

Pengaruh Jenis Pelarut Pada Ekstraksi Asam Lemak Dari Mikroalga

Surani¹, dan Cahyo Puji Asmoro²

¹Laboratorium Kimia Instrumen, Departemen Pendidikan Kimia, Universitas Pendidikan Indonesia

²Laboratorium Bumi dan Antariksa, Departemen Pendidikan Fisika, Universitas Pendidikan Indonesia

Email : suranihendra@upi.edu

Abstrak

Mikroalga merupakan mikroorganisme penghasil lipid yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif bahan baku pembuatan biodiesel. Salah satu tahapan yang dilakukan untuk memperoleh bahan baku biodiesel dari mikroalga adalah ekstraksi asam lemak. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis pelarut yang paling baik untuk mengekstraksi asam lemak dari mikroalga. Metode ekstraksi yang digunakan adalah sonikasi dengan variasi lama waktu 30,60 dan 90 menit yang kemudian diteruskan dengan maserasi selama 24 jam. Jenis pelarut yang digunakan adalah heksan, metanol dan kloroform. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kadar asam lemak sebanyak 11.95 % (hexana), 7.47 % (methanol) dan 1.98 % (kloroform). Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa pelarut yang paling baik adalah heksan.

Kata kunci: Pemecahan dinding sel, ekstraksi asam lemak, Nannochloropsis

Abstract

Microalgae are lipid-producing microorganisms that have the potential to be developed as an alternative raw material for biodiesel production. To become biodiesel raw material, several stages of treatment must be carried out. One of the treatments that must be done is to extract the fatty acids contained in the microalgae. In this study, we wanted to find out which type of solvent was the best for extracting fatty acids from microalgae nanochloropsis. The extraction method used was sonication with variations in the length of time 30,60 and 90 minutes, then continued with maceration for 24 hours. The type of solvent used is hexane, methanol and chloroform. The selection of this type of solvent is based on the difference in the polarity of the solvent.

Keywords: Cell wall breakdown, fatty acid extraction, Nannochloropsis

I. Pendahuluan

Mikroalga sebagai bahan baku pembuatan biosiesel secara ekonomi cukup menjanjikan tetapi ada beberapa kendala yang harus diatasi yaitu masih tingginya biaya untuk ekstraksi lipid. Efisiensi proses ekstraksi dari mikroalga kering maupun basah merupakan langkah yang sangat penting untuk dilakukan penelitian agar dihasilkan ekstrak lipid yang maksimal (Lee, J.Y 2010).

Biodiesel merupakan bahan bakar minyak dari nabati maupun lemak hewan yang memiliki sifat menyerupai minyak diesel. Biodiesel terdiri dari monoalkil ester yang dapat terbakar bersih. Biodiesel bersifat terbarukan, dapat menurunkan emisi kendaraan, bersifat melumasi dan dapat meningkatkan kinerja mesin. Biodiesel dibuat secara transesterifikasi maupun esterifikasi minyak nabati dengan katalis basa maupun asam sehingga menghasilkan metil ester (Nilawati, 2012 dan Fukuda 2001).

Lemak mikroalga pada umumnya terdiri dari asam lemak tidak jenuh, seperti linoleat, *eicosapentaenoic acid (EPA)* dan *docosahexaenoic acid (DHA)* (Skjak-Braek, 1992). Mikroalga mengandung lemak dalam jumlah yang besar terutama asam arachidonat (AA, 20:4 ω 6) (yang mencapai 36% dari total asam lemak) dan sejumlah asam eikosapentaenoat (EPA, 20:5 ω 3) (Fuentes, et al., 2000). Selain itu, lemak mikroalga juga kaya akan asam lemak poli tidak jenuh (PUFA) dengan 4 atau lebih ikatan rangkap.

Sebagai contoh, yang sering dijumpai yaitu *eicosapentaenoic acid* (EPA, C20:5) dan *docosahexaenoic acid* (DHA, C22:6) (Chisti, 2007).

Nannochloropsis merupakan mikroalga yang berwarna hijau, memiliki dinding sel, mitokondria dan nukleus yang dilapisi membran sel. *Nannochloropsis sp* berbentuk bola (bulat kecil), berukuran 4-6 mikrometer, dan memiliki kandungan minyak yang tinggi dari massa tubuhnya. *Nannochloropsis sp* juga merupakan salah satu pakan alami untuk larva udang dan ikan yang mempunyai nilai gizi tinggi (Rusyani et al., 2013).

Selain sebagai bahan baku biodiesel mikroalga *Nannochloropsis* ini telah banyak dibudidayakan dan kaya akan manfaat terutama dalam hal kesehatan. Nutrisi yang terkandung didalamnya termasuk protein, karbohidrat, lemak. Beberapa mineral seperti kalsium, kalium, natrium, tembaga dan kobalt dan vitamin seperti totrienol. Beberapa pigmen bermanfaat juga terkandung dalam mikroalga ini (D. Fithriani, dkk 2019)

Banyak kendala dalam pengembangan biofuel berbasis mikroalga karena lipid yang terdapat pada sel mikroalga belum dimanfaatkan secara maksimal akibat dinding sel mikroalga yang rigid mengandung *glucosamine* (Yamamoto M, et al., 2005). *Glucosamine* (C₆H₁₃NO₅) merupakan gula amino dan bagian dari struktur *polysaccharides chitosan* dan *kitin*. *Glucosamine* adalah salah satu monosakarida yang paling banyak. Salah satu upaya ekstraksi asam lemak yang efektif adalah dengan bantuan mekanis untuk memecah dinding sel. Teknik mekanik untuk memecah dinding sel sudah diteliti dengan berbagai macam cara, salah satunya dengan memanfaatkan proses kavitasi menggunakan ultrasonik atau sonikasi.

Untuk mendapatkan asam lemak dari mikroalga harus dilakukan preparasi dengan cara ekstraksi lipid, ada beberapa metoda yang bisa digunakan untuk ekstraksi asam lemak. Salah satu metode ekstraksi asam lemak dari mikroalga yaitu dengan cara pemecahan dinding sel nya sehingga lemak yang ada didalam sel dapat keluar dan akan dengan mudah diikat oleh pelarut hexana. Agar dihasilkan ekstrak asam lemak maksimal harus menggunakan metode pemecahan dinding sel yang efektif,

Berbagai macam cara sudah dilakukan untuk mengambil lipid dari mikroalga (Ranjan, A., dkk, 2010.) sebagian besar pengambilan lipid digunakan ekstraksi dengan pelarut seperti ekstraksi dengan soxlet dan pelarut heksan (Halim, R., dkk, 2011). Metode Bligh and Dyer dengan campuran pelarut methanol dan kloroform (Bligh, E.G., dkk., 1959). Ekstraksi superkritis dengan CO₂ telah dilakukan oleh Andrich dkk (Andrich, G., dkk., 2005). Beberapa penelitian untuk dapat mengambil lipid dari mikroalga dengan metode gabungan ekstraksi kimia dengan proses mekanik telah dilakukan diantaranya menggunakan ultrasonik digabung ekstraksi dengan ethanol (Wiyarno, B., dkk.). Ekstraksi n. Heksan dengan bantuan ultrasonik (Ranjan, A., dkk, 2010.)

Beberapa kriteria yang perlu diperhatikan untuk menentukan pelarut yang akan digunakan dalam ekstraksi adalah toksisitas, ketersediaan, harga, sifat tidak mudah terbakar, rendahnya suhu kritis untuk meminimalkan biaya operasi dan reaktivitas. Pelarut yang dipilih untuk ekstraksi minyak nabati biasanya adalah n-heksana. Pelarut ini bersifat inert, memiliki titik didih yang relatif rendah serta dapat melarutkan dengan cepat dan sempurna, namun n-heksana memiliki efek toksik terhadap manusia misalnya menimbulkan euforia ringan yang mengakibatkan kegagalan saraf (EPA 2013). Oleh karena itu, substitusi pelarut heksana dengan pelarut lain yang relatif lebih aman misalnya seperti etanol sangat dianjurkan (Aziz, Ratih, and Asima 2009). Pelarut organik yang umum digunakan dalam produk pangan adalah etanol, sedangkan untuk kosmetika selain etanol juga digunakan aseton, eter, ester dan lain-lain. Penggunaan n-heksana dalam proses ekstraksi minyak/lemak sangat lazim digunakan, hanya harus dipastikan setelah penguapan pelarut minyak hasil ekstraksi benar-benar bebas heksana

Menurut Sudarmadji (1989), pelarut organik berdasarkan konstanta dielektrikum dapat dibedakan menjadi dua yaitu pelarut polar dan pelarut non polar. Konstanta dielektrikum dinyatakan sebagai gaya tolak menolak antara dua pertikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektrikunya maka pelarut bersifat semakin polar. Konstanta dielektrikum hexana (0.009), Kloroform (0.259) dan methanol (0.762), dilihat dari data konstanta dielektrikunya hexana termasuk kedalam pelarut non polar, kloroform semi polar dan methanol termasuk kedalam pelarut polar.

Pada penelitian ini ingin mengetahui pelarut yang paling baik untuk mengekstraksi asam lemak dari mikroalga *nannochloropsis*. Metode ekstraksi yang digunakan sonikasi dengan variasi waktu 30,60 dan 90 menit kemudian diteruskan dengan maserasi selama 24 jam. jenis pelarut yang digunakan adalah hexana, methanol dan kloroform pemilihan jenis pelarut ini berdasarkan perbedaan kepolarannya.

II. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI Selama 6 bulan. Alat yang digunakan tabung ulir, magnetic stirrer, heater, pipet ukur 10, ultrasonik, GCMS Shimadzu Ultra 2010 sedangkan bahan yang digunakan hexana dan mikroalga *nannochloropsis*.

Sampel yang digunakan untuk percobaan ini menggunakan biomassa kering dari mikroalga *nannochloropsis* yang berasal dari Wuhan China. Siapkan tabung ulir 3 buah, timbang biomassa kering 3 gr kemudian dimasukkan ke dalam tabung ulir dan ditambahkan kedalam masing masing tabung dengan pelarut hexana, methanol dan kloroform sebanyak 10 ml. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam ultrasonik untuk disonikasi selama 30 menit. Ulangi langkah preparasi tersebut untuk variasi waktu 60 menit dan 90 menit. Setelah disonikasi sampel dimaserasi selama 24 jam untuk memberi kesempatan pelarut dan sampel mikroalga berinteraksi lebih lama sehingga semakin banyak asam lemak yang terikat selain itu juga agar sampel terpisah antara fitrat dan endapan. Lapisan atas merupakan campuran pelarut dan asam lemak yang terekstrak oleh pelarut sedangkan lapisan bawah merupakan endapan dari residu mikroalga. Setelah sampel terbentuk dua lapisan, kemudian dilakukan penyaringan menggunakan corong buchner dan filtrat yang dihasilkan ditampung didalam gelas kimia yang sudah diketahui berat nya. Kemudian dilakukan proses penguapan filtrat di ruang asam, dan setelah kering timbang lipid yang dihasilkan. Dari selisih berat ekstrak lipid sesudah dan sebelum dikeringkan dapat diketahui kadar lipid yang dihasilkan. Ekstrak lipid yang dihasilkan kemudian di Analisa menggunakan GCMS untuk mengetahui jenis dan kadar asam lemaknya.

III. Hasil dan Pembahasan

Sampel yang digunakan untuk percobaan ini menggunakan biomassa kering sebanyak 3 gr. Ada tiga jenis pelarut yang digunakan yaitu methanol,hexana dan kloroform. Variasi waktu yang digunakan 30,60 dan 90 menit, setelah disonikasi sampel dimaserasi agar endapan dan filtrat terpisah menjadi dua lapisan. Lapisan atas merupakan campuran pelarut dan asam lemak yang terekstrak oleh pelarut sedangkan lapisan bawah merupakan endapan dari residu mikroalga.

Dari hasil penelitian, pada saat sampel ditambahkan pelarut kemudian disonikasi terjadi perbedaan ketiga warna sampel, untuk pelarut hexana warna sampel menjadi hijau kecoklatan dan sampel terpisah menjadi dua fasa yaitu fasa atas pelarut dan lipid yang terikat dalam pelarut sedangkan fasa bawah berupa endapan berwarna kecoklatan. Pada pelarut methanol warna sampel menjadi hijau terang dan sampel terpisah menjadi dua

fasa seperti pada pelarut hexana tetapi warna yang terbentuk berbeda, untuk endapan warnanya hijau dan warna pelarut hijau terang. Untuk pelarut kloroform warna sampel menjadi hijau kehitaman dan tidak terbentuk dua fasa, sampel menjadi bentuk pasta semuanya.

Tabel 1. Kadar lipid dari Nanno Chloropsis dengan ekstraksi sonikasi

No.	Waktu sonikasi	Kadar total lipid dalam pelarut (%)		
		Hexana	Methanol	Kloroform
1.	30 menit	8.91	5.71	1.20
2.	60 menit	13.46	7.21	2.51
3.	90 menit	13.48	9.50	2.22
Rata-rata		11.95	7.47	1.98

Dari hasil data kadar lipid diatas dapat dilihat pelarut hexana paling banyak mengikat lipid dari mikroalga nannochloropsis dengan rata-rata kadar lipid dari pelarut hexana 11.95% , methanol 7.47% dan kloroform 1.98%. Hal ini sesuai dengan sifat dasar dari lemak yang bersifat non polar dan akan lebih larut terhadap pelarut yang lebih non polar, dimana hexana merupakan pelarut non polar, kelarutan ini disebabkan oleh gaya Tarik Van Der Wall anatara pelarut dan zat terlarut, seperti halnya senyawa-senyawa gugus alkana lainnya hexana tidak larut dalam air.

Struktur dinding sel mikroalga memiliki karakteristik yang berbeda beda berdasarkan fase pertumbuhan masing masing species mikroalga, sehingga menghasilkan perbedaan dalam hal ketebalan, kekerasan dan kandungannya dan hal ini menyebabkan kadar lipid setiap jenis mikroalga akan berbeda-beda.

Tabel 2. Profil asam lemak mikroalga sonikasi 30 menit

No.	Jenis asam lemak	Hexana	Methanol	Kloroform
1	Hexanoic acid (CAS) n-Hexanoic acid	0.55	5.26	-
2	Heptanoic acid (CAS) Heptoic acid	0.27	-	-
3	Octanoic acid (CAS) Caprylic acid	1.35	3.87	-
4	Dodecanoic acid (CAS) Lauric acid	1.47	-	-
5	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	8.93	3.95	-
6	9-Hexadecenoic acid, methyl ester	1.18	26.82	-
7	Hexadecanoic acid, methyl ester	2.47	-	-
8	Octadecenoic acid	24.7	-	-
9	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	51.40	40.16	-
10	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	0.43	-	-
11	Butanoic acid (CAS) n-Butyric acid	-	13.27	-

Dari tabel diatas dapat dilihat pelarut hexana lebih banyak mengekstrak jenis asam lemak dibandingkan methanol dan kloroform. Untuk pelarut hexana jenis asam lemak yang paling tinggi kadarnya adalah pentadecanoic acid (51.40%), 9 octadecenoic acid (24.7%) dan tetradecanoic acid (8.93%).Pelarut methanol jenis asam lemak yang mempunyai kadar paling tinggi adalah pentadecanoic acid (40.16%), 9-Hexadecenoic acid, methyl ester (26.82 %) dan Butanoic acid (CAS) n-Butyric acid (13.27%). Untuk

pelarut kloroform tidak terdeteksi adanya asam lemak, meskipun pada penentuan kadar lipid dihasilkan 1.98% kemungkinan lipid yang dihasilkan bukan dalam bentuk asam lemak. Asam lemak yang dihasilkan dari ekstrak lipid ini merupakan jenis asam lemak precursor biodiesel.

Tabel 3. Profil asam lemak mikroalga sonikasi 60 menit

No.	Jenis asam lemak	Hexana	Methanol	Kloroform
1	Butanoic acid (CAS) n-Butyric acid	-	1.59	-
2	Hexanoic acid (CAS) n-Hexanoic acid	0.33	0.87	-
3	Heptanoic acid (CAS) Heptoic acid	0.09	0.84	-
4	Octanoic acid (CAS) Caprylic acid	0.69	0.74	-
5	Nonanoic acid (CAS) Nonoic acid	0.08	-	-
6	Dodecanoic acid (CAS) Lauric acid	0.99	1.68	-
7	9-Octadecenoic acid (Z)- (CAS) Oleic acid	0.20	-	-
8	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)	0.13	-	-
9	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	6.77	11.7	-
10	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS)	0.60	1.13	-
11	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	4.69	16.79	27.14
12	Octadec-9-enoic acid	26.48	57.17	-
13	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	52.99	-	-
14	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	0.37	-	-
15	9-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS)	2.63	-	-
16	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester (CAS)	0.17	-	-
17	Octadecanoic acid, methyl ester (CAS)	0.83	-	-
18	9-Octadecenoic acid (Z)- (CAS) Oleic acid	0.01	-	-

Pada sonikasi 60 menit hasil analisa GCMS tidak jauh berbeda dengan sonikasi 30 menit pelarut hexana paling banyak mengikat asam lemak dengan jenis asam lemak Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid (52.99 %), 9 octadecenoic acid (26.48%) dan Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid (6.77%). Untuk pelarut methanol jenis asam lemak yang mempunyai kadar lemak paling tinggi 9 octadecenoic acid (57.17%), Hexadecanoic acid methyl ester (CAS) Methyl palmitate (16.79%) dan Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid (11.73%). Pada pelarut kloroform hanya teridentifikasi satu asam lemak yaitu hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl palmitate (27.14%).

Pada sonikasi 60 menit ini asam lemak yang terikat lebih banyak dari sonikasi 30 menit untuk semua jenis pelarut hal ini dimungkinkan karena waktu terjadinya kavitasasi lebih lama sehingga dinding sel yang terpecahkan lebih banyak sehingga asam lemak yang terikat pun akan lebih banyak pula

Tabel 4. Profil asam lemak mikroalga sonikasi 90 menit

No	Jenis asam lemak	Hexana	Methanol	Kloroform
1	Propanoic acid (CAS) Propionic acid	-	-	-
2	Butanoic acid (CAS) n-Butyric acid	-	1.56	-
3	Butanoic acid, 3-methyl- (CAS)	-	0.45	-

4	Hexanoic acid (CAS) n-Hexanoic acid	0.42	0.86	-
5	Heptanoic acid (CAS) Heptoic acid	0.22	0.88	-
6	Octanoic acid (CAS) Caprylic acid	0.81	0.77	-
7	Decanoic acid (CAS) Capric acid	0.24	0.50	-
8	Octadecanoic acid, 2-oxo-, methyl ester	0.13	-	-
9	Dodecanoic acid, methyl ester (CAS)	0.55	-	-
10	Dodecanoic acid (CAS) Lauric acid	1.15	1.65	-
11	Tetradecanoic acid, methyl ester (CAS)	0.46	-	-
12	Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid	6.96	11.79	-
13	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	0.56	-	-
14	9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	0.78	1.15	9.82
15	Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS)	3.09	15.09	51.71
16	Octadec-9-enoic acid	30.97	56.31	2.26
17	Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid	45.50	-	-
18	Ethyl -9 hexadecanoat	0.05	-	-
19	Hexadecanoic acid, ethyl ester (CAS)	0.12	-	-
20	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-,	0.24	-	-
21	9-Octadecenoic acid, methyl ester (CAS)	1.35	-	10.14

Pada sonikasi 90 menit pelarut hexana dapat mengikat asam lemak lebih banyak dibanding dengan sonikasi sebelumnya. Jenis asam lemak dengan kadar paling tinggi adalah *Pentadecanoic acid (CAS) Pentadecylic acid* (45.50%), *9 Octadecenoic acid* (30.97%) dan *Tetradecanoic acid (CAS) Myristic acid* (6.96%). Untuk pelarut methanol *9 Octadecenoic acid* (56.31%), *Hexadecanoic acid, (CAS) Methyl palmitate* (15.09%), dan *Tetradecanoic acid (CAS) Myristic methyl ester acid* (11.79%). Untuk pelarut kloroform *Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl palmitate* (51.71%), *9 Octadecenoic acid, methyl ester (CAS) Methyl octadecenoat* (10.14%) dan *9 Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)- (CAS) Methyl palmitoleat* (9.82%).

Dari data hasil analisa asam lemak metode sonikasi secara keseluruhan jenis asam lemak yang dihasilkan mulai dari C rendah *Butanoic acid methyl ester* ($C_5H_{10}O_2$) dan paling tinggi *Octadecanoic acid methyl ester* ($C_{19}H_{38}O_3$).

IV. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ekstraksi asam lemak dari mikroalga *nannochloropsis* dengan metode sonikasi dan variasi lamanya waktu sonikasi selama 30, 60 dan 90 menit dan pelarut yang digunakan hexana, kloroform dan methanol. Dihasilkan rata rata kadar lipid sebanyak 11.95 % (hexana), 7.47 % (methanol) dan 1.98 % (kloroform). Dari data yang dihasilkan tersebut dapat disimpulkan bahwa pelarut yang paling baik mengekstrak asam lemak dari mikroalga *nannochloropsis* adalah hexana. Untuk mikroalga *Nannochloropsis* jenis asam lemak yang teridentifikasi oleh GCMS dimulai dari C rendah *Butanoic acid methyl ester* ($C_5H_{10}O_2$) dan paling tinggi *Octadecanoic acid methyl ester* ($C_{19}H_{38}O_3$).

Daftar Pustaka

- [1] Andrich, G., Nesti, U., Venturi, F., Zinnai, A., Fiorentini, R., 2005. Supercritical fluid extraction of bioactive lipids from the microalga *Nannochloropsis* sp. *Eur. J. LipidSci. Technol.* 107, 381–
- [2] Azis, T,R,C, K,N, A, Fresca. 2009. “Pengaruh pelarut hexana dan etanol, volume pelarut dan waktu ekstraksi minyak kopi. “*Jurnal Teknik Kimia* 16.
- [3] Bligh, E.G. & W.J. Dyer. 1959. A rapid method for totallipid extraction and purification. *Can.J. Biochem.*
- [4] Chisti, Y., *Biodiesel from Microalgae. Biotechnology Advances*, 2007.
- [5] D. Fithriani, D. Ambarwaty, dan Nurhayati, “Identification of bioactive compounds from *Nannochloropsis* sp.” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 404, no. 1, 2019, doi: 10.1088/1755-1315/404/1/012064.
- [6] Fukuda H, K.A., Noda A, Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng*, 2001.
- [7] Fuentes, et all. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalgae *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*
- [8] Hadiyanto. 2011. Valorisasi Mikroalga Untuk Sumber Bioenergi dan Pangan Sebagai Upaya Peningkatan Ketahanan Pangan dan Energi di Indonesia. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro Semarang.
- [9] Halim, R., Gladman, B., Danquah, M.K., Webley, P.A., 2011. Oil extraction from microalgae for biodiesel production. *Bioresour.*
- [10] 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
- [11] Nilawati, Destya. 2012. Studi Awal Sintesis Biodiesel dari Lipid Mikroalga *Chlorella vulgaris* Berbasis Medium Walne melalui Reaksi Esterifikasi dan Trans-esterifikasi. Skripsi Universitas Indonesia.
- [12] Ondrey, G., Commercial production and debut of a new solid-acid catalyst for making biodiesel. *Chemical Engineering*, 2008.
- [13] Ranjan, A., Patil, C., Moholkar, V., 2010. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. *Ind.*
- [14] Rusyani, E. 2012. Molase Sebagai Sumber Mikro Nutrien Pada Budidaya Phytoplankton *Nannochloropsis* sp. Salah Satu Alternatif Pemanfaatan Hasil Samping Pabrik Gula. Tesis Unila Jurusan Ilmu Lingkungan, Bandar Lampung. 85 hlm.
- [15] Skjak-Braek, G. (1992), “Alginates-Biosynthesis and Some Structure Function Relationships Relevant to Biomedical and Biotechnological Applications,”