

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/ma>

ANALISIS PENGARUH KONSENTRASI VANADAT (VO_4^{3-}) DALAM MEDIA KULTUR TERHADAP PERTUMBUHAN *Dunaliella* sp.

Andi Kurniawan^{*)#}, Mohammad Elham Firdaus^{*)}, Lutfi Ni'matus Salamah^{*)}, dan Siti Mariyah Ulfa^{*)}

^{*)} Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Pusat Studi Pesisir dan Kelautan, Universitas Brawijaya
Gedung Layanan Bersama UB Lt. 8, Jl. Veteran, Ketawanggede, Lowokwaru, Ketawanggede,
Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

^{*)} Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya
Jl. Veteran, Ketawanggede, Lowokwaru, Ketawanggede, Kec. Lowokwaru, Kota Malang, Jawa Timur 65145

(Naskah diterima: 4 Januari 2019; Revisi final: 22 Juni 2019; Disetujui publikasi: 24 Juni 2019)

ABSTRAK

Dunaliella sp. adalah mikroalga halotoleran yang banyak dijumpai pada lingkungan hipersalin. Mikrolaga ini mengandung berbagai substansi yang berharga seperti karotenoid, gliserol, lipid, protein dan vitamin sehingga banyak dibudidayakan. Salah satu faktor utama yang memengaruhi pertumbuhan *Dunaliella* sp. yang dibudidayakan adalah ketersediaan senyawa di dalam media kulturnya. Salah satu senyawa yang dapat menstimulus pertumbuhan mikroalga adalah vanadat (VO_4^{3-}). Penelitian ini menganalisis pengaruh konsentrasi vanadat dalam media kultur terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. Konsentrasi vanadat yang digunakan adalah 0,002 mg/L; 0,02 mg/L; 0,2 mg/L; dan 0 mg/L (kontrol). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keberadaan vanadat dalam media kultur memengaruhi secara signifikan pertumbuhan *Dunaliella* sp. di mana pertumbuhan terbaik didapatkan pada pemberian vanadat dengan konsentrasi 0,002 mg/L. Berdasarkan hasil penelitian ini, vanadat dalam media kultur dapat digunakan sebagai penstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp.

KATA KUNCI: *Dunaliella* sp.; pertumbuhan; media kultur; vanadat

ABSTRACT: *The effects of vanadate (VO_4^{3-}) concentrations in culture medium on the growth of *Dunaliella* sp. By: Andi Kurniawan, Mohammad Elham Firdaus, Lutfi Ni'matus Salamah, and Siti Mariyah Ulfa*

Dunaliella sp. is halotolerant microalgae commonly found in hypersaline waters. This microalgae contains various valuable substances such as carotenoids, glycerol, lipid, protein, and vitamins, and thus, widely cultivated. One of the primary factors that influence the growth of cultured *Dunaliella* sp. is the availability of certain nutrient/chemical compounds in its culture media. One of the compounds that can stimulate the growth of microalgae is vanadate (VO_4^{3-}). This study analyzed the effects of vanadate concentration in the culture media on the growth of *Dunaliella* sp. The vanadate concentrations used were 0.002 mg/L, 0.02 mg/L, 0.2 mg/L, and 0 mg/L as the control concentration. The results of this study suggested that the existence of vanadate in the culture media significantly affected the growth of *Dunaliella* sp. in which the best growth of *Dunaliella* sp. was obtained by the treatment with 0.002 mg/L of vanadate. This study recommends that the vanadate with concentration of 0.002 mg/L should be used in the culture media of *Dunaliella* sp.

KEYWORDS: *Dunaliella* sp.; growth; culture media; vanadate

PENDAHULUAN

Dunaliella sp. merupakan mikroalga yang termasuk ke dalam filum *Chlorophyta*. Mikroalga ini dilengkapi dengan sepasang flagela, dan berbentuk menyerupai

telur dengan ukuran 9-11 μ m (García *et al.*, 2007; Polle *et al.*, 2008; Byrd & Burkholder, 2017). *Dunaliella* sp. dikenal sebagai mikroalga dengan potensi yang cukup besar sehingga banyak dibudidayakan (Abu-Rezq *et al.*, 2010; Helena *et al.*, 2016; Imamoglu *et al.*, 2014; Malibari *et al.*, 2018). Mikroalga ini mengandung berbagai macam senyawa bermanfaat seperti gliserol, lipid, mineral, vitamin, protein, dan karotenoid. Salah satu potensi terbesar *Dunaliella* sp. adalah kandungan senyawa karotenoid terutama beta karotena yang

Korespondensi: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Pusat Studi Pesisir dan Kelautan, Universitas Brawijaya
Gedung Layanan Bersama UB Lt. 8, Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia.
Tel.: + 62 812 35352299
E-mail: andi_k@ub.ac.id

dapat mencapai 14 % dari bobot kering (Tafreshi & Shariati, 2009). Beta karotena merupakan pigmen terpenoid yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi (Prieto *et al.*, 2011).

Dunaliella sp. juga memiliki kelebihan lain yaitu relatif mudah dibudidayakan karena cukup toleran terhadap perubahan lingkungan dan dapat hidup di berbagai habitat bersalininitas tinggi (Chevanton *et al.*, 2013; Keerthi *et al.*, 2018; Novoveská *et al.*, 2016; Sathasivam *et al.*, 2018). Modifikasi-modifikasi lingkungan/media tumbuh *Dunaliella* sp. telah banyak dilakukan. Salah satu dari modifikasi ini adalah dengan pembuatan berbagai media kultur seperti media Johnson yang merupakan media yang paling umum dipakai dalam kultur *Dunaliella* sp. (Imamoglu *et al.*, 2014; Sathasivam & Juntawong, 2013; Santín-Montanyá *et al.*, 2007). Modifikasi media kultur untuk *Dunaliella* sp. juga dilakukan dengan memberikan senyawa-senyawa yang bisa digunakan sebagai stimulator pertumbuhan. Salah satu senyawa yang diduga dapat menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp. adalah vanadat (VO_4^{3-}) (Shathasivam & Juntawong, 2013).

Vanadat memiliki struktur kimia yang mirip dengan fosfat. Vanadat adalah bentuk oksidasi dari vanadium yang memiliki kemiripan struktur, analogi kelistrikan, dan reaksi protonasi dengan fosfat (Crans *et al.*, 2004). Analogi ini terlihat dari bentuk tetrahedral trianionik kedua ion tersebut (VO_4^{3-} dan PO_4^{3-}). Hanya saja pada kondisi sekitar pH netral, monomer vanadat ada dalam bentuk utama monoanion ($H_2VO_4^{3-}$) sedangkan fosfat ada dalam bentuk utama dianion (HPO_4^{3-}). Fosfat mempunyai peranan penting dalam metabolisme intraseluler di mana fosfat grup dapat meningkatkan solubilitas, serta membantu meningkatkan rekognasi enzim antara substrat seluler dan enzim (Crans *et al.*, 2004). Fosfat merupakan nutrisi penting untuk pertumbuhan mikroalga dan berperan penting dalam penyusunan struktur RNA dan DNA (Delgadillo-Mirquez *et al.*, 2016; D'Este *et al.*, 2018; Shah & Abdullah, 2018). Konsentrasi fosfat optimal dalam media kultur alga adalah lebih dari 2 mg/L (Mostert & Grobbelaar, 1987). Seperti halnya fosfat, vanadat juga dilaporkan dapat berperan sebagai penstimulus pertumbuhan dengan berperan pada biosintesis klorofil dan fotosintesis (Lee & Wendisch, 2017; Sathasivam & Juntawong, 2013).

Vanadate esensial untuk pertumbuhan *Dunaliella* sp. namun, penelitian tentang pengaruh konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. terutama pada konsentrasi rendah ($< 0,2$ mg/L) sangat jarang dilakukan. Penelitian terkait pengaruh vanadat (VO_4^{3-}) pada konsentrasi rendah tersebut sangat dibutuhkan untuk dapat mengetahui dosis vanadat (VO_4^{3-}) terbaik dalam media kultur untuk menstimulus

pertumbuhan *Dunaliella* sp. karena pada konsentrasi tinggi (lebih dari 2 mg/L) vanadat justru dapat menjadi racun bagi mikroalga (Crans *et al.*, 2004). Penelitian ini menganalisis pengaruh konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) $< 0,2$ mg/L pada media kultur terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. sehingga dapat memberikan informasi mengenai konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) terbaik untuk pertumbuhan *Dunaliella* sp. Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian vanadat (VO_4^{3-}) di media kultur dengan konsentrasi yang rendah ($< 0,2$ mg/L) dapat menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya pada bulan Februari sampai dengan Maret 2018. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan-bahan untuk membuat media kultur yang terdiri atas Media Johnson (media standar yang digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini) dan modifikasi dari media Ramaraj (Sathasivam *et al.*, 2013) terkait konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) sebagaimana dijelaskan pada Tabel 1.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan media dengan konsentrasi vanadat yang berbeda yaitu media A (0,002 mg/L); media B (0,02 mg/L); media C (0,2 mg/L); dan kontrol (0 mg/L). Penentuan konsentrasi ini didasarkan pada laporan bahwa pada konsentrasi tinggi, vanadat bersifat toksik untuk mikroalga (Sathasivam & Juntawong, 2013). Penentuan perbedaan konsentrasi sebesar 10 kali lipat (0,002-0,2 mg/L) dimaksudkan untuk dapat melihat pengaruh perbedaan konsentrasi vanadat dalam media kultur terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. Kepadatan awal *Dunaliella* sp. yang digunakan dalam penelitian ini adalah $\pm 1 \times 10^6$ sel/mL. Keseluruhan penelitian direplikasi sebanyak tiga kali secara *independent*. Masing-masing media kultur (1 L) dimasukkan ke dalam toples kaca (ukuran 2 L) dan diberikan aerasi untuk kemudian ditempatkan pada rak kultur dengan intensitas pencahayaan 2.800 lux (24 jam terang). Perhitungan kepadatan sel dilakukan setiap hari selama 11 hari masa kultur dengan menggunakan Mikroskop Olympus CX21 dan Neubauer Haemocytometer. Data hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Tukey HSD pada tingkat kepercayaan 95% dengan software SPSS Statistik 22.

HASIL DAN BAHASAN

Pertumbuhan *Dunaliella* sp. dalam empat media yang berbeda diamati setiap hari selama 11 hari (Gambar 1). Hasil pengamatan menunjukkan kepadatan

Tabel 1. Komposisi kimia dari media kultur *Dunaliella* sp. yang digunakan
 Table 1. Chemical compositions of culture medias of *Dunaliella* sp.

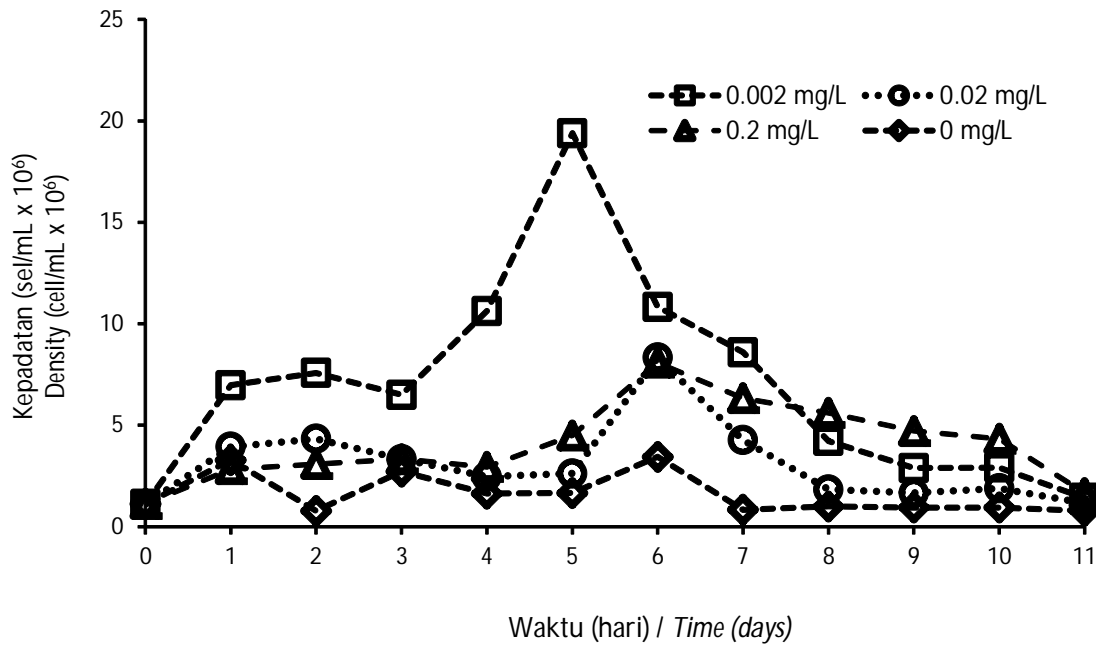
Bahan kimia Chemical material (g/L)	Media			
	Jhonson	A	B	C
H ₃ BO ₃	0.61	9.28	9.28	9.28
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.38	-	-	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.06	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05
ZnCl ₂	0.04	0.11	0.11	0.11
MnCl ₂ ·2H ₂ O	0.033	1.62	1.62	1.62
Na ₂ MoO ₄	-	0.49	0.49	0.49
NH ₄ VO ₃	-	0.002	0.02	0.2
CuCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.05	0.05	0.05
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1.5	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	1.23	1.23	1.23
KCl	0.2	0.2	0.2	0.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.2	0.044	0.044	0.044
KNO ₃	1	0.5	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	0.04	0.014	0.014	0.014
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0024	0.0005	0.0005	0.0005
Na ₂ EDTA	0.0018	0.074	0.074	0.074
NaHCO ₃	0.04	2.1	2.1	2.1
NaCl	87.7	87.7	87.7	87.7
pH [*]	7.5	7.5	7.5	7.5

Keterangan (Note): * pH diukur sebelum penambahan NaHCO₃ (pH measured before addition NaHCO₃)

sel *Dunaliella* sp. berbeda pada masing-masing media kultur. Hasil ini mengindikasikan media kultur yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan laju pertumbuhan *Dunaliella* sp. yang berbeda. Pertumbuhan mikroalga seperti *Dunaliella* sp. akan sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan termasuk keberadaan senyawa terlarut di media hidupnya (Kurniawan, 2011).

Pada semua media yang diujikan dalam penelitian ini, kepadatan *Dunaliella* sp. meningkat sejak hari pertama pengamatan. Kondisi ini mengindikasikan kalau pada semua media kultur, fase adaptasi *Dunaliella* sp. berlangsung cepat (kurang dari 24 jam) sehingga kepadatan sel sudah menunjukkan kenaikan dari hari pertama pengkulturan (Kim, 2015). Hasil dalam penelitian ini mengindikasikan kalau fase eksponensial pertumbuhan *Dunaliella* sp. pada semua media kultur terjadi mulai dari hari ke-1 dan mencapai puncak pertumbuhan pada hari ke-5 atau ke-6.

Pada media A (konsentrasi vanadat 0,002 mg/L) pertumbuhan mencapai puncak pada hari ke-5 sedangkan media lainnya termasuk kontrol mengalami puncak pertumbuhan sel pada hari ke-6. Perbedaan ini bisa disebabkan karena vanadat dalam konsentrasi yang lebih rendah mampu dimanfaatkan dengan lebih baik oleh mikroalga (Crans *et al.*, 2004) sehingga pada media A mencapai puncak kepadatan lebih cepat dibandingkan dengan media B, media C, dan kontrol. Vanadat berfungsi sebagai *trace element* yang merupakan elemen esensial untuk pertumbuhan organisme seperti mikroalga. Vanadat dapat berperan sebagai *counterions* untuk protein, DNA, RNA, dan berbagai organela sel (Sathasivam & Juntawong, 2013). Keberadaan vanadat dalam jumlah terbatas dapat menjaga berbagai struktur biologi dan menjadi kunci berbagai reaksi terkait protein terutama pertumbuhan dan perkembangan sel (Crans *et al.*, 2004). Fase puncak pertumbuhan setelah sekitar 126 jam pengkulturan



Gambar 1. Kepadatan sel *Dunaliella* sp. pada media kultur yang berbeda.
 Figure 1. Cell density of *Dunaliella* sp. in different culture media.

(5-6 hari) merupakan kisaran waktu yang pada umumnya dibutuhkan oleh mikrolaga seperti *Dunaliella* sp. untuk mencapai puncak kepadatan sel (Becerra-Dórame *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2017; Pradana *et al.*, 2017).

Setelah mencapai puncak pertumbuhan, kepadatan sel *Dunaliella* sp. pada ke seluruh media yang digunakan dalam penelitian ini mengalami penurunan. Hal ini mengindikasikan kalau setelah mencapai puncak pertumbuhan, terjadi penurunan laju pertumbuhan dan juga kematian *Dunaliella* sp. Kejadian ini bisa diakibatkan karena berkurangnya nutrisi dalam media kultur seiring dengan peningkatan kepadatan sel yang tinggi. Kompetisi antara sel *Dunaliella* sp. juga berpengaruh terhadap kemampuan pembelahan sel sehingga mengakibatkan produksi sel semakin berkurang (Abidin & Trihandaru, 2009).

Analisis statistik sidik ragam (ANOVA) dilakukan untuk mengetahui secara lebih jelas pengaruh perbedaan konsentrasi vanadat yang terjadi. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa nilai *significance* lebih kecil dari 0,05 yang menandakan kalau konsentrasi vanadat yang berbeda memberi pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. (Nawari, 2010). Data hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa konsentrasi vanadat memberi pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp.

Selanjutnya dilakukan uji Tukey HSD untuk membandingkan keseluruhan pasangan perlakuan

setelah uji analisis ragam dilakukan (Saefuddin *et al.*, 2009). Hasil uji Tukey HSD menunjukkan bahwa perlakuan kontrol dan media B memiliki perbedaan yang paling kecil (Hsu, 1996). Sedangkan perlakuan media C dan perlakuan media A memberikan perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. Hasil ini menunjukkan kalau dosis vanadat terbaik untuk menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp. ada pada perlakuan media A yaitu sebesar 0,002 mg/L. Perlakuan pemberian vanadat dengan dosis yang rendah dapat menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp. secara lebih baik dibanding perlakuan dosis yang lebih tinggi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kadar vanadat (VO_4^{3-}) yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pertumbuhan *Dunaliella* sp. Hasil dalam penelitian ini menunjukkan bahwa kadar vanadat (VO_4^{3-}) yang paling baik untuk mendukung pertumbuhan *Dunaliella* sp. adalah 0,002 mg/L. Vanadat (VO_4^{3-}) adalah keadaan teroksidasi dari vanadium (V) yang merupakan *trace element* yang esensial untuk kehidupan mikroalga. Elemen ini dapat memainkan peranan penting bagi kehidupan dengan berperan sebagai *counterions* untuk protein, DNA, RNA, dan berbagai organel sel (Crans *et al.*, 2004). Vanadat (VO_4^{3-}) juga memiliki struktur kimia yang mirip dengan fosfat dan dapat berperan pada biosintesis klorofil dan fotosintesis. Akan tetapi, walaupun vanadat (VO_4^{3-}) dapat berfungsi untuk menstimulus pertumbuhan, elemen ini hanya dibutuhkan dalam jumlah yang kecil. Keberadaan

vanadat (VO_4^{3-}) dalam jumlah yang besar justru dapat menjadi racun untuk kehidupan mikroalga seperti *Dunaliella* sp. (Shatasivam & Juntawong, 2013). Kelebihan vanadat justru bisa mengganggu pembentukan protein dan menyebabkan gangguan pada RNA maupun DNA. Kelebihan vanadat dilaporkan dapat mengakibatkan kematian sel (Capella *et al.*, 2002; Elfant & Keen, 1987). Oleh karena itulah, untuk dapat menjadikan vanadat (VO_4^{3-}) sebagai stimulator pertumbuhan untuk *Dunaliella* sp. maka elemen ini harus diberikan dalam konsentrasi rendah dalam media kultur.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) secara signifikan memengaruhi laju pertumbuhan *Dunaliella* sp. Konsentrasi vanadat (VO_4^{3-}) terbaik untuk menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp. adalah 0,002 mg/L. Berdasarkan hasil penelitian ini, vanadat (VO_4^{3-}) dalam dosis yang rendah pada media kultur dapat digunakan untuk menstimulus pertumbuhan *Dunaliella* sp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nurjannah, Ph.D. dari Jurusan Statistik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Brawijaya untuk masukan dan diskusi terkait analisis data dalam penelitian ini. Penelitian dan publikasi ini didanai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi dengan pelaksanaan kegiatan di bawah koordinasi Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Brawijaya.

DAFTAR ACUAN

- Abidin, D. & Trihandaru, S. (2009). Monitoring densitas optik *Dunaliella salina* dengan *optical densitometer* sederhana serta uji kandungan klorofil. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains IV*. (hlm. 602). Salatiga, Indonesia: Departement of Science and Math, UKSW Salatiga.
- Abu-Rezq, T.S., Al-Hooti, S., & Jacob, D.A. (2010). Optimum culture conditions required for the locally isolated *Dunaliella salina*. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 1(2), 12-19.
- Becerra-Dórame, M., López-Elías, J.A., & Martínez-Córdova, L.R. (2010). An alternative outdoor production system for the microalgae *Chaetoceros muelleri* and *Dunaliella* sp. during winter and spring in Northwest Mexico. *Aquacultural Engineering*, 43, 24-28.
- Byrd, S.M. & Burkholder, J.M. (2017). Environmental stressors and lipid production in *Dunaliella* spp. II. Nutrients, pH, and light under optimal or low salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 487, 33-44.
- Capella, L.S., Gefe, M.R., Silva, E.F., Affonso-Mitidieri, O., Lopes, A.G., Rumjanek, V.M., & Capella, M.A. (2002). Mechanisms of vanadate-induced cellular toxicity: role of cellular glutathione and NADPH. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 406, 65-72.
- Chevanton, M.L., Garnier, M., Bougaran, G., Schreiber, N., Lukomska, E., Berard, J.-B., Foulland, E., Bernard, O., & Cadoret, J.-P. (2013). Screening and selection of growth-promoting bacteria for *Dunaliella* cultures. *Algal Research*, 2, 212-222.
- Crans, D.C., Smee, J.J., Gaidamauskas, E., & Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chemical Review*, 104(2), 849-902.
- D'Este, M., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2018). Amino acids production focusing on fermentation technologies: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 14-25.
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18-26.
- Elfant, M. & Keen, C.L. (1987). Sodium vanadate toxicity in adult and developing rats. *Biological Trace Element Research*, 14, 193-208.
- García, F., Freile-Pelegrín, Y., & Robledo, D. (2007). Physiological characterization of *Dunaliella* sp. (Chlorophyta, Volvocales) from Yucatan, Mexico. *Bioresource Technology*, 98, 1359-1365.
- Helena, S., Zainuri M., & Suprijanto, J. (2016). Microalgae *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) growth using the LED light (Light Limiting Dioda) and Different Media. *Aquatic Procedia*, 7, 226-230.
- Hsu, J. (1996). Multiple Comparisons: Theory and Methods (pp. 82). Florida: CRC Press.
- Imamoglu, E., Demirel, Z., & Dalay, M. C. (2014). Evaluation of culture conditions of locally isolated *Dunaliella salina* strain EgeMacc-024. *Biochemical Engineering Journal*, 92, 22-27.
- Keerthi, S., Koduru, U.D., Nittala, S.S., & Parine, N.R. (2018). The heterotrophic eubacterial and archaeal co-inhabitants of the halophilic *Dunaliella salina* in solar salterns fed by Bay of Bengal along south

- eastern coast of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 1411-1419.
- Kim, G.Y., Heo, J., Kim, H.S., & Han, J.I. (2017). Bicarbonate-based cultivation of *Dunaliella salina* for enhancing carbon utilization efficiency. *Bioresource Technology*, 237, 72-77.
- Kim, S. (2015). Biothecnology advances. Handbook of marine microalgae (p. 57). Amsterdam: Academic Press.
- Kurniawan, A. (2011). Pendugaan status pencemaran air dengan plankton sebagai bioindikator di pantai Kabupaten Banyuwangi Jawa Timur. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 4(1), 18-23.
- Lee, J.H. & Wendisch, V.F. (2017). Production of amino acids: Genetic and metabolic engineering approaches. *Bioresource Technology*, 245, 1575-1587.
- Malibari, R., Sayegh, F., Elazzazy, A.M., Baeshen, M.N., Dourou, M., & Aggelis, G. (2018). Reuse of shrimp farm wastewater as growth medium for marine microalgae isolated from Red Sea, Jeddah. *Journal of Cleaner Production*, 198, 160-169.
- Mostert, E.S. & Grobbelaar, J.U. (1987). The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoors mass algal cultures. *Biomass*, 13, 219-233.
- Nawari. (2010). Analisis statistik dengan MS. Excel 2007 dan SPSS 17. Jakarta: Elex Media Komputindo, 186 hlm.
- Novoveská, L., Franks, D.T., Wulfers, T.A., & Henley, W.J. (2016). Stabilizing continuous mixed cultures of microalgae. *Algae Research*, 13, 126-133.
- Polle, J.E.W., Struwe, L., & Jin, E. (2008). Identification and characterization of a new strain of the unicellular green alga *Dunaliella salina* (Teod.) from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(5), 821-827.
- Pradana, D.P., Putri, B., & Hudaidah, S. (2017). Pengaruh intensitas cahaya terhadap pertumbuhan dan kandungan karotenoid *Dunaliella* sp. pada media ekstrak daun lamtoro *Leucaena leucephala*. *Scripta Biologica*, 5(4), 263-267.
- Prieto, A., Canavate, J.P., & Garcia-Gonzalez, M. (2011). Assessment of carotenoid production by *Dunaliella salina* in different culture systems and operation regimes. *Journal of Biotechnology*, 151, 180-185.
- Saefuddin, A., Notodiputro, K.A., Alamudi, A., & Sadik, K. (2009). Statistika dasar. Jakarta: Grasindo, 102 hlm.
- Santín-Montanyá, I., Sandín-España, P., García Baudín, J.M., & Coll-Morales, J. (2007). Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides. *Chemosphere*, 66, 1315-1322.
- Sathasivam, R. & Juntawong, N. (2013). Modified medium for enhanced growth of *Dunaliella* strains. *Int. J. Curr. Sci.*, 5, 67-73.
- Sathasivam, R., Pongpadung, P., Praiboon, J., Chirapart, A., Trakulnaleamsai, S., Roytrakul, S., & Juntawong, N. (2018). Optimizing NaCl and KNO₃ concentrations for high β -carotene production in photobioreactor by *Dunaliella salina* KU11 isolated from saline soil sample. *Chiang Mai J. Sci.*, 45(1), 106-115.
- Shah, S.M.U. & Abdullah, M.A. (2018). Effects of macro/micronutrients on green and brown microalgal cell growth and fatty acids in photobioreactor and open-tank systems. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 10-17.
- Tafreshi, A.H. & Shariati, M. (2009). *Dunaliella* biotechnology: Methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 14-35.