



seperti omega 3 dan omega 6. Asam lemak esensial berperan dalam tumbuh kembang sel-sel neuron otak untuk penghantaran *impuls* saraf (Diana, 2013).

Pada saat ini, sumber omega 3 dan omega 6 yang paling umum dikonsumsi adalah minyak ikan. Namun minyak ikan sebagai sumber asam lemak esensial memiliki keterbatasan seperti pencemaran logam berat, sumber daya ikan yang akan menurun dimasa mendatang, harga komoditas yang relatif mahal dan ketersediaannya yang sangat bergantung dengan musim (Tidwell dan G.L. Allan, 2001). Sementara itu, permintaan minyak ikan terus mengalami peningkatan. Menurut *Food and Agriculture Organization United Nations* (2011), diprediksi pada tahun 2020, permintaan minyak ikan akan mencapai 104,48% dari kapasitas produksi global.

Untuk mengatasi keterbatasan sumber asam lemak, diperlukan sumber alternatif asam lemak. Saat ini telah banyak penelitian mengenai pemanfaatan mikroorganisme untuk menghasilkan asam lemak. Penggunaan mikroorganisme sebagai sumber alternatif asam lemak memiliki berbagai keuntungan diantaranya waktu yang dibutuhkan dalam menghasilkan asam lemak relatif singkat, tidak memerlukan lahan yang luas, pekerja yang dibutuhkan sedikit dan mudahnya dalam melakukan *scale up* (Bayizit, 2014). Sumber alternatif asam lemak, salah satunya yaitu *fungi* (kapang). Penggunaan kapang sebagai sumber alternatif asam lemak memiliki berbagai kelebihan yaitu lebih mudah dalam penanganan, dapat tumbuh pada pH rendah, dapat mendegradasi sumber karbon yang kompleks dan mampu tumbuh cepat pada limbah (Ratledge dan Wilkinson, 1988).

Penggunaan mikroorganisme dalam produksi asam lemak sangat dipengaruhi oleh kondisi kultur seperti suhu dan pH. Suhu berperan penting terhadap perubahan komposisi asam lemak dari mikroorganisme *oleaginous* (Sumanti et al., 2003), sementara pH berperan dalam pertumbuhan sel dan pembentukan produk (Amanullah et al., 2001).

Penelitian ini mengkaji suhu dan pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Aspergillus oryzae* dalam menghasilkan asam lemak tak jenuh dengan menggunakan metode *submerged fermentation* dan ekstraksi sonikasi dengan pelarut etanol.

## **2.0 Metodologi**

### **2.1 Medium Onggok dan Ampas Tahu**

Medium berupa limbah onggok dan ampas tahu didapatkan dari industri tapioka dan industri tahu yang berada di Bogor. Limbah tersebut dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 60<sup>o</sup>C, kemudian dihaluskan hingga membentuk tepung.

Pengujian kadar karbon dan nitrogen dilakukan pada limbah onggok dan ampas tahu yang sudah kering. Pengujian kadar karbon dilakukan dengan menggunakan metode Walkey dan Black, sedangkan pengujian nitrogen menggunakan metode Kjeldal.

### **2.2 Mikroorganisme dan Kultur Medium PDA**

*Strain Aspergillus oryzae* didapatkan dari *Indonesian Culture Collection* (InaCC) dan disimpan didalam medium PDA pada suhu 4<sup>o</sup>C. *Strain Aspergillus oryzae* dikultur kembali dalam medium PDA dengan menggunakan metode agar miring pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama 3 hari pada suhu 25<sup>o</sup>C.

### **2.3 Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

*Aspergillus oryzae* yang terdapat pada medium PDA dipindahkan kedalam medium cair 100 mL dengan menggunakan metode *submerged fermentation*. Kapang dikultur pada kondisi C:N 30: 1, pH 6, agitasi sebesar 120 rpm dan suhu ± 30<sup>o</sup>C, dengan waktu inkubasi

yang berbeda-beda yaitu berkisar 1-6 hari. Proses inkubasi dilakukan didalam *shaker waterbath* Memmert WNB14L4. Medium yang digunakan berasal dari onggok dan ampas tahu serta dilengkapi oleh nutrisi tambahan seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Nutrisi tambahan

Senyawa	Bahan	Komposisi
Buffer	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2
Mikronutrien	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7$	0,1
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7$	0,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot 2$	0,001
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5$	0,005

Sumber: Bayizit et al., 2014

#### 2.4 Kultur pada Medium 100 mL

*Aspergillus oryzae* dikultur dengan medium yang sama seperti pada tahap sebelumnya, dengan variasi suhu (25, 28, 30, 35°C), C:N 30: 1, pH 6, agitasi sebesar 120 rpm dan dilakukan berdasarkan waktu optimum yang didapatkan dari kurva pertumbuhan. Kondisi suhu yang memberikan *yield* lipid optimum, digunakan pada tahap kultur dengan kondisi variasi pH medium (4,5,6, dan 7), C:N 30: 1, agitasi sebesar 120 rpm dan dilakukan berdasarkan waktu optimum yang didapatkan dari kurva pertumbuhan. Variasi pH dilakukan dengan menambahkan HCl 1 N dan NaOH 1 N.

#### 2.5 Pemanenan

Biomassa yang terdapat pada medium cair disaring dengan menggunakan kertas saring dan kemudian dibilas dengan air steril. Biomassa dikeringkan pada oven dengan suhu 60°C hingga berat biomassa konstan.

Ekstraksi lipid yang terdapat pada biomassa dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi sonikasi dengan pelarut etanol. Etanol ditambahkan ke dalam biomassa dengan rasio 15:1 dan kemudian disonikasi dengan *ultrasonic cleaner* Elma S30H selama 3 jam pada suhu 45°C (Saxena et al., 2011). Sentrifugasi dilakukan pada *centrifuge* Hanil MF 50 selama 5 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Pada proses sentrifugasi, lipid akan berada pada fasa etanol. Selanjutnya, dilakukan evaporasi untuk menghilangkan etanol, sehingga didapatkan lipid.

#### 2.6 Analisis Kandungan Asam Lemak

Analisis dilakukan dengan mengubah lipid menjadi Fatty Acid Methyl Ester (FAME). FAME dianalisis dengan menggunakan GC Shimadzu tipe 2010 dengan *Flame Ionization Detector* (FID) dan *split injection*. untuk mengetahui kandungan dan konsentrasi asam lemak tak jenuh berupa MUFA, PUFA, serta  $\omega$ -3,  $\omega$ -6,  $\omega$ -9. Analisis tersebut dilakukan di Balai Besar Industri Agro (BBIA), Bogor.

### 3.0 HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1 Analisis Mutu Limbah Onggok dan Ampas Tahu

Pengujian mutu limbah onggok dan ampas tahu, melalui kandungan karbon dan nitrogen dilakukan pada tempat yang berbeda. Pengujian kadar karbon dilakukan di

Laboratorium Rekayasa Bioproses Departemen Teknik Kimia FTUI, sedangkan pengujian nitrogen dilakukan di Balai Besar Industri Agro (BBIA). Hasil pengujian kadar karbon dan nitrogen pada limbah ongkok dan ampas tahu tertera pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Kadar Karbon dan Nitrogen pada Ongkok dan Ampas Tahu

Bahan Dasar	Kadar C (%)	Kadar N (%)
Ongkok	30,25	0,2
Ampas Tahu	26,5	3

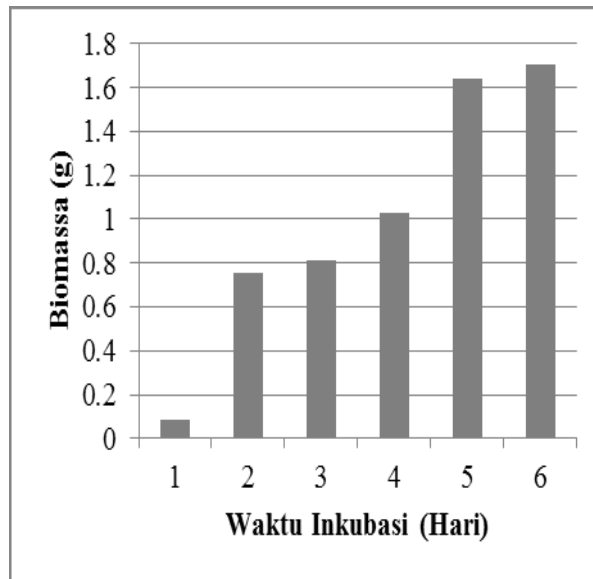
Pada hasil pengujian tersebut diketahui bahwa ongkok dan ampas tahu memiliki kadar karbon yang lebih besar daripada kadar nitrogennya. Kadar karbon pada ongkok lebih besar daripada kadar karbon pada ampas tahu, sedangkan kadar nitrogen pada ampas tahu jauh lebih besar dibandingkan dengan kadar nitrogen pada ongkok. Ampas tahu sebenarnya memiliki kadar karbon yang cukup besar dan berpotensi sebagai sumber karbon, namun menurut Rita (1997) bahwa karbon pada ampas tahu sebagian besar berasal dari pati dan serat kasar yang lebih sulit oleh mikroorganisme digunakan sebagai sumber karbon (Sumanti et al., 2003). Dari pemaparan tersebut, dapat diketahui bahwa ongkok berfungsi sebagai sumber karbon pada medium, sedangkan ampas tahu berfungsi sebagai sumber nitrogen pada medium.

### 3.2 Kurva Pertumbuhan *A. oryzae*

Pemanenan kapang dilakukan selama 24 jam sekali dalam 6 hari. Pola pertumbuhan kapang dapat diketahui melalui pengukuran berat kering biomassa seperti yang tertera pada Gambar 1.

Pada Gambar 1, diketahui bahwa pertumbuhan kapang terdiri dari fase lag, log dan stasioner. Kapang memasuki fase lag pada hari pertama, dimana kapang berada dalam kondisi adaptasi dengan lingkungan barunya dan pertumbuhan kapang masih sangat lambat (Doran, 1995). Pada hari ke-2 sampai memasuki hari ke-5, kapang memasuki fase log, dimana kapang tumbuh dengan sangat pesat yaitu dengan bertambah banyaknya filamen atau gumpalan putih kecoklatan yang terbentuk pada medium. Pada hari ke-5 dan ke-6, kapang mulai memasuki fase stasioner, dimana pertumbuhan kapang mulai mengalami perlambatan dan tidak terjadi penambahan biomassa secara signifikan. Berdasarkan kurva pertumbuhan tersebut, hari ke-5 merupakan waktu terbaik untuk pemanenan kapang.





Gambar 1. Kurva pertumbuhan *A. oryzae*

### 3.3 Pengaruh Suhu Inkubasi

#### 3.3.1 Pertumbuhan Kapang pada Variasi Suhu

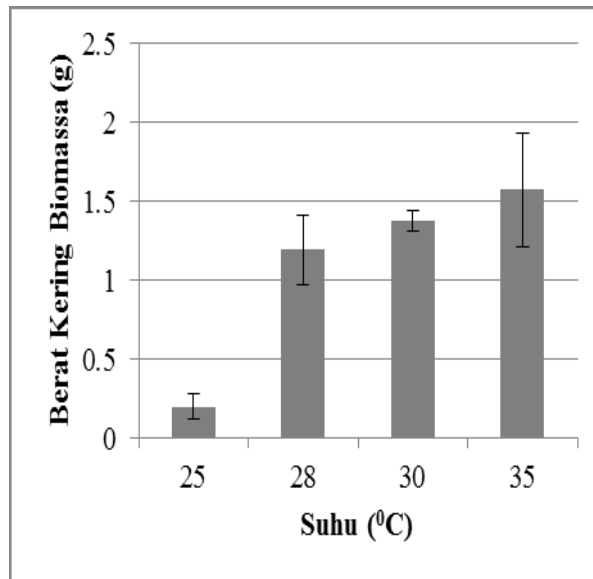
Pada penelitian ini, pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan kapang dapat diketahui dengan menggunakan berat biomassa kering. Kapang dikultur pada beberapa kondisi suhu inkubasi yaitu 25°C, 28°C, 30°C dan 35°C. Hal tersebut disebabkan pada 35-40°C pertumbuhan kapang akan terhambat dan pada 45°C kapang tidak mengalami pertumbuhan (Ali dan Dina, 2014). Pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan kapang dapat dilihat pada Gambar 2.

Pada Gambar 2, kapang mengalami pertumbuhan seiring dengan bertambahnya suhu inkubasi. Pada suhu 25°C, pertumbuhan kapang cenderung sangat lambat. Hal tersebut dapat dilihat dari berat kering biomassa yang sedikit. Suhu inkubasi yang relatif rendah dapat memperlambat pertumbuhan sel (Liang et al., 2012). Pada suhu 35°C, jumlah biomassa lebih banyak dibandingkan dengan suhu lainnya yaitu sebesar 15,75 g/L. Pada suhu yang lebih tinggi, waktu yang dibutuhkan untuk mencapai biomassa dalam jumlah yang maksimum lebih singkat (Ganggang et al., 2015). Tingginya temperatur dapat mempercepat laju metabolisme, sehingga menghasilkan pembelahan sel yang lebih cepat dan berdampak pada fase lag dan log berjalan lebih singkat (Ganggang et al., 2015).

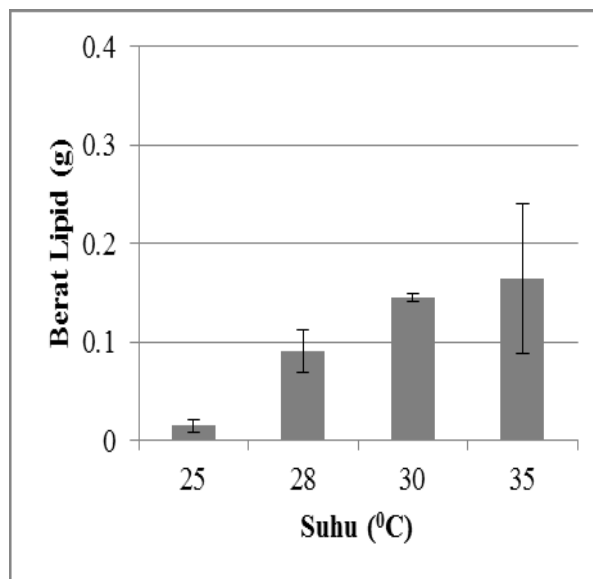
#### 3.3.2 Produksi Lipid pada Variasi Suhu

Produksi lipid pada kapang dapat diketahui dengan menggunakan berat lipid yang terbentuk selama masa inkubasi. Profil produksi lipid pada beberapa kondisi suhu dapat dilihat pada Gambar 3.

Pada Gambar 3, produksi lipid berkisar antara 0,15 – 1,6 g/L, dengan *yield* lipid berkisar antara 7,37 – 10,63 %. Produksi lipid terbesar terjadi pada suhu inkubasi 35°C.



Gambar 2. Pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan *A. oryzae*



Gambar 3. Pengaruh suhu inkubasi terhadap produksi lipid dari *A. oryzae*

Suhu 35°C merupakan suhu optimum untuk pertumbuhan kapang dan produksi lipid dibandingkan suhu lainnya. Produksi lipid yang tinggi pada suhu ini terjadi karena laju metabolisme yang cenderung bekerja lebih cepat pada keadaan suhu yang lebih tinggi (Ganggang et al., 2015). Kapang akan mencapai biomassa dalam jumlah maksimal dengan waktu yang lebih singkat, sehingga kapang akan lebih optimal dalam mengonsumsi karbon yang masih tersedia di dalam medium untuk mengakumulasi lipid di dalam selnya.

### 3.3.3 Analisis Kandungan Asam Lemak

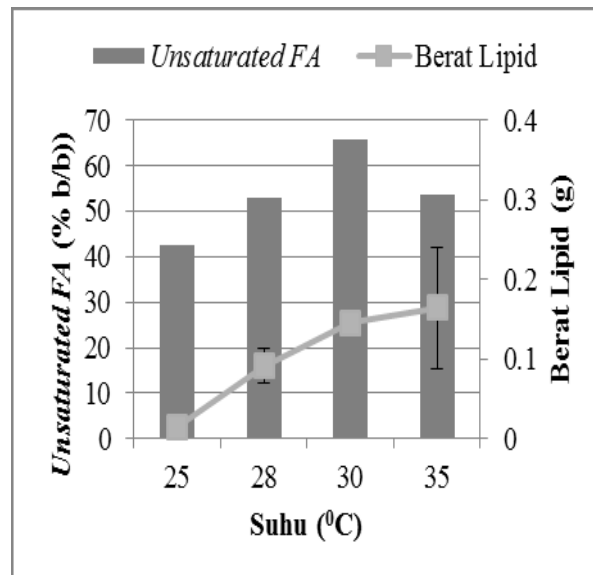
Untuk mengetahui pengaruh suhu inkubasi terhadap kandungan asam lemak tak jenuh yang terdapat pada lipid, dilakukan pengujian dengan menggunakan GC di Balai Besar Industri Agro (BBIA). Komposisi asam lemak pada variasi suhu inkubasi dapat dilihat pada

Tabel 3.

**Tabel 3.** Komposisi asam lemak pada variasi suhu

Komposisi Asam Lemak	Suhu (°C)			
	25	28	30	35
Asam Lemak Jenuh (% b/b)				
Laurat	4,54	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>
Miristat	3,91	1,17	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>
Palmitat	26,5	27,1	26,1	27,4
Stearat	22,7	18,8	18	19,1
Asam Lemak Tak Jenuh (% b/b)				
Oleat	1,38	1,61	1,28	1,74
Linoleat	41,1	51,4	53,9	51,8
γ Linolenat	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>	10,7	<i>n. d<sup>a</sup></i>

Keterangan: *n. d<sup>a</sup>* (not determined)



**Gambar 4.** Konsentrasi asam lemak tak jenuh dan berat lipid pada variasi suhu

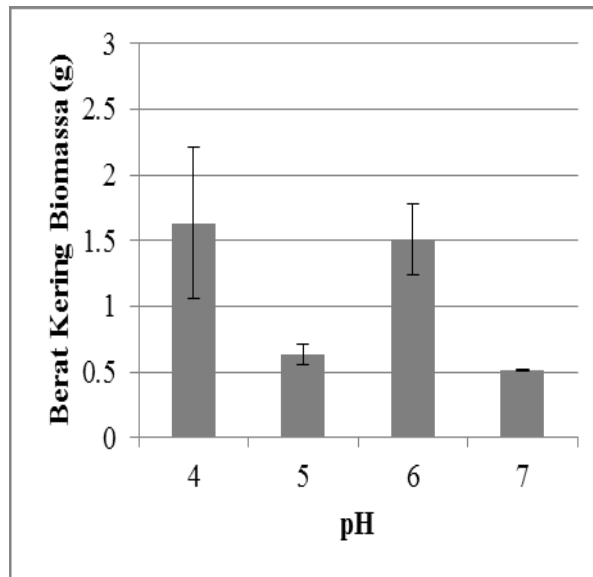
Pada Gambar 4, menunjukkan bahwa konsentrasi asam lemak tak jenuh meningkat dari suhu 25-30°C dan mengalami penurunan pada suhu 35°C. Konsentrasi asam lemak tak jenuh tertinggi diperoleh sebesar 65,88% atau setara dengan 0,69 g/L.. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam lemak tak jenuh paling mendominasi pada suhu 30°C. Produksi lipid optimal terjadi pada suhu 35°C, namun konsentrasi asam lemak tak jenuh tertinggi didapatkan pada kondisi suhu yang lebih rendah yaitu pada suhu inkubasi 30°C. Pada suhu yang lebih rendah, aktivitas enzim desaturase yang berperan dalam pembentukan ikatan rangkap mengalami peningkatan, namun pada kondisi tersebut pertumbuhan sel mengalami penurunan (Liang et al., 2012), yang berdampak pada produksi lipid yang menurun.

### 3.4 Pengaruh pH Medium

#### 3.4.2 Pertumbuhan Kapang pada Variasi Ph

Kapang dikultur pada kondisi pH yang sedikit asam sampai dengan netral. Hal tersebut dikarenakan pertumbuhan kapang akan terhambat apabila dilakukan kultur pada kondisi basa (Mishra dan Firoz, 2015). Oleh karena itu, variasi pH pada penelitian ini diatur pada 4, 5, 6 dan 7. Nilai pH tersebut merupakan nilai pH awal inkubasi. Pengambilan data dilakukan dengan dua kali pengulangan. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan kapang dapat dilihat pada Gambar 5.

Pada Gambar 5, dapat diketahui bahwa pada kondisi yang lebih asam, pertumbuhan kapang cenderung lebih cepat, seperti yang terjadi pada pH 4 dan 6. Nilai biomassa pada pH 4 dan 6 menunjukkan hasil yang cenderung sama yaitu sekitar 15 g/L. Dari gambar tersebut dapat dikatakan bahwa kisaran pH optimum kapang *Aspergillus oryzae* pada penelitian ini yaitu pada pH 4-6. *Fungi* lebih baik pertumbuhannya jika berada pada kondisi yang asam yaitu pada pH 4-6, dimana fotosintesis juga terjadi pada kondisi sedikit asam (J.L. Ingraham et al., 1983).



Gambar 5. Pengaruh pH Medium Terhadap Pertumbuhan *A. Oryzae*

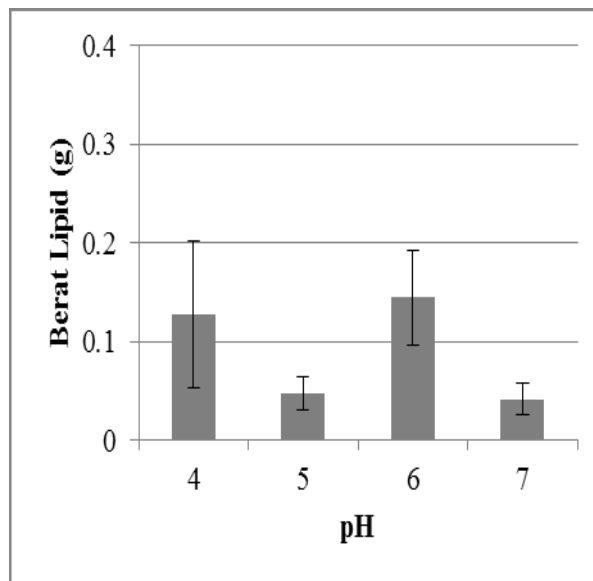
Pada Gambar 5, terlihat bahwa eror yang cukup besar terjadi pada pH 4. Hal ini diduga dipengaruhi oleh adanya metabolisme sekunder berupa terbentuknya asam organik, yang ditandai dengan warna medium yang berbeda dengan warna medium pada kondisi normal. Adanya kandungan asam organik dapat diketahui oleh perubahan warna dan rasa (Hassan et al., 2015). Asam tersebut dapat menurunkan pH pada medium kultur. Penurunan pH secara drastis dapat bersifat membahayakan bagi kapang yaitu dengan terganggunya membran plasma dan aktivitas enzim (J.L. Ingraham et al., 1983). Terbentuknya metabolisme sekunder diduga juga terjadi pada pH 5, ditandai dengan warna medium yang berubah menjadi putih pucat yang menyebabkan biomassa kapang turun drastis dari pada pH sebelumnya. Akibat terbentuknya metabolisme sekunder terhadap pH medium, juga terjadi pada penelitian Li et al. (2006), dimana metabolisme sekunder menyebabkan menurunnya pH medium pada kultivasi kapang *Arthrinium c.f. saccharicola* selama > 5 hari dan berdampak pada pertumbuhan kapang.



### 3.4.3 Produksi Lipid pada Variasi pH

Produksi lipid pada kapang dapat diketahui dengan menggunakan berat lipid yang terbentuk selama masa inkubasi. Profil produksi lipid pada beberapa kondisi pH dapat dilihat pada Gambar 6.

Pada Gambar 6, diketahui bahwa berat lipid yang dihasilkan pada penelitian ini sekitar 0,4-1,4 g/L, dengan *yield lipid* 7,42-9,46%. Lipid dengan jumlah maksimum terbentuk pada pH 4 dan 6. pH 4-6 merupakan pH optimum untuk pertumbuhan kapang (J.L. Ingraham et al., 1983). Kondisi tersebut merupakan kondisi yang sesuai untuk pembentukan kompleks enzim



Gambar 6. Pengaruh pH medium terhadap produksi lipid dari *A. oryzae*

substrat, yang menyebabkan aktivitas enzim berjalan optimum. Pembentukan lipid oleh kapang sangat dipengaruhi oleh aktivitas enzim seperti enzim FAS (*Fatty Acid Synthase*), enzim desaturase dan elongase.

Lipid mengalami penurunan pada pH 5. Hal tersebut disebabkan oleh sedikitnya biomassa yang terbentuk, dibandingkan dengan pH 4 dan 6. Jumlah biomassa yang dapat dihasilkan selama masa inkubasi, dapat mempengaruhi akumulasi lipid. Jumlah kapang dapat mempengaruhi jumlah karbon yang dapat dikonsumsi dan selanjutnya karbon tersebut akan dikonversi menjadi lipid di dalam sel kapang.

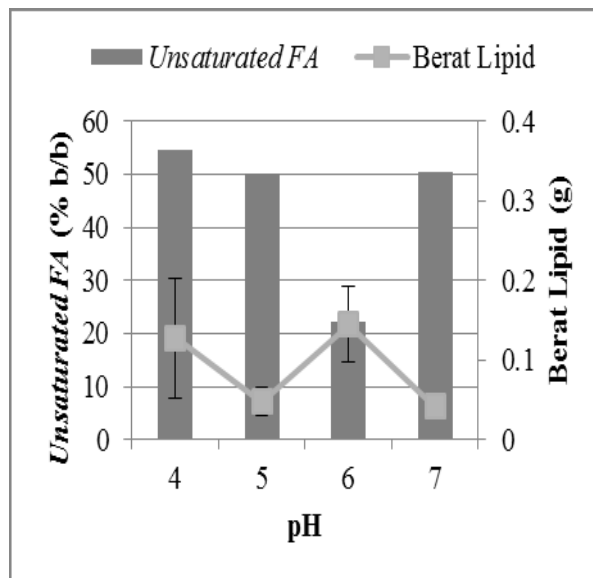
### 3.4.4 Analisis Kandungan Asam Lemak

Tabel 4. Komposisi asam lemak pada variasi pH

Komposisi Asam Lemak	pH			
	4	5	6	7
Asam Lemak Jenuh (% b/b)				
Laurat	0,44	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>	<i>n. d<sup>a</sup></i>
Miristat	1,16	<i>n. d<sup>a</sup></i>	0,54	<i>n. d<sup>a</sup></i>
Palmitat	18,3	29	11,8	31

Stearat	15,7	20,9	65,6	18,6
Asam Lemak Tak Jenuh (% b/b)				
Oleat	1,84	1,66	0,8	2,2
Linoleat	52,6	48,4	21,3	48,1
γ Linolenat	n. d <sup>a</sup>	n. d <sup>a</sup>	n. d <sup>a</sup>	n. d <sup>a</sup>

Keterangan: n. d<sup>a</sup> (not determined)



Gambar 7. Konsentrasi Asam Lemak Tak Jenuh dan Berat Lipid pada Variasi pH

Tabel 4. tersebut menunjukkan bahwa lipid yang diproduksi terdiri dari asam lemak jenuh dengan jenis laurat, miristat, palmitat dan stearat, serta asam lemak tak jenuh dengan jenis oleat (omega 9) dan linoleat (omega 3). Konsentrasi asam lemak tak jenuh yang dapat dihasilkan pada percobaan ini yaitu sebesar 22,1-54,44%. Konsentrasi asam lemak tak jenuh tertinggi terjadi pada pH 4 dan hasil terendah terjadi pada pH 6. pH 7 menghasilkan konsentrasi asam lemak tak jenuh yang cukup tinggi, namun pada kondisi tersebut menghasilkan lipid yang rendah.

Konsentrasi asam lemak tak jenuh tertinggi yang terjadi pada pH 4 yaitu sebesar 54,44% atau setara dengan 0,71 g/L. Konsentrasi asam lemak yang tinggi disebabkan oleh adanya aktivitas enzim yang berkerja secara optimum. Biosintesis asam lemak menggunakan kompleks multi enzimatik FAS (*Fatty Acid Synthase*) (Martinez et al., 2015). Biosintesis menghasilkan pembentukan asam lemak jenuh C16 atau C18, dan kemudian asam lemak dimodifikasi oleh enzim desaturase dan elongase membentuk beragam PUFAs (*Poly Unsaturated Fatty Acids*) (Martinez et al., 2015). Pada pH yang cenderung asam yaitu pH 6, konsentrasi asam lemak tak jenuh yang terbentuk rendah. Kondisi ini sesuai untuk aktivitas enzimatik, namun tidak semua enzim yang bekerja secara optimal. Hal tersebut disebabkan oleh aktivitas enzim FAS untuk membentuk asam lemak jenuh, namun aktivitas enzim tersebut tidak diikuti secara optimal oleh enzim desaturase dan elongase, sehingga asam lemak jenuh yang sudah terbentuk tidak semuanya diubah menjadi asam lemak tak jenuh.



#### 4.0 KESIMPULAN

Kondisi optimal dalam produksi asam lemak tak jenuh dengan menggunakan *Aspergillus oryzae* telah diobservasi. Konsentrasi asam lemak tak jenuh dari *Aspergillus oryzae* tertinggi didapatkan pada suhu inkubasi 30°C dengan lipid sebesar 1,4 g/L yang terdiri dari 65,88 % dengan 1,28% MUFA dan 64,6% PUFA atau 1,28% oleat, 53,9% linoleat and 10,7% gamma linolenat, serta pH 4 menghasilkan asam lemak tak jenuh tertinggi dengan lipid sebesar 1,27 g/L yang terdiri dari 54,44% dengan 1,84% MUFA dan 52,6% PUFA atau 1,84% oleat and 52,6% linoleat. Dengan demikian, *Aspergillus oryzae* berpotensi sebagai sumber alternatif asam lemak tak jenuh.

#### Daftar Pustaka

- Ali dan Dina H. El-Gonemy. 2014. "Optimization of culture conditions for the highest lipid production from some oleaginous fungi for biodiesel preparation" *Asian Journal Applied Sciences*, 2: 600-609.
- Amanullah, A., Mc Farlane C.M., Emery A.N., & Nienow A.W. 2001. "Scale-down model to simulate spatial pH variations in large-scale bioreactors" *Biotechnol Bioeng.* 73: 390–399.
- Bayazit, A., Tulay Ozcan, Lutfiye Yilmaz-Ersan & Fikri Basoglu. 2014. "Single cell oil (SCO) production by *Fusarium species* using cheese whey as a substrate" *Mljekarstvo.* 64(2): 111-118.
- Bayazit, A. A. 2014. "Fungal lipids: The biochemistry of lipid accumulation" *International Journal of Chemical Engineering dan Application.* 5(5): 409-414.
- Diana, Fivi M. 2013. "Omega 3 dan kecerdasan anak" *Jurnal Kesehatan Masyarakat.* V 7(2): 82-88.
- Doran, Pauline M. 1995. *Bioprocess engineering principles.* Elsevier Science & Technology Books. Sydney.
- FAO. 2011. *OECD-FAO agricultural outlook 2011-2020.* [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/newsroom/docs/Outlookflyer.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Outlookflyer.pdf). 22 Juni 2016.
- Ganggang, Zhengbing Guan, Feixiang Liu, Xiangru Liao, & Yujie Cai. 2015. "Arachidonic acid production by *Mortierella alpina* using raw crop materials" *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 14(2): 133-143.
- Hassan, Sherif El-Kadi & Mostafa Sand. 2015. "Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production" *International Journal of Advances Biology.* 2(1): 1-11.
- J. L. Ingraham, O. Maaløe, & F. C. Neidhardt. 1983. *Growth of bacterial cell.* Sinauer. Sunderland Mass.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013.* <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatanindonesia/profil-kesehatan-indonesia-2013.pdf>. 4 Juli 2015.
- Li, M., Theresa F. N. Kwong, & Pei-Yuan Qian. 2006. "Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium c.f. saccharicola*" *Applied Microbial and Cell Physiology.* 72: 1063-1073.
- Liang, Y., Zhao, X., Strait, M., & Wen, Z. 2012. "Use of drymilling derived thin stillage for producing eicosapentaenoic acid (EPA) by the fungus *Pythium irregular*" *Biores. Technol.* 111: 404–409.

- Martinez, E. J., Vijaya Raghavan, Fernando González-Andrés & Xiomar Gómez. 2015. "New biofuel alternatives: Integrating waste management and single cell oil production, *International Journal of Molecular Sciences*" 16: 9385-9405.
- Mishra, P.K., and Firoz Naem Khan. 2015. "Effect of different growth media and physical factors on biomass production of *Trichoderma Viride*" *People's Journal of Scientific Research*. 8(2): 11-16.
- Ratledge, C. Dan Wilkinson, S.G. 1988. *Microbial lipid* Vol. 2. Academic Press. London.
- Saxena, D.K., S.K. Sharma, & S. S. Sambhi. 2011. "Comparative extraction of cottonseed oil by n-hexane and ethanol" *ARPJ Journal of Engineering and Applied Sciences*. 9(1): 84-89.
- Sumanti, Debby M, Carmencita Tjahjadi, MarleenHerudiyanto, & Tati Sukarti. 2005. Mempelajari mekanisme produksi minyak sel tunggal dengan sistem fermentasi padat pada media onggok-ampas tahu dengan menggunakan kapang *Aspergillus terreus*. Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran: 1-116.
- Tidwell, J.H. and G.L. Allan. 2001. "Fish as food: Aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contribution of fish farming and capture fisheries" *EMBO Reports*. 2: 958-963.

