



PERTUMBUHAN DAN METABOLIT SEKUNDER *Chlorella sorokiniana* YANG DIKULTUR PADA LIMBAH CAIR TAHU

Devy Susanty*¹, Ade Ayu Oksari²

¹Program studi kimia, FMIPA, Universitas Nusa Bangsa, Jl. KH. Sholeh Iskandar Km. 4, Tanah Sareal, Bogor

²Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Nusa Bangsa, Jl. KH. Sholeh Iskandar Km. 4, Tanah Sareal, Bogor

*email korespondensi : dvsusanty@gmail.com

Diterima: Oktober 2021; Direvisi: November 2021; Disetujui: Desember 2021

ABSTRAK

Pemanfaatan limbah sebagai media kultur dapat menekan biaya produksi dan menjadi salah satu cara penanganan limbah. Limbah cair tahu (LCT) merupakan salah satu limbah yang banyak dihasilkan dan berpotensi sebagai media tumbuh *Chlorella sorokiniana*. Hal ini karena LCT telah diketahui mengandung makronutrien seperti nitrogen, fosforus, dan kalium. Penelitian ini bertujuan menentukan pertumbuhan *C. sorokiniana* pada media LCT, menentukan kandungan metabolit sekunder dan total fenolik pada ekstrak etanol *C. sorokiniana* yang dikultur pada media limbah tahu. Mikroalga dikultur pada konsentrasi media LCT 15, 20, 25, dan 30%. Pertumbuhan terbaik diperoleh pada media LCT dengan konsentrasi 30%. Biomassa mikroalga yang diperoleh dari hasil kultivasi pada media terbaik diekstraksi menggunakan metode maserasi berulang dengan pelarut etanol. Metabolit sekunder pada ekstrak dianalisis dengan uji fitokimia. Hasil uji menunjukkan keberadaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan terpenoid. Uji total fenolik dengan pereaksi Folin Ciocalteu menghasilkan 14,16 mg GAE/g dan total flavonoid ekstrak adalah 40,59 mg QE/g yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut berpotensi memiliki aktivitas hayati seperti antimikroba dan antioksidan.

Kata Kunci : *Chlorella sorokiniana*, limbah cair tahu, flavonoid, metabolit sekunder, fenolik

GROWTH AND SECONDARY METABOLITES of *Chlorella sorokiniana* CULTURED IN TOFU LIQUID WASTE

ABSTRACT

Utilizing waste as a culture medium can reduce production costs and become a way of handling waste. Tofu liquid waste (LCT) is one of the wastes that is produced and has the potential as a growth medium for *Chlorella sorokiniana*. LCT has been known to contain macronutrients such as nitrogen, phosphorus, and potassium. This study aims to determine the growth of *C. sorokiniana* on LCT media, determine the content of secondary metabolites and total phenolics in the ethanol extract of *C. sorokiniana* cultured on tofu waste media. Microalgae were cultured at LCT media concentrations of 15, 20, 25, and 30%. The best growth was obtained on LCT media with a concentration of 30%. The microalgae biomass obtained from cultivation on the best media was extracted using the repeated maceration method with ethanol as solvent. The secondary metabolites in the extract were analyzed by phytochemical test. The test results showed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, and terpenoids. Total phenolic test with Folin Ciocalteu reagent gave 14.16 mg GAE/g, and total flavonoid extract was 40.59 mg QE/g which indicated that the extract has potential as antimicrobial and antioxidant.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*,, *tofu liquid waste*, *flavonoids*, *secondary metabolites*, *phenolic*

Pendahuluan

Mikroalga merupakan mikroorganisme yang bermanfaat di berbagai bidang di antaranya bidang energi (Makareviciene *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011) dan kesehatan (Olasehinde *et al.*, 2019). Pemanfaatan mikroalga di bidang kesehatan terkait dengan kandungan senyawa yang terdapat dalam mikroalga tersebut. Salah satu mikroalga yang dapat dimanfaatkan ialah *Chlorella sorokiniana*. Ekstrak spesies ini mengandung fenol dan flavonoid yang mendukung kemampuannya sebagai antioksidan (Olasehinde *et al.*, 2019; Hamed *et al.*, 2017; Petruk *et al.*, 2019).

Media kultur merupakan hal penting dalam memanfaatkan *C. sorokiniana*. Pemanfaatan limbah pada kultur mikroalga dapat menekan biaya produksi dan menjadi salah satu solusi penanganan limbah. Jenis mikroalga ini diketahui mampu tumbuh baik pada limbah (Qiu *et al.*, 2020) seperti limbah domestik (Ramanna *et al.*, 2014) dan limbah peternakan (Chen *et al.*, 2020; Susanty and Oksari, 2020).

Salah satu limbah yang juga dapat dimanfaatkan sebagai media kultur *Chlorella* ialah limbah cair tahu. Di Indonesia, banyak industri tahu dengan limbah cair sekitar sekitar 20 juta m³/tahun (Widayat *et al.*, 2016). Pengolahan limbah cair tahu yang masih belum baik oleh sebagian industri dapat menimbulkan masalah pencemaran pada air sungai (Kesuma *et al.*, 2013). Agar limbah ini tidak terbuang dan mencemari air sungai, maka sebaiknya dimanfaatkan untuk media kultur mikroalga. Limbah tersebut dapat digunakan sebagai media kultur mikroalga karena mengandung nutrisi seperti karbon, nitrogen, dan fosforus (Syaichurrozi *et al.*, 2017). Beberapa mikroalga diketahui dapat tumbuh pada limbah cair tahu seperti *Chlorella pyrenoidosa* (Munir *et al.*, 2017) dan *Chlorella* sp. (Aulia *et al.*, 2017). Potensi *C. sorokiniana* untuk hidup pada limbah cair tahu belum diketahui. Untuk itu, penelitian ini bertujuan mengevaluasi pertumbuhan *C. sorokiniana* pada berbagai konsentrasi limbah cair tahu dan kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanolnya.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah kultur mikroalga *C. sorokiniana* (InaCCM 38), limbah cair tahu (LCT) yang berasal dari daerah Ciriung, Kabupaten Bogor, alkohol 96%, larutan NaOH 2N, asam tanat, asam klorida, asam sulfat, asam asetat anhidrida, 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich), etanol 96%, FeCl₃, reagen Folin-Ciocalteu (Merck), kloroform, kuersetin (Himedia), Na₂CO₃, reagen Dragendorff, reagen Mayer, reagen Wagner, pita Mg, AlCl₃ 10%, dan kalium asetat 1M.

Alat yang digunakan ialah lampu TL (3000-4000 lux), hemositometer, *laminar air flow*, sentrifus (Hettich Zentifugen EBA 20), spektrofotometer ultraviolet-tampak (UV-Vis) (Optizen™ POP-Smart), dan peralatan kaca.

Persiapan Media LCT

Media LCT disiapkan dalam 4 ragam konsentrasi, yaitu 15, 20, 25, dan 30% (v/v) dan diatur pH 7. Media LCT disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

Kultivasi pada media LCT (Azhar *et al.*, 2017)

C. sorokiniana dikultivasi pada media LCT steril, pada suhu ruang dan pencahayaan dari lampu dengan intensitas 3000–4000 lux. Densitas sel dihitung dengan hemositometer. Laju pertumbuhan spesifik mikroalga (*k*) dihitung dengan rumus:

$$k = 3,22 \frac{\log(\frac{n_1}{n_0})}{T_1 - T_0}$$

Keterangan:

- n*₁ : kepadatan sel pada hari ke-*n*
- n*₀ : kepadatan sel awal (sebelumnya)
- T*₁ : hari ke-*n*
- T*₀ : hari sebelumnya

Ekstraksi

Biomassa sel dengan pertumbuhan terbaik diekstraksi dengan etanol 96% [1:10 (b/v)], menggunakan *shaker* selama 3 hari. Ekstrak diuapkan pada suhu 50 °C (tekanan 1 atm) menggunakan penguap putar hingga tidak ada lagi pelarut yang menetes. Sisa pelarut yang masih ada diuapkan.

Uji Fitokimia Ekstrak

Kandungan bioaktif ekstrak etanol diuji secara kualitatif, meliputi alkaloid, terpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin (Harbone, 1987).

Uji Total Fenolik (Azaman *et al.*, 2017)

Total fenolik ditentukan dengan metode Folin Ciocalteu. Sebanyak 50 mg ekstrak etanol dilarutkan dengan akuades hingga volume larutan 50 mL. Sebanyak 1 mL larutan tersebut diambil dan ditambah reagen 10% sebanyak 2,5 mL, dan didiamkan selama 5 menit. Setelah itu 2,5 mL Na₂CO₃ 7,5% ditambahkan dan didiamkan kembali selama 45 menit dalam ruang gelap. Asam galat sebagai standar juga direaksikan dengan cara yang sama dengan konsentrasi deret 5, 10, 15, 20, dan 25 mg/L. Absorbans diukur pada panjang gelombang 760 nm. Total fenol ekstrak sampel dinyatakan dengan rumus :

$$\text{Total fenol (mg } \frac{\text{GAE}}{\text{g}}) = c \frac{V}{m}$$

Keterangan:

c = kadar dari kurva standar (mg/L)

V = volume sampel (L)
 m = bobot sampel (g)

Uji Total Flavonoid (Azizah et al., 2014 (modifikasi)
 Ekstrak etanol (50 mg) ditimbang dan dilarutkan dalam akuades hingga 50 mL. Sebanyak 1 mL larutan ditambahkan 0,2 mL $AlCl_3$ 10%, 0,2 mL kalium asetat 1 M dan 3 mL etanol, kemudian dicukupkan dengan akuades hingga volume akhir 10 mL. Setelah 30 menit, serapan larutan diukur pada panjang gelombang 425 nm. Flavonoid total ditentukan dengan menggunakan rumus:

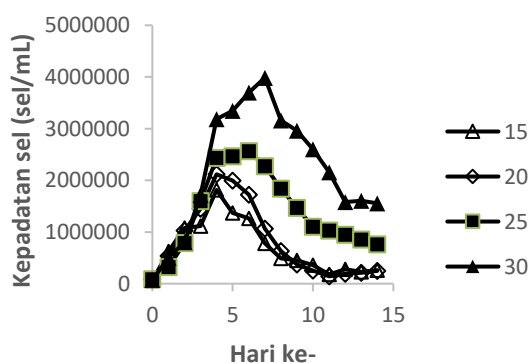
$$\text{Total flavonoid mgQE/g} = c \frac{V}{m}$$

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan *Chlorella sorokiniana* pada Media Limbah Cair Tahu (LCT)

C. sorokiniana memperlihatkan kemampuan tumbuh baik dalam media LCT, pada semua konsentrasi. Namun, pertumbuhan terbaik ialah pada konsentrasi media LCT 30%. Pada media LCT 30%, mikroalga ini langsung dapat beradaptasi dan jumlah selnya meningkat hingga hari ke-7 dengan kepadatan sel $3,98 \times 10^6$ sel/mL. Kepadatan sel tertinggi pada media lainnya ialah $2,56 \times 10^6$ sel/mL (konsentrasi 25% dan hari ke-6), $2,12 \times 10^6$ sel/mL (konsentrasi 20% dan hari ke-4), $1,81 \times 10^6$ sel/mL (konsentrasi 15% dan hari ke-4). Kepadatan sel dari hari pertama hingga hari ke-14 dapat dilihat pada Gambar 1.

Kemampuan tumbuh *C. sorokiniana* pada media limbah cair tahu dapat dilihat dari laju pertumbuhannya (Tabel 1). Pada hari pertama, tampak pertumbuhan cepat pada semua konsentrasi media. Namun, laju pertumbuhan hari kedua melambat. Pada media LCT dengan konsentrasi 15 dan 20%, spesies *Chlorella* ini mampu tumbuh hingga hari ke-4. Pada LCT 25%, kemampuan tumbuh masih terjadi hingga hari ke-6 dan melambat di hari berikutnya. Pada media LCT 30%, mikroalga ini masih mampu tumbuh hingga hari ke-7.



Gambar 1. Kepadatan Sel *Chlorella sorokiniana* pada Berbagai Konsentrasi Media Limbah Cair Tahu

Rata-rata kepadatan sel yang tinggi pada media LCT 30% disebabkan jumlah LCT yang diberikan sudah sesuai sehingga *C. sorokiniana* mampu memanfaatkan sumber nutrisi tersebut dengan efektif. Hal ini sejalan dengan pernyataan Munir et al. (2017), bahwa kadar nutrisi yang tepat dapat diserap ke dalam sel yang berperan penting dalam proses biosintesis dan digunakan dalam metabolisme. Nutrisi dalam media memengaruhi kemampuan mikroalga untuk beradaptasi dan tumbuh. Jumlah serta rasio nitrogen:fosforus memengaruhi laju pertumbuhan mikroalga (Lee et al., 2013).

Berdasarkan data pertumbuhan tersebut, dapat diketahui juga bahwa limbah cair tahu dapat dijadikan media tumbuh *C. sorokiniana*. Hal ini karena LCT mengandung makronutrien seperti N, P, dan K yang dibutuhkan oleh mikroalga. LCT mengandung nitrogen 13,8 mg/L, fosforus 29,6 mg/L, dan kalium 511 mg/L (Gisela, 2021).

Pertumbuhan *C. sorokiniana* pada media LCT terlihat tidak mengalami fase lag, sebagaimana terlihat pada laju pertumbuhan yang tinggi di hari pertama. Ini menandakan bahwa spesies tersebut mampu beradaptasi dan menyerap nutrisi dari media. Laju pertumbuhan pada LCT 30% berfluktuasi meskipun kepadatan sel meningkat hingga hari ke-7. Hal ini dapat disebabkan oleh sel yang mampu bertahan dan berkembang, meskipun ada juga yang mati (Hanifa et al., 2019).

Tabel 1. Laju Pertumbuhan *Chlorella sorokiniana* pada Berbagai Variasi Konsentrasi Media Limbah Cair Tahu (LCT)

Hari Ke-	LCT 15%		LCT 20%		LCT 25%		LCT 30%	
	kepadatan sel	k	kepadatan sel	k	kepadatan sel	k	kepadatan sel	k
0	63500		88500		87500		72000	
1	623500	3.19	536500	2.52	320000	1.81	500000	2.71
2	1080000	0.77	1030000	0.91	786500	1.26	806500	0.67
3	1113500	0.04	1446500	0.47	1596500	0.99	1713500	1.05
4	1813500	0.68	2116500	0.53	2436500	0.59	3183500	0.87
5	1366500	-0.40	1993500	-0.08	2466500	0.02	3343500	0.07
6	1266500	-0.11	1723500	-0.20	2563500	0.05	3696500	0.14
7	780000	-0.68	1066500	-0.67	2276500	-0.17	3986500	0.11
8	490000	-0.65	630000	-0.74	1840000	-0.30	3160000	-0.32
9	450000	-0.12	370000	-0.74	1470000	-0.31	2960000	-0.09
10	360000	-0.31	256500	-0.51	1100000	-0.41	2603500	-0.18
11	180000	-0.97	140000	-0.85	1026500	-0.10	2153500	-0.27
12	276500	0.60	190000	0.43	950000	-0.11	1580000	-0.43
13	230000	-0.26	210000	0.14	856500	-0.14	1606500	0.02
14	260000	0.17	246500	0.22	763500	-0.16	1556500	-0.04

Fitokimia Ekstrak Etanol

Ekstrak etanol dari kultur pada media LCT 30% diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, dan fenolik (Tabel 2). Kandungan golongan senyawa tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang kesehatan. Flavonoid dilaporkan memiliki aktivitas hayati sebagai antioksidan (Pradhan *et al.*, 2021), antimikrob dan antikanker (Jayshree *et al.*, 2016). Alkaloid banyak ditemukan pada tumbuhan dan juga memiliki aktivitas sebagai antikanker, antijamur, dan antibakteri (Gutierrez *et al.*, 2012). Kandungan metabolit sekunder dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya ialah metode pengolahan (Pyo *et al.*, 2014). Dalam hal ini pengolahan dalam memperoleh ekstrak, yaitu dengan maserasi dalam pelarut etanol. Etanol mampu mengekstraksi hampir seluruh metabolit yang ada pada sel. Teknik maserasi juga memungkinkan terjaganya metabolit sekunder dari kerusakan atau penguapan.

Tabel 2. Uji Fitokimia Ekstrak *Chlorella sorokiniana*

No	Pengujian	Hasil
1	Alkaloid a. Wagner b. Dragendorff c. Mayer	++
2	Flavonoid	++
3	Steroid/triterpenoid	+
4	Fenolik/Tanin	+
5	Saponin	-

Keterangan: (+) : sedikit
 (++) : cukup banyak
 (-) : Tidak ada

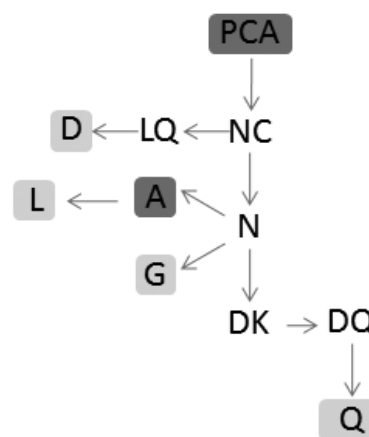
Total Fenolik Ekstrak Etanol

Ekstrak etanol *C. sorokiniana* yang dikultur pada media LCT 30% memiliki total fenolik 14,16 mg GAE/g. Kadar ini tidak begitu berbeda dengan temuan Olasehinde *et al.* (2019) yang menunjukkan hasil total fenolik ekstrak etanol dari spesies yang sama yang dikultur dengan media BG-11, yakni 14,21 mg GAE/g. Total fenolik diperoleh lebih tinggi pada ekstrak dengan pelarut yang lebih polar dibandingkan pelarut nonpolar. Ekstrak dari kultur pada vinase tebu (dengan tambahan N, P, dan K sebanyak 20, 5, dan 20 g/L) mengandung total fenolik 15,28 mg GAE/g (Ansilago *et al.*, 2021). Total fenolik pada penelitian Lai dan Sun (2017) dengan ekstraksi menggunakan etanol 75% pada tepung *C. sorokiniana* yang diperoleh dari Taiwan Chlorella Manufacturers, Ltd., hanya 3,17 GAE/g. Dengan demikian, kandungan metabolit sekunder pada suatu spesies dipengaruhi oleh lingkungan media tumbuh dan prosedur ekstraksinya.

Ekstraksi dengan pelarut etanol dan metanol menunjukkan hasil yang lebih tinggi untuk total fenolik dibandingkan ekstraksi dengan pelarut etil asetat dan aseton (Safafar *et al.*, 2015). Senyawa fenolik dalam *Chlorella* yang sama juga mengandung asam kafeat, asam ferulat, asam *p*-kumarat, dan asam sinamat. Goiris *et al.* (2014) menambahkan bahwa pada *Chlorella*, senyawa fenolik terbanyak ialah floroglusinol dan asam *p*-kumarat.

Total Flavonoid Ekstrak Etanol

Total flavonoid ekstrak etanol *C. sorokiniana* yang dikultur pada media LCT 30% ialah 40,59 mg QE/g. Dari spesies yang sama, Olasehinde *et al.* (2019) melaporkan total flavonoid ekstrak etanol 11,54 mg QE/g, lebih rendah daripada ekstrak diklorometana (18,36 mg QE/g). Kandungan flavonoid pada ekstrak dari media vinase tebu (dengan tambahan N, P, dan K sebanyak 20, 5, dan 20 g/L) mengandung total flavonoid 72,30 mg QE/g (Ansilago *et al.*, 2021). Asam *p*-kumarat merupakan salah satu prekursor penting pada biosintesis flavonoid (Goiris *et al.*, 2014). Asam organik tersebut diketahui merupakan komponen mayor pada *Chlorella* membentuk naringenin kalkon yang kemudian dapat membentuk naringenin (Gambar 2). Naringenin menjadi awal terbentuknya apigenin. Apigenin juga merupakan komponen mayor pada *Chlorella*. Senyawa lainnya yang dapat disintesis ialah daidzein, luteolin, genistein, dan kuersetin (Goiris *et al.*, 2014).



Gambar 2. Jalur metabolisme beberapa flavonoid pada *Chlorella vulgaris*. Abu tu: komponen mayor dan abu muda: komponen minor. PCA: asam *p*-kumarat, NC: naringenin kalkon, PHL: Phloretin, LG: likuiritigenin, D: Daidzein, A: Apigenin, G: Genistein, L: Luteolin: DK: Dihidroksamferol, DQ: Dihidroksisetin, K: Kamferol, Q: Kuersetin (Goiris *et al.*, 2014).

Kesimpulan

C. sorokiniana dapat tumbuh pada media limbah cair tahu dengan pertumbuhan terbaik pada konsentrasi media 30%. Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin dan terpenoid. Ekstrak mengandung sekitar 14 mg GAE/g total fenolik dan sekitar 40 mg QE/g total flavonoid, Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang dapat berpotensi sebagai antimikroba dan antioksidan.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada kemenristek dikti yang telah mendanai penelitian ini dengan skema penelitian dosen pemula

Daftar Putaka

- Aulia, M., Istirokhatun, T., Sudarno. (2017). Penyisihan Kadar COD dan Nitrat melalui Kultivasi *Chlorella* sp dengan Variasi Konsentrasi Limbah Cair Tahu. *J Tek Lingkungan*, 6(2),1-9.
- Ansilago, M., Ramos, M. M., Mussury, R.M., Carvalho, E.M. (2021). Enhancing secondary metabolite production by *Chlorella sorokiniana* using an alternative medium with vinasse. *Research, Society and Development*, 10 (5),e49710515237. DOI: 10.33448/rsd-v10i5.15237.
- Azaman, A., Nagao, S. N., Yusoff, N., Tan, F. M., & Yeap, S. K. (2017). A comparison of the morphological and biochemical characteristics of *chlorella sorokiniana* and *chlorella zofingiensis* cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions. *PeerJ*, (5), 1-22. <https://doi.org/10.7717/peerj.3473>
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., & Faramayuda, F. (2014). Penetapan kadar flavonoid metode $AlCl_3$ pada ekstrak metanol kulit buah kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*.2(2):33-37
- Chen, C.Y., Kuo, E.W., Nagarajan, D., et al. (2020). Cultivating *Chlorella sorokiniana* AK-1 with swine wastewater for simultaneous wastewater treatment and algal biomass production. *Bioresour Technol*, 302, 1-10. doi:10.1016/j.biortech.2020.122814
- Gisela, D. (2021). *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Chlorella Sp. Terhadap Bakteri Staphylococcus Aureus Dan Escherichia coli.* (Skripsi). Universitas Nusa Bangsa. Bogor.
- Gutierrez, R.M.P., Gonzalez, A.M.N., Ramirez, A.M. (2012). Compounds Derived from Endophytes: A Review of Phytochemistry and Pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*, 19(18), 2992–3030.
- Goiris, K., Muylaert, K., Voorspoels, S., Noten, B., Paepe, D.D., et al. (2014) Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J Phycol* 50(3), 485-492.
- Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H. (2012). Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicol Environ Saf*. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.048
- Hanifa, F., Nasution, S., Siregar, S.H. (2019). Effect of Salinity Difference and Fertilizer Dose Walne against *Chlorella* sp Population Growth in Laboratory Scale. *JOM*. 6, 1-13.
- Harbone, J.B. (1996). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB
- Jayshree, A., Jayashree, S., and Thangaraju, N. (2016). *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. *Indian J Pharm Sci*, 78(5), 575-581.
- Kesuma DD, Widyastuti M. (2013). Pengaruh Limbah Industri Tahu Terhadap Kualitas Air Sungai Di Kabupaten Klaten. *Bumi Indones*, 2 (1), 115-124.
- Lai, P.F.H, and Sun, T.C. (2017). Optimizing extraction process and characterization of antioxidant ingredients from *chlorella sorokiniana*. *MOJ Food Process Technol*. 5(1), 202-210. DOI: [10.15406/mojfpt.2017.05.00114](https://doi.org/10.15406/mojfpt.2017.05.00114)
- Lee, S.H, et al. (2013). Increased Microalgae Growth and Nutrient Removal Using Balanced N:P Ratio in Wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23 (1), 92-98. <https://doi.org/10.4014/jmb.1210.10033>
- Li, Y., Chen, Y.F., Chen, P., et al. (2011). Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Bioresour Technol*. 102, 5138-5144. doi:10.1016/j.biortech.2011.01.091
- Makareviciene, P.D.V, Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., Kasperovičienė, J. (2011). Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environ Res Eng Manag*, 3(57), 21-27. doi:10.5755/j01.erem.57.3.476
- Munir, F., Hariyati, R dan Wiryani, E. (2017). Pengaruh Limbah Cair Tahu Terhadap Pertumbuhan Chick Dalam Skala Laboratorium. *Jurnal Biologi*, 6(2), 84-92.
- Olasehinde, T.A., Odjajare, E.C., Mabinya, L.V., Olaniran, A.O., Okoh, A.I. (2019). *Chlorella*

- sorokiniana and *Chlorella minutissima* exhibit antioxidant potentials, inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of β -amyloid fibrils. *Electron J Biotechnol.* doi:10.1016/j.ejbt.2019.03.008
- Pradhan, B., Patra, S., Dash, S.R. *et al.* (2021). Evaluation of the anti-bacterial activity of methanolic extract of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] with special reference to antioxidant modulation. *Futur J Pharm Sci* 7 (17), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00172->
- Petruk, G., Gifuni, I., Illiano, A., *et al.* (2018). Simultaneous production of antioxidants and starch from the microalga *Chlorella sorokiniana*. *Algal Res*, 34, 164-174. doi:10.1016/j.algal.2018.07.012
- Pyo, Y.H., Jin, Y.J., and Hwang, J.Y. (2014). Comparison of the Effects of Blending and Juicing on the Phytochemicals Contents and Antioxidant Capacity of Typical Korean Kernel Fruit Juices. *rev. Nutr. Food Sci.* 19(2),108-114.
- Qiu, S., Shen, Y., Zhang, L., Ma, B., Amadu, A.A., Ge, S. (2020). Antioxidant assessment of wastewater-cultivated *Chlorella sorokiniana* in *Drosophila melanogaster*. *Algal Res.*, 46, 101795. doi:10.1016/j.algal.2020.101795
- Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., Bux, F. (2014). The optimization of biomass and lipid yields of *Chlorella sorokiniana* when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresour Technol*, 168, 127-135.
- Safafar, H., Wagenen, J.V., Møller, P., Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Mar. Drugs*, 13, 7339-7356. doi:10.3390/md13127069
- Susanty, D., and Oksari, A.A. (2020). Growth and secondary metabolites content of chloroform extract of *Chlorella* sp. and *Chlorella sorokiniana* cultured on chicken broiler waste media. *Nusant Biosci.*, 12 (1), 28-32. doi:10.13057/nusbiosci/n120105
- Syaichurrozi I, Jayanudin J. Kultivasi *Spirulina Platensis* Pada Media Bernutrisi Limbah Cair Tahu Dan Sintetik. *J Bahan Alam Terbarukan.* 2017;5(2):68-73. doi:10.15294/jbat.v5i2.7398