

## Peningkatan Perolehan Hasil Lipid dari *Nannochloropsis* sp Menggunakan Metode Ekstraksi Kombinasi Bligh-dryer dan *Osmotic Stress*

Dianursanti dan Pijar Religia

Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Indonesia  
Kampus UI Depok, Depok 16424 Tel. (021) 7863516  
[danti@che.ui.edu](mailto:danti@che.ui.edu)

### Abstrak

Budidaya *Nannochloropsis* sp telah banyak dilakukan oleh para peneliti mengingat kandungan-kandungan essensial seperti lipid yang sangat tinggi. Pemanfaatannya sebagai biodiesel juga sangat menjanjikan, dilihat dari tingginya kandungan lipid didalamnya. Dalam proses sintesis biodiesel, proses ekstraksi lipid dari *Nannochloropsis* sp menjadi bagian penting. Fokus penelitian ini adalah mencari desain ekstraksi yang paling optimal mengekstraksi lipid dengan kombinasi ekstraksi antara metode Bligh Dyer dan *Osmotic Stress*. Pada ekstraksi Bligh Dyer, perlakuan *osmotic stress* dilakukan untuk merusak dinding sel mikroalga *Nannochloropsis* sp. *Osmotic stress* dilakukan dengan merendam mikroalga dalam larutan agen osmotik berkonsentrasi tinggi. Perlakuan yang divariasikan mencakup berat kering sel, waktu rendam, jenis dan konsentrasi agen osmotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat kering sel yang paling optimal digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah 0,332 g/L. Sementara itu, waktu rendam yang paling efisien adalah tiga jam. Sedangkan konsentrasi larutan agen osmotik yang paling optimal untuk tiap agen osmotik masing-masing adalah 1,5 g/L untuk glukosa, 2 g/L untuk sorbitol serta 0,5 g/L untuk NaCl.

**Kata kunci:** Bligh Dyer, ekstraksi, lipid, *Nannochloropsis* sp., *osmotic stress*

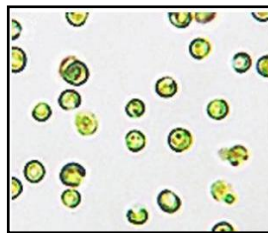
### 1 Pendahuluan

Biodiesel merupakan salah satu jenis bahan *biofuel* yang berpotensi menggantikan bahan bakar diesel dari fosil. Biodiesel merupakan bahan bakar non-toksik, *biodegradable* dan memiliki emisi gas rumah kaca yang rendah saat dibakar di mesin diesel (Demirbas, 2009). Salah satu sumber biodiesel yang berpotensi untuk menghasilkan biodiesel ini adalah mikroalga. Mikroalga mampu mengakumulasi sejumlah besar lipid dalam sel mereka, dimana lipid dapat dikonversi menjadi biodiesel. Kandungan lipid rata-rata berkisar antara 1 hingga 70%, tetapi pada kondisi tertentu beberapa spesies dapat mencapai 90% dari berat kering (Mata, Martins, & Caetano, 2010). Mikroalga yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah *Nannochloropsis* sp. *Nannochloropsis* sp. terdeteksi memiliki beberapa asam lemak seperti asam palmitat, asam oleat, asam stearat, dan asam eikosapentanoat (EPA) dengan total asam lemak jenuh mencapai 30,96% dan asam lemak tak jenuh mencapai 59,2% berat/berat ekstrak minyak (Gouveia & Oliveira, 2009).

*Nannochloropsis* sp. juga menunjukkan kandungan minyak per ton biomassa (berat % massa kering) hingga 50% (Scott et al., 2010).

Pada produksi biodiesel dari mikroalga, bagian ekstraksi merupakan bagian yang penting karena di sinilah lipid yang dibutuhkan akan diambil. Oleh karena itulah dibutuhkan metode yang efektif dan efisien untuk memperoleh lipid, salah satunya dengan melakukan perusakan dinding sel. Dalam penelitian ini dilakukan perusakan non-mekanik berupa *osmotic stress* yang memanfaatkan tekanan osmotik antara sel dengan lingkungannya.

*Osmotic stress* adalah reduksi tiba-tiba dalam tekanan osmotik yang menyebabkan sel mikroalga dalam larutan pecah atau mengkerut dan melepaskan minyak sel serta komponen lain. *Osmotic stress* cocok untuk spesies mikroalga laut yang tidak memiliki dinding sel yang tebal, misalnya *Dunaliella* sp (Gong & Jiang, 2011). Metode *osmotic stress* juga telah digunakan dalam beberapa penelitian untuk beberapa jenis mikroalga. Metode ekstraksi *osmotic stress* pada *Botryococcus* sp. menghasilkan lipid 10% dari biomassa mikroalga kering (Lee, Yoo, Jun, Ahn, & Oh, 2010). Pada *Chlorella vulgaris* dengan pelarut kloroform dan metanol, *osmotic stress* mampu mengeluarkan lipid 8% dari biomassa kering (Lee et al., 2010).



Gambar 1. *Nannochloropsis* sp.

Metode *osmotic stress* dipilih karena berdasarkan beberapa penelitian, metode ini mampu mengeluarkan lipid yang ada pada ruang periplasma mikroalga dengan *yield* yang cukup tinggi (Lee et al., 2010; Ramanan et al., 2010). Namun, metode yang dianggap memiliki biaya operasi yang rendah ini ternyata membutuhkan beberapa optimasi kondisi. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan variasi dan perlakuan tertentu agar ekstraksi dengan bantuan *osmotic stress* yang dilakukan dapat menghasilkan tingkat lipid yang tinggi dari *Nannochloropsis* sp.

Pada penelitian ini, *osmotic stress* akan dilakukan dengan pemberian agen osmotik pada *Nannochloropsis* sp. basis basah dengan kandungan air mencapai 99,7%. Pemberian agen osmotik pada mikroalga basis basah ini akan menjadikan kandungan menjadi hipertonik terhadap sel mikroalga. *Osmotic stress* akan dilakukan dengan menggunakan berbagai agen osmotik dengan variasi waktu rendam dan konsentrasi. Waktu rendam sel akan mempengaruhi lama kontak sel dengan larutan agen osmotik yang selanjutnya akan mempengaruhi banyak kandungan intrasel yang berhasil dikeluarkan. Konsentrasi agen osmotik juga akan mempengaruhi banyaknya kandungan yang berhasil dikeluarkan. *Osmotic stress* yang memanfaatkan perbedaan

tekanan osmotik sebagai *driving force* akan sangat dipengaruhi perbedaan konsentrasi di dalam sel dan di luar sel. Perbedaan konsentrasi yang terlalu rendah tidak akan mengeluarkan kandungan sel dengan optimal. Namun, perbedaan konsentrasi yang terlalu tinggi ditakutkan juga tidak mengeluarkan kandungan sel yang lebih banyak. Dari masalah ini maka akan dicari waktu rendam dan konsentrasi paling optimal untuk tiap agen osmotik pada perusakan dinding sel mikroalga. Kandungan sel yang telah berhasil dikeluarkan selanjutnya akan diekstraksi dengan metode Bligh dan Dyer untuk mengekstraksi lipid mikroalga.

*Osmotic stress* ini akan dilakukan pada mikroalga dengan berat kering yang berbeda. Variasi berat kering ini dilakukan untuk memperoleh perlakuan yang tepat pada mikroalga dengan berat kering tertentu dan untuk melihat jika terdapat perbedaan *yield* lipid yang signifikan. Hasil dari *osmotic stress* yang dilanjutkan dengan ekstraksi Bligh dan Dyer ini akan dibandingkan dengan hasil ekstraksi Bligh dan Dyer sebagai metode ekstraksi yang sudah umum dipakai pada ekstraksi mikroalga yang diawali oleh sonikasi sebagai metode perusakan dinding sel. Dengan mengetahui jenis dan konsentrasi agen osmotik serta waktu rendam yang paling efektif untuk mikroalga dengan berat kering tertentu, diharapkan akan diperoleh perlakuan metode *osmotic stress* yang mampu mengeluarkan lipid paling tinggi untuk *Nannochloropsis* sp.

## **2 Metode Penelitian**

### **2.1 Bahan**

*Starter* kultur *Nannochloropsis* sp. (diperoleh dari Balai Besar Riset dan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kementerian Kelautan dan Perikanan); Natrium klorida (Merck); D-Sorbitol (Sigma Aldrich); D-Glukosa (Merck); Kloroform, metanol, akuades (Bratachem); dan bahan kimia lain berstandar teknis atau analisis.

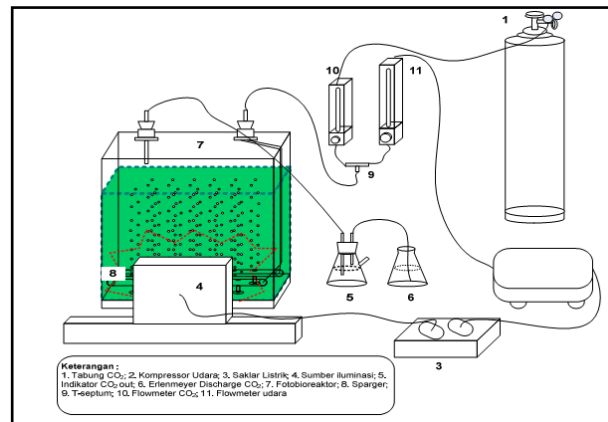
### **2.2 Sterilisasi Peralatan**

Prosedur sterilisasi peralatan dilakukan dengan mencuci peralatan dengan sabun dan dibilas dengan air sampai bersih, mengeringkan peralatan dengan tisu atau kompresor udara dan kemudian menutup peralatan yang berlubang atau berongga dengan plastik wrap agar tidak terkontaminasi setelah disterilisasi. Selanjutnya, membilas peralatan dengan alkohol 70 % selama 5 menit dan kemudian dibilas dengan air. Peralatan yang sudah disterilisasi disimpan di dalam lemari penyimpanan.

### **2.3 Perangkaian Peralatan**

Penelitian ini menggunakan fotobioreaktor berukuran 18 liter. Fotobioreaktor yang akan digunakan diletakkan dalam posisi sejajar dan menghadap ke lampu halogen sebagai sumber iluminasi. Kalibrasi *flowmeter* dilakukan agar skala dari masing-masing *flowmeter* dapat diketahui dengan tepat. Hal ini penting karena aliran gas yang mengandung CO<sub>2</sub> harus selalu dijaga konstan. Setiap sambungan selang dilapisi dengan segel pipa agar tidak ada sambungan yang bocor dan mencegah kontaminan masuk ke dalam rangkaian peralatan. Sumber iluminasi yang digunakan adalah dua

buah lampu halogen dengan kekuatan intensitas cahaya sampai 5.000 lx. Rangkaian peralatan yang digunakan diilustrasikan pada gambar 2.



**Gambar 2.** Ilustrasi Rangkaian Alat (Dianursanti, Wijanarko, & Nasikin, 2010)

#### 2.4 Kultivasi Mikroalga dan Pemanenan

Prosedur pembiakan kultur murni adalah dengan menyiapkan medium Walne juga peralatan pembiakan (wadah, selang udara, tutup wadah) yang telah disterilkan terlebih dahulu. Stok murni *Nannochloropsis* sp. dimasukkan ke dalam wadah steril dan dicampur dengan medium yang telah steril. Perbandingan antara jumlah stok mikroalga dengan medium dapat diatur sesuai kebutuhan riset. Lalu medium kultur tersebut dipindahkan ke dalam fotobioreaktor pembiakan dan di-*bubbling* dengan menggunakan kompresor udara. Pada tahap ini juga harus diberikan cahaya namun cukup dengan intensitas kecil 3,000 lx. Pembiakan dapat dilakukan selama satu minggu atau lebih bila bertujuan untuk memperbanyak stok yang ada, tetapi jika hanya untuk melewati lag time dapat dilakukan selama 2-3 hari atau 60 jam, tergantung pertumbuhan jumlah selnya. Pemanenan dilakukan dengan mendinginkan kultur mikroalga selama kurang lebih 2 hari lalu mengambil endapannya. Endapan dapat langsung diekstrak atau disimpan di lemari pendingin sebagai stok.

#### 2.5 Pengukuran Optical Density

Pengukuran *optical density* (OD) dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan sel secara umum. Dengan mengetahui nilai OD akan diketahui jika mikroalga yang dikultivasi tumbuh dengan baik atau tidak. Pertumbuhan mikroalga ditandai dengan meningkatnya nilai OD yang terukur. Nilai OD diukur setiap 6 jam hingga total waktu kultivasi selama 204 jam. Pengukuran ini memanfaatkan spektrofotometer yang diatur pada panjang gelombang 540 nm. Untuk melihat nilai OD pada penelitian ini digunakan spektrofotometer *single beam*, dan cahaya tampak (VIS) sebagai sumber cahaya yang akan diabsorpsi oleh mikroalga.

#### 2.6 Pelaksanaan Osmotic Stress

Perlakuan *osmotic stress* dilakukan dengan memberi agen osmotik pada mikroalga. Volume yang digunakan pada ekstraksi ini adalah 100 ml. 100 ml mikroalga dengan

OD yang sama dikeringkan untuk mengetahui berat kering mikroalga. Mikroalga diberi 3 jenis agen osmotik yaitu glukosa, sorbitol dan NaCl.

## 2.7 Pengaruh Kandungan Berat Kering Sel

Untuk memeriksa pengaruh berat kering sel terhadap yield lipid, tiga berat kering sel akan diberi perlakuan kejutan osmotik yang sama. Berat kering sel yang digunakan adalah 0,1 gram, 0,2 gram, dan 0,3 gram. Mikroalga basis basah ini lalu diberi agen osmotik sebanyak 0,5 M berupa glukosa lalu didiamkan selama 3 jam. Setelah 3 jam, mikroalga diekstrak dengan metode Bligh Dyer dengan memberikan kloroform, metanol, dan akuades dengan perbandingan 1:2:2:1 untuk mikroalga : methanol : kloroform : akuades. Selanjutnya fase kloroform yang berada di bawah diambil dan dikeringkan dalam cawan petri. Perbedaan massa cawan petri saat kosong dan setelah diisi kloroform adalah massa lipid kering yang diperoleh.

### 2.7.1 Pengaruh Waktu Rendam dan Agen Osmotik

Massa paling optimal pada percobaan sebelumnya digunakan untuk percobaan kali ini. Waktu rendam yang digunakan divariasikan menjadi 1, 3 dan 5 jam. Percobaan kali ini menggunakan tiga agen osmotik dengan konsentrasi yang sama. Setelah waktu rendam tertentu, mikroalga diekstrak dengan metode Bligh dan Dyer.

### 2.7.2 Pengaruh Konsentrasi Agen Osmotik

Waktu rendam paling optimal selanjutnya digunakan untuk percobaan ini. Konsentrasi yang digunakan untuk tiap agen osmotik adalah 1, 1,5, dan 2 M. Mikroalga lalu diekstrak dengan metode Bligh dan Dyer.

## 2.8 Analisis Kandungan Lipid

Pada penelitian ini, parameter yang diukur adalah *yield* lipid yang diperoleh. *Yield* lipid paling optimum kemudian dianalisis kandungan asam lemaknya untuk mengetahui jika lipid yang dihasilkan dapat dijadikan bahan baku sintesis biodiesel. Kandungan asam lemak dianalisis dengan menggunakan *Gas Chromatography and Mass Spectrophotometry* (GCMS) di Pusat Laboratorium Forensik, Markas Besar Polisi Republik Indonesia (PUSLABFOR Mabes POLRI).

## 3 Hasil dan Pembahasan

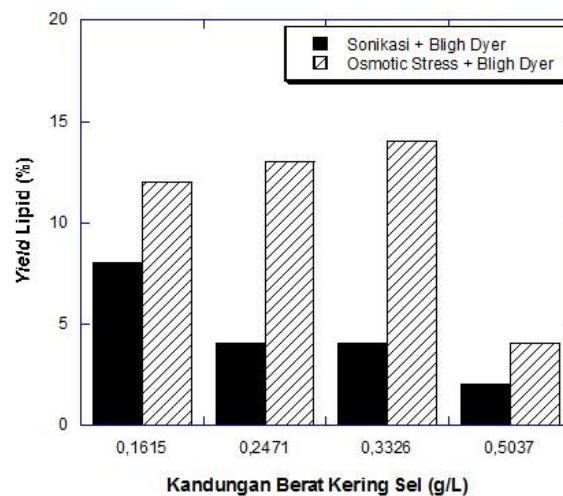
### 3.1 Pengaruh Kandungan Berat Kering Sel terhadap *Yield* Lipid

Berdasarkan grafik pada gambar 3. terlihat bahwa ekstraksi Bligh dan Dyer dengan bantuan *osmotic stress* menghasilkan *yield* lipid yang lebih besar. *Yield* lipid dari kandungan berat kering 0,1615 sampai 0,3326 g/L mencapai 4% hingga 14%. Sedangkan untuk ekstraksi dengan Bligh dan Dyer diawali sonikasi berkisar antara 2% hingga 8%.

Untuk ekstraksi Bligh dan Dyer, semakin besar kandungan berat kering sel, maka *yield* lipid yang terekstrak semakin kecil. Hal ini dapat terjadi karena pada volume biomassa yang sama terdapat jumlah sel yang berbeda. Berdasarkan perhitungan tren pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. diperoleh berat kering mikroalga yang terkandung



dalam volume tertentu. Dengan adanya jumlah sel mikroalga yang lebih besar dalam volume yang sama, diperkirakan pelarut yang digunakan tidak berhasil melarutkan semua lipid yang ada di dalam sel.



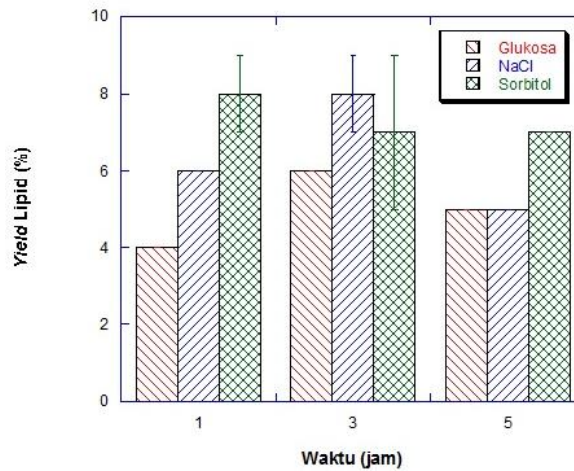
**Gambar 3.** Pengaruh Kandungan Berat Kering Sel terhadap *Yield Lipid*

Untuk perlakuan *osmotic stress* sebelum diekstraksi, *yield lipid* yang diperoleh dapat dilihat pada grafik yang sama. Dengan konsentrasi agen osmotik berupa glukosa sebesar 0,5 M Dapat terlihat bahwa *osmotic stress* berhasil mengeluarkan lipid lebih banyak untuk diekstraksi pada kandungan berat kering 0,3326 g/L. Ini berarti glukosa 0,5 M masih mampu memberi perbedaan tekanan osmotik terhadap sel dengan kandungan berat kering hingga 0,3326 g/L. Setelah mencapai berat kering 0,3326 g/L, jumlah lipid yang berhasil diekstrak menurun. Hal ini dapat terjadi diperkirakan karena kurang meratanya kontak sel dengan agen osmotik pada mikroalga berat kering 0,3326 g/L dibandingkan berat kering 0,5037 g/L. Selain itu hal ini juga dapat terjadi jika dengan lebih banyaknya lipid yang dikeluarkan oleh *osmotic stress* tetapi pelarut yang ada hanya bisa mengekstrak hingga massa lipid tertentu.

### 3.2 Pengaruh Waktu Rendam dan Agen Osmotik terhadap *Yield Lipid*

Hasil dari variasi agen osmotik dan waktu rendam dapat dilihat pada gambar 4. Dari grafik terlihat bahwa terdapat tren *yield lipid* yang berbeda untuk tiap agen osmotik, walaupun konsentrasi agen osmotik yang digunakan sama untuk semua percobaan. Hal ini menunjukkan bahwa lipid yang berhasil dikeluarkan dari sel oleh tiap agen osmotik berbeda. Hal ini dapat dipengaruhi oleh perbedaan sifat agen osmotik terhadap dinding dan membran sel mikroalga NaCl yang larut dalam air akan membentuk ion Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup>. Sedangkan glukosa dan sorbitol hanya akan larut dalam air dan tidak terpisah menjadi ion apa pun. Ion Na<sup>+</sup> dapat mengalami transfer pasif ke plasma membran karena adanya perbedaan konsentrasi. Namun, perpindahan ion ini menyebabkan berkurangnya perbedaan tekanan osmotik yang ada sehingga *osmotic stress* yang ditimbulkan tidak optimal. Sedangkan untuk glukosa dan sorbitol, tidak terjadi perpindahan agen osmotik ke plasma membran

karena sifatnya yang polar. Hal ini menyebabkan tekanan osmotik yang diberikan agen osmotik sama dari awal hingga selesai.



**Gambar 4.** Pengaruh Waktu Rendam terhadap *Yield* Lipid

Selain itu, dari grafik di atas juga terlihat bahwa waktu rendam mempengaruhi *yield* lipid. Waktu rendam akan mempengaruhi waktu kontak sel dengan agen osmotik yang ada. Waktu rendam yang lama akan memperlama waktu kontak sehingga kandungan sel yang dapat dikeluarkan menjadi lebih banyak. Namun dari grafik terlihat bahwa waktu yang lebih lama tidak selalu meningkatkan *yield* lipid. Hal ini dapat terjadi pada agen osmotik NaCl karena adanya perpindahan ion  $\text{Na}^+$  ke dalam plasma membran. Semakin lama waktu kontak, maka akan semakin banyak ion  $\text{Na}^+$  yang berpindah ke plasma membran sehingga mengurangi tekanan osmotik yang ada. Pada sorbitol dan glukosa hal ini dapat juga terjadi. Pada glukosa dapat terjadi transfer aktif dengan bantuan pembawa protein pada membran sel, walaupun kemungkinan besar jumlah molekul yang berpindah tidak besar. Pada sorbitol juga memungkinkan adanya perpindahan molekul sorbitol ke dalam sel. Hal ini pernah diteliti oleh Siebens AW dan Spring KR (1989) bahwa terdapat mekanisme transfer sorbitol pada sel *renal papillary* epitel. Hal yang serupa juga pernah diteliti oleh Grunewald RW (2001) bahwa sorbitol mengalami transfer pada sel *renal interstitial*.

### 3.3 Pengaruh Konsentrasi Agen Osmotik terhadap *Yield* Lipid

Dari gambar 5 terlihat bahwa tren untuk tiap agen osmotik kembali berbeda. Konsentrasi yang semakin tinggi akan meningkatkan perbedaan tekanan osmotik sehingga menghasilkan *osmotic stress* yang semakin besar. Hal ini sesuai dengan persamaan Van't Hoff berikut:

$$\Pi = cRTi \quad (1)$$

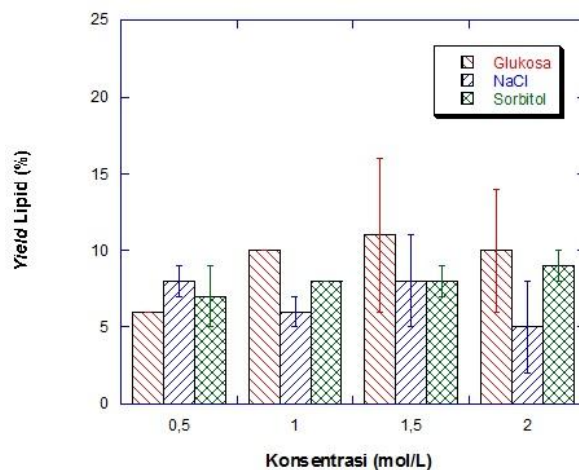
dengan  $\Pi$ : tekanan osmotik

$c$  : konsentrasi

$R$  : konstanta gas molar (8,314 J/K mol)

$i$  : faktor Van't Hoff

Pada NaCl, NaCl terdisosiasi menjadi ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$ . Nilai faktor Van't Hoff sebanding dengan jumlah ion yang menjadi hasil disosiasi. NaCl memiliki nilai faktor Van't Hoff sebesar 2. Sedangkan glukosa dan sorbitol memiliki faktor Van't Hoff sebesar 1. Dengan konsentrasi yang diperlakukan sama selama percobaan, konsentrasi yang lebih besar pada NaCl seharusnya memberi tekanan osmotik yang lebih besar dibandingkan glukosa dan sorbitol. Namun, hal ini tidak terjadi. NaCl menghasilkan *yield* lipid paling kecil dibandingkan agen osmotik yang lain, bahkan terus turun dengan meningkatnya konsentrasi. Hal ini dapat terjadi karena tidak semua NaCl berdisosiasi menjadi sepenuhnya dua mol ion. Bahkan beberapa ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  beresosiasi dengan cepat kembali menjadi NaCl dan hal ini semakin mungkin terjadi pada konsentrasi yang lebih besar (Brown, LeMay, & Bursten, 2002). Beresosiasinya NaCl ini akan mengurangi ion terlarut dan faktor Van't Hoff NaCl yang selanjutnya mempengaruhi tekanan osmotik yang diberikan. Oleh karena itulah semakin besar konsentrasi NaCl, semakin kecil *yield* lipid yang dihasilkan.



Gambar 5. Pengaruh Konsentrasi Agen Osmotik terhadap *Yield* Lipid

Tabel 1. Hasil Analisis Kualitatif GCMS

Jenis Asam Lemak	Persen dari Total Asam Lemak
2-Asam propenoat	8,93
Asam heksadekanoat	16,53
9,12-Asam oktadekadinoat	66,22
9,12,15-Asam oktadekatrinoat	8,32
Total	100

Sedangkan pada sorbitol dan glukosa hal yang terjadi tidak seperti pada NaCl. Sorbitol dan glukosa terlarut tetapi tidak berubah menjadi ion. Diperkirakan terlalu banyaknya sorbitol dan glukosa ini menyebabkan berkurangnya kontak kloroform dengan lipid sehingga lipid yang berhasil diekstrak menjadi lebih sedikit.



### 3.4 Hasil Analisis Kualitatif GCMS

Berdasarkan analisis GCMS, diketahui lipid yang berhasil diekstrak memiliki beberapa asam lemak. Asam lemak yang terdeteksi antara lain dapat dilihat pada tabel di bawah ini. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa lipid yang diperoleh dari ekstraksi ini mengandung beberapa senyawa asam lemak yang nantinya dapat ditransesterifikasi untuk menjadi biodiesel. Asam lemak yang ada pada Tabel 1. adalah asam lemak tak jenuh yang cocok untuk dijadikan bahan baku sintesis biodiesel untuk tempat beriklim dingin.

## 4 Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan berat kering sel yang paling optimal untuk diberi *osmotic stress* dan dilanjutkan dengan ekstraksi Bligh dan Dyer adalah 0,3326 g/L. Sementara itu, waktu rendam yang paling efisien dalam mengeluarkan lipid untuk tiap agen osmotik adalah tiga jam. Sedangkan konsentrasi larutan agen osmotik yang paling optimal mengeluarkan lipid untuk tiap agen osmotik adalah 1,5 g/L untuk glukosa, 2 g/L untuk sorbitol serta 0,5 g/L untuk NaCl.

## 5 Ucapan Terima Kasih

Kami ucapkan terima kasih pada pihak Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian melalui program PKMP dan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (BOPTN).

## 6 Daftar Pustaka

- Brown, T. L., LeMay, H. E., & Bursten, B. E. (2002). *Chemistry: The Central Science* (10 ed.): Prentice Hall.
- Demirbas, A. (2009). Progress and recent trends in biodiesel fuels. *Energy Conversion and Management*, 50, 14-34.
- Dianursanti, Wijanarko, A., & Nasikin, M. (2010). NO<sub>x</sub> Enriched Flue Gas Fixation for Biomass Production of *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. *Asean Journal of Chemical Engineering*, 10(1), 14-20.
- Gong, Y., & Jiang, M. (2011). Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnol Lett*, 33, 1269-1284.
- Gouveia, L., & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36, 269-274.
- Lee, J. Y., Yoo, C., Jun, S. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2010). Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, 101.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217-232.

- Ramanan, R. N., Tan, J. S., Mohamed, M. S., Ling, T. C., Tey, B. T., & Ariff, A. B. (2010). Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon-  $\alpha$  2b from *Escherichia coli* using response surface method. *Process Biochemistry*, 45, 196-202.
- Scott, S. A., Davey, M. P., Dennis, J. S., Horst, I., Howe, C. J., Lea-Smith, D. J., & Smith, A. G. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 277-286.

