

PENGUNAAN METODE FILTRASI PADA TAHAP PEMANENAN MIKROALGA – *CHLORELLA VULGARIS* TERHADAP PRODUKSI BIODIESEL

USE OF FILTRATION METHOD ON HARVESTING STAGE OF MICROALGAE - *CHLORELLA VULGARIS* FOR BIODIESEL PRODUCTION

Lidia Elvina¹, Lutfia Isna Ardhayanti² dan Andik Yulianto³

Program Studi Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia,
Jl. Kaliurang km 14,5 Yogyakarta 55584

¹elvinalidia@gmail.com ²lutfia.isna@uii.ac.id dan ³025100407@uii.ac.id

Abstrak : Peningkatan produksi mikroalga pada tahap kultivasi disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya ketersediaan sinar matahari, CO₂, nutrisi dan metode pemanenan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan komponen *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) menggunakan metode ekstraksi Osmotic Shock menggunakan metode filtrasi pada tahap pemanenan melalui uji GCMS. *Chlorella vulgaris* diambil dari kolam fakultatif IPLT Sewon Bantul dan dikultivasi pada dua *photobioreactor* dengan fiksasi CO₂ sebesar 0,5 cc/min dan variasi intensitas cahaya yaitu 6225 lux di siang hari dan 3660 lux di malam hari. Ekstraksi lipid mikroalga dilakukan dengan metode *Osmotic Shock* menggunakan pelarut metanol/kloroform (1:2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa fiksasi CO₂ meningkatkan nilai pH dan kerapatan sel mencapai 12,1 x 10⁶ sel/mL dan 14,4x10⁶ sel/mL pada hari keempat, pengukuran berat basah untuk sampel W1 sebanyak 3,274 gram sedangkan sampel W42 sebanyak 3,592 gram. Asam Miristoleat (C_{14:1}) telah teridentifikasi melalui proses transesterifikasi menggunakan asam sulfat sebagai katalis dengan waktu retensi 15,642 menit pada sampel W42 menggunakan Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS).

Kata Kunci: *Chlorella vulgaris*, Biodiesel, Filtrasi, Berat Basah

Abstract : Increased on production of microalgae at cultivation stage caused by several factors such as availability intensity of light, CO₂, nutrient and harvesting method. This research aimed to determine Fatty Acid Methyl Ester (FAME) component using Osmotic Shock extraction method with filtration method at harvesting stage through GCMS test. *Chlorella vulgaris* was taken from the facultative pool of IPLT Sewon, Bantul and cultivated on two photobioreactors with CO₂ fixation of 0.5 cc / min and variations in light intensity of 6225 lux during the day and 3660 lux at night. Microalgae lipid extraction using Osmotic Shock method using methanol / chloroform as solvent (1:2). The results showed that CO₂ fixation increased pH and cell density reached 12.1 x 10⁶ cells / mL and 14.4x10⁶ cells / mL on the fourth day, wet weight measurement for W1 sample was 3,274 gram while W42 sample was 3,592 gram. Myristoleat Acid (C_{14:1}) had identified through the transesterification process using sulfuric acid as catalyst with retention time 15,642 minutes in W42 sample using Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS).

Keywords : *Chlorella vulgaris*, Biodiesel, Filtration, Wet Weight

PENDAHULUAN

Mikroalga *Chlorella* digunakan dalam pengolahan air limbah, produksi biodiesel, produksi listrik menggunakan sel bahan bakar mikroba, suplemen makanan hewan dan menyediakan ekstrak berharga untuk produk kimia (Ponnuswamy,2013). *Chlorella vulgaris* adalah sel mikroskopis bola dengan diameter 2-10 μm dan memiliki banyak elemen struktur mirip dengan tanaman. Dinding sel dari sel anak secara bertahap meningkatkan ketebalan sampai mencapai 17-21 nm setelah pematangan sel, dimana lapisan *microfibrillar* terbentuk seperti lapisan kitosan pada glukosamin yang menyumbang kekakuan. Kandungan lipidnya yang cukup tinggi juga potensial untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel dengan menggunakan teknik ekstraksi atau pemisahan zat berdasarkan perbedaan kelarutannya.

Biodiesel bersifat *non-toxic* dan *biodegradable* dengan kadar polutan yang rendah dan saat ini menerima banyak perhatian karena potensinya sebagai energi alternatif, berkelanjutan dan ramah lingkungan untuk petrodiesel, tidak mengandung sulfur dan bahan sisa setelah ekstraksi minyak dapat digunakan untuk produksi etanol atau sebagai pupuk (Demirbas,2011). Pulz (Pulz,2002) melaporkan bahwa dengan menggunakan sistem tubular pada skala industri (700 m^3) dengan luas wilayah 10.000 m^2 , produksi tahunan yang dapat diperoleh mencapai 130-150 ton berat kering *Chlorella*. Kadar lemak atau lipid dalam *Chlorella vulgaris* dapat meningkat secara signifikan, yaitu, antara 50% dan 70% (Yeh *et al.*,2012). Alkohol dengan rantai pendek seperti metanol pada tahap transesterifikasi digunakan untuk pembuatan biodiesel (Vasudevan *et al.*, 2008 dan Lam *et al.*, 2012).

Pemisahan mikroalga dengan air maupun larutan-larutan yang lain menjadi sulit karena harus memikirkan biaya dan waktu yang efektif (Shah J. *et al*, 2014). Metode filtrasi umumnya digunakan pada tahap pemisahan padatan dan cairan (Surendhiran D, *et al*, 2012). Pemanenan biomassa mikroalga melalui penyaring (filter), yang kemudian mikroalga tersebut akan terakumulasi menjadi pasta. Beberapa jenis filtrasi ada yang berbentuk kontinu dan diskontinu. Metode filtrasi memungkinkan variasi dari ukuran filter dan membran tergantung dari jenis mikroalga, sangat disarankan untuk sel mikroalga dengan diameter cukup besar.

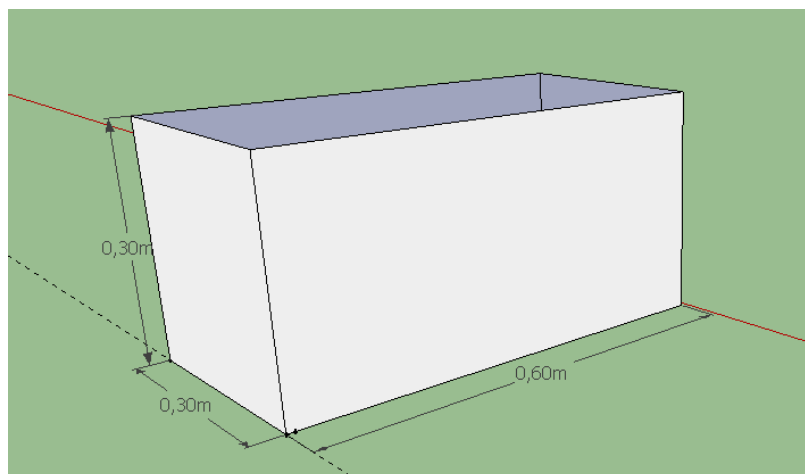
Penelitian ini dilakukan untuk melihat penggunaan teknik filtrasi dalam tahap pemanenan terhadap kandungan FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) yang dihasilkan dengan menggunakan pelarut metanol dan kloroform.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Lingkungan Program Studi Teknik Lingkungan Universitas Islam Indonesia Yogyakarta.

Seeding dan Aklimatisasi

Reaktor memiliki dimensi 60 cm x 30 cm x 30 cm dapat dilihat pada **Gambar 1**. Pengenceran 1:2 dengan air kran. Tahap aklimatisasi dilakukan dengan menambahkan lampu LED, aerator dan pupuk NPK untuk memenuhi kebutuhan makronutrien mikroalga.



Gambar 1 Dimensi reaktor

Kultivasi Mikroalga

Sistem pencahayaan yang digunakan adalah sistem penyinaran 24 jam dengan menggunakan lampu *Light-Emitting Diode* (LED) dengan intensitas cahaya 3860 lux. Proses kultivasi dan perhitungan sel alga dilakukan selama 4 hari. Mengalirkan gas CO_2 sebesar 0,5 cc/min menggunakan pompa dosis melalui diffuser (Chiu *et al*, 2011).

Filtrasi

Teknik pemanenan yang digunakan adalah Filtrasi. Teknik ini menggunakan kertas saring *Whatman* No.1 dan No. 42 dengan ukuran pori masing-masing yakni 2,5 μm dan 11 μm berbahan selulosa.

Ekstraksi Lipid - Osmotic Shock

mikroalga yang digunakan berada pada fase basah dengan menggunakan magnetic stirrer. Penambahan HCl 5 M dilakukan untuk memecah lapisan lipid. Pelarut yang digunakan adalah kloroform dan methanol dengan perbandingan 2:1 (v/v) (Byreddy A. *et al*, 2015). Kemudian dilakukan penambahan NaOH 5M untuk proses penetralan. Proses pengadukan dilakukan selama 60 menit dengan 200 rpm dan suhu 25° C dan dimaserasi selama 18 jam pada suhu ruang. Filtrat yang dihasilkan selanjutnya dipisahkan menggunakan *Rotary Evaporator*.

Transesterifikasi

Tahapan ini menggunakan katalis asam yakni asam sulfat (H_2SO_4) dan pelarut metanol/kloroform. Hasil ekstraksi yang dihasilkan kemudian dipanaskan dengan suhu 90° C untuk menguapkan pelarut selama 50 menit dengan kecepatan pengadukan sebesar 50 rpm menggunakan *magnetic stirrer* (Chiu *et al*, 2011).

Identifikasi Jumlah Sel Mikroalga

Identifikasi alga dilakukan dengan metode *Haemocytometer* dengan mengambil sample dari reaktor W1 dan W42. Sampel kemudian disisipkan ke alat *Hecytometer* kemudian diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 10 kali dan dilakukan perhitungan. Sedangkan identifikasi alga dengan pengamatan pembesaran 40 kali lalu dibandingkan dengan literatur.

Perhitungan Berat Mikroalga

Setelah dilakukan proses filtrasi dengan kertas filter *Whatman* No.1 dan No.42, kedua kertas ditimbang dengan timbangan analitik sebelum dan sesudah terbentuknya endapan alga. Kedua nilai dibandingkan untuk mendapatkan berat basah alga dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Berat Alga Basah} = W2 - W1$$

Keterangan :

W1 : Berat kertas filter

W2 : Berat kertas filter setelah proses filtrasi

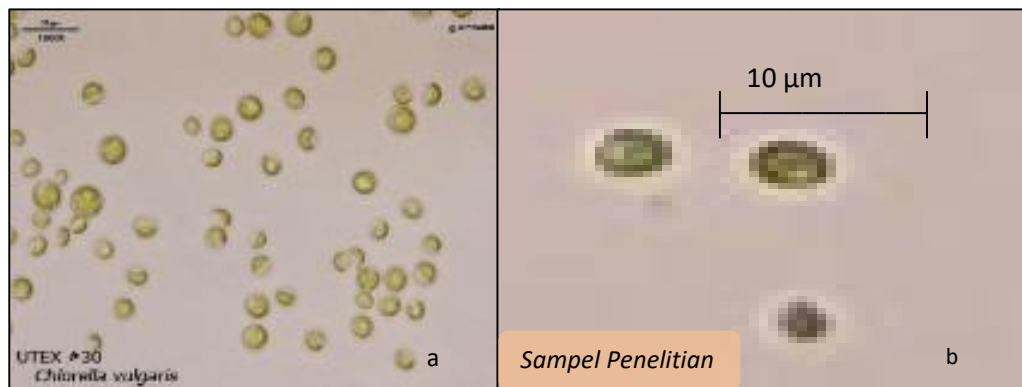
Analisis GC-MS *Fatty Acid Methyl Ester*

Fatty Acid Methyl Ester (FAME) dapat dianalisa dengan menggunakan instrumen GCMS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Mikroalga

Fitur morfologi sel mikroalga seperti dinding sel, bentuk sel dan dimensi sel diobservasi dengan teliti secara mikroskopik. Gambar mikroskopis mikroalga ditunjukkan pada **Gambar 2**



Gambar 2 Penampakan *Chlorella vulgaris* pada penelitian Universitas Texas (a) dan sampel penelitian (b)

Dari perbandingan gambar diatas dapat dilihat bahwa morfologi *Chlorella vulgaris* yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan morfologi pada literatur. Mikroalga yang berasal dari Sewon berwarna hijau pada intinya yang menunjukkan kandungan parietal tunggal kloroplas yang mengisi hampir keseluruhan sel, dengan bentuk bundar dan memiliki ukuran 5 – 6 μm . Ciri tersebut menunjukkan klasifikasi ganggang hijau (Bellinger et. al. 2015).

Seeding dan Aklimatisasi

Tahap aklimatisasi dilakukan di laboratorium dengan menambahkan lampu LED, aerator dan pupuk NPK untuk memenuhi kebutuhan makronutrien mikroalga. Penambahan aerator untuk

memberikan pasokan oksigen agar dapat mencegah penggumpalan dan pengendapan pada kultur mikroalga (Kawaroe *et al.* , 2010). Proses ini dilakukan hingga mendapatkan kultur berwarna hijau pekat yang menunjukkan sel-sel mikroalga telah berproduksi dan memiliki densitas sel yang tinggi dengan kerapatan sel lebih dari 6×10^6 sel/mL.

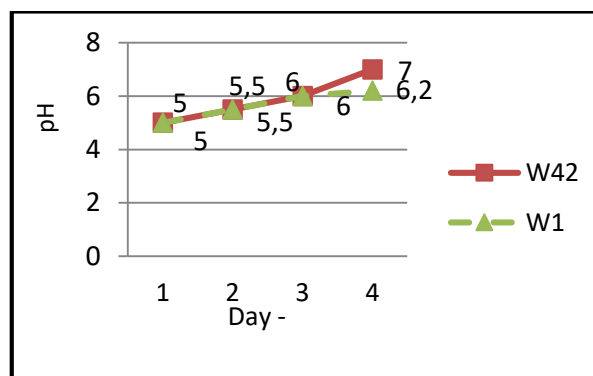
Dilakukan pengukuran pH secara acak menggunakan pH meter, hasilnya menunjukkan kadar pH media kultur berada pada angka 4 dan warna kultur kuning kehijauan menunjukkan tingkat kerapatan sel yang rendah. Untuk itu dilakukan penambahan NaOH 1M untuk menaikkan pH kultur agar berada pada angka 7-8. Rodolfi *et. al.* (2009) menyatakan bahwa pH yang baik untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan rentang pH 6,5 hingga 7,0, dan mengakumulasi lipid pada pH 7 hingga 8,5. Namun terganggunya proses aklimatisasi tidak terjadi karna penurunan pH. Penurunan pH merupakan efek dari turunnya kerapatan sel secara bertahap. Hal ini terjadi dikarenakan jumlah CO₂ dan O₂ berkurang dan rendahnya penetrasi cahaya yang masuk ke reaktor.

Pemindahan ke luar ruangan dengan sinar matahari langsung untuk memenuhi kebutuhan mikroalga dalam proses fotosintesis dilakukan pada bulan ketiga. Terjadi perubahan yang signifikan dimana mikroalga dapat beradaptasi dengan baik, ditandai oleh berubahnya warna kultur dari bening atau hijau muda menjadi hijau pekat. Warna hijau pekat mengindikasikan naiknya kerapatan sel mikroalga.

Kultivasi dan Analisis Sel *Chlorella vulgaris*

Setelah didapatkan kultur yang hijau pekat, sel alga dipindahkan ke reaktor alga dengan perbandingan 1:4 (v/v) sebanyak 0,5 liter alga dari bak pembibitan ke kultur baru pada masing masing reaktor dengan menggunakan air kran. Untuk memaksimalkan cahaya yang masuk ke media kultur maka digunakan sistem penyinaran secara kontinyu Intensitas cahaya yang digunakan penelitian ini mencapai 6225 lux untuk jumlah cahaya total yang diukur menggunakan luxmeter dibawah sinar matahari dan lampu LED yang dipasang didalam reaktor dan 3860 lux pada malam hari.

Untuk kondisi kultivasi tahap awal, pH berada pada angka 5 dan terus mengalami kenaikan hingga angka 6,2 untuk reaktor W1 dan 7 untuk reaktor W42 pada hari keempat dan dapat dilihat lebih jelas pada **Gambar 3**.

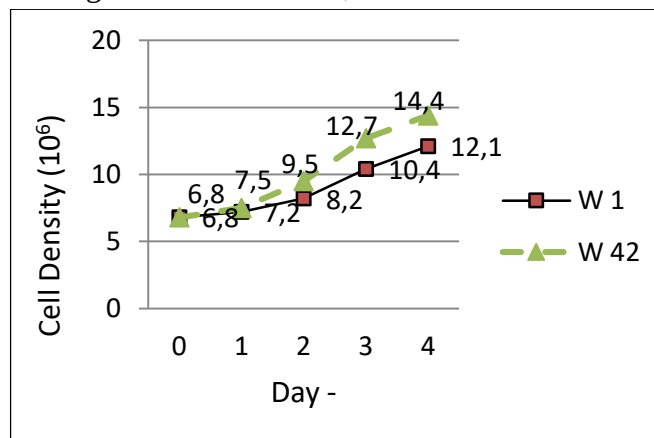


Gambar 3 Grafik kenaikan pH

Pengaliran gas CO₂ sebesar 0,5 cc/min menggunakan pompa dosis melalui diffuser secara terus menerus selama 4 hari penuh akan mempengaruhi kultur mikroalga selama tahap kultivasi. Hal ini dikarenakan suplai CO₂ akan berubah menjadi senyawa bikarbonat dalam air dimana *Chlorella*

vulgaris akan menyerap karbon tidak dalam bentuk CO₂ melainkan bentuk senyawa bikarbonat tersebut. Saat terjadi fotosintesis senyawa bikarbonat akan bereaksi dengan membentuk senyawa organik dan melepaskan ion OH⁻ ke media kultur dan menyebabkan pH menjadi semakin basa. Selain itu kondisi ini juga ditandai dengan berubahnya warna media kultur mikroalga menjadi lebih pekat. Perubahan media kultur mengindikasikan mikroalga dapat berfotosintesis secara optimal.

Berdasarkan **Gambar 4**, kerapatan sel mikroalga terus meningkat setiap harinya. Kedua sampel pada awal masa kultivasi memiliki kerapatan sel yang sama yakni $6,8 \times 10^6$ sel/mL. Pada hari pertama hingga hari keempat pengamatan pada dua sampel didapatkan kerapatan sel yang berbeda dengan nilai $7,2 \times 10^6$, $8,2 \times 10^6$, $10,4 \times 10^6$ dan $12,1 \times 10^6$ sel/mL untuk sampel W1 dan $7,5 \times 10^6$, $9,5 \times 10^6$, $12,7 \times 10^6$ dan $14,4 \times 10^6$ sel/mL untuk sampel W42. Kedua sampel terus mengalami peningkatan pada sel alga yang dihasilkan namun pada hari ketiga dan keempat terdapat perbedaan nilai yang cukup besar dimana sampel W42 memiliki kerapatan sel yang lebih besar yakni $14,4 \times 10^6$ sel/mL sedangkan W1 sebesar $12,1 \times 10^6$ sel/mL.



Gambar 4 Grafik kerapatan sel *Chlorella vulgaris*

Perbedaan yang terjadi bisa disebabkan oleh dua hal. Kemungkinan pertama, tidak dilakukan pengadukan terhadap kedua reaktor secara terus menerus, pengadukan yang terjadi hanya pada saat pemberian pupuk NPK sebagai nutrisi agar pupuk dapat tersebar di media kultur hal ini mengakibatkan jumlah sel mikroalga pada kedua reaktor berbeda. Kemungkinan kedua, sampel uji yang diambil tidak dilakukan pada waktu yang sama. Pengambilan sampel yang diambil pada pagi hari cenderung memiliki kerapatan sel yang lebih sedikit dibandingkan sampel yang diambil pada siang hari, hal ini berhubungan dengan proses fotosintesis yang terjadi pada malam hari yang tidak maksimal karena intensitas cahaya yang kurang akan menyebabkan kerapatan sel pada pagi hari menurun.

Pemanenan *Chlorella vulgaris* dengan Metode Filtrasi

Pemanenan *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan metode filtrasi, menggunakan kertas *Whatman* No.1 (W1) dan No.42 (W42). Proses filtrasi berjalan cukup lambat dikarenakan hanya memanfaatkan gravitasi bumi untuk menyaring alga yang dihasilkan. Sampel W1 memerlukan waktu 2 jam 15 menit untuk menyaring satu liter media kultur mikroalga dengan menggunakan dua kertas saring dan menghasilkan berat basah sebesar 3,274 gram. Untuk sampel W42 membutuhkan waktu yang lebih lama mencapai 2 jam 56 menit dan menghasilkan berat basah yang lebih banyak yakni 3,592 gram. Perbedaan hasil berat basah yang didapat dikarenakan oleh ukuran pori pada

kertas filter *Whatman* No.42 lebih kecil dan dapat menyaring alga yang memiliki diameter paling kecil 2,5 μm , sehingga mikroalga yang disaring lebih banyak dibandingkan kertas filter *Whatman* No.1 yang memiliki ukuran pori sebesar 11 μm .

Ekstraksi Lipid – Osmotic Shock

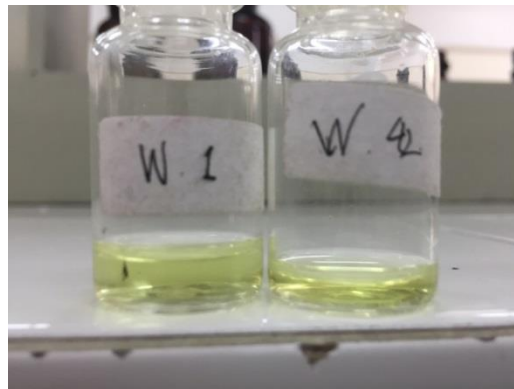
Proses ekstraksi lipid dilakukan dengan metode Osmotic Shock. Metode ini lebih menghemat energi dibandingkan metode umum lainnya. Dengan menggunakan HCl 5M yang bertujuan untuk merusak membran sel sehingga lipid pada mikroalga dapat keluar. Setelah proses perusakan membran sel untuk meningkatkan ekstraksi lipid dilanjutkan dengan proses Maserasi. Proses maserasi ini berjalan selama 18 jam agar lipid mikroalga yang telah dirusak membran selnya oleh HCl dapat terikat dengan pelarut polar yang digunakan. Selanjutnya, dilakukan teknik pemisahan cair-cair dengan menggunakan bantuan corong pemisah.

Setelah didiamkan selama 2 jam, maka terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas merupakan campuran antara methanol/air sedangkan lapisan bawah merupakan chloroform. Molekul yang lebih polar seperti protein dan gula terbagi kedalam fase polar dari metanol/air. Kloroform dan lipid yang berada dilapisan bawah diambil secara perlahan-lahan tanpa membawa lapisan atas.

Sintesis Biodiesel – Transesterifikasi

Transesterifikasi dapat dilakukan jika minyak bebas (FFA) tidak lebih dari 2%, maka dapat dilakukan sintesis *single step*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan pelarut organik yakni metanol-kloroform, asam sulfat dan ekstrak lipid yang telah dihasilkan pada tahapan sebelumnya.

Asam sulfat digunakan sebagai katalis agar mempercepat reaksi yang diinginkan pada proses transesterifikasi ini. Setelah dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* pada suhu 90°C selam 40 menit dilakukan pencucian dengan menggunakan aquades sebanyak 1 mL.

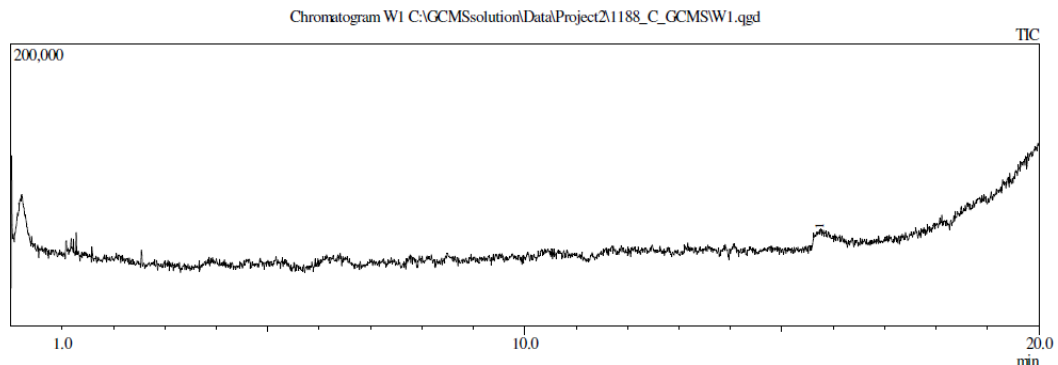


Gambar 5. Hasil transesterifikasi ekstrak *Chlorella vulgaris*

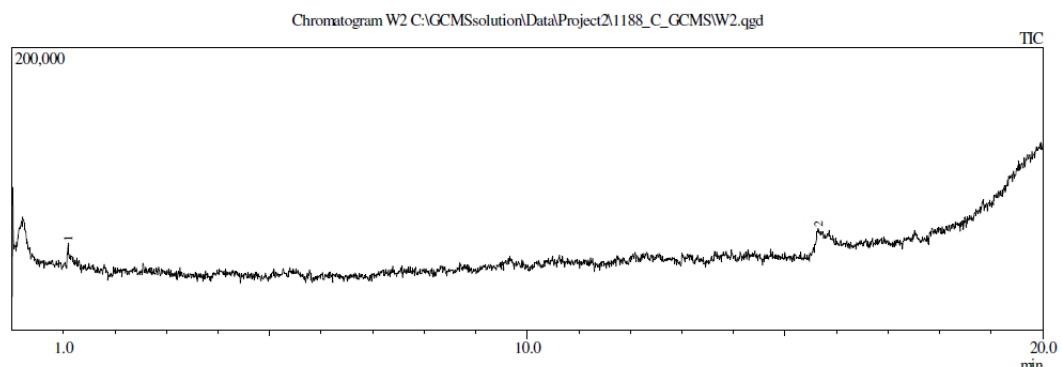
Umumnya akan terbentuk dua lapisan dengan lapisan pelarut pada bagian atas sedangkan FAME (*Fatty Acid Methyl Ester*) pada lapisan bawah. Lapisan FAME akan mengalami perubahan warna menjadi kuning gelap dikarenakan proses pemanasan yang berlangsung. Namun seperti yang terlihat pada **Gambar 5** tidak terlihat adanya batasan lapisan secara visual. Hal ini kemungkinan terjadi karena konsentrasi biodiesel yang sangat kecil hingga tidak adanya indikasi biodiesel pada larutan.

Analisis GC-MS *Fatty Acid Methyl Ester*

Larutan yang dihasilkan pada tahap sintesis biodiesel tidak dapat diidentifikasi secara visual. Uji senyawa biodiesel dilakukan dengan menggunakan *Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS)*. Kedua sampel kemudian dianalisis untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung. Hasil kromatogram dapat dilihat pada **Gambar 6** dan **Gambar 7**.



Gambar 6 Kromatogram larutan sintesis biodiesel *Chlorella vulgaris* (sampel W1)



Gambar 7 Kromatogram larutan sintesis biodiesel *Chlorella vulgaris* (sampel W42)

Pada Analisa kromatogram kedua sampel diatas, sampel W1 hanya menghasilkan 1 peak pada waktu retensi 15,733 menit dengan 5 senyawa teridentifikasi tanpa komponen asam lemak. Sedangkan sampel W42 menghasilkan 2 peak dan 10 senyawa yang teridentifikasi termasuk komponen asam lemak yang dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1 Komponen kimia larutan hasil transesterifikasi (sampel W42)

No	Waktu Retensi	Area (%)	Nama Senyawa	Rumus Molekul	Referensi
1	15,642	64,04	<i>Miristoleate Acid/ Methyl Miristoleate</i>	$C_{14}H_{26}O_2$ ($C_{14:1}$)	DIN EN14103:2011

Pada sampel W42 diidentifikasi kandungan asam lemak dari lipid mikroalga *Chlorella vulgaris* yang berpotensi menjadi bahan baku biodiesel. Miristoleate Acid/ Methyl Miristoleat teridentifikasi pada waktu retensi 15,642 menit sedangkan berdasarkan European method EN14103:2011 for the determination of FAME content waktu retensi Miristoleate Acid/ Methyl Miristoleat berada pada 16,275 menit. Miristoleate Acid/ Methyl Miristoleat merupakan asam lemak tak jenuh (unsaturated fatty acid) berantai sedang (C_{14:1}). Komponen asam lemak ini juga ditemukan pada penelitian Ivanova et. al (2013) dan Prartono et. al. (2013) dengan konsentrasi yang kecil.

KESIMPULAN

Berdasarkan Uji GC-MS dilaboratorium *Miristoleate Acid/ Methyl Miristoleat* teridentifikasi pada sampel W42 dengan waktu retensi 15,642 menit yang berpotensi menjadi bahan baku biodiesel. Proses transesterifikasi harus dilakukan pada refluks tertutup untuk menghindari asam lemak yang telah terikat dengan pelarut selama terpapar panas.

DAFTAR PUSTAKA

- Bellinger EG, Sigeo DC (2015) **Freshwater Algae: Identification, Enumeration and Use as Bioindicators**, second ed., John Wiley & Sons Ltd.
- Byreddy. A.R. ,et al. 2015. **Comparison of Cell Disruption Methods for Improving Lipid Extraction from Thraustochytrid Strains**. Marine Drugs. 13, 5111 – 5127.
- Chiu SY, et al. 2011. **Microalgal Biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella Sp* cultures**. Bioresour Tecnol. 102: 9135-42.
- Demirbas A. 2011. **Importance of Algae Oil as a Source of Biodiesel**. Energy Conversion and Management, 53, 163 – 170.
- Kawaroe, M., Tri Prartono, Adriani Sunuddin, Dahlia Wulan Sari, dan Dina Augustine. 2010. **Mikroalga: Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar**. Bogor: IPB Press
- L. Rodolfi, Z. G. Chini, Bassi, N. and et al. 2009. **Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor**", BiotechnolBioeng 102:100–112.
- Lam, Man K., et al.. 2016. **Cultivation of *Chlorella vulgaris* Using Nutrients Source from Domestic Wastewater for Biodiesel Production: Growth Condition and Kinetic Studies**. Renewable Energy. Elsevier. 103 (2017) 197-207.
- Ponnuswamy, Indhumathi, Soundarajan Madhavan, Syed Shabudeen. 2013. **Isolation and Characterization of Green Microalgae for Carbon Sequestration, Waste Water Treatment and Biofuel Production**. International Journal of Bio-Science and Bio-Technology. Vol. 5, No. 2
- Pulz, O. 2001. **Photobioreactor : Production systems for phototrophic microorganism**. Appli. Microbiol Biotechnol. 57, 287-293.
- Surendhiran D. And Vijay M. 2012. **Microalgal Biodiesel – A Comprehensive Review on the Potential and Alternative Biofuels**. Research Journal of Chemical Sciences. Vol 2(11). 71-82

- Shah J. H., *et al.* 2014. **Comprehensive Overview on Various Method of Harvesting Microalgae According to Indian Perspective.** International Conference on Multidisciplinary Research & Practice. Vol. I Issue VII. 313-317.
- Tri Prartono, Mujizat Kaware, Vicky Katili. 2013. Fatty Acid Composition of Three Diatom Species *Skeletonen costatum*, *Thalassiosira sp.* And *Chaetoceros gracilis*. International Journal of Environment and Bioenergy, 28 – 43.
- Vasudevan PT, Birggs M. 2008. **Biodiesel production-current state of the art and challenges.** J. In. Microbiol Biotechnol, 35. 421-430.
- V. Ivanova, M. Stancheva, D. Petrova. 2013. Fatty Acid Composition of Black Sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 42-47.
- Yeh, K –L: *et al.*, 2012. **Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella Vulgaris**, ESP-31. Bioresour. Technol, 105, 120-127.