

## KANDUNGAN PIGMEN ASTAXANTHIN DARI MIKROALGA *Botryococcus braunii* PADA BERBAGAI PENAMBAHAN NITROGEN DAN PHOSPHOR

### Pigment Content Astaxanthin from Microalgae *Botryococcus Braunii* Addition to Various Nitrogen and Phosphorus

Ni Wayan Sri Agustini  
Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI  
e-mail : wayan\_sa2002@yahoo.com

**Abstract-** *Botryococcus braunii* is a microalgae that produce astaxanthin . The content of astaxanthin in microalgae cells is influenced by environmental factors and nutrition . One source of nutrients that can influence the content of astaxanthin is nitrogen and phosphorus . Nitrate as nitrogen source used in this study is potassium nitrate at a concentration of 0.5 g / L ; 1 g / L ; 1.5 g / L ; 2 g / L and phosphate as a phosphorus source used is potassium dihydrogen phosphate at a concentration of 0.010 g / L ; 0.035 g / L ; 0.070 g / L ; 0.105 g / L . Qualitative and quantitative analysis of the astaxanthin dilakukan with UV- VIS spectrophotometric method and using the ANOVA statistical test . The results showed that the maximum content of astaxanthin was obtained on the medium with the addition of potassium nitrate with a concentration of 1.5 g / l is equal to 1441.875 ppm and with the addition of potassium dihydrogen phosphate at a concentration of 0.035 g / L 1331.583 ppm .

**Keywords :** nitrogen, phospos, *Botryococcus braunii* , astaxanthin

#### PENDAHULUAN

Salah satu spesies mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan adalah *Botryococcus braunii*, termasuk ke dalam kelompok alga hijau (Chlorophyceae). Pigmen yang terkandung dalam mikroalga *Botryococcus braunii* antara lain klorofil a yang berperan memberi warna hijau, disamping itu terdapat pigmen klorofil b dan karotenoid yang juga berperan dalam proses fotosintesis. Mikroalga *Botryococcus braunii* menghasilkan senyawa metabolit primer yang terdiri dari protein, karbohidrat dan lipid, serta senyawa metabolit sekunder berupa pigmen karotenoid yang berisi antara lain violaxantin, lutein,  $\beta$ -karoten dan astaxanthin (Cohen, Z, et al., 1999)

Astaxanthin adalah keto – karotenoid yang diklasifikasikan sebagai xantofil. Astaxanthin merupakan metabolit dari zeaxanthin dan/atau canthaxanthin, yang mengandung hidroksil dan gugus fungsional keton. Seperti banyak karotenoid, astaxanthin berwarna-warni dan pigmen yang larut dalam lemak dan banyak ditemukan dalam mikroalga, ragi, salmon, trout, krill,

udang, lobster, udang-udangan , dan bulu beberapa burung. Astaxanthin ini yang memberikan warna merah pada daging salmon dan kerang saat dimasak. Astaxanthin, tidak seperti beberapa karoten dan karotenoid lainnya, di dalam tubuh manusia tidak akan dikonversi menjadi vitamin A (retinol) dalam tubuh manusia. Food and Drug Administration ( FDA ) telah menyetujui astaxanthin sebagai pewarna makanan (atau aditif warna) untuk keperluan tertentu pada hewan dan makanan ikan, sedangkan komisi Eropa menganggap pewarna makanan dan diberikan nomor E yaitu E161j, astaxanthin alami dinyatakan aman (GRAS)

Kandungan astaxanthin dalam sel mikroalga *B. braunii* sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi di dalam media kulturnya, salah satu unsur nutrisi tersebut adalah nitrogen dan fosfor. Nitrogen merupakan unsur pokok pembentukan protein dan penyusun utama protoplasma, kloroplas dan enzim. Dalam kegiatan sehari-hari peran nitrogen berhubungan dengan aktivitas fotosintesis, sehingga secara



langsung atau tidak nitrogen sangat penting dalam proses metabolisme dan respirasi. Sedangkan fosfor merupakan untuk penting penyusun Adenosin Triphosphat (ATP) yang secara langsung berperan dalam proses penyimpanan dan transfer energi yang terkait dalam proses metabolisme (E.W. Becker., 1994).

Keterbatasan nitrat dan fosfat pada media kultur *Botryococcus braunii* dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Salah satu cara untuk mengoptimalkan kandungan astaxanthin dalam sel yaitu dengan cara memodifikasi kultur dengan penambahan kalium nitrat dan kalium dihidrogen fosfat pada jumlah yang tepat pada media kultur akan menghasilkan jumlah astaxanthin yang optimal.

Berdasarkan hal tersebut diatas maka dilakukan penelitian ini untuk melihat bagaimana pengaruh perubahan konsentrasi nitrat sebagai sumber nitrogen dan fosfat sebagai sumber fosfor terhadap produksi astaxanthin pada mikroalga *Botryococcus braunii*. Astaxanthin merupakan pigmen yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi sehingga dapat memberi serapan pada spektrum cahaya tampak, sehingga dalam penelitian ini akan digunakan metode spektrofotometri UV-Vis untuk analisis kadar dari Astaxanthin.

#### METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Air Tawar, Puslit Bioteknologi-LIPI, Mikroalga yang digunakan adalah *Botryococcus braunii* yang diperoleh dari Laboratorium Pakan Alami, BBPBAP, Jepara. Medium kultivasi *Botryococcus braunii* menggunakan medium Jhonson yang terdiri dari (g/l) magnesium sulfat 0,5 g, magnesium klorida 0,2 g, kalium nitrat 1,0 g, kalium klorida 0,2 g, natrium klorida 27 g. Elemen mikro (*trace element*) dibutuhkan sebanyak 1 mL, yang dibuat dari : mangan klorida 1,81 g, asam borat 2,86 g, dan tembaga (II) sulfat

pentahidrat 0,079 g, ammonium molibdat 0,018 g, zink sulfat dihidrat 0,22 g dan di larutkan dalam 1 L aquades. Larutan besi (III) klorida – EDTA dibuat dari : 0,085 g besi (III) klorida dan 2,67 g EDTA yang dilarutkan dalam 100 mL aquades. Dalam 1 L media larutan besi (III) klorida yang dibutuhkan sebanyak 1 mL. Cara kerja yang dilakukan meliputi :

1. Kultivasi mikroalga *Botryococcus braunii*  
*Botryococcus braunii* dikultivasi pada media Jhonson dengan pH awal media 7. Kultur diberi cahaya menggunakan lampu neon 40 watt dengan intensitas cahaya 2500 lux pada suhu 25<sup>o</sup>C, dan diberi aerasi secara terus menerus. Setelah stok kultur mencapai fase logaritmik kemudian dilakukan uji pengaruh nitrat dan fosfor yang bervariasi sebagai sumber nutrisi. Stok kultur pada fase logaritmik diambil biomasanya sesuai dengan kepadatan yang diinginkan yaitu dengan nilai serapan pada spektrofotometer 680 nm adalah 0,8. Biomassa dipindahkan ke dalam 4 botol ukuran 1 liter yang telah berisi medium Jhonson dengan memodifikasi konsentrasi Kalium nitrat sebagai sumber nitrogen (g/l) yaitu 0,5; 1,0; 1,5 dan 2. Setelah diketahui kadar optimum pada konsentrasi penambahan kalium nitrat sebagai sumber N dilanjutkan dengan variasi penambahan konsentrasi kalium dihidrogen fosfat sebagai sumber P. Konsentrasi kalium dihidrogen fosfat yang digunakan adalah (g/l) : 0,010; 0,035; 0,070 dan 0,105. Kepadatan biomassa diukur dengan metode turbidimetri dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm. Serapan yang diperoleh dibuat kurva dengan cara memplotkan waktu kultur dengan kepadatan jumlah populasi sel mikroalga.
2. Ekstraksi Karotenoid dan Astaxanthin  
Ekstraksi astaxanthin *Botryococcus braunii* dengan metode Hua-bin li 2001.



Biomassa basah ditambahkan KOH 10M, lalu dipanaskan pada suhu 60°C selama 10 menit. Setelah didinginkan, ekstrak ditambahkan diklorometan, kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 4.000 rpm. Selanjutnya supernatan yang berwarna hijau dibuang sedangkan lapisan berwarna kuning yang merupakan karotenoid dan astaxanthin diuapkan pada suhu 40°C sampai ekstrak benar-benar mengering. Selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan etanol yang kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 455 nm (karotenoid) dan 479 nm (astaxanthin) pada spektrofotometer. Hasil serapan yang diperoleh untuk astaxanthin diplotkan pada standar baku pembanding astaxanthin yang telah dibuat.

### 3. Larutan baku banding astaxanthin

Larutan baku pembanding Astaxanthin dibuat 4 konsentrasi yaitu 25, 15, 10 dan 5 ppm. Dibuat kurva hubungan antara luas puncak dan konsentrasi larutan baku Astaxanthin, didapatkan persamaan garis regresi sebagai berikut :  $Y = a + b x$ , Keterangan : Y = luas puncak astaxanthin dan X = kadar Astaxanthin (mg/l)

### 4. Analisis Statistik

Analisis data menggunakan RAL (Rancangan Analisis Lengkap) dengan analisis varian, ANOVA uji F. Untuk menentukan adanya perbedaan kandungan astaxanthin dari setiap ekstrak yang diperiksa dilakukan uji statistik analisis dengan ANOVA.

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### 1. Variasi konsentrasi KNO<sub>3</sub> (Kalium nitrat) dalam media tanam terhadap pertumbuhan Mikroalga *Botryococcus braunii*

#### 1.1 Pola Pertumbuhan pada variasi konsentrasi kalium nitrat

Dalam skala laboratorium, dimana keberadaan nutrisi terbatas dan tidak ada penambahan dari luar, mikroalga mengalami beberapa fase. Dimulai dari fase

lag dimana mikroalga beradaptasi terhadap lingkungannya, dalam fase ini peningkatan pertumbuhan mikroalga sangat kecil sekali. Selanjutnya mikroalga mengalami fase logaritmik yang ditandai dengan peningkatan pertumbuhan yang signifikan. Pertumbuhan tersebut terhenti secara perlahan pada fase linier dan pada fase stasioner laju pertumbuhan dan laju kematian seimbang. Hingga akhirnya mikroalga mengalami fase kematian yang ditandai dengan kepadatan populasi yang terus berkurang.

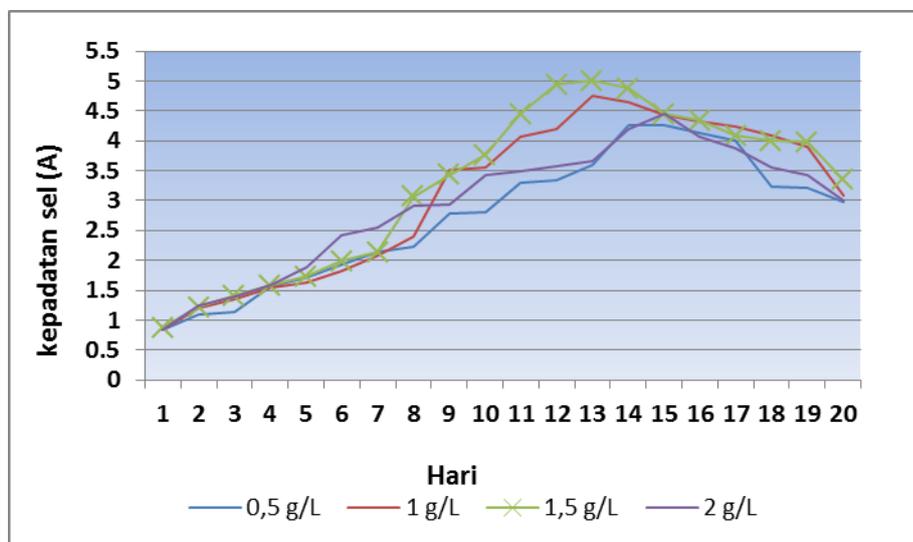
Selama mengalami fase tersebut, keberadaan nutrisi memegang peranan yang sangat penting yang menyebabkan pertumbuhan dan kematian pada mikroalga. Salah satu makronutrisi yang penting dalam pertumbuhan mikroalga adalah Nitrogen (N) dalam media kultur. Pemberian N pada kultur berupa kalium nitrat (KNO<sub>3</sub>). Menurut Becker, EW., 1994, selain nitrogen senyawa fosfor juga merupakan senyawa esensial bagi pertumbuhan mikroalga, serta merupakan bahan dasar pembentukan asam nukleat, enzim dan vitamin dan juga berperan dalam proses selular yang berperan dalam biosintesis asam nukleat dan tranfer energi yang berperan dalam proses fotosintesis dan pembentukan klorofil, karena nitrogen dan fosfat sangat penting dalam pertumbuhan mikroalga oleh sebab itu dalam penelitian ini dilakukan variasi nitrat dan fosfat dalam media pertumbuhan mikroalga *Botryococcus braunii*.

Pada penelitian ini, penetapan kepadatan biomassa dilakukan dengan metode turbidimetri. Metode turbidimetri merupakan metode yang umum digunakan untuk menetapkan konsentrasi kultur alga dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 680 nm. Keuntungan metode ini yaitu cepat dan non destruktif. Kepadatan awal biomassa mikroalga pada masing-



masing perlakuan memiliki serapan 0,800. Mikroalga tidak mengalami fase lag (adaptasi), hal ini dikarenakan stok kultur telah memasuki fase logaritmik, sehingga saat diinokulasi ke dalam media yang baru tidak mengalami fase adaptasi (Gambar 2). Hal ini sama seperti pendapat Becker, EW., 1994, inokulan yang berasal dari fase lag akhir, fase logaritmik, atau fase stasioner awal akan mengalami fase lag yang lebih singkat di bandingkan inokulan dari fase pertumbuhan yang lain. Bahkan fase lag seringkali ringkali tidak dijumpai bila inokulan diambil pada fase logaritmik.

Kepadatan biomasa dengan jumlah nitrogen 1,5 g/L pada fase logaritmik memiliki kepadatan tertinggi, dengan menunjukkan serapan sebesar 3,770 pada hari ke-8 dibanding perlakuan lainnya. Hal ini diduga sel menyerap nutrisi lebih cepat untuk memenuhi kebutuhan metabolisme sel, karena ketersediaan nitrogen untuk tranfer energi kecil. Sehingga sebelum kultur mengalami kekurangan nitrogen, maka sel membelah diri lebih cepat dan pertumbuhan sel menjadi lebih tinggi. Kandungan nitrogen yang tepat dapat memberikan pertumbuhan mikroalga yang optimum.



Gambar 1. Pola pertumbuhan kultur *Botryococcus braunii* variasi  $KNO_3$

Kepadatan biomasa pada fase stasioner lebih tinggi dibandingkan fase logaritmik. Saat fase stasioner, kepadatan sel menjadi konstan dan maksimum. Hal ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi dan intensitas cahaya akibat bayangan dari populasi selnya sendiri, sehingga laju pertumbuhan setara dengan laju kematian.

Intensitas cahaya yang kurang, dapat mengakibatkan pertumbuhan biomassa mikroalga yang diukur menjadi lebih rendah. Disamping itu, gelembung gas yang ditimbulkan oleh aerasi tidak cukup kuat

untuk memberikan pengadukan biomassa dengan merata, kesempatan untuk memperoleh intensitas cahaya menjadi tidak sama. Saat pengambilan sampel perlu diperhatikan, karena jika ada mikroalga yang berbentuk filamen ikut terukur, maka serapan akan semakin besar dan hasil pengukuran ini bukan yang sebenarnya. (Becker, EW., 1994)

## 1.2 Analisis Pigmen Karotenoid pada variasi konsentrasi kalium nitrat

Karotenoid diekstraksi dengan diklorometan untuk menarik karotenoid dengan penambahan KOH 10 M untuk memutuskan ikatan ester dan dipengangas pada suhu 60°C selama 10 menit untuk membantu mempercepat reaksi, selanjutnya didinginkan pada suhu ruangan, lalu ditambahkan diklorometan. Pencampuran sel *Botryococcus braunii* dengan pelarut dilakukan secara mekanik dengan menggunakan vortex

selama 5 menit, selanjutnya filtrat disentrifuse untuk memisahkan biomassa dengan larutan karotenoid yang ditarik oleh diklorometan. Selanjutnya identifikasi pigmen karotenoid dilakukan pada panjang gelombang 450 nm. Berdasarkan hasil yang diperoleh ternyata penambahan biomassa sejalan dengan peningkatan kandungan karotenoid. Kandungan karotenoid tertinggi dicapai pada media dengan penambahan KNO<sub>3</sub> 1,5 g/l sebesar 68,88 ppm yang terjadi pada fase stasioner.

Tabel 1. Biomassa basah dan kadar karotenoid *Botryococcus braunii* pada berbagai media dengan penambahan Kalium Nitrat

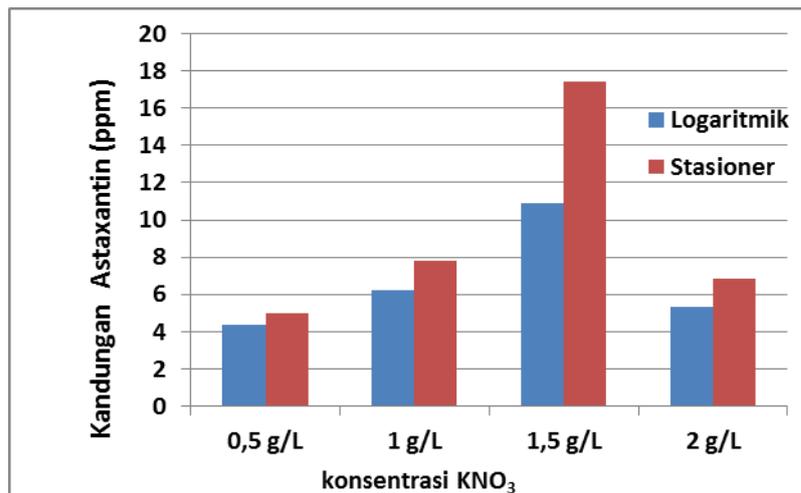
Fase Pertumbuhan	Sampel KNO <sub>3</sub>	Biomassa basah g/L	Karotenoid (ppm)
Logaritmik	0,5 g/L	17,91	22,79
	1 g/L	19,80	33,55
	1,5 g/L	22,50	44,31
	2 g/L	18,50	26,43
Stasioner	0,5 g/L	17,29	21,82
	1 g/L	19,20	31,46
	1,5 g/L	25,96	68,88
	2 g/L	15,06	35,27

Analisis Pigmen Astaxanthin pada variasi konsentrasi kalium nitrat

Identifikasi pigmen astaxanthin dilakukan dengan panjang gelombang serapan maksimum dari zat yang diperiksa dari larutan baku pembanding yang dibuat dari ekstrak astaxanthin murni yaitu pada panjang gelombang 479 nm. Menurut Jan olsina, dkk., (2004) panjang gelombang

maksimum pada pigmen astaxanthin berkisar antara 470 – 495 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa baku pembanding sesuai dengan literatur. Maka didapat kandungan astaxanthin dengan pengukuran panjang gelombang 479 nm pada berbagai penambahan kalium nitrat (Gambar 3)





Gambar 2. Kandungan Astaxanthin *Botryococcus braunii* pada berbagai penambahan KNO<sub>3</sub>

Berdasarkan Gambar 2, kandungan astaxanthin saat sel mengalami fase stasioner lebih tinggi dibandingkan fase logaritmik. Tingginya kadar pigmen saat fase stasioner, dikarenakan pada fase ini jumlah sel mencapai maksimum mengakibatkan terjadi keterbatasan sel dalam perolehan cahaya maupun nutrisi. Di samping itu juga, saat fase ini sel berusaha untuk mempertahankan dirinya sel meningkatkan produksi karotenoid. Kandungan CO<sub>2</sub> pada proses fotosintesis berkontribusi terhadap peningkatan pH. Perubahan pH berpengaruh terhadap penurunan biomassa dan destruksi klorofil. Sehingga meningkatkan produksi astaxanthin yang berperan membantu fotosintesis.

Konsentrasi KNO<sub>3</sub> sebesar 1,5 g/L memiliki kandungan astaxanthin tertinggi yaitu 17,875 ppm pada fase stasioner. Pada Gambar 3 juga terlihat, kelebihan maupun kekurangan KNO<sub>3</sub> sebagai sumber nitrogen dalam media kultur dapat mempengaruhi pembentukan karotenoid dan pigmen astaxanthin, sehingga dapat dikatakan bahwa Nitrogen sebagai faktor pembatas bagi pertumbuhan maupun untuk produksi pigmen. Berdasarkan uji anova atau *analysis of variance* dengan menggunakan program SPSS versi 19 diperoleh hasil nilai hitung

6,148 < F tabel 3,98 ( $\alpha = 5\%$ ) dengan signifikansi 0,865 (> 0,05), artinya bahwa hasil pengujian ini menolak H<sub>0</sub> dan menerima H<sub>1</sub> yang menyatakan: “terdapat perbedaan bermakna dari hasil pengujian kadar astaxanthin dari berbagai penambahan konsentrasi KNO<sub>3</sub>”

## 2. Variasi konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (kalium dihidrogen fosfat) dalam media tanam terhadap pertumbuhan Mikroalga *Botryococcus braunii*

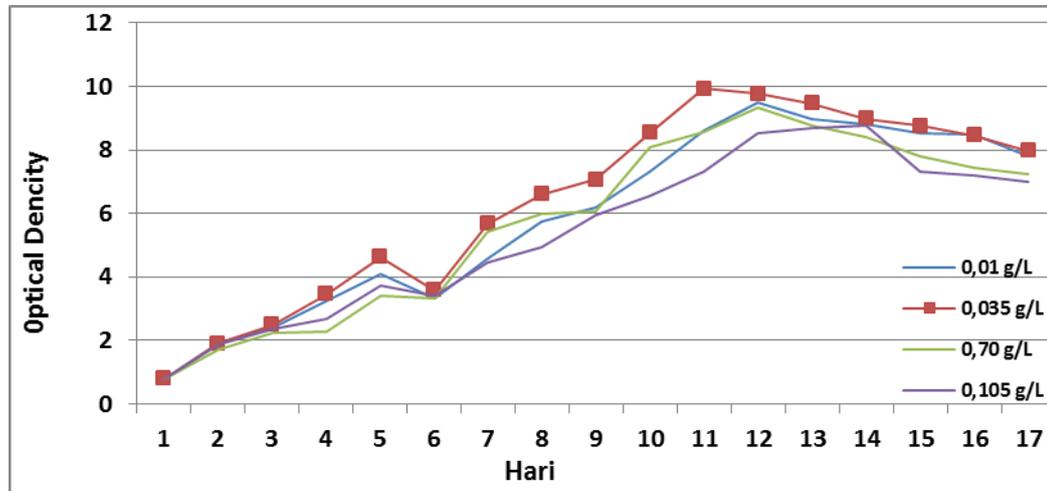
Setelah diketahui jumlah kalium nitrat yang optimum dalam media untuk menghasilkan Astaxanthin tertinggi pada pertumbuhan mikroalga *Botryococcus braunii* maka dilanjutkan dengan variasi konsentrasi kalium dihidrogen fosfat dengan menggunakan media jhonson dan merubah konsentrasi kalium nitrat menjadi 1,5 g/L sesuai dengan jumlah yang optimum untuk menghasilkan Astaxanthin tertinggi.

### 1.1 Pola Pertumbuhan pada Variasi konsentrasi kalium dihidrogen fosfat.

Perbandingan laju pertumbuhan mikroalga *Botryococcus braunii* dengan variasi pemberian kadar P adalah sebagai berikut, perbedaan pemberian kadar P terhadap kultur mikroalga *Botryococcus braunii* mempengaruhi laju



pertumbuhannya. Laju pertumbuhan terbaik dicapai dengan pemberian 0.035 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$



Gambar 3. Pola pertumbuhan kultur *Botryococcus braunii* pada berbagai penambahan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

## 2.2 Analisis Karotenoid pada Variasi konsentrasi kalium dihidrogen fosfat

Pada medium dengan penambahan kalium dihidrogen fosfat sebagai sumber fosfat menunjukkan bahwa adanya korelasi positif antara kepadatan biomasa dengan kandungan karotenoid mikroalga *Botryococcus brauni* yaitu, semakin tinggi populasi mikroalga atau

kepadatan biomassa pada mikroalga *Botryococcus braunii* maka semakin tinggi kadar karotenoidnya. Kandungan karotenoid mencapai hasil yang optimum ditunjukkan pada medium dengan penambahan kalium dihidrogen fosfat dengan konsentrasi 0.035 gr/l yaitu sebesar 69,62 ppm

Tabel 2. Biomassa dan kadar karotenoid *Botryococcus braunii* pada berbagai penambahan Kalium Dihidrogen Fosfat (ppm)

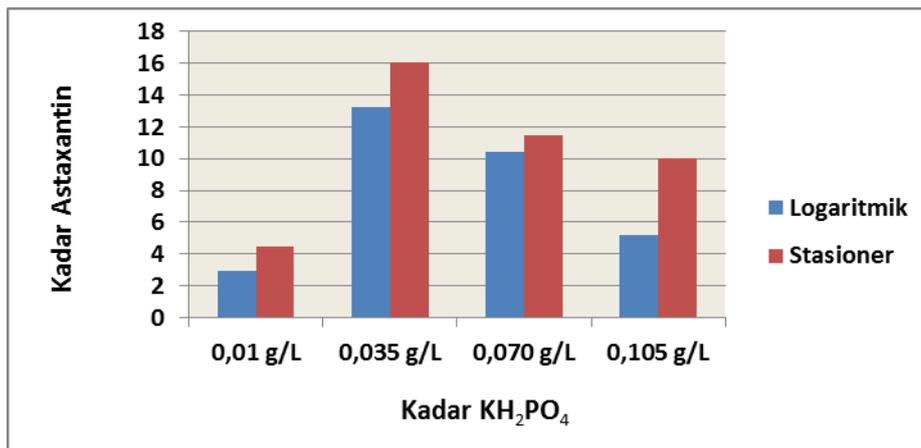
Fase Pertumbuhan	Sampel $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Biomassa Basah g/L	Karotenoid (ppm)
Logaritmik	0,01 g/L	11,25	20,74
	0,035 g/L	25	52,29
	0,070 g/L	9,625	44,41
	0,105 g/L	13,3	29,92
Stasioner	0,01 g/L	8,57	27,41
	0,035 g/L	37,035	69,62
	0,070 g/L	15,505	43,29
	0,105 g/L	11,835	39,72

## 2.3 Analisis Kadar Astaxanthin pada Variasi konsentrasi kalium dihidrogen fosfat

Hasil ekstraksi dengan perolehan astaxanthin pada ekstrak dari kultur

mikroalga *Botriococcus braunii* dengan variasi kalium dihidrogen fosfat sebagai sumber P adalah sebagai berikut:





Gambar 4. Astaxanthin *Botryococcus braunii* pada media dengan variasi penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Berdasarkan data-data tersebut, perbedaan pemberian kadar P pada kultur mikroalga *Botryococcus braunii* mempengaruhi jumlah Astaxanthin. Phosphor merupakan unsur penting penyusun Adenosin Triphosphat (ATP) yang secara langsung berperan dalam proses penyimpanan dan transfer energi yang terkait dalam proses metabolisme. Kadar Astaxanthin tertinggi diperoleh pada mikroalga dengan konsentrasi kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/L, dengan perolehan kadar 16,01 ppm yang diperoleh pada fase stasioner.

Hasil ANOVA dengan menggunakan SPSS versi 19 menunjukkan, nilai F hitung  $6,029 < F \text{ tabel } 3,98$  ( $\alpha = 5\%$ ) dengan signifikansi  $0,971 (> 0,05)$ , artinya bahwa hasil pengujian ini menolak  $H_0$  dan menerima  $H_1$  yang menyatakan: "Terdapat perbedaan bermakna dari hasil pengujian kadar astaxanthin pada fase logaritmik dengan fase stasioner dari berbagai penambahan konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>".

#### KESIMPULAN

1. Kandungan astaxanthin *Botryococcus braunii* tertinggi dihasilkan pada fase stasioner sebesar 17,875 ppm pada penambahan kalium nitrat 1,5 g/ dan sebesar 16,01 ppm pada media

penambahan kalium dihidrogen fosfat 0,035 g/l

2. Hasil dari analisis statistik menggunakan metoda ANOVA menyatakan Terdapat perbedaan bermakna dari hasil pengujian kadar astaxanthin dari berbagai penambahan konsentrasi KNO<sub>3</sub> maupun dari berbagai penambahan konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>".

#### DAFTAR PUSTAKA

- Harborne J.B. Metode fitokimia: penuntun dari modern menganalisis tumbuhan. Diterjemahkan padmawinata K dan Sudiro. Bandung:ITB Bandung; 1987. H.17-24, 158-165.
- Astaxanthin and Human Health – Medical Summary : Alga Technologies. Diambil dari : <http://algatechnologies.com>. Diakses 15 September 2012.
- Becker EW. Biotechnology and Microbiology, 1st edition. New York: Cambridge University Press; 1994. p. 9-41, 51-58.
- Botryococcus braunii* diambil dari : [http://en.wikipedia.org/wiki/Botryococcus\\_braunii](http://en.wikipedia.org/wiki/Botryococcus_braunii). Diakses 15 September 2012.
- Cohen Z, Taylor, Francis. Chemicals from Microalgae. Israel: Ben Gurion of the Negev; 1999. P. 205-253.
- Ambati RR, Ravi S, Aswathanarayana RG. Enhancement of Carotenoids in Green Alga-*Botryococcus braunii* in Various Autotrophic Media under Stress Conditions. International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences 2010.



- Dayanada C, Kumudha A, Sarada R and Ravishankar GA . Isolation, characterization and outdoor cultivation of green microalgae *Botryococcus sp.* Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 1992-2248.
- Dayananda C, Sarada R, Kumar V and Ravishankar GA. Isolation and characterization of hydrocarbon producing green alga *Botryococcus braunii* from Indian freshwater bodies. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458.
- London: The University of Wisconsin Press; 1987. p. 11-32.
- Wusqy , Karyvu. Astaxantin dari bakteri laut: biosintesis, manfaat dan potensi produksi masal. 2010.h.1-6.
- Harborne JB. Metode fitokimia. Terjemahan Padmawinata K, Sudiro I. Edisi II. Bandung: Penerbit ITB Bandung; 1987. H.6-7,42,125

Fogg GE, Thake B. Algal cultures and phytoplankton ecology. 3rd ed.

