

## Kandungan Lutein Mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan Salinitas Berbeda pada Media Kultur

Theresia Claudia Lasmarito\*, Widianingsih, Hadi Endrawati

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro  
Jl. Prof.H.Soedarto S.H, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah 50275 Indonesia  
\*Corresponding author, e-mail: therclaudiaa@gmail.com

**ABSTRAK:** *Chlorella vulgaris* merupakan mikroalga yang tergolong dalam alga hijau (*chlorophyta*). *C. vulgaris* mengandung pigmen karotenoid yang hampir sebagian besar terdiri dari lutein. Hal ini membuat *C. vulgaris* memiliki keunggulan dibandingkan dengan jenis mikroalga lain. Lutein memiliki manfaat sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas pada mata. Salah satu parameter lingkungan yang mempengaruhi jumlah kandungan lutein adalah salinitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui salinitas terbaik guna mengoptimalkan pertumbuhan dan produksi pigmen lutein pada *C. vulgaris*. Metode yang digunakan adalah eksperimen laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Mikroalga *C. vulgaris* di kultivasi dengan tiga taraf perlakuan salinitas yang berbeda yaitu 20, 25, 35 dan 30 ppt (kontrol) dengan tiga ulangan. Pertumbuhan *C. vulgaris* diamati selama 8 x 24 jam kemudian dipanen untuk perhitungan biomasanya. Biomassa basah hasil kultivasi diekstraksi menggunakan pelarut aseton PA. Ekstrak aseton *C. vulgaris* kemudian dianalisis kandungan pigmen luteinnya secara spektrofotometri. Kandungan pigmen lutein *C. vulgaris* tertinggi diproduksi pada salinitas 35 ppt yakni 0.011363 µg/g. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan salinitas berpengaruh secara signifikan terhadap kandungan pigmen lutein *C. vulgaris*.

**Kata kunci:** Salinitas; Lutein; Mikroalga; *Chlorella vulgaris*

### ***Lutein Content of Chlorella vulgaris Microalgae with Different Salinity in Culture Media***

**ABSTRACT:** *Chlorella vulgaris* is a microalga belonging to the green algae (*chlorophyta*). *C. vulgaris* contains carotenoid pigments which consist mostly of lutein. This makes *C. vulgaris* has advantages compared to other types of microalgae. Lutein has benefits as an antioxidant to fight free radicals in the eyes. One of the environmental parameters that affect the amount of lutein content is salinity. This study aims to determine the best salinity to optimize the growth and production of lutein pigment in *C. vulgaris*. The method used is a laboratory experiment using a completely randomized design. Microalgae *C. vulgaris* was cultivated with three different levels of salinity treatment, namely 20, 25, 35 and 30 ppt (control) with three replications. The growth of *C. vulgaris* was observed for 8 x 24 hours and then harvested for the calculation of its biomass. The wet biomass from the cultivation was extracted using acetone PA as a solvent. The acetone extract of *C. vulgaris* was then analyzed for its lutein pigment content by spectrophotometry. The highest content of lutein pigment *C. vulgaris* was produced at a salinity of 35 ppt, namely 0.011363 g/g. Based on the results of the study, it can be concluded that the salinity treatment had a significant effect on the lutein pigment content of *C. vulgaris*.

**Keywords:** Salinity; Lutein; Microalgae; *Chlorella vulgaris*

## PENDAHULUAN

Age-related Macular Degeneration (AMD) merupakan penyebab kebutaan pada orang dewasa karena adanya perubahan pada pusat retina dan makula, yang mendorong menurunnya

kemampuan melihat (Abidin dan Karwur, 2009). Penyakit AMD bisa dicegah dengan suplemen atau asupan makanan yang kaya akan lutein. Lutein dikenal sebagai pigmen makula (*macular pigment*) yang berfungsi untuk menutrisi mata karena keberadaannya terletak pada jaringan penting dalam penglihatan yaitu makula (Kurniawan *et al.*, 2020). Pigmen lutein juga berfungsi sebagai antioksidan yang dapat mencegah perkembangan penyakit degeneratif yang berkaitan dengan pertambahan usia (Kusmiati, 2012). Mikroalga merupakan salah satu alternatif sumber potensial pigmen lutein. Mikroalga umumnya dapat hidup di perairan tawar dan laut, beberapa jenis mikroalga yang banyak dijumpai pada wilayah perairan serta dibudidayakan untuk dikembangkan potensinya antara lain *C. vulgaris*. Mikroalga *C. vulgaris* mempunyai kandungan yang penting dalam kehidupan antara lain karbohidrat, protein, lipid, klorofil, serta mempunyai pigmen karotenoid. Karotenoid dari *C. vulgaris* hampir seluruhnya terdiri dari lutein, hal ini yang membuat *C. vulgaris* memiliki keunggulan dibandingkan dengan jenis mikroalga lain (Fretes *et al.*, 2012).

Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kandungan lutein pada mikroalga adalah suhu, penyinaran cahaya, pH, sumber nitrogen dan salinitas (Guedes *et al.*, 2011). Faktor stress abiotik yang paling berpengaruh terhadap produktivitas lutein pada mikroalga, yaitu sumber nitrogen, pencahayaan dan salinitas (Fu *et al.*, 2014). Salinitas yang tinggi mengakibatkan adanya tekanan osmosis melalui pertukaran ion yang dapat memicu perubahan protein menjadi asam piruvat yang digunakan sebagai bahan dasar pembentukan lutein (Imron *et al.*, 2016). Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kandungan pigmen lutein pada mikroalga. Penelitian Kimberly *et al.* (2019), tentang kandungan pigmen lutein pada *Dunaliella salina* dengan kadar salinitas yang berbeda, menunjukkan bahwa kandungan pigmen lutein tertinggi diperoleh pada salinitas 25 ppt sebesar 0,0039  $\mu\text{g/g}$ . Penelitian tentang kandungan pigmen lutein juga dilakukan oleh Imron *et al.* (2016), pada mikroalga *Botryococcus braunii* dengan kondisi salinitas yang berbeda menghasilkan kandungan pigmen lutein tertinggi pada salinitas 20 ppt sebesar 0,0035  $\mu\text{g/g}$ . Pigmen lutein sudah banyak banyak diekstraksi dari tumbuhan darat seperti bunga kenikir dan marigold, namun masih sedikit lutein yang diekstraksi dari mikroalga, sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai produksi pigmen lutein pada mikroalga.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh salinitas terhadap kandungan lutein pada kultur mikroalga *Chlorella vulgaris*, serta untuk menentukan salinitas terbaik untuk pertumbuhan sel dan produksi pigmen lutein.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Oktober - November 2021. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium, yaitu suatu metode penelitian yang melihat hubungan sebab akibat melalui perbandingan kelompok yang diberikan perlakuan dengan kelompok yang tidak diberikan perlakuan (Setyanto, 2013). Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor (Perbedaan Salinitas) dengan 3 taraf perlakuan, yaitu 20 ppt, 25 ppt dan 35 ppt dengan 3 ulangan dan 1 kontrol (30 ppt).

Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroorganisme atau zat pengganggu yang tidak diharapkan keberadaannya pada alat dan media kultivasi yang akan digunakan selama penelitian (Hartanto *et al.*, 2013). Alat dan bahan yang perlu disterilisasikan seperti toples kaca, pipet tetes, selang aerasi, dan air laut sebagai media kultivasi. Peralatan yang telah dibersihkan dan dikeringkan kemudian disemprot menggunakan alkohol 70%, fungsi penggunaan alkohol ini adalah untuk menghambat pertumbuhan kuman dengan cara denaturasi protein pada kuman (Wahyuni *et al.*, 2017). Setelah itu peralatan dilapisi dengan plastik wrap agar tidak terkena debu menempel (Wulandari *et al.*, 2019). Pada tahap terakhir sterilisasi alat dilakukan penyinaran UV untuk memastikan kembali bahwa peralatan ini terbebas dari bakteri, penyinaran UV dilakukan selama 2 jam (Sulatri *et al.*, 2017).

Sterilisasi air laut sebagai media kultur dilakukan dengan merebus dan menyaring air laut hingga mendidih selama kurang lebih 2 jam, kemudian didinginkan sampai suhu air laut mencapai temperatur ruang (Hartanto *et al.*, 2013). Selanjutnya, media kultur dilakukan penyinaran UV selama

2 jam untuk memastikan tidak ada bakteri yang tertinggal (Sulatri *et al.*, 2017). Stok air laut steril dengan salinitas 40 ppt diencerkan menjadi empat salinitas perlakuan yang berbeda, yaitu 20, 25, 30, dan 35 ppt.

Kultivasi dilakukan menurut Zainuddin *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa kultivasi dilakukan dengan perbandingan 1:2 (*C. vulgaris*: air laut steril) pada stoples dengan volume 3000 ml. Pupuk Walne diberikan sebanyak 3 mL ke dalam kultivasi *C. vulgaris* (dosis 1 mL/L). Pengamatan kepadatan sel *C. vulgaris* dilakukan setiap 24 jam. Perhitungan kepadatan sel dilakukan dengan cara mengambil sampel mikroalga sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol sampel. Selanjutnya dilakukan perhitungan menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x. Kepadatan sel *C. vulgaris* dihitung dengan menggunakan rumus menurut Ariany dan Syamsunarno, (2021).

Pemanenan biomassa *C. vulgaris* dilakukan pada fase stasioner (H-8). Pemanenan dilakukan dengan metode sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit (Imron *et al.*, 2016). biomassa berupa pasta kemudian di timbang menggunakan timbangan analitik untuk mengetahui berat basahnya.

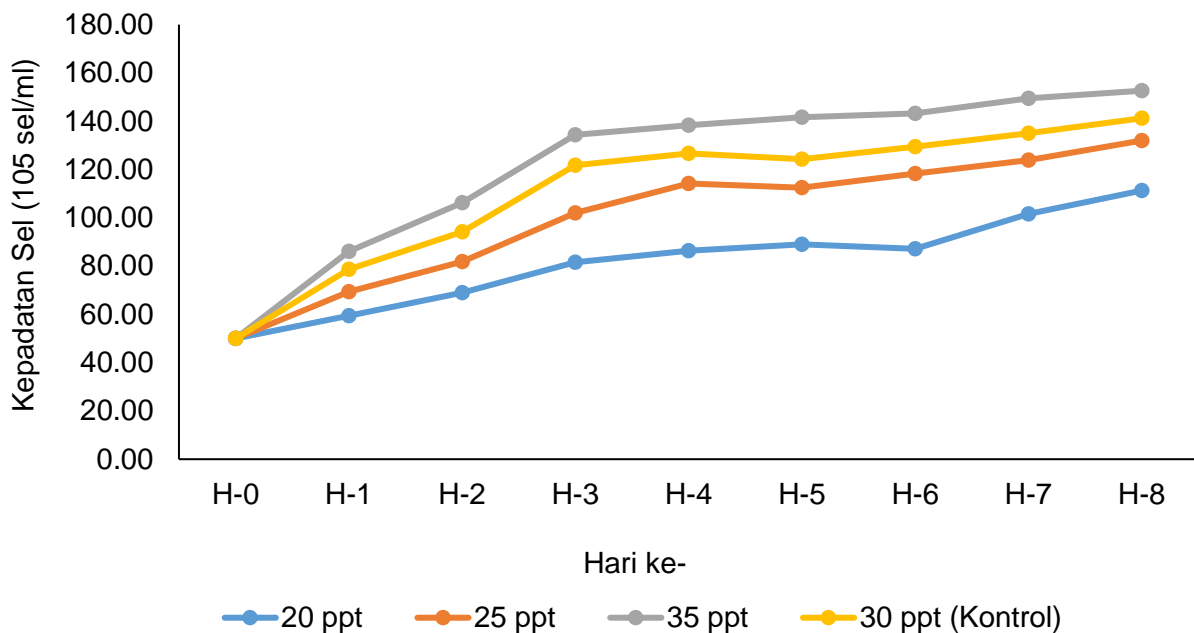
Ekstraksi pigmen lutein dilakukan dengan melakukan maserasi biomassa basah *C. vulgaris*, metode maserasi ini menggunakan pelarut yang akan berdifusi masuk ke dalam sel dan selanjutnya senyawa aktif akan keluar akibat adanya tekanan osmosis (Maleta *et al.*, 2018). Maserasi biomassa basah *C. vulgaris* dilakukan dengan pelarut aseton PA selama 12 jam dengan perbandingan 1:10 (gram biomassa basah: mililiter pelarut aseton) (Imron *et al.*, 2016). Pembacaan absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 446 nm yang merupakan spektrum serapan puncak (Koushan *et al.*, 2013). Perhitungan kadungan lutein dihitung dengan menggunakan rumus menurut Hajare *et al.* (2013).

Data pertumbuhan dan kandungan pigmen lutein diolah menggunakan aplikasi SPSS 22 dan Microsoft Excel. Analisis statistik SPSS 22 menggunakan Uji ANOVA satu arah, sebelumnya dilakukan uji normalitas serta uji homogenitas terlebih dahulu. Apabila dalam hasil pengujian Anova terlihat berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan Uji Tukey. Uji ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan signifikan antara masing-masing perlakuan (Persulesy *et al.*, 2016).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan awal sel *C. vulgaris* pada penelitian ini adalah  $50 \times 10^5$  sel/ml. Hasil pengamatan terhadap kepadatan sel *C. vulgaris* menunjukkan bahwa terjadi penambahan dan pengurangan kepadatan sel dari hari ke-0 (H-0) hingga hari ke-8 (H-8) selama masa kultur seperti yang disajikan pada Gambar 1. Lama masa kultur pada pengamatan *C. vulgaris* ini juga sesuai dengan penelitian Rosahdi *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa pemanenan *C. vulgaris* dilakukan saat kepadatan sel sudah cukup tinggi yaitu terdapat pada hari ke-7 (H-7) dan ke-8 (H-8). Pertumbuhan *C. vulgaris* dapat diamati dengan kurva pertumbuhan fase awal (lag), pada fase ini terdapat penambahan kepadatan sel yang sedikit yaitu terjadi pada hari pertama hingga hari ke-2 (H-2). Setelah itu dilanjutkan dengan fase eksponensial yang ditandai dengan penambahan kepadatan sel yang cukup tinggi yaitu di hari ke-3 (H-3) hingga hari ke-6 (H-6) kultur. Pada hari ke-7 (H-7) hingga ke-8 (H-8) merupakan fase stasioner yang ditandai dengan kepadatan sel yang mulai stabil (Setyati *et al.*, 2015).

Kepadatan sel pada hari ke-7 (H-7) hingga hari ke-8 (H-8) menunjukkan peningkatan yang relatif kecil. Hal ini sesuai dengan penelitian Setyati *et al.* (2015), yang menyatakan bahwa saat fase stasioner kepadatan sel cenderung tetap karena jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mati. Faktor lain yang juga berpengaruh terhadap penurunan kepadatan sel adalah kandungan unsur hara yang terdapat dalam media kultur (Zainuddin *et al.*, 2017). Kandungan nutrisi yang tinggi pada fase awal kultur digunakan oleh masing-masing sel untuk melakukan pertumbuhan hingga pada fase eksponensial. Namun tidak adanya penambahan nutrisi setelah fase eksponensial dapat menyebabkan kepadatan sel mulai menurun dikarenakan terjadi persaingan dalam memperebutkan nutrisi yang ada (Kurniawan *et al.*, 2017). Kepadatan sel di hari ke-8 (H-8) pada salinitas 20 ppt, 25 ppt, 30 ppt dan 35 ppt secara berturut-turut, yaitu  $111,25 \times 10^5$  sel/ml,  $131,98 \times 10^5$  sel/ml,  $141,20 \times 10^5$  sel/ml dan  $152,63 \times 10^5$  sel/ml. Kepadatan sel tertinggi, yaitu  $152,63 \times 10^5$  sel/ml pada salinitas 35 ppt. Hal ini diduga karena salinitas 35 ppt merupakan salinitas awal bibit dari stok kultur BBPBAP Jepara. Pernyataan ini juga didukung oleh Djunaedi *et al.* (2017), yang menyatakan bahwa mikroalga *C. vulgaris* dapat tumbuh pada salinitas 10 – 35 ppt, namun salinitas 35 ppt diduga merupakan salinitas optimal untuk pertumbuhan *C. vulgaris*.



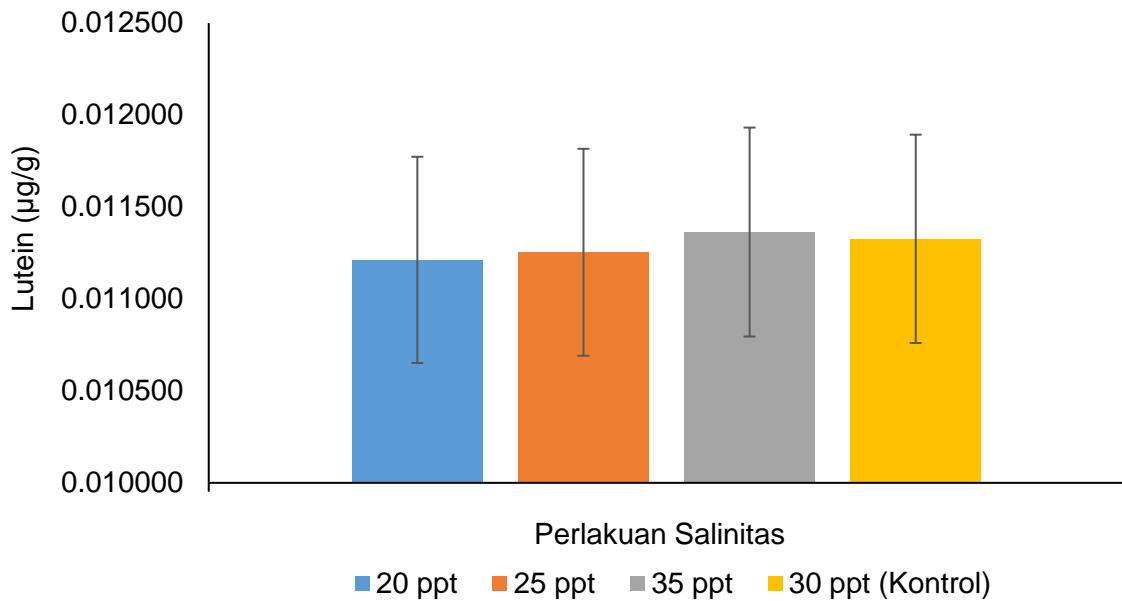
**Gambar 1.** Pertumbuhan *C. vulgaris* pada Perlakuan Salinitas yang Berbeda

Berdasarkan Uji ANOVA satu arah perbedaan salinitas pada media kultivasi memberikan pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan *C. vulgaris*. Hal ini diduga karena salinitas memberikan pengaruh terhadap tekanan osmotik sel. Tekanan osmotik dapat mempengaruhi Kecepatan sel dalam menyerap nutrisi (Zainuddin *et al.*, 2017). Konsentrasi garam yang tinggi pada media kultivasi dapat menyebabkan air dalam sel banyak keluar (Imron *et al.*, 2016).

Salinitas merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan lutein pada mikroalga. Kondisi stress pada *C. vulgaris* akan memproduksi pigmen karotenoid yang berperan dalam melindungi kloroplas dari kerusakan oksidatif sehingga menghasilkan pigmen karotenoid yang tinggi (Kojo, 2004). Pigmen karotenoid tidak digunakan dalam proses pertumbuhan melainkan sebagai bentuk pertahanan diri pada saat mikroalga mengalami kondisi stress (Kimberly *et al.*, 2019). Pada salinitas tinggi sel mampu bertahan hidup karena adanya bantuan gliserol yang berfungsi untuk menyeimbangkan proses osmolaritas pada sel bagian luar. Produksi karotenoid berbanding lurus dengan tahap kematian sel. Pigmen yang meningkat pada fase stasioner disebabkan karena pigmen tersebut dihasilkan sebagai upaya untuk bertahan hidup karena nutrisi yang ada pada medium semakin menipis (Kusumaningrum dan Zainuri, 2013).

Kandungan lutein pada salinitas 20 ppt merupakan kandungan lutein terendah yakni 0,011212  $\mu\text{g/g}$  berat basah. Pada salinitas 20 ppt diduga *C. vulgaris* tidak mengalami gangguan tekanan osmotik sehingga kurang optimum dalam produksi pigmen lutein. Sedangkan kandungan lutein tertinggi terdapat pada perlakuan dengan salinitas 35 ppt yaitu sebesar 0,011363  $\mu\text{g/g}$  berat basah (Gambar 2). Hal ini diduga karena pada salinitas 35 ppt memiliki kepadatan yang tinggi, sehingga kandungan karotenoidnya juga tinggi. Hal ini juga didukung oleh penelitian Agustini (2014), yang menyatakan bahwa jumlah karotenoid berbanding lurus dengan kepadatan biomassa. Semakin tinggi kepadatan biomassa pada mikroalga, maka semakin tinggi kadar karotenoidnya. Semakin tinggi kadar karotenoid, maka kandungan lutein juga semakin tinggi.

Kondisi stress pada *C. vulgaris* akan memproduksi pigmen karotenoid yang berperan dalam melindungi kloroplas dari kerusakan oksidatif sehingga menghasilkan pigmen karotenoid yang tinggi (Kojo, 2004). Pigmen adalah suatu zat kimia yang memiliki warna dan merupakan bagian dari sistem fotosintesis mikroalga. Pigmen dibedakan menjadi tiga kelas yaitu karotenoid, klorofil dan phycobiliprotein (Barra *et al.*, 2014). Salinitas akan menyebabkan adanya tekanan osmolaritas yang berakibat pada perubahan tatanan lipid membran plasma. Perubahan ini mengaktifkan protein kinase yang akan dipecah menjadi asam piruvat. Asam piruvat digunakan sebagai dasar pembentukan senyawa karotenoid. Asam piruvat pada mikroalga hijau akan digunakan bersamaan dengan Gliseraldehida-3-Fosfat untuk proses pembentukan *isopentenil pirofosfat* (IPP).



**Gambar 2.** Kandungan Lutein *C. vulgaris* pada Perlakuan Salinitas yang Berbeda

Molekul *isopentenil pirofosfat* (IPP) bergabung dengan *dimetilalil pirofosfat* (DMAPP) untuk menghasilkan *geranylgeranyl difosfat* (GGPP). Senyawa GGPP inilah yang merupakan prekursor dari semua karotenoid (Ramos *et al.*, 2011). Pigmen lutein merupakan hasil dari metabolit sekunder yang akan meningkat jumlahnya apabila mengalami suatu tekanan. Tekanan yang ditimbulkan akan mengakibatkan kondisi keseimbangan sel terganggu dan terciptanya radikal bebas yang berlebih. Pigmen lutein diproduksi sebagai bentuk pertahanan diri dari kondisi keseimbangan yang terganggu (Kimberly *et al.*, 2019). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan salinitas memiliki pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap kandungan lutein pada mikroalga *C. vulgaris*. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya peningkatan konsentrasi garam pada media kultur. Konsentrasi garam didominasi oleh ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  yang dapat mengganggu keseimbangan osmotik antara sel dengan lingkungan luarnya, hal ini kemudian menyebabkan air dalam sel banyak keluar (Erdmann dan Hagemann, 2001). Proses hilangnya air dan ion dalam sel mengharuskan sel melakukan proses aklimatisasi atau penyesuaian diri untuk mempertahankan hidup. Salah satunya adalah dengan mengeluarkan metabolit sekunder guna mendukung aklimatisasi terhadap peningkatan salinitas (Erdmann dan Hagemann, 2001).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan mikroalga *C. vulgaris* dapat tumbuh pada salinitas yang diberikan (20 ppt, 25 ppt, 35 ppt dan 30 ppt). Perbedaan kadar salinitas pada media kultivasi memberikan pengaruh nyata ( $p < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan dan kandungan pigmen lutein. Perlakuan dengan salinitas 35 ppt merupakan salinitas optimal untuk pertumbuhan dan pembentukan pigmen lutein pada mikroalga *C. vulgaris*. Semakin tinggi kepadatan *C. vulgaris* yang didapatkan maka semakin tinggi kandungan luteinnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, D. & Karwur, F. 2009. Zeasantin dari Mikroalga: Biosintesis dan Pemanfaatannya. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 4(3):112-118.
- Agustini, N.W.S. 2014. Kandungan Pigmen Astaxanthin dari Mikroalga *Botryococcus braunii* pada Berbagai Penambahan Nitrogen dan Phosphor. *Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*. 9 hal.
- Ariany, N. & Syamsunarno, M.B. 2021. The Application of Duckweed Liquid Organic Fertilizer to Cell Populations in the Culture of *Nannochloropsis oculata*. *Torani Journal of Fisheries and Marine Science*, 4(2):58-71. DOI: 10.35911/torani.v4i2.13707

- Barra, L.R., Chandrasekaran., Corato, F. & Brunet, C. 2014. The challenge of ecophysiological biodiversity for biotechnological applications of marine microalgae. *Marine Drugs*, 12(3): 1641-1675.
- Djunaedi, A.S., Sunaryo., Suryono, C.A. & Santosa, A., 2017. Kandungan Pigmen Fikobi liprotein dan Biomassa Mikroalga *Chlorella vulgaris* pada media dengan Salinitas Berbeda. *Jurnal Kelautan Tropis*, 20(2):112-116.
- Erdmann, N. & Hagemann, M. 2001. Salt Acclimation of Algae and Cyanobacteria: A Comparison. In: L.C Rai and J.P Gaur. *Algal Adaptation to Environmental Stres. Physiological, Biochemical and Molecular Mechanism. Springer Verlag Berlin Heidelberg.* German. pp. 324-350.
- Fretes, H., Susanto, A.B., Budhy, P. & Leenawanty, L. 2012. Karotenoid dari Makroalga dan Mikroalga: Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 23(2):221-228.
- Fu, W., Paglia, G., Magnúsdóttir, M., Steinarsdóttir, E.A., Gudmundsson, S., Pálsson, B.Ø. & Brynjólfsson, S. 2014. Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microbial cell factories*, 13(1):1-9
- Guedes, A.C., H. Amaro, H.M. & Malcata, F.X. 2011. Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4):625-644.
- Hajare, R., Ray, A., Shreya, T.C., Avadhani, M.N. & Selvaraj, I.C. 2013. Extraction and quantification of antioxidant lutein from various plant sources. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 22(1):152-157.
- Hartanto, H.S.B., Hariyati, R. & Soeprobowati, T.R. 2013. Pertumbuhan Populasi *Chlorella Vulgaris* Beijerinck Dengan Perlakuan Penambahan Logam Berat Tembaga (Cu) Pada Skala Laboratorium. *Jurnal Akademika Biologi*, 2(1):19-27.
- Imron, M.A., Sudarno & Mastihah, E.D. 2016. Pengaruh Salinitas Terhadap Kandungan Lutein pada Mikroalga *Botryococcus braunii*. *Journal Marine and Coastal Science*, 5(1): 36-48.
- Kimberly, F.D., Supriyantini, E. & Sedjati, S. 2019. Pertumbuhan dan Kandungan Lutein *Dunaliella salina* pada Salinitas yang Berbeda. *Buletin Oseanografi Marina*, 8(1):44-48.
- Kojo, S., 2004. Vitamin C: Basic Metabolism and Its Function as an Index of Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 11:1041-1064.
- Koushan, K., Rusovici, R., Li, W., Ferguson, L.R. & Chalam, K.V. 2013. The role of lutein in eye-related disease. *Nutrients*, 5(5):1823-1839.
- Kurniawan, J.M., Yusuf, M.M., Heriyanto, H. & Brotosudarmo, T.H.P. 2020. Telaah Literatur Potensi Lutein dari Bunga Marigold Lokal sebagai Suplemen Kesehatan. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 30(2):147-162.
- Kusmiati, K. 2012. Kemampuan Senyawa Lutein Dari Daun Bayam (*Amaranthus* SP) Untuk Menetralisir Oksidan T-bhp Dalam Sel Darah. *Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Enviromental, and Learning*, 9(1):691-697
- Kusumaningrum, H.P. & Zainuri, M. 2013. Aplikasi pakan alami kaya karotenoid untuk post larvae *Penaeus monodon* Fab. *Ilmu Kelautan : Indonesian Journal of Marine Sciences*, 18(3):143-149.
- Maleta, H.S., Indrawati, R., Limantara, L. & Brotosudarmo, T.H.P. 2018. Ragam metode ekstraksi karotenoid dari sumber tumbuhan dalam dekade terakhir (telaah literatur). *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*, 13(1):40-50.
- Persulesy, E.R., Lembang, F.K. & Djidin, H. 2016. Penilaian Cara Mengajar Menggunakan Rancangan Acak Lengkap. *Jurnal Ilmu Matematika dan Terapan*, 10(1):9-16.
- Ramos, A.A., Polle, J., Tran, D., Cushman, J.C., Jin, E.S. & Varela, J.C. 2011. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod.as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 26(1):3-20.
- Rosahdi, T.D., Susanti, Y. & Suhendar, D. 2015. Uji aktivitas daya antioksidan biopigmen pada fraksi aseton dari mikroalga *chlorella vulgaris*. *Jurnal Istek*, 9(1):1-16
- Setyati, W.A., Martani, E., & Zainuddin, M., 2015. Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *Ilmu Kelautan : Indonesian Journal of Marine Sciences*, 20(3):163-169
- Sulatri, N.L., Yogeswara, I.B. & Nursini, N.W. 2017. Efektivitas Sinar Ultraviolet terhadap Cemar Bakteri Patogen pada Makanan Cair Sonde untuk Pasien *Immune-Compromised*. *Jurnal Gizi Indonesia*, 5(2):112-117.

- Wahyuni, D., Herliawati, H. & Purnamasari, N. 2017. Penggunaan Alkohol Sebagai Desinfektan Pada Terapi Komplementer Bekam. *Proceeding Seminar Nasional Keperawatan*. 3(1):251-253.
- Wulandari, R., Dharma, A. & Syafrianti. 2019. Pengaruh Pemberian Variasi pH terhadap Produksi Trigliserida Total dan Komposisi Asam Lemak dari *Chlorella vulgaris* Air Tawar. *Jurnal Riset Kimia*, 10(2):66–74.
- Zainuddin, M., Hamid, N., Mudiarti, L., Kursistyanto, N. & Aryono, B. 2017. Pengaruh Media Hiposalin dan Hipersalin terhadap Respon Pertumbuhan dan Biopigmen *Dunaliella salina*. *Jurnal Enggano*, 2(1):46-57.