



PRODUKSI PROTEIN SEL TUNGGAL MIKROALGA *Chlorella vulgaris* MENGUNAKAN LIMBAH AYAM BROILER DAN APLIKASINYA DALAM PAKAN

Wa Iba^{1,2,3*}, Crasilia Yanti Padang³, Nilam Sari³, Sri Ambardini³, Suriana⁴

¹Jurusan Akuakultur Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Halu Oleo
Kampus Bumi Tridharma Anduonohu Kendari Sulawesi Tenggara, Indonesia 93232

²Departemen Ilmu Perikanan, Peternakan dan Kedokteran Hewan, Sekolah Tinggi Ilmu Lingkungan dan
Ilmu Hayati Universitas Rhode Island, Kingston, RI Amerika Serikat 02881

³Jurusan Bioteknologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Halu Oleo
Kampus Bumi Tridharma Anduonohu Kendari Sulawesi Tenggara, Indonesia 93232

⁴Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Halu Oleo
Kampus Bumi Tridharma Anduonohu Kendari Sulawesi Tenggara, Indonesia 93232

Diterima: 19 Agustus 2024/Disetujui: 21 November 2024

*Korespondensi: wa.iba@uho.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Iba, W., Padang, C. Y., Sari, N., Ambardini, S., & Suriana. (2024). Produksi protein sel tunggal mikroalga *Chlorella vulgaris* menggunakan limbah ayam broiler dan aplikasinya dalam pakan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(11), 1091-1103. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i11.58151>

Abstrak

Protein sel tunggal dari mikroalga berpotensi digunakan dalam formulasi pakan ayam broiler. Mikroalga yang banyak dikembangkan saat ini salah satunya adalah *Chlorella vulgaris*. Penelitian bertujuan untuk menentukan konsentrasi *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan media organik limbah ternak ayam broiler dan kandungan proteinnya dalam pakan. *Chlorella vulgaris* dikultur menggunakan media organik dari feses ayam broiler dalam air laut pada 4 konsentrasi (10, 100, 1.000, dan 10.000 ppm). Kandungan protein *C. vulgaris* dan pakan dianalisis menggunakan metode Kjeldahl. Protein tertinggi diperoleh pada *C. vulgaris* dalam media feses ayam 10 ppm, yaitu 23,53%. Biomassa mikroalga yang dikultur dalam media 10 ppm feses ayam ditambahkan dalam formulasi pakan ayam broiler pada konsentrasi yang berbeda, yaitu 0; 2,5; 5; 7,5 dan 10% dengan 3 kali ulangan. Kandungan protein tertinggi, yaitu 34,65% pada penambahan biomassa *C. vulgaris* 2,5%. Kandungan protein yang mendekati optimal untuk ayam broiler fase *pre-starter* dan *starter* yaitu 22,71% dan 24,06% diperoleh dengan penambahan tepung *C. vulgaris* 5 dan 7,5%.

Kata kunci: formulasi, kjeldahl, media organik, *pre-starter*, *starter*

Production of Microalgae Single-Cell Protein *Chlorella vulgaris* Using Broiler Chicken Waste and Its Application in Feeds

Abstract

Single-cell proteins from microalgae have the potential for use in broiler chicken feed formulations. One of the microalgae that has been widely developed today is *Chlorella vulgaris*. This study aimed to determine the concentration of *C. vulgaris* cultivated using organic media derived from broiler chicken waste and its protein content in feed. *Chlorella vulgaris* was cultured using organic media from broiler chicken feces in seawater at 4 concentrations (10, 100, 1,000, and 10,000 ppm). The protein content of *C. vulgaris* and the feed was analyzed using the Kjeldahl method. The highest protein content was obtained from *C. vulgaris* in chicken fecal media at 10 ppm, which was 23.53%. The biomass of *C. vulgaris* cultured in 10 ppm chicken feces medium was added to the formulation of broiler chicken feed at different concentrations (0, 2.5, 5, 7.5, and 10 %) with three replicates. The highest protein content (34.65 %) was observed with the addition of 2.5% *C. vulgaris* biomass. The protein content that approached optimal levels for broiler chickens in the

pre-starter and starter phases, which were 22.71% and 24.06%, respectively, was obtained with the addition of 5% and 7.5% *C. vulgaris*.

Keywords: formulation, Kjeldahl, organic media, pre-starter, starter

PENDAHULUAN

Permintaan daging ayam broiler yang semakin meningkat menyebabkan masalah baru bagi para peternak, salah satunya ketersediaan pakan. Pakan menjadi faktor utama dalam pemeliharaan ayam karena pakan sebagai sumber protein memengaruhi kualitas daging yang dihasilkan (Astuti *et al.*, 2015). Pakan ayam broiler terbagi menjadi dua macam yaitu pakan periode *starter* dan *finisher*, sesuai dengan periode pertumbuhan ayam. Kebutuhan energi untuk ayam broiler pada periode *starter* 3.080 kkal/kg ransum pada tingkat protein 24%, sedangkan periode *finisher* 3.190 kkal/kg ransum pada tingkat protein 21% (Herlina *et al.*, 2015).

Permintaan yang tinggi akan daging ayam broiler berakibat terhadap meningkatnya limbah feses atau kotoran ayam yang menimbulkan dampak yang mengganggu lingkungan. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengurangi dampak lingkungan yang disebabkan oleh limbah ternak ayam broiler, salah satunya yaitu dengan memanfaatkan limbah kotoran ayam tersebut sebagai media pertumbuhan mikroalga untuk produksi protein sel tunggal (PST). Limbah ternak ayam broiler dapat digunakan sebagai pengganti bahan-bahan kimia dalam media kultur mikroalga dan mencukupi unsur hara makro yaitu nitrogen (N), fosfor (P), kalium (K), dan air (H₂O) serta unsur hara mikro di antaranya kalsium (Ca), magnesium (Mg), tembaga (Cu), mangan (Mn), dan boron (Bo). Limbah ternak ayam broiler mengandung unsur hara utama yaitu nitrogen sebesar 1%, fosfor 0,8% dan kalium 0,4% (Pancapalaga, 2011). Ketersediaan unsur hara dalam limbah tersebut mendukung pertumbuhan mikroalga sehingga biaya kultur mikroalga menjadi lebih murah (Utomo *et al.*, 2005).

Protein sel tunggal dari mikroalga dapat digunakan sebagai upaya untuk mengurangi ketergantungan industri perunggasan nasional terhadap impor bahan pakan sumber protein, obat aditif dan suplemen. Mikroalga

merupakan fitoplankton yang dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik, yang bisa dijumpai di air laut, tawar misalnya sungai. Mikroalga memiliki kemampuan tumbuh dalam waktu yang relatif singkat dan dapat dikembangbiakkan pada area yang terbatas (Mubarok *et al.*, 2018). Mikroalga dapat digunakan untuk pengobatan gizi buruk pada anak karena dinilai sebagai suplemen yang sehat (Yuliani *et al.*, 2020). Mikroalga telah dikembangkan karena berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai penghambat infeksi virus (Kalontong *et al.*, 2022), industri akuakultur, kesehatan dan pakan (Imelda *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2023), energi maupun pangan sebagai sumber protein, vitamin dan mineral (Darsi *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2023). Oleh karena itu, penambahan biomassa mikroalga yang dikultur menggunakan media feses ayam broiler dapat membantu mengurangi biaya produksi pakan dan meningkatkan kandungan protein dalam pakan pada kondisi optimal untuk digunakan dalam industri ayam broiler.

Mikroalga yang banyak dikembangkan saat ini, salah satunya adalah *Chlorella vulgaris* (Beyerinck [Beijerinck], 1890). *C. vulgaris* menyebar secara luas dan dapat ditemukan diberbagai tipe lingkungan perairan dan sering digunakan sebagai pakan alami dalam budidaya ikan dan udang (Iba *et al.*, 2014; Novianti, 2019). *C. vulgaris* mengandung protein 51–58%, karbohidrat 12-17%, lemak 14-22%, dan asam nukleat 4-5%. Kandungan protein pada *C. vulgaris* bekisar antara 60-70% dari berat kering (Mufidah *et al.*, 2017). Kandungan nutrisi *C. vulgaris* yang lengkap terutama protein yang tinggi, menjadikannya sebagai sumber protein sel tunggal (PST). Protein sel tunggal (PST) adalah biomassa mikroorganisme kering atau jumlah total protein yang diekstraksi dari kultur murni atau kultur bersama bakteri, ragi, jamur dan mikroalga (Spalvins *et al.*, 2018). Protein sel tunggal (PST) dari *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan limbah kotoran ayam dapat



menjadi salah satu alternatif pemenuhan kebutuhan protein di masa depan terutama sebagai pakan ikan dan ternak (Junaid et al., 2020; Darsan et al., 2021). Pertumbuhan dan kandungan protein dari *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan media kotoran ayam broiler memiliki potensi sangat besar sebagai alternatif produksi PST, namun belum diteliti lebih lanjut sampai saat ini.

Pakan terdiri atas beberapa bentuk yaitu tepung (*mash*), biasanya diberikan pada ayam petelur fase *stater* dan *layer*; bentuk pelet, biasanya untuk ayam petelur fase *layer* dan ayam pedaging fase *finisher*; bentuk *crumble* (pecahan pelet), biasanya untuk ayam pedaging fase *stater* dan ayam petelur fase *starter* (Purnamasari et al., 2016). Bahan penyusun pakan broiler yang komplisit umumnya terdiri atas dedak, jagung, tepung ikan, bungkil kedelai, bungkil kelapa, tepung daging dan tulang, pecahan gandum bungkil kacang tanah dan sebagainya (Kleyn & Ciacciariello, 2023; Doyin & Akinfala, 2023; Pesti & Choct, 2023). Penambahan PST dari tepung *C. vulgaris* diharapkan mampu menghasilkan pakan pelet formulasi untuk ayam broiler fase *starter* dengan kandungan protein yang optimal sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan media organik limbah ternak ayam broiler dan kandungan proteinnya dalam pakan.

BAHAN DAN METODE
Kultur Mikroalga

Mikroalga *C. vulgaris* diperoleh dari stok biakan murni dalam media *Walne* dari Lab. Produktivitas dan Lingkungan Perairan

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Halu Oleo (*Figure 1*).

Kultivasi mikroalga *C. vulgaris* dilakukan sebelum perlakuan (Regista et al., 2017). Tahapan kultivasi mikroalga yang digunakan mengacu pada Iba et al. (2019) dan Jumardin (2020), yang terdiri atas kultivasi skala laboratorium yang bertujuan memperbanyak stok kultur mikroalga. *C. vulgaris* dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi media *Walne* (1 mL), air laut steril dengan volume 1000 mL, dan disinari lampu *Fluorescent* dengan intensitas cahaya 34 $\mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Hartini et al., 2017). Kepadatan *C. vulgaris* dihitung menggunakan *Neubaur haemocytometer* yang dilengkapi dengan mikroskop dan *hand counter*. Kepadatan sel sampel dihitung dengan persamaan yang mengacu pada Chalid et al. (2011) sebagai berikut:

$$\frac{n}{5} \times 10.000 \tag{1}$$

Keterangan:

- n = total sel hasil perhitungan
- 5 = jumlah kotak dalam Haemocytometer
- 10.000 = volume kerapatan sel kotak

Setelah dilakukan perhitungan kepadatan awal, kemudian dilakukan pengenceran. Pengenceran bertujuan untuk mengetahui konsentrasi awal *C.vulgaris* yang dibutuhkan menggunakan rumus pengenceran, mengacu pada Yulina et al. (2020), sebagai berikut:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \dots \dots \dots \tag{2}$$

Keterangan:

- V_1 = volume media dari stok kultur
- C_1 = kepadatan sel stok kultur (sel.mL)

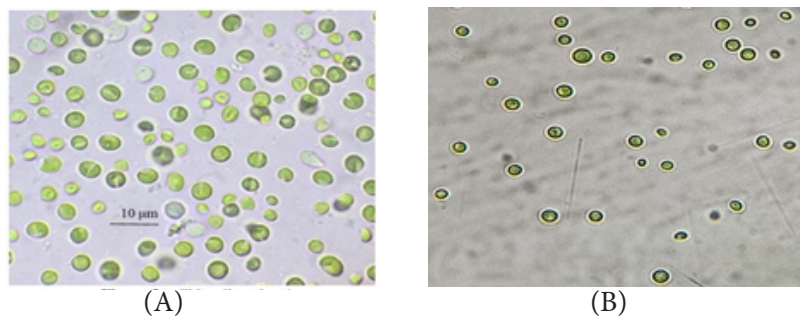


Figure 1 (A) Microscopic view of *C. vulgaris* (Ramaraj et al., 2016); (B) *C. vulgaris* from collection
Gambar 1 (A) Foto mikroskopik *C. vulgaris* (Ramaraj et al., 2016); (B) *C. vulgaris* dari koleksi

V_2 = volume media kultur yang diinginkan (mL)
 C_2 = kepadatan sel awal yang diinginkan (sel.mL)

Kultivasi mikroalga *C. vulgaris* menggunakan kepadatan awal 10^5 sel.mL⁻¹ dilakukan menggunakan botol transparan berukuran 1500 mL dengan volume kultur 100 mL. Kultivasi inokulum mikroalga *C. vulgaris* dalam media limbah ternak ayam broiler yang telah dipersiapkan. Limbah ternak ayam yang sudah dikeringkan dihaluskan dan dilarutkan menggunakan akuades (20 g/1.000 mL) disimpan selama satu minggu kemudian disaring menggunakan kapas dan kertas saring ke dalam tabung erlenmeyer (Utomo *et al.*, 2005), selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit dan dilakukan analisis kadar nitrat, fosfat, magnesium, nitrogen dan amonia sebelum dilakukan perlakuan. Media limbah ternak ayam broiler tersebut kemudian diencerkan pada konsentrasi 10, 100, 1.000 dan, 10.000 ppm ditambahkan air laut sebagai pengencer sampai volume 1 L. Media Walne juga digunakan sebagai media kultur dan kondisi kultur pada salinitas 28 ppt, suhu 28-30°C, dan pH 7-8, di bawah pencahayaan lampu TL sebesar 250 watt dengan intensitas cahaya sebesar 34 $\mu\text{moles.m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Salinitas, suhu dan pH media kultur dijaga agar tetap dalam kondisi optimal.

Kepadatan populasi *C. vulgaris* dihitung setiap 2 hari sekali hingga mencapai fase stasioner awal menggunakan alat *Nubaure haemocytometer* yang diletakkan di bawah lensa objektif mikroskop dengan pembesaran 40 \times yang dimulai pada hari pertama sampai mencapai fase stasioner awal (Iba *et al.*, 2018). Perhitungan jumlah sel juga dilakukan menggunakan *handcounter*. Kepadatan sel mL⁻¹ sampel dihitung dengan persamaan yang mengacu pada persamaan (1). Tahap pemanenan dilakukan menggunakan kertas *whattman fiber glass* dan alat *vacum pump* (Iba *et al.*, 2018).

Analisis Kandungan Protein Mikroalga dan Pakan Ayam Broiler

Kandungan protein *C. vulgaris* dianalisis dengan metode Kjeldahl mengacu pada Sáez-Plaza *et al.* (2013) dengan sedikit

modifikasi. Mikroalga *C. vulgaris* disaring sebanyak 150 mL menggunakan kertas *whattman fiber glass*, selanjutnya ditimbang sebanyak 0,1 g kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 500 mL. Biomassa dalam labu kjeldahl kemudian didestruksi dengan menambahkan 2 g selenium dan 10 mL H₂SO₄ dan dipanaskan di atas pembakar *Bunsen* sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijauan-hijauan (sekitar 2 jam). Sampel kemudian dibiarkan sampai dingin dan dimasukkan larutan ke dalam alat destilasi dan ditambahkan akuades 150 mL serta 50 mL NaOH 40%, setelah itu ditutup labu destilasinya (Gifarey, 2020). Destilasi dilakukan selama kurang lebih 10 menit dengan penambahan 10 mL larutan asam borat (selama proses penyulingan, ujung pipa kondensor harus selalu tercelup dalam larutan borat), setelah itu dibilas ujung pipa dengan air suling, serta ditambahkan titrasi dengan larutan HCl N. Perhitungan kadar protein dilakukan dengan mengacu persamaan sebagai berikut:

$$\text{Protein (\%)} = \frac{(V1-V2) \times N \times 0,014 \times FK}{W}$$

Keterangan:

- W = bobot cuplikan (g)
- V1 = volume HCl N yang dipergunakan pada penitaran contoh (mL)
- V2 = Volume HCl N yang dipergunakan pada penitaran blangko (mL)
- NHCl = normalitas HCl
- FK = faktor konversi (5,95 untuk protein mikroalga dan 6.25 untuk protein pakan)

Dasar perhitungan penentuan protein menurut Kjeldahl adalah umumnya protein mengandung rata-rata 16% N dalam protein murni (Sáez-Plaza *et al.* (2013). Jumlah protein dalam mikroalga dihitung dengan faktor konversi 5,95 (Lopes *et al.*, 2010).

Formulasi Pakan Ayam Broiler

Biomassa mikroalga yang digunakan dalam pakan ayam broiler diperoleh dengan melakukan kultur mikroalga menggunakan media kultur limbah ternak ayam broiler (LTAB) dengan hasil protein terbaik yaitu konsentrasi 10 ppm dengan peningkatan



volume secara berurutan yaitu pada 1 L, 10 L dan 17 L. Biomassa *C. vulgaris* yang telah dikultur dipanen dengan cara disaring menggunakan kain kasa 20-30 μm setelah mencapai fase stasioner awal pada hari ke-7.

Proses pembuatan pakan berupa pelet terdiri dari tiga tahap yaitu pertama pengolahan pendahuluan yang terdiri atas pencacahan, pengeringan, dan penghalusan bahan pakan menjadi tepung, kedua pembuatan pelet meliputi pencampuran, pencetakan, pendinginan, dan pengeringan, ketiga perlakuan akhir yang terdiri dari sortasi, pengepakan, dan penyimpanan pakan (Ismi *et al.*, 2017). Biomassa *C. vulgaris* dengan konsentrasi yang berbeda (0; 2,5; 5; 7,5; dan 10%) dimasukkan ke dalam wadah kemudian dicampur dengan beberapa pakan komersial yaitu jagung, bekatul, tepung ikan, dan bungkil kedelai serta bahan pelengkap lainnya dengan total pakan keseluruhan sebanyak 100 g, kemudian diaduk sampai tercampur rata (Table 1). Kemudian dimasukkan perekat yang dibuat dari 15 g tepung tapioka yang dicampur dengan akuades 20 mL dan dipanaskan sampai kental (Bulu, 2021). Setelah adonan pakan

tercampur rata, adonan didiamkan 10 menit, kemudian adonan dicetak menggunakan gilingan ikan sampai terbentuk pelet. Adonan yang sudah berbentuk pelet dikeringkan di bawah sinar matahari selama 2 hari atau dapat menggunakan oven suhu 70°C selama 12 jam. Pakan yang sudah kering bersifat mudah patah menjadi bagian-bagian kecil. Pakan yang bentuk pelet selanjutnya dikemas dengan menggunakan kemasan yang kedap udara dan siap digunakan (Yulita, 2015).

Penentuan kadar protein pakan dilakukan dengan cara uji kuantitatif yang menggunakan metode Kjeldahl yang terdiri atas 3 tahap yaitu tahap destruksi, tahap destilasi, dan tahap titrasi. Penentuan kadar protein menggunakan persamaan (3) dengan faktor konversi 6,25 (Sáez-Plaza *et al.* (2013).

Analisis Data

Data perubahan jumlah sel selama periode kultur mikroalga dianalisis menggunakan *Repeated Measure ANOVA*, sedangkan kandungan protein mikroalga dan ayam broiler dianalisis menggunakan *one way ANOVA*. Apabila hasil analisis berpengaruh

Table 1 Broiler chicken feed formulation

Tabel 1 Formulasi pakan ayam broiler

Feed ingredients (g)	Treatment				
	Control	2.5	5.0	7.5	10
Corn meal	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
Bran	9.50	9.50	9.50	9.50	9.50
Fish meal	7.40	8.35	9.00	10.00	10.35
Soybean meal	25.00	22.50	20.00	17.50	15.00
<i>C. vulgaris</i> meal	0.00	2.50	5.00	7.50	10.00
Vitamin permix	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Limestone	3.25	2.80	2.50	2.25	2.00
Palm oil	3.85	3.35	3.00	2.25	2.15
L-Lysine-HCl	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
DL-Methionine	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
NaCl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

($p \leq 0.05$) maka dilanjutkan dengan uji Duncan dengan bantuan aplikasi SPSS versi 22.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Mikroalga

Perbedaan konsentrasi LTAB yang digunakan dan hari kultur berpengaruh terhadap jumlah sel akhir *C. vulgaris* ($p < 0.05$). Konsentrasi 10, 100, 1.000 dan 10.000 ppm media LTAB dan Walne memberikan efek yang berbeda nyata ($p < 0.05$) terhadap kepadatan sel akhir *C. vulgaris*. Kepadatan sel pada akhir yang tertinggi ditemukan pada *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan media Walne sebanyak 96×10^5 sel·mL⁻¹ dan terendah pada media LTAB dengan konsentrasi 10 ppm sebanyak 18×10^5 sel·mL⁻¹. Konsentrasi media LTAB 10000 ppm menghasilkan kepadatan sel *C. vulgaris* yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 10, 100 dan 1000 ppm (Figure 2).

Menurut Iba *et al.* (2014), nutrisi dalam media merupakan salah satu faktor yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga dan erat kaitannya dengan ketersediaan unsur makro dan mikro nutrisi dalam suatu media. Unsur hara yang

berperan dalam pertumbuhan *C. vulgaris* adalah nitrogen (N) dan fosfor (P) (Elystia *et al.*, 2019). Nitrogen dimanfaatkan oleh mikroalga dalam bentuk nitrat (NO₃⁻) dan amonium (NH₄⁺), namun karena kandungan amonium yang lebih besar dari 25 µM bersifat toksik bagi mikroalga maka suplai nitrogen dalam bentuk nitrat lebih sering dipakai dalam media kultur. Mikroalga dapat menyerap fosfor dalam bentuk polifosfat atau ortofosfat untuk meningkatkan pertumbuhan dan kandungan nutrisinya dalam sel (Yakoob *et al.*, 2021).

Hasil analisis kandungan nutrisi LTAB sebelum diencerkan pada penelitian ini yaitu nitrat 0,421 mg/L dan fosfat 0,038 mg/L, amonia 0,192 mg/L dan magnesium 0,08% (Table 2). Setelah diencerkan sebagai media kultur *C. vulgaris* pada berbagai konsentrasi maka diduga kandungan N, P dan amonia akan menurun mengikuti konsentrasi LTAB dalam air laut. Kandungan nitrat 0,2-0,5 g/L atau 200-500 mg/L merupakan nilai optimal untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. (Nouri *et al.*, 2021). Menurut Roopnarain *et al.* (2014), konsentrasi fosfor optimal untuk mikroalga berada di kisaran 0,001-

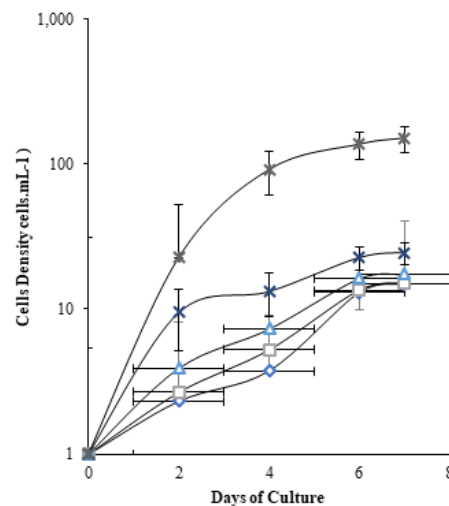


Figure 2 Changes in cell density of microalgae (mean±standard error, logarithmic scale) during days culture period in different concentration of LTAB media; —◇— 10 ppm; —□— 100 ppm; —△— 1,000 ppm; —×— 10,000 ppm; —*— Walne

Gambar 2 Perubahan kepadatan sel mikroalga *Chlorella vulgaris* selama 7 hari pengamatan (rata-rata jumlah sel± standar error, dalam skala logaritma) yang dikultur dengan variasi konsentrasi media LTAB; —◇— 10 ppm; —□— 100 ppm; —△— 1.000 ppm; —×— 10.000 ppm; —*— Walne



0,179 g/. Unsur fosfor (P) yang terkandung dalam media kultur diserap oleh mikroalga dalam bentuk fosfat (PO_4^{3-}), berfungsi untuk metabolisme energi, pengaturan metabolisme alga, pengaturan produksi pati atau amilum, pembentukan karbohidrat, dan sangat penting dalam transfer energi (Wijoseno, 2011). Walaupun kandungan fosfor dalam media LTAB sebesar 0,038 mg/L masih berada dalam kondisi optimal untuk pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* sehingga pertumbuhan masih terjadi, namun kandungan nitrat berada dalam kondisi yang tidak optimal sehingga pertumbuhan cenderung lambat jika dibandingkan dengan *C. vulgaris* yang dikultur dalam media Walne. Oleh karena itu penambahan media LTAB sebesar 10000 ppm dalam air laut sebagai media kultur *C. vulgaris* menghasilkan kepadatan sel yang lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan media LTAB pada konsentrasi yang lebih rendah. Penelitian Zhu *et al.* (2014) menunjukkan pertumbuhan *Chlorella zofingiensis* sangat terhambat pada kondisi kekurangan nitrogen dan hasilnya mirip dengan penelitian yang dilakukan oleh Ji *et al.* (2011) pada *Tetraselmis subcordiformis*. Penggunaan media organik untuk kultur mikroalga menunjukkan bahwa pertumbuhan mikroalga cenderung terhambat tetapi produksi lipid dan karotenoidnya lebih baik dari media kultur konvensional seperti Walne dan f/2 (Iba *et al.*, 2023; Yulina *et al.*, 2020). Pertumbuhan *C. vulgaris* yang baik pada media Walne dalam penelitian ini menunjukkan bahwa selain media ini memiliki komposisi nutrisi yang lengkap untuk pertumbuhan mikroalga (Halima *et al.*,

2020), media Walne memenuhi kebutuhan *C. vulgaris* bagi pertumbuhan selnya.

Kandungan amonia yang terkandung dalam media LTAB belum dalam kondisi yang toksik dan masih dapat dimanfaatkan *C. vulgaris* untuk pertumbuhan, produksi biomassa serta sebagai pembentukan protein. Hasil analisis kadar amonia pada media LTAB dalam penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan kadar amonia pada air limbah tahu yaitu 23,3-23,5 mg/L (Kaswinarni, 2007). Amonia bersifat racun bagi mikroalga, namun berbeda halnya jika amonia yang tinggi disertai dengan $\text{pH} < 7$, maka akan terjadi proses ionisasi amonia yang pada akhir prosesnya akan menghasilkan amonium. Amonium inilah yang merupakan sumber nutrisi bagi mikroalga tersebut (Saragih *et al.*, 2018) namun kadarnya dalam media kultur tidak boleh melebihi 25 μM .

Kandungan Protein Mikroalga dan Pakan Ayam Broiler

Kandungan protein *C. vulgaris* yang dikultur dalam media LTAB menunjukkan nilai yang berbanding terbalik dengan pertumbuhan dan kepadatan sel akhir. Nilai rata-rata kadar protein dari kultur *C. vulgaris* dari yang tertinggi sampai yang terendah pada masing-masing konsentrasi media LTAB berturut-turut adalah 10 ppm yaitu 23,531%, 100 ppm yaitu 17,459%, 1.000 ppm yaitu 16,456%, 10.000 ppm yaitu 16,197% dan kadar protein yang terendah terdapat pada Walne (kontrol) yaitu 13,082% (Figure 3).

Kandungan protein yang cenderung makin menurun dengan penambahan

Table 2 Nutrient content of LTAB culture media

Tabel 2 Kandungan nutrisi media kultur LTAB

No	Parameter	Value	Method of analysis
1.	Amonia (mg/L)	0.192	Spectrophotometer
2.	Nitrat (mg/L)	0.421	Brucin (SNI 06-2480-1991)
3.	Fosfat (mg/L)	0.038	Spectrophotometer
4.	Nitrogen (%)	0.41	Spectrophotometer
5.	Magnesium (%)	0.08	Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)

konsentrasi media LTAB kemungkinan berhubungan dengan pertumbuhan dan kondisi sel saat panen. Panen mikroalga *C. vulgaris* dalam penelitian ini dilakukan pada fase stasioner akhir sebelum memasuki fase kematian kecuali pada *C. vulgaris* yang dikultur dalam media LTAB 10 ppm (Figure 2) yang masih dalam kondisi stasioner awal. Panen yang dilakukan pada fase stasioner awal biasanya membuat kandungan protein pada mikroalga lebih tinggi dari panen yang dilakukan pada fase stasioner dimana energi untuk pertumbuhan telah dialihkan untuk sintesis dan akumulasi lipid (Iba *et al.*, 2014; Yakoob *et al.*, 2021).

Kadar protein dalam biomassa kering *C. vulgaris* sebesar 23,532% yang dikultur pada konsentrasi 10 ppm media LTAB menunjukkan bahwa nutrisi yang terdapat pada media kultur tersebut pada fase stasioner awal masih mendukung kebutuhan nutrisi *C. vulgaris*. Media kultur dan waktu panen sangat menentukan kandungan metabolit primer dan sekunder pada mikroalga (Iba *et al.*, 2014; Yuli, 2020; Iba *et al.*, 2023). Kandungan protein mikroalga bervariasi antar spesies dan berkisar antara 12 % hingga

35 %, dan nilai ini dipengaruhi oleh media dan kondisi kultur (Iba *et al.*, 2014). Kondisi kultur dan waktu panen yang optimal bahkan dapat meningkatkan kandungan protein pada *C. vulgaris* 51-58 % (Jansen *et al.*, 2022).

Kandungan protein *C. vulgaris* yang tinggi pada konsentrasi 10 ppm media LTAB menunjukkan bahwa unsur nitrogen yang terdapat pada media LTAB dengan konsentrasi yang rendah mampu meningkatkan kandungan protein *C. Vulgaris*. Hal ini menunjukkan bahwa penggunaan media LTAB hanya dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan diharapkan mampu semakin menurunkan biaya produksi protein sel tunggal dari mikroalga *C. vulgaris* dan selanjutnya akan mampu menurunkan biaya produksi pakan formulasi ayam broiler.

Peningkatan kandungan protein terjadi pada pakan pelet ayam broiler setelah diberi penambahan suplemen protein sel tunggal dalam tepung mikroalga *C. vulgaris* yang dikultur menggunakan media LTAB dengan konsentrasi 10 ppm pada persentase yang berbeda. Kandungan protein tertinggi diperoleh dengan penambahan 2,5% tepung *C. vulgaris* sebesar 34,65%, sedangkan

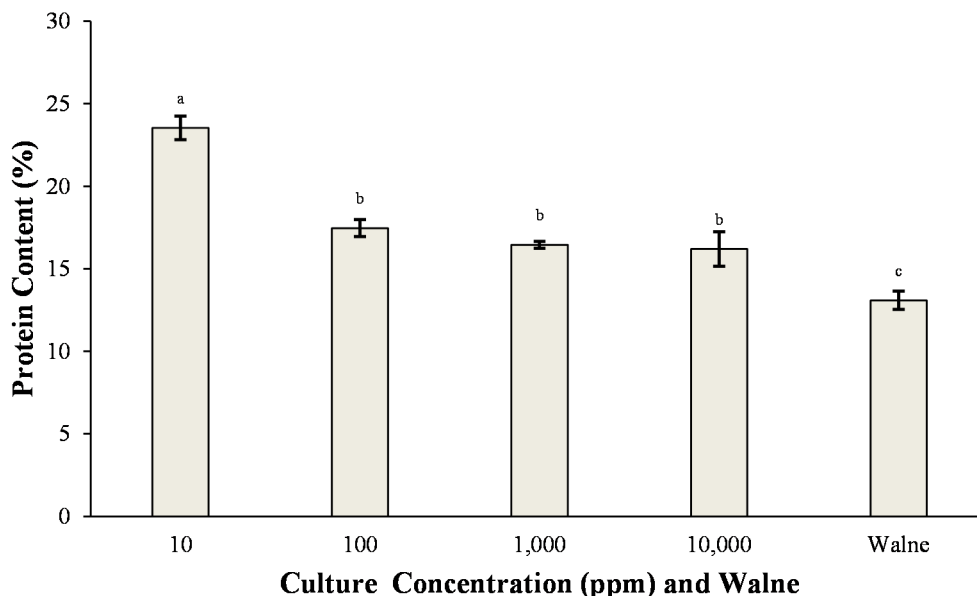


Figure 3 Protein content of microalgae dry weight cultured in LTAB culture media and Walne; different superscripts showed a significant difference ($p < 0.05$)

Gambar 3 Grafik kandungan protein; Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata variasi konsentrasi LTAB dan Walne terhadap kandungan protein *Chlorella vulgaris* ($p < 0.05$)



kandungan protein optimal yaitu 22,71% dan 24,06% diperoleh dengan penambahan tepung mikroalga masing-masing 5 dan 7,5%. Kandungan protein dalam pakan formulasi ayam broiler ditemukan pada perlakuan tanpa penambahan tepung mikroalga dan penambahan 10% masing-masing yaitu 20,02% dan 20,41% (Figure 4).

Perbedaan dari kandungan protein pakan formulasi ayam broiler pada setiap perlakuan dipengaruhi oleh kandungan tepung *C. vulgaris* kombinasi bahan penyusun pakan, antara lain bungkil kedelai, tepung ikan dan metode pembuatan pakan. Pembuatan pakan dengan metode *repeleting* membutuhkan persentase tepung mikroalga yang lebih banyak sampai 25% untuk menghasilkan protein pakan ikan 21,67% (Darsan *et al.*, 2021). Sedangkan penambahan tepung mikroalga *Dunaliella salina* sebesar 7% dalam pakan formulasi untuk udang menghasilkan pertumbuhan mutlak terbaik dengan kandungan protein sebesar 47%. Kandungan protein pakan formulasi untuk udang menurun seiring dengan penambahan tepung mikroalga sampai 9% (Sumarno, 2022). Penambahan 10% tepung *C. vulgaris* dalam formulasi pakan ayam broiler menghasilkan protein total pakan sebesar

20,4%. Penambahan tepung mikroalga yang tinggi dalam pakan menurunkan kandungan protein pakan dan pencernaan protein yang berpengaruh terhadap pertumbuhan ayam broiler (Alfaia *et al.*, 2021). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh interaksi asam amino dari berbagai bahan pakan sumber protein yang berbeda yang digunakan seperti tepung ikan dan tepung kedelai. Interaksi tersebut tidak selamanya berpengaruh negatif karena pada penambahan tepung mikroalga juga diimbangi dengan kandungan asam lemak omega-3 untuk kesehatan ternak. Oleh karena itu, dalam pembuatan pakan ayam broiler perlu memerhatikan jumlah optimal dari setiap bahan yang digunakan agar tidak kelebihan nutrisi. Bahan penyusun yang lain yaitu *L-lysine* juga dapat merusak kadar protein ketika terjadi degradasi protein (Seo *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2021).

Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan tepung mikroalga yang optimal untuk pakan ayam broiler dapat dilakukan dengan persentase sebesar 5 dan 7,5%; sedangkan 2,5% tepung *C. vulgaris* menghasilkan pakan dengan protein yang tertinggi (34,06%). Penambahan tepung *C. vulgaris* 5 dan 7,5% disebut optimal dikarenakan jika pemberian protein yang

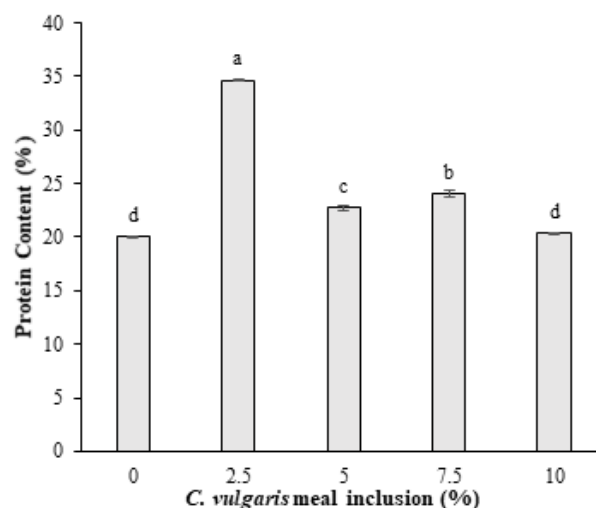


Figure 4 Protein content in broiler chicken feed with the addition of different concentration of *Chlorella vulgaris* meal; Different superscripts showed a significant difference ($p < 0.05$)

Gambar 4 Kandungan protein pada pakan pelet ayam broiler dengan persentase penambahan tepung *C. vulgaris* yang berbeda. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan pengaruh yang signifikan antar perlakuan ($p < 0,05$)

terlalu tinggi atau terlalu rendah di luar nilai optimal dapat menghambat penyerapan nutrisi pada pakan. Hal ini menyebabkan konsumsi pakan pada ayam, pertumbuhan, komposisi tubuh serta konversi ransum menjadi menurun (Zulfanita et al., 2011). Kandungan DNA dan RNA protein sel tunggal yang tinggi dapat menurunkan berat badan ayam broiler yang cukup signifikan (Falah et al., 2022).

Protein yang dihasilkan dalam pakan pada penelitian ini rata-rata lebih tinggi dari yang dibutuhkan oleh ayam broiler fase *pre-starter* dan *starter*. Standar Nasional Indonesia (SNI) 7652-2:2023 menunjukkan bahwa kebutuhan protein bagi ayam broiler fase *pre-starter* yaitu minimum 19-20% sedangkan fase *starter* minimum 16-17% (BSN, 2023). Pertumbuhan ayam broiler selama kedua fase ini memerlukan asupan protein yang lebih tinggi karena organisme sedang dalam masa pertumbuhan yang pesat. Oleh karena itu, kandungan protein yang optimal sangat penting dalam memenuhi kebutuhan protein disebabkan oleh retensi protein dalam daging ayam tergantung retensi protein dari pakan yang dikonsumsi (Susanty et al., 2021). Penelitian ini menunjukkan bahwa LTAB dengan konsentrasi 10 ppm sebagai media kultur mikroalga *C. vulgaris* dapat digunakan untuk produksi protein sel tunggal yang selanjutnya dapat diaplikasikan dalam formulasi pakan ayam broiler fase *starter* yang memenuhi standar SNI pakan.

KESIMPULAN

Media LTAB dengan konsentrasi 10 ppm dapat digunakan untuk memproduksi PST dari mikroalga *C. vulgaris* dengan kandungan protein tertinggi sebesar 23,53 % pada biomassa kering mikroalga. Kandungan protein tertinggi pada pakan formulasi ayam broiler diperoleh dengan penambahan tepung *C. vulgaris* 2,5% yaitu 34,65%, sedangkan kandungan protein yang mendekati optimal menurut SNI diperoleh dengan penambahan 5 dan 7,5 % tepung mikroalga *C. vulgaris* yaitu 22,71 % dan 24,06 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Afkar, M., Nisah, K., Sa'diah, H. (2020). Analisis kadar protein pada tepung jagung, tepung ubi kayu dan tepung labu kuning dengan metode kjedhal. *Jurnal AMINA*, 1(3), 108-113.
- Alfaia, C.M., Pestana, J.M., Rodrigues, M., Coelho, D., Aires, M.J., Ribeiro, D.M., Major, V.T., Martins, C.F., Santos, H., Lopes, P.A., Lemos, J. P. C., Fontes, C. M. G. A, Lordelo, M. M., Prates, J. A. M. (2021). Influence of dietary *Chlorella vulgaris* and carbohydrate-active enzymes on growth performance, meat quality and lipid composition of broiler chickens. *Poult. Sci. J*, 100, 926-937.
- Astuti, F. K., Busono, W., & Sjoifan, O. (2015). Pengaruh penambahan probiotik cair dalam pakan terhadap penampilan produksi pada ayam pedaging. *J-PAL*, 6(2), 99-104.
- [BSN] Badan Standar Nasional. (2023). SNI 7652-2:2023 tentang pakan bibit induk (*parent stock*) ayam ras tipe pedaging - Bagian 2: *starter* sebagai revisi dari SNI 7652-2:2021 pakan bibit induk (*parent stock*) ayam ras tipe pedaging - Bagian 2: *starter*.
- Bulu, M. F. Z. I. (2021). Optimasi tepung tapioka dan molasses pada pelet pakan kucing dan anjing berbahan limbah jeroan ikan dengan metode desain faktorial. [Skripsi]. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Chalid, S. Y., Amini, S., & Lestari, S. D. (2011). Kultivasi *Chlorella* sp. pada media tumbuh yang diperkaya dengan pupuk anorganik dan soil extract. [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Darsan, I. M., Iba, W., & Nur, I. (2021). Kandungan proksimat dan antioksidan pakan budidaya yang mengandung tepung *Chlorella vulgaris* beyerinck (Beijerinck) 1890. *Jurnal Sains dan Inovasi Perikanan*, 5(2), 54-59. <http://dx.doi.org/10.33772/jspi.v5n2>.
- Darsi, R., Supriadi, A., & Sasanti, A. D. (2012). Karakteristik kimiawi dan potensi pemanfaatan *Dunaliella salina* dan



- Nannochloropsis* sp. *Jurnal Fishtech*, 1(1), 14–25.
- Doyin, A.E., & Akinfala, E. O. (2023). Optimizing broiler nutrition and feed formulation strategies: A comprehensive review for the Nigerian poultry industry. *Zoological and Entomological Letters*, 3(2), 70-76.
- Elystia, S., Muria, S. R., & Pertiwi, S. I. P. (2019). Pemanfaatan mikroalga *Chlorella* sp. untuk produksi lipid dalam media limbah cair hotel dengan variasi rasio C:N dan panjang gelombang cahaya. *Jurnal Sains & Teknologi Lingkungan*, 11(1), 25–43. <https://doi.org/10.20885/jstl.vol11.iss1.art3>.
- Falah, R. R., Sadara, H. T., Sjoftan, O., & Natsir, M. H. Pengaruh penggunaan organik protein dalam pakan terhadap produktivitas ayam pedaging. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis*, 5(2), 125-138.
- Fitro, R., Sudrajat, D. & Dihansih, E. 2015. The performance of broiler chickens fed commercial ration containing date press cake meal as a substitute for corn. *Jurnal Peternakan Nusantara*, 1(1), 1-8.
- Gifarey, N. B. H. A. (2020). Potensi limbah cair industri tempe sebagai media kultur *Arthrospira (Spirulina platensis)* untuk produksi protein sel tunggal. [Skripsi]. Universitas Halu Oleo.
- Halima, A., Nursyirwani, Effendi, I., & Ambarsar, H. (2020). Potential microalga *Chlorella vulgaris* for bioremediation of heavy metal Pb. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 2(3), 224–234. <https://doi.org/10.31258/ajoa.2.3.224-234>
- Hartini, F., Restuhadi, F., & Dahril, T. (2017). Pemanfaatan mikroalga *Chlorella* sp dalam menurunkan baku mutu polutan limbah cair industri sagu. *Jurnal FAPERTA*, 4(1), 1–13.
- Herlina, B., Novita R., & Karyono, T. (2015). Effect of time and ration on the performance growth and broiler production. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, 10(2), 107-113.
- Iba, W., Rice, M. A., & Wikfors, G. H. (2014). Microalgae in eastern pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) hatcheries: a review on roles and culture environments. *Journal Asian Fisheries Science*, 27(1), 212–233.
- Iba, W., Rice, M. A., Maranda, L., & Wikfors, Gary H. (2018). Growth characteristics of newly isolated Indonesian microalgae under different salinity. *Indonesian Aquaculture Journal*, 13(2), 71–81. <https://doi.org/10.15578/iaj.13.2.2018.71-81>
- Iba, W., Abidin, L. O. B., & Indrayani. (2019). Bimbingan teknis kultur mikroalga bagi teknisi balai benih perikanan Kendari Sulawesi Tenggara. *Jurnal Abdi Mas TPB Unram*, 1(1), 91–96. <https://doi.org/10.29303/ampb.v1i1.16>.
- Iba, W., Akib, N.I., Ilham, Jumardin, L.O.M., Arif, B., Nursainuddin, Yosalina, S., & Andas, J.A. (2023). Organic culture media for sustainable carotenoid production from microalgae In P. O. Fuertes and M. F.C. Corral (Eds.) Recent developments in antioxidants from natural sources (pp. 116-127). InTech Open. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.109789>
- Imelda, S., Claudia, C., Lambui, O., & Suwastika, I. N. (2018). Cultivation of local microalga isolate on bean sprouts extract medium. *Journal of Science and Technology*, 7(2), 148-157.
- Ismi, R. S., Pujaningsih, R. I. & Sumarsih, S., (2017). The effect of molasses level addition on physical and organoleptic quality of goat feed pelets on fattening period. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 5(3), 58-63.
- Janssen, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. (2022). Microalgae based production of single-cell protein. *Current Opinion in Biotechnology*, 75, 102705. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102705>
- Jumardin, M. L. O. (2020). Pertumbuhan dan kandungan karotenoid mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultur menggunakan media pupuk organik cair (POC) eceng gondok (*Eichornia crassipes*). [Skripsi]. Universitas Halu Oleo.
- Junaid, F., Khawaja, L. A., & Ali, S. (2020). Single cell protein as a potensial substitute: a critical review. *World Journal of Pharmaceutical Research*,

- 9(2), 141–161. <https://doi.org/10.20959/wjpr20202-16686>
- Kalontong, P. K., Safithri, M., & Tarman, K. (2022). Penambatan molekul senyawa aktif *Spirulina platensis* sebagai inhibitor TMPRSS2 untuk mencegah infeksi SARS-COV-2. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(2), 253-267.
- Kaswinarni. (2007). Penurunan konsentrasi amonia limbah cair tahu menggunakan teknologi *Biofilm*-Pond dengan media pipa PVC sarang tawon dan bata ringan disertai penambahan lumpur aktif. [Skripsi]. Universitas Diponegoro.
- Kleyn, R, & Ciacciariello, M. (2023). Feed Formulation: Expanding our Horizons Beyond the Simple Provision of Least-cost Diets. *Proceedings of the Arkansas Nutrition Conference*, 6, 1-18.
- López, C. V. G., García, M. del C. C., Fernández, F. G. A., Bustos, C. S., Chisti, Y., & Sevilla, osé M. F. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*, 101(19), 7587–7591. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>
- Martins, C.F., Ribeiro, D.M., Costa, M., Coelho, D., Alfaia, C.M., Lordelo, M., Almeida, A.M., Freire, J.P.B., Prates, J.A.M. (2021). Using microalgae as a sustainable feed resource to enhance quality and nutritional value of pork and poultry meat. *Foods*, 10, 2933. <https://doi.org/10.3390/foods10122933>
- Mubarok, A., Setyaningsih, I., & Uju. (2018). Karakteristik eksopolisakarida mikroalga *Porphyridium cruentum* yang berpotensi untuk produksi bioetanol. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1), 24-34.
- Mufidah, A., Agustono, Sudarno, & Nindarwi, D. D. (2017). Teknik kultur *Chlorella* sp. skala laboratorium dan intermediet di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Sitobondo Jawa Timur. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 7(2), 50–56.
- Nasruddin, (2010). Nutrition food composition broiler finisher from several local food material. *Jurnal Dinamika Penelitian BIPA*, 21(38), 144-152.
- Nouri, H., Mohammadi Roushandeh, J., Hallajisani, A., Golzary, A., & Daliry, S. (2021). The effects of glucose, nitrate, and pH on cultivation of *Chlorella* sp. microalgae. *Global Journal of Environmental Science and Management*, 7(1), 103-116. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2021.01.08>.
- Novianti, T. (2019). Kandungan betakaroten dari mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultur dengan perlakuan sumber cahaya dan kepadatan awal inokulum (KAI) yang berbeda. *Jurnal Mangifera Edu*, 4(1), 46–61. <https://doi.org/10.31943/mangiferaedu.v4i1.37>
- Pancapalaga, W. (2011). Pengaruh rasio penggunaan limbah ternak dan hijauan terhadap kualitas pupuk cair. *Jurnal Gamma*, 7(1), 61-68.
- Pesti, G.M., & Choct, M. (2023). The future of feed formulation for poultry: toward more sustainable production of meat and eggs. *Animal Nutrition*, 15, 71-87. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.02.013>
- Purnamasari, D. K., Erwan, Syamsuhaidi, & Kurniawan, M. (2016). Evaluasi kualitas pakan komplit dan konsentrat unggas yang diperdagangkan di Kota Mataram. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*, 5(1), 30-38.
- Putra, I. K. R. W., Anggreni, A. A. M. D., & Arnata, I. W. (2015). Pengaruh jenis media terhadap konsentrasi biomassa dan klorofil mikroalga *Tetraselmis chui*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 3(2), 40–46.
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y., & Dussadee, N. (2016). Cultivation of green microalga, *Chlorella vulgaris* for biogas purification. *International Journal of New Technology and Research*, 2(3), 117–122.
- Regista, A., Litaay, M., & Umar, M. R. (2017). Pengaruh pemberian vermikompos cair *Lumbricus rubellus* Hoffmeister pada pertumbuhan *Chlorella* sp. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.20956/bioma.v2i1.1346>.
- Rosaini, H., Rasyid, R., Hagramida, V. (2015). Penetapan kadar protein secara kjeldahl beberapa makanan olahan kerang remis (*Corbiculla moltkiana* Prime.) dari Danau Singkarak. *Jurnal Farmasi Higea*,



- 7(2), 120-125.
- Roopnarain, A., Gray, V.M., Sym, S.D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 156, 408–411.
- Sáez-Plaza, P., Navas, M. J., Wybraniec, S., Michałowski, T., & Asuero, A. G. (2013). An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 43(4), 224– 272. doi:10.1080/10408347.2012.751787.
- Saragih, H. S., Rudiyan, S., & Haeruddin. (2018). Toksisitas limbah cair pecucian udang dari Pasar Kobong, Semarang terhadap pertumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Maquares*, 7(1), 99–109.
- Seo, S. Kim, H. J. Lee, S. Y., & Jong K. (2008). Ruminant protein degradation characteristics of cell mass from *Lysine* production. *Jurnal Asian-Aust. Anim. Sci*, 21(3), 364-370.
- Su, M., Bastiaens, L., Verspreet, J., & Hayes, M. (2023). Applications of microalgae in foods, pharma and feeds and their use as fertilizers and biostimulants: legislation and regulatory aspects for consideration. *Foods*, 12: 3878. <https://doi.org/10.3390/foods12203878>
- Susanty, A., Adji, D., & Tafsin, M. (2021). Analysis of the quality of broiler chicken from modern and traditional market in Medan, North Sumatera. *Jurnal Sain Veteriner*, 39(3), 224-232.
- Spalvins, K., Ivanovs, K., & Blumberga, D. (2018). Single cell protein production from waste biomass: review of various agricultural by-products. *Journal Agronomy Research*, 16(2), 1493–1508. <https://doi.org/10.15159/AR.18.129>
- Sumarno. (2022). Efek variasi tepung *Dunaliella salina* (dunal) teodoresco 1905 dalam pakan buatan terhadap kandungan karotenoid dan pertumbuhan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) Boone 1931. [Skripsi]. Universitas Halu Oleo
- Utomo, N. B. P., Winarti, & Erlina, A. (2005). Pertumbuhan *Spirulina platensis* yang dikultur dengan pupuk inorganik (Urea, TSP dan ZA) dan kotoran ayam. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 4(1), 41–48.
- Wijoseno, T. (2011). Uji pengaruh variasi media kultur terhadap tingkat pertumbuhan dan kandungan protein, lipid, klorofil dan karotenoid pada mikroalga *Chlorella vulgaris* Buitenzorg. [Skripsi]. Universitas Indonesia.
- Yaakob, M.A., Mohamed, R.M.S.R., Al-Gheethi, A., & Aswathnarayana Gokare, R. (2021). Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview. *Cells*, 10, 393. <https://doi.org/10.3390/cells10020393>
- Yuli, N. (2020). Pertumbuhan dan kandungan protein mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultur menggunakan limbah cair hotel. [Skripsi]. Universitas Halu Oleo.
- Yuliani, Agustini, T. W., & Dewi, E. N. (2020). Intervensi *Ocimum basilicum* L pada serbuk dan mikroenkapsulasi *Spirulina platensis* terhadap protein dan karakteristik sensorik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(2), 225-235.
- Yulina, Iba, W., & Hamzah, M. (2020). Pengaruh konsentrasi pupuk organik cair dari eceng gondok (*Eichhornia crassipes*) yang berbeda terhadap pertumbuhan dan kandungan protein *Chlorella vulgaris*. *Jurnal Media Akuatika*, 5(1), 34–42.
- Yulita, S. (2015). Substitution *Chlorella vulgaris* from isolation crumb rubber waste water as fish feed to the nila fish (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Dinamika Penelitian Industri*, 26(2), 131-138.
- Zulfanita, Eny, M. R., & Utami, D. P. (2011). Pembatasan ransum berpengaruh terhadap pertambahan bobot badan ayam broiler pada periode pertumbuhan. *Jurnal Mediargo*, 7(1), 59-61.