role for growth and lipid product of Nannochloropsis sp. Growth rate and lipid produced by Nannochloropsis sp. were observed to determine the effect of magnesium and iron concentration in media cultivation. Nannochloropsis sp cultivation used semi missal scale in outdoor with 3 treatments included control, magnesium and iron. 3 level concentrations of magnesium and iron at media were 1x, 3x and 5x. Nannochloropsis sp. growth rate was daily observed and lipid content were analyzed using Mojonnier method. The result of research showed that Nannochloropsis sp. growth rate with magnesium augmentation 0.319/day and iron augmentation 0.256/day were higher than control. Then, higher lipid of Nannochloropsis sp produced were 4.16% and 2.27%. This showed that the increased concentrations of magnesium and iron in the cultivation of Nannochloropsis sp. increased the growth rate as well as higher lipid production.

Key words: growth rate, proximate, *Nannochloropsis* sp, magnesium, iron

PENDAHULUAN

Nannochloropsis sp. salah satu mikroalga yang pertumbuhan relatif cepat dan mudah untuk dikultivasi, jenis ini memiliki ciri bentuknya bulat, diameter sel 4-6 μm , tidak memiliki flagel, pergerakan tidak motil dan warna sel kehijauan. Pertumbuhan yang relatif cepat maka jenis ini sering dibudidayakan karena mampu memproduksi hasil metabolisme sel menjadi karbohidrat, protein, lemak dan memiliki nilai nutrisi tinggi. Ketersediaan nutrien dan lingkungan yang mendukung akan sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikrolaga. Kondisi lingkungan optimum untuk *Nannochloropsis* sp. yaitu salinitas 20-35‰, suhu 21-35°C dan pH 8.4 (Yusof *et al.*, 2011; Kawaroe *et al.*, 2010; 2015). Ohse *et al.* (2014) menjelaskan bahwa kondisi media kultivasi yang berbeda umumnya disebabkan oleh beberapa faktor, seperti komposisi nutrien, kandungan karbon dan lingkungan. Hal ini akan berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga dan hasil metabolisme, salah satunya lemak. Lemak mikroalga memiliki potensi untuk menggantikan minyak ikan, minyak nabati dan produk bahan bakar (Kawaroe *et al.*, 2010).

Nutrien bagi mikroalga berperan penting membantu pertumbuhan, seperti magnesium dan besi karena kedua unsur ini essensial bagi mikroalga (Chai, 2012). Bosnir *et al.* (2013), Encarnacao *et al.* (2012) menjelaskan bahwa magnesium sangat dibutuhkan dalam proses metabolisme dan sistem enzim untuk semua mikroalga, sedangkan besi membantu proses pertumbuhan, fotosintesis, sintesis protein, dan respirasi (Xing *et al.*, 2009; Sasireka and Muthuvelayudhan, 2015). Kedua unsur tersebut akan berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga yang ditandai dengan peningkatan jumlah sel dan laju pertumbuhan menjadi lebih cepat sehingga berpengaruh terhadap akumulasi lemak mikroalga (Essakimuthu *et al.*, 2016).

Magnesium dan besi yang ditambahkan dalam media kultivasi akan mampu meningkatkan pertumbuhan dan lemak mikroalga. Hal ini telah dilakukan penelitian dalam beberapa tahun terakhir. Gorain *et al.* (2013), pertumbuhan dan lemak *Chlorella vulgaris* dan *Scenedesmus obliquus* meningkat dengan penambahan konsentrasi magnesium <10x, sedangkan konsentrasi magnesium > 10x mengakibatkan pertumbuhan dan lemak kedua jenis mikroalga mengalami penurunan. Hasil berbeda ditunjukkan ketika konsentrasi besi semakin tinggi yang ditambahkan dalam media kultivasi

mendorong pertumbuhan *C.vulgaris* meningkat, hal ini berdampak terhadap tingginya lemak yang dihasilkan (Liu *et al.*, 2008; Carpio *et al.*, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kedua unsur tersebut akan dimasukkanirespon berbeda oleh mikroalga. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan membahas pengaruh penambahan konsentrasi magnesium dan besi terhadap pertumbuhan dan lemak *Nannochloropsis* sp.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Ekologi, Politeknik KP Karawang, Jawa Barat dan Laboratorium Kimia Terpadu, Kampus IPB Baranangsiang, Bogor, Jawa Barat. Waktu penelitian dimulai bulan Maret – Juni 2022.

Kultivasi Mikroalga

Jenis mikroalga yang digunakan selama penelitian yaitu *Nannochloropsis* sp. dari kelas alga hijau Eutigmatophyceae. Kultivasi mikroalga dilakukan skala laboratorium terlebih dahulu selama ± 7 hari. Hal ini dimaksudkan untuk *restocking* dan selama kultivasi kebutuhan nutrisi mikroalga menggunakan pupuk *Walne*. Kemudian, mikroalga dikultivasi *outdoor* skala semi massal menggunakan kolam 800 L selama 17 hari. Sumber nutrisi yang diperoleh dari 3 jenis pupuk yang digunakan yaitu ZA, TSP dan urea (Kawaroe *et al.*, 2010). Standarisasi kepadatan awal kultivasi *Nannochloropsis* sp. skala semi massal yaitu 7×10^6 sel/mL karena dengan adanya perlakuan akan membuat laju pertumbuhan dan kemampuan bertahan *Nannochloropsis* sp. berbeda.

Prosedur Penelitian

Perlakuan penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 jenis nutrisi yaitu magnesium (Mg) dan besi (Fe) dengan tingkat konsentrasi yang berbeda yang ditampilkan pada Tabel 1. Kedua unsur tersebut ditambahkan dalam media diawal kultivasi dan tidak mencampurkan kedua unsur dalam satu media yang sama. Selama penelitian perhitungan laju pertumbuhan spesifik menggunakan *haemocytometer* dilakukan setiap hari setelah didapatkan jumlah kepadatan sel dan pengukuran kualitas air yaitu salinitas, pH dan oksigen terlarut (mg/L).

Tabel 1. Penambahan konsentrasi magnesium dan besi untuk setiap perlakuan.

Tingkatan konsentrasi*	Perlakuan		
	Kontrol	Magnesium	Besi
1x	-	0.2 ppm	0.05 ppm
3x	-	0.6 ppm	0.15 ppm
5x	-	1 ppm	0.25 ppm

*Berdasarkan (Gorain *et al.*, 2013).

Ekstrak kandungan lemak

Metode pengujian lemak digunakan Mojonnier dengan campuran ether. Sampel sebanyak 10 mg dimasukkan tabung Mojonnier, ditambahkan ammonia 25% sebanyak 1.5 mL dan dikocok. Setelah itu ditambahkan indikator fenolptalein 2-3 tetes agar kedua fase yang terbentuk terlihat jelas, ditambahkan 10 mL etanol lalu dikocok. Kemudian proses ekstraksi dilakukan 3 tahap (AOAC, 2005), kandungan lemak dihitung dengan persamaan (1) sebagai berikut.

$$\text{Kandungan lemak} = \frac{W_b - W_a}{W_s} \times 100\% \quad (1)$$

W_a adalah bobot labu lemak awal, W_b adalah bobot labu lemak akhir dan W_s adalah bobot sampel.

Analisis Data

Laju pertumbuhan

Kawaroe *et al.* (2015) menjelaskan bahwa laju pertumbuhan spesifik menggambarkan pertumbuhan harian mikroalga. Laju pertumbuhan spesifik dihitung dengan persamaan (2) sebagai berikut.

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_o}{T_t - T_o} \quad (2)$$

μ adalah laju pertumbuhan spesifik (/hari), N_t adalah kepadatan sel mikroalga pada waktu ke-t, N_0 adalah kepadatan awal sel mikroalga, T_t adalah waktu akhir kultivasi, T_0 adalah waktu awal kultivasi.

Uji statistika

Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp. dianalisis menggunakan ANOVA dan kandungan lemak *Nannochloropsis* sp. dianalisis menggunakan uji T dengan *software* SPSS versi 22. Selang kepercayaan yang digunakan sebesar 95% (Santoso, 2015).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Penambahan konsentrasi magnesium dan besi terhadap pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.

Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp. menjadi lebih tinggi setelah ditambahkan konsentrasi magnesium dan besi dalam media kultivasi dibandingkan dengan kontrol (tanpa penambahan konsentrasi magnesium dan besi) yang disajikan Tabel 2. Tingginya laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp. diikuti dengan jumlah peningkatan kepadatan sel *Nannochloropsis* sp. Kepadatan kontrol *Nannochloropsis* sp. sebesar 11.55×10^6 sel/mL dengan laju pertumbuhan 0.081/hari, sedangkan kepadatan *Nannochloropsis* sp. penambahan konsentrasi magnesium mencapai $12.35-15.55 \times 10^6$ sel/mL laju pertumbuhan 0.284-0.319/hari dan penambahan konsentrasi besi menjadikan kepadatan sel mencapai $12.25-13.70 \times 10^6$ sel/mL laju pertumbuhan 0.126-0.256/hari. Pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. didukung kondisi fisik lingkungan, hasil pengukuran kualitas air selama kultivasi diperoleh salinitas berkisar 29.33-34.56‰, pH berkisar 7.07-7.98 dan oksigen terlarut berkisar 2.93-3.08 mg/L.

Tabel 2. Laju pertumbuhan spesifik *Nannochloropsis* sp. (hari⁻¹) pada perlakuan selama kultivasi

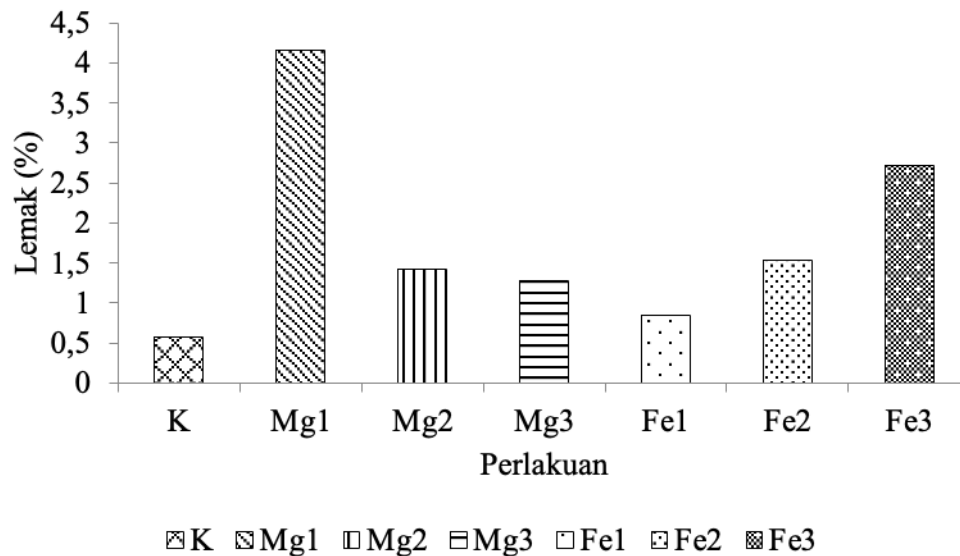
Hari	Laju pertumbuhan spesifik (/hari)						
	K	Mg1	Mg2	Mg3	Fe1	Fe2	Fe3
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0.049	0.146	0.279	0.284	0.206	0.268	0.316
3	0.085	0.201	0.209	0.284	0.115	0.175	0.256
4	0.151	-0.264	0.143	-0.231	0.126	0.172	0.100
5	0.037	0.397	-0.183	-0.578	0.112	-0.196	-0.507
6	0.060	0.319	-0.132	0	-0.420	0.103	-0.246
7	0.038	-0.073	-0.504		-0.147	-0.636	-0.141
8	0.077	-0.268	0.083		-0.216	-0.194	
9	-0.067	-0.531	-0.118		0	0.101	
10	-0.108	0	0.044		0	-0.009	
11	-0.070	-0.047			0	0.009	
12	-0.075	0.024			0	0.009	
13	-0.162	-0.016			0		
14	-0.021				0		
15	0.028				0.052		
16	0.021				0.074		
17	0.007						

Keterangan : K adalah perlakuan kontrol tanpa penambahan konsentrasi magnesium dan besi, Mg1 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi magnesium 1x (0.2 ppm), Mg2 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi magnesium 3x (0.6 ppm), Mg3 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi magnesium 5x (1 ppm), Fe1 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi besi 1x (0.05 ppm), Fe2 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi besi 3x (0.15 ppm) dan Fe3 adalah perlakuan dengan penambahan konsentrasi besi 5x (0.25 ppm). (Mengacu pada Kawaroe *et.al.*, 2015 bahwa laju pertumbuhan spesifik dapat menyentuh angka dibawah 0 bahkan minus).

Tabel 2 menunjukkan laju pertumbuhan tertinggi pada penambahan konsentrasi magnesium 1x sebesar 0.319/hari dengan kepadatan sel 15.55×10^6 sel/mL dan laju pertumbuhan tertinggi 0.256/hari pada penambahan konsentrasi besi 5x dengan kepadatan sel 13.70×10^6 sel/mL. Hasil tersebut menunjukkan bahwa respon *Nannochloropsis* sp. terhadap penambahan konsentrasi magnesium dan besi pada media

kultivasi berbeda ($P < 0,05$). Penambahan Konsentrasi Magnesium dan Besi Terhadap Kandungan Lemak *Nannochloropsis* sp.

Lemak *Nannochloropsis* sp yang dihasilkan pada perlakuan kontrol sebesar 0.58%, sedangkan lemak penambahan konsentrasi magnesium dan besi mencapai 1.28-4.16% dan 0.85-2.72% yang ditampilkan pada Gambar 1. Gambar 1 menunjukkan lemak *Nannochloropsis* sp. tertinggi penambahan konsentrasi magnesium 0.2 ppm dan besi 0.25 ppm sebesar 4.16% dan 2.72%. Tingginya lemak yang dihasilkan *Nannochloropsis* sp. diikuti dengan tingginya laju pertumbuhan spesifik (Tabel 2), diduga akibat laju pertumbuhan yang cepat akan menghasilkan lemak lebih tinggi. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan penambahan konsentrasi magnesium dan besi menghasilkan lemak yang berbeda ($P < 0,05$) seperti yang ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kandungan lemak *Nannochloropsis* sp (%) setiap perlakuan

Pembahasan

Pertumbuhan rata-rata *Nannochloropsis* sp meningkat hingga hari ke tiga kultivasi hal ini dikarenakan ketersediaan nutrisi masih mencukupi (Kawaroe *et al.*, 2010), namun pertumbuhan *Nannochloropsis* sp dengan penambahan konsentrasi magnesium dan besi tertinggi yaitu 5x menjadikan fase eksponensial menjadi lebih cepat dibandingkan dengan konsentrasi lebih kecil. Hal ini diduga stress yang disebabkan penambahan nutrisi yang

terlalu tinggi sehingga pencapaian fase eksponensial yang lebih cepat namun mempercepat fase stasioner hingga mengakibatkan kematian pada mikroalga (Essakimuthu *et al.*, 2016).

Laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp kontrol sebesar 0,081/hari lebih tinggi dibandingkan De Bhowmick *et al.* (2014) dan Kawaroe *et al.* (2015), laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp skala *outdoor* berkisar antara 0.048-0.05/hari dengan kondisi kontrol (tanpa penambahan nutrisi). Laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp meningkat setelah ditambahkan magnesium dan besi dalam media kultivasi (Tabel 2), menurut Wang *et al.* (2010) penambahan konsentrasi nutrisi mampu mempercepat laju pertumbuhan mikroalga. Laju pertumbuhan *Microcystis aeruginosa* dengan penambahan magnesium berkisar antara 0.2-0.23/hari dan *Chlorella* sp. meningkat 0.13/hari setelah ditambahkan besi dalam media kultivasi (Nur, 2014). Laju pertumbuhan *Nannochloropsis* sp lebih tinggi dibandingkan kedua mikroalga tersebut. Semakin tinggi konsentrasi nutrisi yang ditambahkan maka laju pertumbuhan mikroalga menjadi lebih rendah dan siklus hidupnya menjadi lebih pendek (Liu *et al.* 2008, Arkronrat *et al.* 2016).

Hasil pengukuran kualitas air selama kultivasi menunjukkan kondisi lingkungan kultivasi masih tergolong aman untuk pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. Salinitas pada penelitian Kawaroe *et al.* (2015) berkisar antara 32-42‰ lebih tinggi dibandingkan salinitas pada penelitian ini. Salinitas 30‰ dan pH 8 *Nannochloropsis* sp mencapai kepadatan optimum (Khatoon *et al.*, 2014) dan Khalil (2010) menyebutkan bahwa kepadatan sel optimum mikroalga umumnya pada kisaran pH 7,5. pH selama penelitian lebih rendah daripada Khatoon *et al.* (2014) namun masih aman untuk pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. Kebutuhan oksigen terlarut bagi organisme baiknya > 5 mg/L menurut Kementerian Negara Lingkungan Hidup No.54 tahun 2004 dan Raso *et al.* (2013) menjelaskan bahwa mikroalga membutuhkan kandungan oksigen terlarut sekitar 2 mg/L untuk pertumbuhan hingga mencapai fase eksponensial.

Secara umum lemak dihasilkan mikroalga ketika dalam kondisi stress yang mana pertumbuhan sel menurun disebabkan oleh penambahan suatu unsur nutrisi dalam media kultivasi (Lubian *et al.* 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi penambahan magnesium, lemak yang dihasilkan *Nannochloropsis* sp menjadi semakin kecil. *C.vulgasis* dan *S.obliquus* menghasilkan lemak tinggi pada penambahan

magnesium sebanyak 2x, 3x, 5x dan 10x sebesar \pm 20-25%, sedangkan penambahan magnesium > 10x lemak kedua jenis mikroalga menurun hingga 10% (Gorain *et al.*, 2013). Esakkimuthu *et al.* (2016) dan Mata *et al.* (2013), lemak *D. tertiolecta* penambahan magnesium 10x dan 20x lebih rendah 5% dibandingkan dengan kontrol. Sehingga pemanambahan magnesium yang semakin tinggi akan menghasilkan lemak lebih rendah.

Kandungan lemak *Chlorella* sp penambahan besi 1x mencapai 0,17% dan penambahan besi 5x kandungan lemak menjadi lebih tinggi menjadi 0.43% (Nur, 2014). Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan lemak yang dihasilkan oleh *Nannochloropsis* sp pada penelitian ini. Hasil penelitian menjelaskan bahwa semakin tinggi konsentrasi besi yang ditambahkan maka lemak yang dihasilkan lebih banyak. laju pertumbuhan yang cepat dengan penambahan konsentrasi yang tinggi membuat akumulasi lemak lebih banyak. Pertumbuhan *C.vulgaris* lebih cepat pada penambahan besi sebesar 1.2×10^{-5} dan menghasilkan lemak lebih tinggi 40% dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah (Liu *et al.*, 2008; Carpio *et al.*, 2015; Nur, 2014; Battah *et al.*, 2013). Ma *et al.* (2016) menjelaskan bahwa penambahan 10x dan 20x besi menghasilkan rata-rata lemak *D. tertiolecta* 11.38% dan 7.76%, sedangkan kontrol hanya menghasilkan 7.31%.

KESIMPULAN

Penambahan konsentrasi magnesium dan besi pada kultivasi *Nannochloropsis* sp meningkatkan laju pertumbuhan sehingga lemak yang dihasilkan menjadi lebih tinggi. Laju pertumbuhan dan lemak yang dihasilkan oleh *Nannchloropsis* sp. paling optimum dengan penambahan magnesium sebanyak 1x.

DAFTAR PUSTAKA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official methods of analysis. www.eoma.aoac.org (Retrieved 19 February 2017).
- Arkronrat, W., P. Deemark, and V. Oniam. 2016. Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp.) with monocultures. *J. Sci. Technol.*, 38(1):1-5.

- Battah, M., Y. El-Ayoty, A. El-Fata, S.A. El-Ghany, and A. Esmael. 2013. Optimization of growth and lipid production of the Chlorophyte microalga *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *World Appl. Sci. J.*, 28(11): 1536-154. doi:10.5829/idosi.wasj.2013.28.11.1918.
- Bosnir, J., D. Puntaric, Z. Cvetkovic, L. Pollack, L. Barusic, I. Klaric, M. Miskulin, I. Puntaric, E. Puntaric, and M. Milasevic. 2013. Effect of magnesium, chromium, iron and zinc from food supplement on selected aquatic organisms. *Coll. Antropol.*, 37(3): 965-971.
- Carpio, R.B., R.L. De Leon, and M.R. Martinez-Goss. 2015. Growth, lipid content, and lipid profile of the green alga, *Chlorella vulgaris* beij., under different concentrations of Fe and CO₂. *Journal of Engineering Science and Technology*, 6(1):19-30.
- Chai, T. 2012. Cultivation of *Nannochloropsis salina* and *Synechocystis* sp. PCC6803 in anaerobic digestion effluent for nutrient removal and lipid production. The Ohio State University. 85p.
- De Bhowmick, G., G. Subramanian, S. Mishra, and R. Sen. 2014. Raceway pond cultivation of a marine microalga of Indian origin for biomass and lipid production: A case study. *Algal Research*, 6:201-209.
- Encarnacao, T., H.D. Burrows, A.C. Pais, M.G. Campos, and A. Kremer. 2012. Effect of N and P on uptake of magnesium and iron and on the production of carotenoids and chlorophyll by the microalgae *Nannochloropsis* sp. *Journal of Agricultural Science and Technology*, A2:824-832.
- Esakkimuthu, S., V. Krishnamurthy, R. Govindarajan, and K. Swaminathan. 2016. Augmentation and starvation of calcium, magnesium, phosphate on lipid production of *Scenedesmus obliquus*. *Biomass and Bioenergy*, 88:126-134.
- Gorain, P.C, S.K. Bachi, and N. Mallick. 2013. Effects of calcium, magnesium and sodium chloride in enhancing lipid accumulation in two green microalgae. *Environmental Technology*, 1-9. doi:10.1080/09593330.2013.812668.
- Kawaroe, M., T. Prartono, A. Sunuddin, D.W. Sari, dan D. Agustine. 2010. Mikroalga: Potensi dan pemanfaatannya untuk produksi bio bahan bakar. Bogor: PT. Penerbit IPB Press. 150 hal.

- Kawaroe, M., J. Hwangbo, D. Agustine, and H.A. Putra. 2015. Comparison of density, specific growth rate, biomass weight, and doubling time of microalgae *Nannochloropsis* sp. cultivated in Open Raceway Pond and Photobioreactor. *AACL Bioflux*, 8(5):740-750.
- Kementerian Negara Lingkungan Hidup. 2004. Baku Mutu Air Laut. Nomor 5. Menteri Negara Lingkungan Hidup.
- Khalil, Z., Asker, M.S. El-Sayed, and S. Kobbia I. 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26(7): 1225-1231.
- Khatoon, H., N.A. Rahman, S. Baneerjee, N. Harun, S.S. Suleiman, N.H. Zakaria, F. Lananan, S.H.A. Hamid, and A. Endut. 2014. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95:11-18.
- Liu, ZY, GC. Wang, and BC. Zhou. 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 99:4717-4722. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.073.
- Lubian, L.M, O. Montero, I. Moreno-Garrido, I.M Huretas, C. Sobrino, M. Gonzalez-del Valle, and G. Pares. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as a source of commercial valuable pigments. *J. Appl. Phycol.*, 12:249-255.
- Ma, X.N., TP. Chen, B. Yang, J. Liu, and F. Chen. 2016. Lipid Production from *Nannochloropsis*. *Mar. Drugs.*, 14(61):1-18. doi:10.3390/md14040061.
- Mata, T. M, R. Almeida, and N.S. Caetano. 2013. Effect of the Culture Nutrients on the Biomass and Lipid Productivities of Microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Chemical Engineering Transactions*, 32:973-978. doi:10.3303/CET1332163.
- Nur, M.M.A. 2014. Effect of bicarbonate, iron and salt on lipid productivity of *Chlorella* sp. extracted by Osmotic Shock Method. *Eksergi*, 11(2):20-24.
- Ohse, S., B.D. Roberto, Á.O. Renata, G.C. Rafaela, B.F. Eliana, and C.R.C. Paulo. 2015. Lipid content and fatty acid profiles in ten species of microalgae. *IDESIA (Chile)*, 3(1):93-101.

- Raso, S., B. van Genugten, M. Vermue, and R.H Wijffels. Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity. *J. Appl. Phycol.*, 24:863-871. doi:10.1007/s10811-011-9706-z.
- Santoso.W. 2015. Menguasai SPSS 22: From basic to expert skills. PT. Kompas Gramedia, Jakarta. 447 hal.
- Sasireka.G and Muthuvelayudham .R. 2015. Effect salinity and iron stressed on growth and lipid accumulation in *Skeletonema costatum* for biodiesel production. *Res. J. Chem. Sci.*, 5(5):69-72.
- Wang, C., HN. Kong, XZ. Wang, HD. Wu, Y. Lin, and SB. He. 2010. Effect of iron on growth and intracellular chemical contents of *Microcystis aeruginosa*. *Biochemical and Enviromental Sciences*, 23:48-52.
- Xing, W., W. Huang, and G. Liu. 2009. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Scheid. *Enviromental Toxicology*, 25:103-112. DOI 10.1002/tox.20480. doi:10.1002/tox.20480.
- Yusof, Y.A.M., J.M.H. Basari, N.A. Mukti, R. Sabuddin, A.R. Muda, S. Sulaiman, S. Makpol, and W.Z.W. Ngah. Fatty acid compositions od microalgae *Chlorella vulgaris* can be modulated by varying carbon dioxide concentration in outdoor culture. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(62):3536-13542. doi:10.5897/AJB11.1602.