
**UJI IDENTIFIKASI ASAM LEMAK TIDAK JENUH DARI MIKROALGA
Thraustochytrids MENGGUNAKAN METODE EKSTRAKSI TRANSETERIFIKASI
IN SITU**

Mochamad Fathurohman, Anna Yuliana, Elsa Aldiany, Anindita Tri Kusuma Pratita
Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada , Jl Cilolohan No.
36, Tasikmalaya, Indonesia
Email: fathur@stikes-bth.ac.id

Received: 17 April 2021; Revised: 28 April 2021; Accepted: 17 April 2021 ; Available online: 30 April 2021

ABSTRACT

Renewable energies including marine energy based on microalgae produce Fatty Acids are one of the marine microalgae which produce unsaturated fatty acids with Omega-3, Omega-6 and Omega-9. The growth and development of microalgae are influenced by environmental conditions and nutrient in its growth. Microalgae contains bioactive components that have significant health benefits such as carotenoids, polysaccharides, antioxidants, and essential fatty acids. Microalgae species are capable of producing fatty acids including Thraustochytrids. Microalgae has a very large ability to produce lipids of approximately 60% of dry weight. The chemical content of heterotrophic types of microalgae, for example Thraustochytrids species was carried out by the study of non-saturated fatty acid levels found using the In Situ Transesterification method which produced dry biomass of 1.1597 grams. And from the results of GC-MS analysis there is oleic acid included in Omega-9 with the highest peak of 55.14%.

Keywords: *Unsaturated Fatty Acids, Fermentation, GC-MS, Microalgae, Thraustochytrids*

ABSTRAK

Energi terbarukan termasuk energi kelautan yang berbasis mikroalga menghasilkan Asam Lemak, salah satunya adalah mikroalga laut yang menghasilkan Asam Lemak tidak jenuh Omega-3, Omega-6, dan Omega-9. Pertumbuhan dan perkembangan mikroalga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan kandungan nutrisi dalam media tumbuhnya. Mikroalga mengandung komponen bioaktif yang memiliki manfaat signifikan bagi kesehatan manusia seperti karotenoid, polisakarida, antioksidan, dan asam lemak esensial. Spesies mikroalga yang mampu menghasilkan asam lemak diantaranya adalah *Thraustochytrids*. Mikroalga mempunyai kemampuan yang sangat besar untuk menghasilkan lipida kurang lebih 60% dari berat kering. Kandungan kimia mikroalga jenis heterotrofik contohnya spesies *Thraustochytrids* dilakukan penelitian kadar Asam Lemak tidak Jenuh yang terdapat dengan menggunakan metode Transesterifikasi In Situ yang menghasilkan biomassa kering sebanyak 1,1597 gram. Dan dari hasil analisis GC-MS terdapat asam oleat yang termasuk kedalam Omega-9 dengan puncak tertinggi yaitu 55,14%.

Kata kunci: Asam Lemak Tidak Jenuh, Fermentasi, GC-MS, Mikroalga, *Thraustochytrids*.

PENDAHULUAN

Mikroalga mengandung komponen bioaktif yang memiliki manfaat signifikan bagi kesehatan manusia seperti karotenoid, polisakarida, antioksidan, dan asam lemak esensial. Beberapa mikroorganisme dilaporkan memproduksi minyak nabati yang mengandung asam lemak. Spesies mikroalga yang mampu menghasilkan asam lemak diantaranya adalah *Cryptocodinium cohnii*, *Ulkenia* sp, *Thraustochytrium aureum* dan *Schizochytrium* sp. Dua spesies yang terakhir termasuk ke dalam anggota mikroalga *Thraustochytrids*. *Thraustochytrids* adalah mikroalga yang sangat potensial dalam menghasilkan asam lemak, diantaranya Asam Lemak tidak Jenuh dikarenakan mikroalga tersebut dapat tumbuh dalam kondisi heterotrof. Keuntungan lain yang dimiliki oleh mikroalga *Thraustochytrids* yaitu memiliki kecepatan tumbuh dan kemampuan mengakumulasi asam lemak yang lebih tinggi dibandingkan mikroalga lainnya (Andriansyah et al., 2014; Giasi et al., 2015; Purba et al., 2015). Mikroalga yang dikenal sebagai produsen asam lemak diklasifikasikan ke dalam filum *Heterokontophyta* (Stramenopiles), ordo *Labyrinthulida*, dan keluarga *Thraustochytriidae*. Ada 12 genus dalam keluarga *Thraustochytriidae* tetapi genus yang secara signifikan menghasilkan Asam Lemak tidak Jenuh.

Berdasarkan beberapa penelitian Komalasari, (2015) menyebutkan bahwa mikroalga mempunyai kemampuan yang sangat besar untuk menghasilkan lipida kurang lebih 60% dari berat kering. Menurut Christi (2017), total kandungan lipida dalam mikroalga dapat bervariasi dari sekitar 1 – 85 % dari berat kering (produktivitas lipida), dengan nilai yang lebih tinggi dari 40% yang biasanya dicapai dalam kondisi stres. Hal ini tergantung dari jenis mikroalga, rata-rata pertumbuhan dan kondisi kultur mikroalga. Penelitian yang telah dilakukan Ferriols et al, (2013) terhadap *Tetraselmis chunii* menunjukkan bahwa mikroalga spesies *Tetraselmis chunii* mengandung protein sebesar 48.42%, karbohidrat 12.10% dan asam lemak 9.70%. Kandungan kimia mikroalga jenis heterotrofik contohnya spesies *Thraustochytrids* dilakukan penelitian kadar Asam Lemak tidak Jenuh yang terdapat dengan menggunakan metode Transesterifikasi In Situ.

Berbagai metode ekstraksi memisalkan banyak kemungkinan untuk hasil pemisahan. Salah satu metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Transesterifikasi In Situ. Transesterifikasi yaitu proses kimiawi yang memerlukan grup alkohol pada senyawa ester dengan alkohol. Untuk mempercepat reaksi ini diperlukan bantuan katalisator berupa asam atau basa. Asam mengkatalis reaksi dengan memberikan proton yang dimilikinya kedalam grup alkohol sehingga lebih reaktif.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut : *Biological Safety Cabinet* (BSC), Mikroskop cahaya, *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC), neraca analitik, *water bath*, autoklaf, pH meter, *vortex mixer*, lemari es, incubator, oven, kamera digital, lemari asam, thermometer, cawan petri gelas, tabung reaksi berukuran 10 mL, jarum ose, tube eppendorf, pipet Pasteur, pipet volume, balon pipet, kaca objek dan *deck glass*, vial dan penutupnya, alat- alat gelas.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Diklorometan, methanol, HCl P, NaCl, n-heksan, media cair *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), medium padat *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) air laut buatan steril, aquadest.

Medium dan Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium padat *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan medium cair *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB).

Pembuatan Air Laut Buatan (ALB)

Prosedur pembuatan air laut buatan (ALB) dalam 1L yaitu dengan cara mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan, kemudian dilakukan penimbangan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan air laut buatan (ALB) meliputi 24,6 gr NaCl, 0,6 gr KCl, 1,36 gr CaCl₂.2H₂O, 6,2 gr MgSO₄.7H₂O, 4,66 gr MgCl₂.6H₂O, dan 0,18 gr NaHCO₃, yang dilarutkan dengan menggunakan aquadest. Air laut buatan (ALB) yang dibuat harus memiliki pH 6, apabila air laut buatan terlalu asam maka dilakukan penambahan NaOH, dan apabila air laut buatan terlalu basa maka dilakukan

penambahan HCl 0,1 N agar pH menjadi 6.

Kultivasi Mikroalga

Isolat mikroalga yang dianggap sudah murni selanjutnya dikultur dan diperbanyak dengan cara ditanam pada media agar SDA pada cawan petri kemudian di inkubasi pada suhu ruangan selama 2 hari, setelah itu dilakukan pengujian makroskopik untuk mengetahui jenis mikroalga sesuai dengan morfologinya.

Fermentasi

Fermentasi ini dilakukan dengan cara memotong agar pada cawan yang sudah di tumbuh mikroalga sebesar 1 x 1 cm, kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang sudah berisi media cair (SDB) dan air laut buatan, kemudian di shaker selama 14 hari dengan tujuan untuk menghasilkan metabolit dari mikroalga. Selanjutnya di sentrifugasi kemudian saring, dan endapannya di ambil. Setelah menghasilkan pellet yang banyak kemudian dikeringkan pada cawan yang di oven pada suhu 70-80°C lalu ditimbang.

Ekstraksi dan Metilasi Lipid Mikroalga Transesterifikasi In Situ

Biomassa mikroalga yang terdapat dalam tabung kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan diklorometan (CH₂Cl₂), dan ditambahkan 1 ml HCl 2M dalam methanol, tutup rapat. Reaksikan dalam *water bath* pada suhu 60° C, selama 3 jam. Setelah itu, ditambahkan 2 ml larutan NaCl jenuh dan 1 ml n-heksan, campur homogeny. Selanjutnya didiamkan agar terjadi pemisahan dalam bentuk FAME (*fatty acid methyl ester*) dalam pelarut n-heksan. Kemudian dipisahkan menggunakan pipet Pasteur dan disimpan dalam tube eppendorf pada suhu 4°C sebelum dilakukan analisa menggunakan GC-MS.

Analisis Asam Lemak Tidak Jenuh dengan GC-MS

Komposisi asam lemak dalam sampel minyak mikroalga selanjutnya dianalisa secara kualitatif dengan GC-MS dengan cara sebagai berikut : minyak mikroalga yang diperoleh, diambil sebanyak 200 mikron kemudian ditambahkan 500 mikron etanol bf 3 20%, setelah itu magnetic stirrer 70° selama 15 menit. Setelah itu lemak-lemaknya di ekstrak menggunakan n-heksan, dan fasa heksan yang diambil dan dimasukkan ke dalam vial gc yang kecil berukuran 2 ml, tutup vial hingga rapat. Vial yang berisi minyak mikroalga kemudian diletakkan pada *autosampler* yang secara otomatis akan menginjek mikroalga dengan volume injeksi sebesar 1 ul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi Mikroalga *Thraustochytrids*

Tahap awal pebelitian ini adalah mikroalga *Thraustochytrids* yang sudah di isolasi menjadi isolat murni dilakukan kultivasi secara aseptis dengan cara meletakkan isolat ke dalam tabung reaksi yang berisikan media padat dan di inkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Selama proses kultivasi dilakukan di dalam alat *Biological Safety Cabinet* (BSC). Proses kultivasi mikroalga dilakukan dengan menggunakan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang berisikan (Mycological peptone 10 g, Glucose 40 g, Agar 15 g). Selama inkubasi dilakukan pengamatan terhadap mikroalga yang tumbuh. Isolat mikroalga yang tumbuh yang terbebas dari kontaminan atau tidak ditumbuhi jamur dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisikan media padat SDA dengan cara aseptis dengan metode gores dan di inkubasi selama 48 jam pada suhu 37° C. Selama proses pengkulturan dilakukan di dalam alat *Biological Safety Cabinet* (BSC).

Fermentasi Mikroalga *Thraustochytrids*

Fermentasi ini dilakukan untuk memperbanyak metabolit mikroalga dengan menggunakan alat orbital shaker dengan kecepatan 150 rpm. Kecepatan pengadukan memiliki pengaruh terhadap hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fermentasi. Sehingga dengan bertambahnya kecepatan pengadukan mampu mencapai kondisi terbaik yang ditandai dengan bertambahnya hasil dari metabolit yang didapatkan. Oleh sebab itu diperlukan pengadukan agar reaksi pembentukan metabolit sekunder dari mikroalga dapat terjadi. Tetapi jika kecepatan terlalu cepat nutrisi dan mikroba tidak stabil sehingga hasil metabolit tidak stabil, dan jika kecepatan pengadukan rendah maka metabolit yang dihasilkan masih sedikit. Jadi kecepatan yang optimum ada di 140-150 rpm. Dengan adanya pengadukan, maka kontak substrat dengan mikroalga akan semakin cepat. Pengadukan berfungsi untuk meratakan kontak sel dengan substrat dan menjaga agar metabolit sekunder dari mikroalga tidak mengendap dibawah (Kurniawan, dkk, 2011 dalam

Wibowo Feri, 2015). Selain itu pengadukan juga berfungsi sebagai pemecah sel-sel mikroorganisme tidak menyatu membentuk gumpalan (flok) yang akan mengganggu perkembangan sel yang tidak mendapatkan nutrisi yang cukup dari substrat (Ahmad, 2009 dalam Wibowo Feri, 2015). Alat orbital shaker ini digunakan untuk memperbanyak metabolit sekunder pada mikroalga dengan cara aerob atau dengan cara gerakan. Pada proses fermentasi aerob ini akan lebih cepat memperbanyak metabolit sekunder pada mikroalga dibandingkan dengan cara anaerob atau proses fermentasi dengan cara fermentasi statis. Hasil dari fermentasi yang dihasilkan dipindahkan pada cawan uap untuk kemudian dioven pada suhu 70-80° C selama 2 jam, setelah kering metabolit mikroalga *Thraustochytrids* kemudian dilakukan penimbangan.

Pembuatan Biomassa Kering

Langkah pertama yang dilakukan adalah dengan membuat biomassa kering mikroalga. Pembuatan biomassa kering mikroalga dilakukan dengan cara memanaskan metabolit hasil fermentasi dalam oven pada suhu 80-90°C selama 3 jam. Jika pengeringan dilakukan pada suhu lebih dari 90°C kemungkinan mikroalga akan mati, dan jika pemanasan pada saat oven kurang dari 80° memakan waktu yang cukup lama. Jadi suhu optimal yang digunakan pada saat melakukan pengeringan 80-90°C. Berat biomassa kering yang ada dihitung dengan cara mengurangi berat tabung yang berisi biomassa kering dengan berat tabung kosong.

Tabel 1 Berat biomassa kering isolat mikroalga

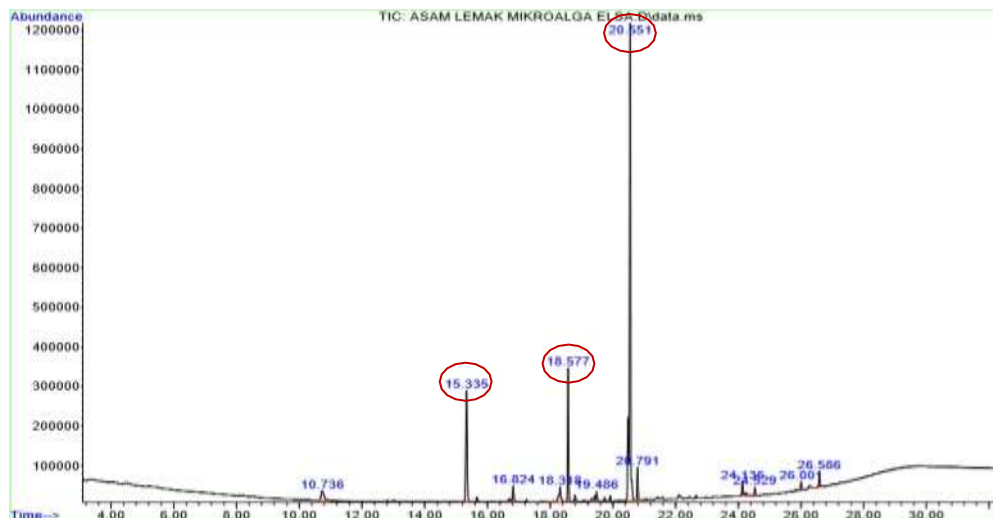
No	Berat Tabung Kosong (gr)	Berat Tabung Berisi Biomassa Kering (gr)	Berat Biomassa (gr)
1	14,7973	15,9570	1,1597

Ekstraksi Dan Metilasi

Pada proses ekstraksi dan metilasi menggunakan metode Transesterifikasi In Situ (transesterifikasi langsung), merupakan metode yang menggabungkan proses ekstraksi dan transesterifikasi menjadi suatu proses. Transesterifikasi disebut juga alkoholisis, adalah antara lemak atau minyak nabati dengan alkohol untuk membentuk ester dan gliserol. Biasanya dalam reaksi ini digunakan katalis untuk meningkatkan laju reaksi. Karena reaksi ini adalah reaksi reversible, maka digunakan alkohol berlebih untuk menggeser keseimbangan (Nilawati Destya, 2012). Menurut Eckey, mekanisme reaksi transesterifikasi dibagi menjadi tiga tahap : Tahap pertama, yaitu penyerangan gugus karbonil dari molekul trigliserida oleh anion alkohol (ion metoksida) untuk membentuk *intermediate tetrahedral*. Tahap kedua, yaitu reaksi antara alkohol dengan *intermediate* untuk meregenerasi anion alkohol (ion metoksida) dan tahap ketiga, yaitu penyusunan kembali ester asam lemak dan gliserida. Pelarut diklorometan dipilih karena diklorometan dapat menghasilkan ekstraksi lipid yang lebih banyak dibandingkan dengan pelarut kloroform (Gertler & Wells, 2016). Proses yang terjadi adalah, asam lemak yang telah terekstraksi oleh pelarut diklorometan, akan berikatan dengan methanol membentuk *fatty acid methyl ester* (FAME), dengan bantuan HCl sebagai katalisator asam. Setelah diperoleh FAME, dilakukan separasi untuk memisahkan FAME dari campuran pelarut. Penggunaan NaCl jenuh bertujuan untuk menarik kandungan air yang ada, karena salah satu produk samping reaksi esterifikasi adalah air. Sedangkan komponen-komponen yang tidak larut dalam air (nonpolar), seperti asam lemak akan larut didalam pelarut heksan mengikuti teori *like dissolve like* kelarutan akan terjadi apabila memiliki sifat kepolaran yang sama. Heksan merupakan pelarut yang baik dan paling sering digunakan untuk melarutkan lipid dengan polaritas yang rendah (Gertler & Wells, 2016).

Identifikasi Asam Lemak Tidak Jenuh Dengan Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS)

Dari hasil analisis asam lemak mikroalga *Traustochytrids* menggunakan kromatografi gas spektrometri massa diperoleh data kromatogram yang disajikan dalam gambar berikut :



Gambar 1 Hasil analisis Asam Lemak mikroalga *Thraustochytrids* menggunakan GC-MS

Dari data kromatogram terdapat 12 puncak dari 12 senyawa yang menunjukkan kandungan senyawa asam lemak pada mikroalga *Thraustochytrids* **Gambar 1**

Tabel 2 Senyawa Asam Lemak mikroalga *Thraustochytrids*

Puncak	Nama senyawa	Area%	Berat molekul
1	4-Phenylethynyl acetophenone	2,96	220
2	1H-Indene,2-butyl-4hexyloctahydro	15,22	264
3	Asam palmitat	1,83	256
4	Asam palmitoleat	3,01	268
5	Hexa decanoic acid	12,62	270
6	Cis-10-Heptadecanoic acid	1,33	282
7	Asam oleat	55,14	296
8	Octadecanoic acid	3,14	298
9	3-Phenyl-2,3-dihydro-1-H-Isoindol	1,64	209
10	N-ethyl-1,3-dithioisindoline	0,72	207
11	N-ethyl-1,3-dithioisindoline	0,87	207
12	Cyclotrisiloxane, hexamethyl	1,44	222

Asam lemak dapat larut dengan baik dalam pelarut n-heksan. Pada penelitian ini, memperoleh kondisi optimum untuk analisis Asam Lemak dilakukan dengan suhu injektor 250°C dan suhu detector 230°C. Suhu injektor dan detector diatur agar penguapan sampel dapat terjadi lebih cepat sehingga komponen sampel tersebut dapat segera dibawa gas pembawa memasuki kolom. Dan analisis optimum pada penelitian ini alir gas sebesar 1micron/menit.

Pada analisis GC-MS atau analisis kualitatif dilakukan dengan metode normalisasi (penormalan luas). Yang dimaksud penormalan luas adalah menghitung susunan dalam persen dengan mengukur luas setiap puncak dan membagi masing-masing luas puncak dengan luas keseluruhan.

Berdasarkan hasil pengukuran menggunakan GC-MS, didapatkan data komposisi senyawa yang terdapat dalam lipid mikroalga *Thraustochytrids* hasil ekstraksi Transesterifikasi In Situ. Dari gambar 1 diperoleh jenis asam lemak yang teridentifikasi pada mikroalga *Thraustochytrids* terlihat bahwa tidak hanya asam lemak oleat, palmitat, dan palmitoleat saja yang terdeteksi, tetapi senyawa-senyawa lain juga ikut terdeteksi oleh kromatogram. Asam-asam lemak terbesar adalah pada puncak ke-3 diidentifikasi sebagai asam palmitat yang termasuk kedalam asam lemak jenuh dengan kadar 1,83%, pada puncak ke-4 diidentifikasi sebagai asam palmitoleat yang termasuk kedalam asam lemak tak jenuh dengan kadar 3,01%, sedangkan pada puncak ke-7 diidentifikasi sebagai

asam oleat yang termasuk juga kedalam asam lemak tak jenuh dengan kadar 55,14%. Total asam lemak yang diperoleh adalah 59,98%. Puncak yang relative tinggi dibandingkan dengan puncak yang lainnya yaitu yang menunjukkan Asam Oleat.

Pada analisis asam lemak mikroalga *Thraustochytrid* tidak terdeteksi omega-3 dan omega-9. Faktor yang mempengaruhi tahap analisis ini salah satunya adalah proses fermentasi, fermentasi yang dilakukan pada penelitian ini kurang optimal karena dilakukan fermentasi semi statis, kemungkinan metabolit sekunder yang dihasilkan tidak optimal (Fathurohman, M, et all, 2019).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini melalui reaksi transesterifikasi berkatalis asam, HCl. Mekanisme reaksi yang terjadi dimulai dengan protonasi gugus karbonil dari ester trigliserida menghasilkan karbokation. Serangan nukleofilik dari alcohol pada karbokation menghasilkan intermediet tetrahedral. Intermediet mengeliminasi gliserol untuk membentuk ester yang baru dan mengeluarkan katalis. Metil ester yang banyak terkandung pada mikroalga *Thraustochytrids* adalah Oleat, Palmitoleat, dan Palmitat yang merupakan Omega-9. Sedangkan asam lemak tidak jenuh lainnya seperti Omega-3 dan Omega-6 tidak teridentifikasi oleh GC-MS. GC-MS menggabungkan mass spectrometry dengan GC. GC berfungsi sebagai pemisah, dan MS menganalisa masing-masing peak GC tersebut. Pada mikroalga spesies *Thraustochytrids* kemungkinan mengandung Omega-3 dan Omega-6 namun dalam jumlah yang relative kecil sehingga tidak teridentifikasi. Pada penelitian ini asam lemak yang dihasilkan dari *Thraustochytrids* memiliki komposisi yang beragam untuk setiap metode dengan komponen tetapnya yaitu metil oleat, metil palmitoleat dan metil palmitat.

Kolom yang digunakan adalah Aglient HP-5MS. Helium Ultra High Purity 99.999% digunakan sebagai fase gerak, karena gas ini bersifat inert. Fase gas hanya berfungsi membawa zat mengalir disepanjang kolom. Suhu injektor yaitu 250°C merupakan suhu terjadinya penguapan sampel dan standar asam lemak tidak jenuh secara cepat tanpa terjadinya penguraian. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen zat uji berdasarkan interaksi yang berbeda dengan fase diam. Metode injektor yang digunakan adalah metode injector Splitless, metode injeksi ini dapat digunakan untuk pembacaan kadar yang relatif kecil nilainya sehingga masih dapat dibaca oleh detektor. Suhu detektor adalah 230° diatur untuk mencegah kondensasi. Selanjutnya detektor akan mendeteksi jumlah masing-masing komponen.

KESIMPULAN

Mikroalga spesies *Thraustochytrids* yang di ekstraksi dengan metode Transesterifikasi In Situ menghasilkan biomassa kering sebanyak 1,1597 gram. Dan dari hasil analisis GC-MS terdapat asam oleat yang termasuk kedalam Omega-9 dengan puncak tertinggi yaitu 55,14%.

DAFTAR PUSTAKA

1. Andriansyah, Setyawati TR, Lovadi I. 2014. Kualitas Perairan Kanal Sungai Jawi dan Sungai Raya Dalam Kota Pontianak Ditinjau dari Struktur Komunitas Mikroalga Perifitik. *J.Probiot.* 3(1):61–70.
2. Fathurohman, M., Pratita, A.T.K., Yuliana, A. and Suhartati, R., 2019. The Molecular Identification of Sea Fungus Isolates from Mangrove Litter as Antimicrobials Potential. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1179, No. 1, p. 012171). IOP Publishing.
3. Ferriols, V.M.E.N. and R.O. Aguilar. 2013. *Efficiency of various flocculants in harvesting the green microalgae Tetraselmis tetrahele (Chlorodendrophyceae: Chlorodendraceae)*. *ACL Bioflux*. 5 (4): 265-273.
4. Komalasari, A. 2015. Studi Kemampuan Pertumbuhan Mikroalga Pada Media Limbah Cair Karet Remah dengan Open Ponds System. (Skripsi). Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung. Lampung.
5. Nilawati Destya. 2012. Studi Awal Sintesis Biodisel Dari Lipid Mikroalga *Chlorella vulgaris* Berbasis Medium Walne Melalui Reaksi Esterifikasi Dan Transesterifikasi [Skripsi]. Depok: Universitas Indonesia.
6. Yokochi, T., Honda, D., Higashihara, T. (2014) Optimization of docosahexaenoic acid production by *S. limacinum* SR21. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 72-26.