

## Evaluasi Rasio C/N pada Kultivasi *Spirulina Platensis* dengan Penambahan Molase sebagai Sumber Karbon Organik

### Evaluation of C/N Ratio in *Spirulina platensis* Cultivation using Molasses Addition as Organic Carbon Source

Tutik M. Setyoningrum<sup>\*a</sup>, Viska A. Wikasitakusuma<sup>a</sup>, Annisaturraihan<sup>a</sup>, N. Islamy Putra<sup>a</sup>, M.M. Azimatun Nur<sup>a</sup>

Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Yogyakarta, Jl. SWK 104 Condongcatur Sleman Yogyakarta, 55283, Indonesia.

#### Artikel histori :

Diterima 11 Desember 2014  
Diterima dalam revisi 12 Desember  
2014 Diterima 20 Desember 2014  
Online 29 Desember 2014

**ABSTRAK:** Pertumbuhan *Spirulina platensis* memerlukan nitrogen, fosfat, dan karbon. Semakin tinggi harga media komersial mendorong dilakukannya pencarian medium alternatif dalam pertumbuhan. Penelitian ini mencoba mengevaluasi rasio C:N dalam media dengan melakukan variasi penambahan molase serta urea untuk sebagai pengganti media komersial. Bibit *Spirulina platensis* dikultivasi sebagai kontrol yang terdiri dari 1500 ppm NaHCO<sub>3</sub> sebagai sumber karbon, 80 ppm urea sebagai sumber nitrogen, 20 ppm TSP (triple super phosphate) sebagai sumber phosphate, 1ppm FeCl<sub>3</sub> dan 50 g L<sup>-1</sup> vitamin B12 sebagai sumber mikronutrien. *Spirulina platensis* dikultivasi pada botol erlenmeyer 2 liter dengan mengubah komposisi urea dan molase pada media pertumbuhan dengan menambahkan 20% (w/w) medium kontrol. Urea divariasi antara 0; 16; dan 80 mg L<sup>-1</sup>. Sedangkan molase divariasi pada level 0,1 sampai 0,9 g L<sup>-1</sup>. Kondisi operasi selama kultivasi dengan variabel tetap adalah pH 9-10. Intensitas cahaya diatur pada 6000- 7000 lux. Pompa mini aerator digunakan sebagai pengaduk media. Salinitas kultivasi dijaga pada kondisi 2 ppt dan suhu dijaga pada kondisi 28-30°C. Hasil terbaik diperoleh pada penambahan molase 0,1 g L<sup>-1</sup> dengan urea 16 mg L<sup>-1</sup> yaitu dengan laju pertumbuhan (growth rate) 0.230 hari<sup>-1</sup>, rasio C:N 6,8 dan biomassa kering 0,333 g L<sup>-1</sup>.

**Kata Kunci:** *Spirulina platensis*; evaluasi C/N; molase

**ABSTRACT :** Growth of *Spirulina platensis* requires nitrogen, phosphate, and carbon. Due to high price of commercial medium, it is necessary to find alternative and cheap medium in *Spirulina* cultivation. The purpose of this research was to evaluate C:N ratio of medium using different concentration of molase and urea addition as replacement of commercial medium. *Spirulina platensis* was cultivated as a control consist of 1500 ppm NaHCO<sub>3</sub> as source of carbon, 80 ppm urea as source of nitrogen, 20 ppm TSP (Triple Super Phosphate) as source of phosphate, 1 ppm FeCl<sub>3</sub> and 50 µg/150B12 vitamin as source of micronutrients. *Spirulina platensis* was cultivated in 2-liter of erlenmeyer flask with variation composition of urea and molasses in growth media by adding 20% (w/w) control medium. Urea was varied between 0; 16; and 80 mg L<sup>-1</sup>, molasses was varied at the level of 0,1-0,9 g L<sup>-1</sup>. Cultivation was maintained in pH 9-10, light intensity 6000-7000 lux and 28°C. Mini aerator pump is used as a medium stirrer. The best result were obtained at the medium varied of 0,1 g L<sup>-1</sup> and 16 mg L<sup>-1</sup> of urea with growth rate of 0.230 day<sup>-1</sup>, C:N ratio 6.8, and dry biomass of 0.333 g L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** *Spirulina platensis*; evaluation of C/N ;molasse

#### 1. Pendahuluan

Karbon merupakan unsur penyusun mikroalga terbesar di dalam sel mikroalga. Saat ini penggunaan karbon anorganik yang paling umum digunakan adalah natrium bikarbonat untuk budidaya *Spirulina platensis*. Namun seiring meningkatnya harga natrium bikarbonat di pasaran, memicu industri pembudidayaan *Spirulina platensis* mencari sumber karbon alternatif agar tetap mempertahankan harga jual produknya. Pendekatan masalah peningkatan produksi maupun penurunan biaya

kultivasi mikroalga dalam skala industri dapat menggunakan metode fed-batch, maupun penggunaan nutrisi lain seperti limbah cair agroindustri. Adapun substrat yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber pengganti pupuk teknis untuk kultivasi mikroalga jenis *Spirulina platensis* adalah molasses (Andrade & Costa, 2007). Namun kondisi penambahan molasses ini selain bergantung pada jumlah substrat juga pada intensitas cahaya. Hasil penambahan molasses pada medium mikroalga menunjukkan laju pertumbuhan yang lambat. Untuk itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar

penambahan molasses dapat digunakan semaksimal dan dapat langsung diaplikasikan dalam industri.

Molase adalah salah satu limbah cair industri tebu yang telah lama dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Molase terbentuk saat keluaran akhir pada saat proses preparasi gula dengan kristalisasi berulang. Jumlah molase yang terbentuk dan kualitas yang dihasilkan dapat memberikan informasi tentang bit (kondisi lokal pertumbuhan dan efek dari musim), dan dapat dijadikan rujukan tentang seberapa efisien pabrik gula mengolah gula seperti pada alat kristaliser, boiler, klarifier, dan separasi kristal gula. Pada industri gula putih, molase bit dapat terbentuk sampai 4% dengan kandungan gula di molase sebesar 25% (Olbrich, 1963). Pembentukan molase dalam proses pembuatan gula dapat dipengaruhi oleh faktor kimia dan mekanik. Kandungan molase secara umum dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi Molase secara umum (Olbrich, 1963)

Komposisi	Kandungan (%)
Air	20
Sukrosa	32
Glukosa	14
Frukotsa	16
Abu	8
Lilin, Sterol, Phospolipid dan kandungan lain	10

Molase telah banyak digunakan dalam industri fermentasi sebagai sumber karbon karena harganya yang relatif murah. Umumnya molase digunakan dalam industri pembuatan etanol, asam asetat, dan asam sitrat. Pemanfaatan molase untuk produksi mikroalga telah lama diketahui. Bhatnagar *et al.* (2011) menyarankan penggunaan molase untuk kultivasi mikroalga karena memungkinkan untuk memotong biaya produksi pengganti glukosa sampai seperlima.

Penelitian penggunaan molase untuk *Spirulina platensis* adalah Andrade dan Costa (2007), memperoleh hasil biomasa sebesar 2,94 g L<sup>-1</sup> dengan laju pertumbuhan yang cukup rendah 0,093/hari. Sementara untuk mikroalga jenis *Chlorella minutissima* yang ditambahkan beberapa jenis sumber karbon organik diperoleh hasil blotong dan molase (100 mM karbon) berpotensi sebagai substrat organik yang berpengaruh terhadap akumulasi biomasa dan kandungan pigmen (Gautam *et al.*, 2013). Hasil penelitian sebelumnya masih dirasa belum menjawab permasalahan di industri mengingat laju pertumbuhannya yang masih rendah dibanding media komersial. Penelitian lain yang mungkin dapat dilakukan untuk meningkatkan laju pertumbuhan dan akumulasi biomassa adalah dengan mengubah komposisi rasio C:N di dalam media (Azimatun Nur & Hadiyanto, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi variasi penambahan molase dan penambahan urea terhadap beberapa parameter kultivasi *Spirulina platensis* sebagai pengganti karbon natrium bikarbonat.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1. Bahan Penelitian

Bibit *Spirulina platensis* diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Selanjutnya *Spirulina platensis* dikultivasi sebagai kontrol dan stok dengan media modifikasi Bangladesh No.12 (Azimatun Nur & Hadiyanto, 2014) yang terdiri dari 1500 ppm NaHCO<sub>3</sub> sebagai sumber karbon, 80 ppm urea sebagai sumber nitrogen, 20 ppm TSP (*triple super phosphate*) sebagai sumber phosphate, 1ppm FeCl<sub>3</sub> dan 50 µg/l vitamin B12 sebagai sumber mikronutrien. Molase diperoleh dari Pabrik Gula Madukismo Yogyakarta sebagai sumber karbon organik.

### 2.2. Kultivasi *Spirulina platensis*

*Spirulina platensis* dikultivasi pada botol erlenmeyer 2 liter dengan mengubah komposisi urea dan molase pada media pertumbuhan dengan menambahkan 20% (w/w) medium kontrol. Urea divariasikan antara 0; 16; dan 80 mg L<sup>-1</sup>. Sedangkan molase divariasikan pada level 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; dan 0,9 g L<sup>-1</sup>

Kondisi operasi selama kultivasi dengan variabel tetap adalah pH 9-10 dengan pengaturan penambahan HCl maupun NaOH masing-masing 0,1 N. Level pH dan suhu diamati selama masa kultivasi dengan menggunakan pH meter AZ Instrument 8686. Intensitas cahaya diatur pada 6000-7000 lux. Pompa mini aerator digunakan sebagai pengaduk media. Salinitas kultivasi dijaga pada kondisi 2 ppt dengan menambahkan NaCl teknis. Suhu dijaga pada kondisi 28-30<sup>0</sup> C

### 2.3. Penentuan Parameter

Pertumbuhan *Spirulina platensis* diukur menggunakan spektrofotometer SP 300 dengan panjang gelombang 680 nm. Pengukuran dilakukan pada hari ke-0 sampai hari ke-5. Selanjutnya data pertumbuhan digunakan untuk mengetahui laju pertumbuhan sesuai Persamaan 1

$$\mu = \ln OD_1 - \ln OD_2 / t_x - t_0 \quad (1)$$

OD<sub>1</sub> adalah optical density pada hari ke -x, OD<sub>0</sub> adalah

optical density pada hari ke-0, t<sub>x</sub> dan t<sub>0</sub> adalah waktu kultivasi pada hari ke-x dan hari ke-0. Konversi nilai OD 680nm ke nilai biomassa kering (X, g L<sup>-1</sup>) menggunakan Persamaan 2 (Olaizola and Duerr, 1990; Chainapong et al., 2012).

$$X = 0,5273 \times OD_{680nm} - 0,0138 \quad (R^2 = 0,9982) \quad (2)$$

Produktivitas biomassa ( $P_{max}$ , g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) dihitung dari persamaan  $P = (X_t - X_0) / (t_x - t_0)$ , di mana X<sub>t</sub> adalah konsentrasi biomassa kering (g L<sup>-1</sup>) pada t<sub>x</sub> (hari) dan X<sub>0</sub> konsentrasi biomassa mula-mula (g L<sup>-1</sup>) pada t<sub>0</sub> (hari) (Schmidell et al., 2001).

Rasio C/N dihitung berdasarkan unsur elemental media yang berasal dari molase dan urea. Kandungan N dan C pada media kontrol dihitung secara teoritis. Sedangkan kandungan C/N pada molase sebesar 27/1 berdasarkan penelitian Molasses Binder oleh Pacorel dan Hampson (2011).

**Tabel 2.** Parameter Pertumbuhan *Spirulina platensis* yang dibiakkan pada varias konsentrasi molase dan urea

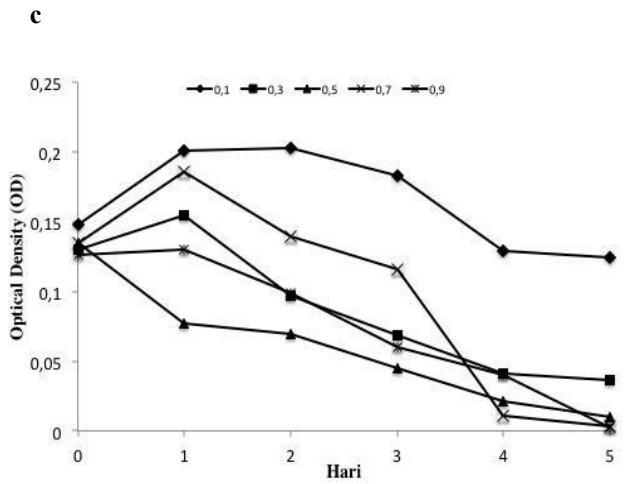
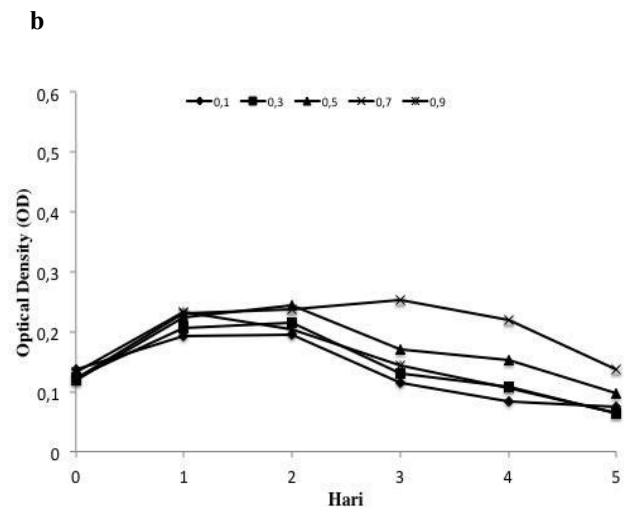
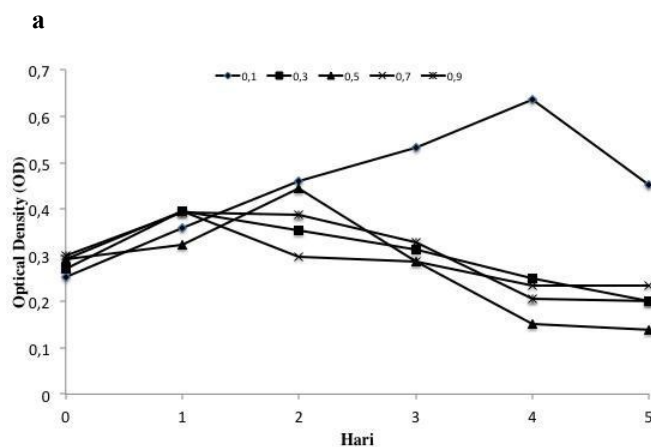
Molase (g L <sup>-1</sup> )	0 mg L <sup>-1</sup> urea				16 mg L <sup>-1</sup> urea				80 mg L <sup>-1</sup> urea			
	Xmax	Pmax (g/L/d)	α max	C/N	Xmax	Pmax (g/L/d)	α max	C/N	Xmax	Pmax (g/L/d)	α max	C/N
0,1	0,106	0,013	0,156	55	0,333	0,049	0,230	6,8	0,101	0,014	0,177	1,7
0,3	0,080	0,012	0,176	36,3	0,206	0,063	0,371	10,7	0,112	0,023	0,275	2,9
0,5	0,092	0,021	0,271	32,6	0,233	0,015	0,211	13,3	0,128	0,032	0,361	4,1
0,7	0,097	0,026	0,320	31	0,207	0,053	0,302	15,2	0,132	0,022	0,334	5,1
0,9	0,067	0,001	0,031	30	0,205	0,048	0,274	16,6	0,121	0,051	0,556	6,1
kontrol									0,331	0,048	0,228	6,3

### 3. Hasil Percobaan dan Pembahasan

Gambar 1a diperoleh hasil bahwa OD tertinggi diperoleh pada run molase 0,1 g L<sup>-1</sup> pada hari ke-4. Sedangkan puncak biomassa tertinggi ke dua dapat dilihat pada run molase 0,5 g L<sup>-1</sup> pada hari ke- 2 lalu mengalami penurunan yang cukup signifikan sampai hari ke-4. Puncak OD untuk konsentrasi molase 0,3 g L<sup>-1</sup>; 0,7 g L<sup>-1</sup>; dan 0,9 g L<sup>-1</sup> berada pada hari ke-1.

Pada Gambar 1b, OD tertinggi diperoleh pada run molase 0,7 g L<sup>-1</sup> hari ke-3. Hal ini dikarenakan pertumbuhan *Spirulina platensis* idealnya membutuhkan C:N adalah sebesar 6,22. Pemberian urea sebanyak 80 ppm memberikan konsentrasi yang cukup tinggi, sehingga untuk memenuhi perbandingan C:N dibutuhkan sumber karbon yang lebih banyak (Tabel 2). Puncak OD ke dua dapat dilihat pada run molase 0,5 g L<sup>-1</sup> pada hari ke-2. Molase 0,9 g L<sup>-1</sup> memperoleh puncak OD pada hari ke-1 dan merupakan puncak OD yang ke- 3. Puncak OD setiap konsentrasi molase berada pada hari yang berbeda.

Gambar 1c menunjukkan OD tertinggi diperoleh pada run molase 0,1 g L<sup>-1</sup> pada hari ke-2 dan pada hari selanjutnya mengalami penurunan. Sedangkan puncak OD ke dua dapat dilihat pada run molase 0,7 g L<sup>-1</sup> pada hari ke-1. Puncak OD konsentrasi molase 0,3 g L<sup>-1</sup>, 0,7 g L<sup>-1</sup>, dan 0,9 g L<sup>-1</sup> berada pada hari yang sama yaitu hari ke-1, kecuali molase 0,5 g L<sup>-1</sup> yang tidak mengalami kenaikan OD. Pada percobaan ini, tidak ditambahkan sumber nitrogen lain sehingga menaikkan rasio C:N yang tinggi (Tabel 2). Kenaikan rasio yang tidak ideal ini mengakibatkan penurunan dan kematian mikroalga.

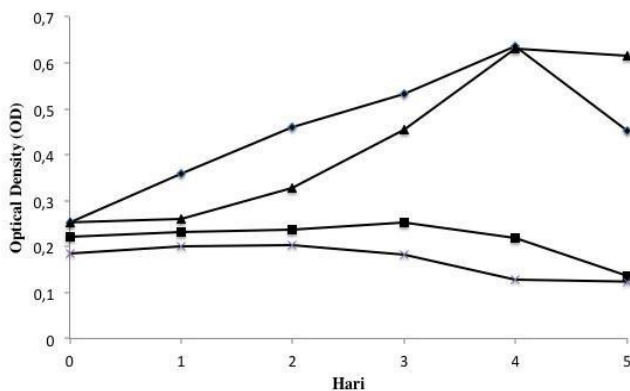


**Gambar 1.** Profil pertumbuhan *Spirulina platensis* pada berbagai konsentrasi molase dengan a) 16 ppm urea b) 80 ppm urea c) 0 ppm urea selama lima hari.

Hasil perhitungan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa hasil biomassa tertinggi adalah pada konsentrasi molase 0,1 g L<sup>-1</sup> dengan urea 16 ppm dengan hasil X<sub>max</sub> = 0,333 gr/l. Hal ini dikarenakan nilai C:N dari sampel tersebut mendekati nilai C:N ideal, yaitu 6,8. Namun pada percobaan tersebut, laju pertumbuhan μ<sub>max</sub> cenderung lebih rendah dibanding penambahan 0,3 maupun 0,7 g L<sup>-1</sup> molase. Pada penambahan 0 mg L<sup>-1</sup> urea, μ<sub>max</sub> dan X<sub>max</sub>

lebih kecil dibanding percobaan lainnya. Suplai nitrogen hanya berasal dari molase. Sehingga kemungkinan pada penambahan 0,5 maupun 0,7 mg L<sup>-1</sup> menghasilkan laju pertumbuhan yang cukup tinggi namun turun pada penambahan 0,9 mg L<sup>-1</sup>.

Sedangkan pada penambahan 80 mg L<sup>-1</sup> urea,  $\mu_{max}$  dan  $X_{max}$  cenderung naik seiring kenaikan rasio C:N. Hal ini menunjukkan bahwa parameter mikroalga dipengaruhi oleh rasio C:N.



**Gambar 2.** Profil optical density *Spirulina platensis* terbaik ◆ = (0,1 g L<sup>-1</sup> molase + 16 ppm urea) ! = (0,7 g L<sup>-1</sup> molase + 80 ppm urea) " = (0,1 g L<sup>-1</sup> molase + 0 ppm urea) □ □ = (kontrol)

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa OD terbaik adalah pada konsentrasi molase 0,1 g L<sup>-1</sup> dengan urea 16 ppm. Bila dibandingkan dengan kontrol, kenaikan OD pada konsentrasi molase 0,1g/l dengan urea 16 ppm kurang stabil dengan penurunan OD pada hari ke-5. Pada konsentrasi urea 80 ppm dan 0 ppm tidak terjadi kenaikan OD yang signifikan karena C:N pada masing-masing konsentrasi urea masih jauh dari kebutuhan C:N ideal *Spirulina platensis* (Tabel 2).

Dari semua percobaan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa molase berpotensi menjadi sumber karbon untuk pertumbuhan *Spirulina platensis* (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Adrade dan Costa (2007) yang menyebutkan semakin kecil konsentrasi molase maka laju pertumbuhan semakin cepat.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Younis, et al., (2010) molase dapat meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme karena kaya akan mineral, vitamin dan komponen lainnya. Bahkan molase mengandung sumber ion yang cukup penting bagi pertumbuhan *Spirulina platensis* seperti Na<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, dan Na<sup>+</sup>.

Pada penelitian ini diperoleh hasil semakin tinggi konsentrasi molase maka laju pertumbuhan dan biomassa yang dihasilkan akan semakin berkurang. Molase mengandung logam berat mungkin dapat menghambat pertumbuhan SRB (*Sulphate-Reducing Bacteria*). Logam berat meskipun pada konsentrasi rendah (5-10 mg/l) dapat mempengaruhi mikroorganisme dan memberi dampak pada pertumbuhan morfologi (aktifitas biokimia). Dampak dari kandungan logam dalam aktifitas mikroba mempengaruhi

penurunan jumlah sel yang sehat dan spesies yang dapat mentolerir toksik (racun) pun akan mati. Logam dapat menurunkan aktifitas metabolisme sel (Teclu, et al., 2009).

Selain itu, molase merupakan produk samping dari industri gula yang mengandung sukrosa tinggi sekitar 32% (Tabel 1). Perez-Garcia et al. (2011) mengemukakan bahwa mikroalga kemungkinan tidak dapat mengasimilasi sukrosa sebagai sumber karbon. Hal ini yang juga mungkin terjadi pada penelitian ini di mana konsentrasi sukrosa yang semakin tinggi menghambat pertumbuhan serta produktivitas *Spirulina platensis*.

Pada penelitian Wang dan Peng, (2008) yang menggunakan sukrosa pada kultivasi *Chlorella zofingensis*, diperoleh hasil laju pertumbuhan maupun produksi biomassa yang tidak baik. Sementara Schmidt et al. (2005) memperoleh hasil *G. sulphuraria* tumbuh sangat baik dengan penambahan sukrosa namun pada pH 2. Hal ini bisa dimungkinkan sukrosa pada pH asam telah terhidrolisis menjadi fruktosa dan glukosa sehingga mikroalga dapat mudah mengasimilasi karbon tersebut.

Di antara monosakarida, glukosa adalah yang terbaik sebagai sumber karbon, lalu galaktosa dan fruktosa untuk pertumbuhan mikotropis. Diantara disakarida, maltosa adalah yang terbaik sebagai sumber karbon, lalu sukrosa dan laktosa untuk pertumbuhan mikotropis. Pertumbuhan paling tinggi adalah pada konsentrasi nitrogen normal dibandingkan pada nitrogen konsentrasi rendah. Disakarida dan kanji dapat berpotensi meningkatkan produktivitas dengan menjaga protein tinggi yang terdapat dalam biomassa (Zhang, et al., 2014).

#### 4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian diperoleh kesimpulan bahwa hasil terbaik diperoleh pada penambahan molase 0,1 g L<sup>-1</sup> dengan urea 16 ppm yaitu dengan rasio C:N 6,8; laju pertumbuhan (*growth rate*) 0,230 hari<sup>-1</sup> dan biomassa kering 0,333 g L<sup>-1</sup>. Molase merupakan senyawa organik yang cukup berpotensi dijadikan sebagai sumber karbon pengganti natrium bikarbonat. Logam berat dan Sukrosa dalam molase kemungkinan menghambat pertumbuhan *Spirulina platensis*. Diperlukan pengolahan molase lebih lanjut seperti hidrolisis sukrosa untuk memecah menjadi gula sederhana sebagai sumber karbon organik dalam kultivasi *Spirulina platensis* dengan harapan diperoleh laju pertumbuhan dan biomassa yang lebih tinggi.

#### Ucapan Terima Kasih

Terima Kasih kepada CV Neoalgae Technology atas partisipasinya dalam pendanaan penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

- Andrade, M.R., Costa Jorge A.V., 2007. Mixotrophic cultivation of microalgae *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture*, Vol. 264: 130-134.
- Azimatun Nur., M.M., Hadiyanto, 2014., Evaluation of Carbon, Nitrogen and Phosphorus Ratio of Palm Oil

- Mill Effluent Digested (POMED) Wastewater as Replacement Synthetic Medium for *Spirulina Sp* Growth. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.*, Vol. 14 (6), 536-540.
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C., 2011. Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Appl. Energ.* 88: 3425-3431.
- Chainapong, T., Traichaiyaporn, S., R.L., Deming. 2012. Effect of light quality on biomass and pigment production in photoautotrophic and mixotrophic cultures of *Spirulina platensis*. *J. Agricult. Technol. Vol. 8(5): 1593-1604.*
- Gautam, K., Pareek, A., Sharma, D.K., 2013. Biochemical composition of green alga *Chlorella minutissima* in mixotrophic cultures under the effect of different carbon source. *J.Biosci. Bioeng.*, Vol. 166(5): 624-627.
- Olbrich, Hubert. 1963. *The Molasses*. Biotechnologie-Kempe GmbH, Berlin.
- Olaizola, M. and Duerr, E.O. (1990). Effects of lighs intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology. Vol. 2: 97-104.*
- Pacorel, Benedicte dan Hampson, Carl A., 2011. Molasses Binder. Paten WO2011015946A2. Google Paten.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F.M.E., de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2011. Henterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.*, Vol. 45: 11-36.
- Schmidell, W., Lima, A.U., Aquarone, E., Borzani, W., 2001. *Biotechnologia Industrial*, vol.2. Edgard Blücher LTDA, São Paulo,. 93–122.
- Schmidt, R.A., Wiebe, M.G., Eriksen, N.T., 2005. Heterotrophic high cell -density fed-batch cultures of the phycocyaninproducing red alga *Galdieria sulphuraria*. *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 90, 77-84.
- Teclu, Daniel, Tivchev, George, Laing, Mark, and Wallis, Mike, 2009. Determination of The Elemental Composition of Molasses and its Suitability as Carbon Source for Growth of *Sulphate-Reducing Bacteria*. *Journal of Hazardous Materials, Vol. 161:1157-1165.*
- Wang, Y., Peng, J., 2008. Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 24, 1915-1922.
- Younis, Magdi A.M., Hezayen, Francis F., Nour- Eldein, Moustafâ A., dan Shabeb, Mohamed S.A., 2010. Optimization of Cultivation Medium and Growth Conditions for *Bacillus subtilis* KO Strain Isolated from Sugar Cane Molasses. *American-Eurasian J.Agric. Environ. Sci.*, Vol. 7 (1): 31-37.
- Zhang, Weiguo, Zhang, Peiliang, Sun, Hao, Chen Maozen, Lu, Shan, and Li, Pengfu., 2014. Effects of Various Organic Carbon Sources on The Growth and Biochemical Composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Bioresource Technology, Vol. 173: 52-58.*