

Bioprocess Potentials of Squalene from Thraustochytrids Microalgae for Nutraceuticals in New Normal Era Isolated from Indonesian Mangroves: A Review)

Review Potensi Bioproses Squalene dari Mikroalga Thraustochytrid untuk Nutrasetikal di Era New Normal Diisolasi dari Hutan Bakau Indonesia

Suhendra^{a,1,*}, Tresya Pantoiyo^{a,2}, Sarah Fazlia^{a,3}, Endah Sulistiawati^{a,4}, Rachma Tia Evitasari^{a,5}

^aProgram Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Ahmad Dahlan Kampus IV, Jl. Ringroad Selatan, Tamanan, Banguntapan, Bantul, D.I Yogyakarta 55164

¹ suhendra@che.uad.ac.id *; ² tresya1600020086@webmail.uad.ac.id; ³ sarah1600020113@webmail.uad.ac.id; ⁴ endahsulistiawati@che.uad.ac.id; ⁵ rachma.evitasari@che.uad.ac.id

* corresponding author

ARTICLE INFO

Article history

Received December 22, 2020

Revised February 21, 2021

Accepted March 29, 2021

Keywords

Mangrove

Microalgae

Nutraceuticals

Squalene

Thraustochytrids

ABSTRACT

The covid-19 pandemic has been increasing people's awareness of good habits to maintain their health. Accordingly, the choice shifted more to consume nutraceutical and functional food to provide a beneficial impact. One of the essential and attractive nutraceuticals is squalene (C₃₀H₅₀) which has a long history the biosynthesis of cholesterol, vitamins and steroid hormones in human. A common raw material to produce squalene comes from the liver oil of a deep-sea shark. However, the strategy to use liver sharks in squalene production encountered environmental and political barriers due to strict nature protection regulations. The renewed scientific interest has found microalgae from the thraustochytrids family as a promising future source of squalene. Thraustochytrids is a group of osmo-heterotrophic marine microalgae, which can be found commonly in mangrove area.. As the country with the largest mangrove forest globally, Indonesia has the highest biodiversity potentials of Thraustochytrids. Unfortunately, the study on the potential of Thraustochytrids microalgae from Indonesian mangrove forests for squalene production has received less attention from researchers. Therefore, this paper presents Thraustochytrids' potential from Indonesian mangrove forests as a sustainable source of squalene production that can replace raw material from shark liver oil. This paper summarizes all selected strains used in the previous study and their operating parameters. Based on our review study *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a-1 is the most productive Thraustochytrids which produced 0.32 g/L.day in the nutrients of 2.0% glucose, 1.0% tryptone, 0.5 g/l yeast, and 50% artificial seawater (ASW). Compared to squalene from other sources (yeast, bacteria, and plants), Thraustochytrid can yield more squalene. Bioprocess engineering aspects and the general uses of squalene are also presented, including the notable developments in the adjuvant vaccine of Covid-19, anti-aging substance, and anti-cancer applications.

This is an open access article under the [CC-BY-SA](#) license.



1. Pendahuluan

Situasi pandemi *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) terkini akibat infeksi yang menyerang kesehatan manusia di bumi meningkatkan perhatian para peneliti untuk

menemukan cara menghambat dampak negatif yang ditimbulkan dari penyebaran Covid-19 [1]–[3]. Kesamaan strategi para peneliti seluruh dunia antara lain berupaya mencegah penyebaran infeksi pada manusia sehat dan meningkatkan daya tahan tubuh [4]–[6]. Karenanya, kajian tentang menjaga kesehatan tubuh dengan cara meningkatkan imunitas tubuh melalui nutrasetikal dan nutrisi fungsional kemudian berkembang dan mendapat peningkatan perhatian. [1], [7]–[11].

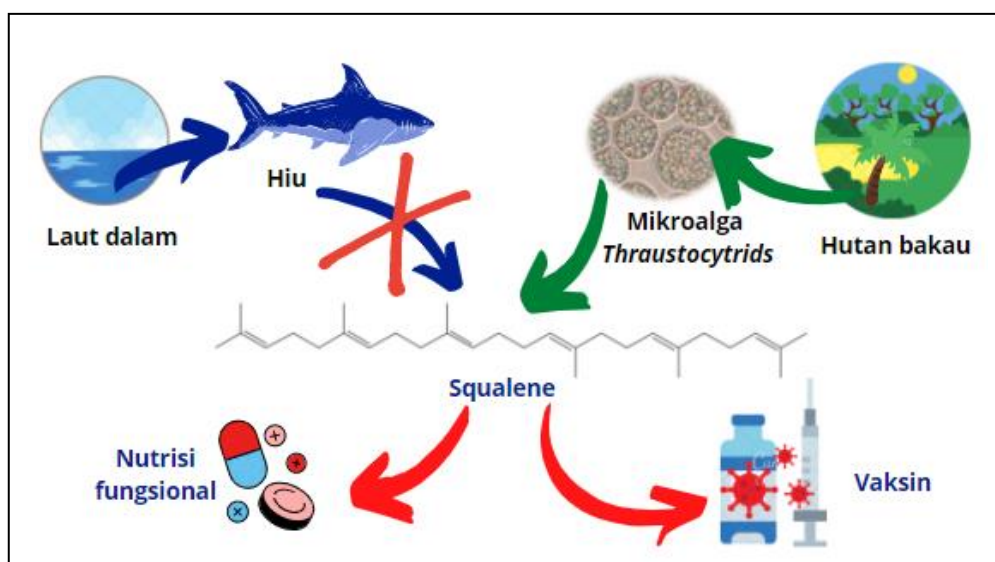
Salah satu sumber nutrasetikal dan alternatif asupan nutrisi fungsional tersebut dapat diperoleh dari mikroalga [12]–[19]. Produk bernilai tinggi (*high added value products*) untuk nutrasetikal dan nutrisi fungsional dari mikroalga berdasar fakta bahwa senyawa utama mikroalga mengandung asam lemak tak jenuh (*polyunsaturated fatty acids*) yang diperlukan oleh tubuh manusia [19]–[22]. Salah satu nutrisi fungsional yang dikenal saat ini adalah *squalene*, yang telah lama dikenal sebagai antioksidan yang kuat, agen anti kanker, sebagai bahan bantu untuk vaksin dan pembawa obat, dan juga mempunyai peranan besar dalam produk perawatan kulit [23].

Pada awalnya, sumber utama *squalene* berasal dari minyak hati hiu laut dalam dan ikan paus yang bertindak sebagai prekursor biosintesis kolesterol, steroid dan asam empedu hewan dan tumbuhan [24]–[27]. Namun, bila bahan baku *squalene* dari hati ikan hiu belum bisa tergantikan, maka upaya meningkatkan kapasitas produksi *squalene* untuk nutrisi fungsional dan vaksin akan berpotensi memusnahkan sekitar 500 juta ekor hiu laut dalam [28]–[31].

Berbasis keprihatinan tersebut, muncul berbagai upaya peneliti terkini untuk mencari sumber alternatif baru pengganti bahan baku *squalene* yang lebih ramah lingkungan dan menghindari kepunahan hiu laut dalam [11], [23], [32–34]. Salah satunya dengan memanfaatkan *squalene* yang berasal dari mikroalga *family thraustochytrids* [35]–[40]. Gambar 1 menggambarkan ilustrasi *trend* pengembangan produksi *squalene* di masa yang akan datang, dimana mikroalga *thraustochytrids* semakin digali potensinya sebagai bahan baku produksi *squalene*.

Mikroalga *thraustochytrids* ditemukan paling banyak di perairan hutan bakau (*mangrove*) [41]–[43]. Sejatinya, Indonesia sebagai negara dengan wilayah hutan bakau terluas di dunia memiliki peran penting sebagai tempat tertinggi keanekaragaman hayati (*biodiversity*) mikroalga *thraustochytrids*, khususnya untuk bahan baku *squalene*. Akan tetapi, kajian potensi mikroalga *thraustochytrids* dari mikroalga hasil isolasi dari hutan bakau di Indonesia sebagai potensi bahan baku *squalene* belum banyak ditemukan di jurnal ilmiah nasional dan internasional.

Oleh karena itu, tulisan ini bertujuan memberikan kontribusi awal sebagai gambaran umum potensi pengembangan teknologi produksi *squalene* yang berbasis mikroalga dari hutan bakau di Indonesia.

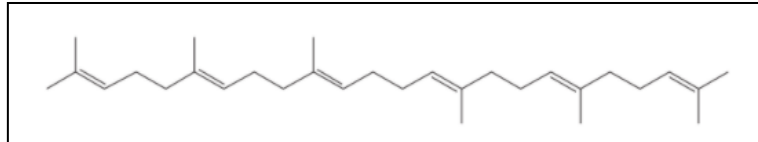


Gambar 1. Ilustrasi Pengembangan Produksi *Squalene* Ramah Lingkungan Berbahan Baku Mikroalga *Thraustochytrids* untuk Menggantikan Hati Hiu Laut Dalam

2. Squalene

2.1. Biokimia Squalene

Squalene ($C_{30}H_{50}$) merupakan senyawa hidrokarbon triterpenik tak jenuh yang terbentuk secara alami dari asam mevalonat (MVA) atau *2-C-metil-D-erythritol 4-fosfat* (MEP) [44], [24], [45]. Gambar 2 menggambarkan struktur molekul *squalene*. *Squalene* pertama kali ditemukan pada tahun 1916 oleh ahli kimia Jepang Mitsumaru Tsujimoto, dinamai "*squalene*" karena senyawa ini terdapat pada hati hiu laut dalam (*Squalus spp*) [26]. Sejak saat itu, minyak hati ikan hiu menjadi sumber *squalene* terbesar.



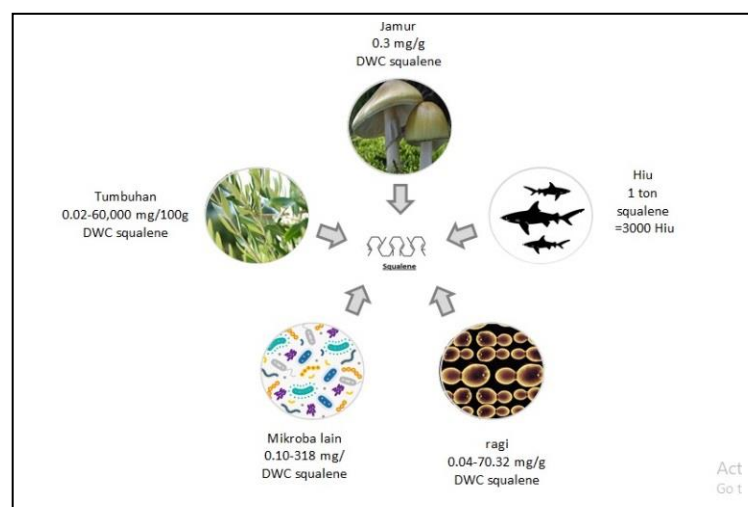
Gambar 2. Struktur Molekul *Squalene* (Diadopsi dari [46])

Squalene dari hati ikan hiu diambil dari bahasa latin "*squalene exogene oleum*" dan nama ini memiliki nama medis *Spinacene or Supraene*. Material *squalene* tidak berwarna, berbau dan berasa, bersifat transparan stabil, *inert*, minyak cair homogen. Bahannya memiliki titik koagulasi rendah (-55 K) dan titik lebur rendah (203 K) [46]. Kajian farmakologis dan klinis menyatakan bahwa *squalene* aman untuk tubuh manusia [47]–[49]. Sifat emulsi *squalene* dengan surfaktan meningkatkan respon imun bila ditambahkan antigen [50]. Setiap dosis ampul vaksin influenza memerlukan sekitar 10 mg *squalene*. Karenanya, sejak tahun 1997 sudah lebih dari 22 juta dosis vaksin dibuat dengan penambahan *squalene* sebagai *adjuvant* [48].

Pada manusia, *squalene* merupakan salah satu komponen utama, yang terdiri dari sebum (12%), epidermis (<0,5%), dan permukaan lipid (10%) [51]. *Squalene* yang disintesis oleh hati disekresikan sebagian besar dari kelenjar *sebaceous* [24]. Jumlah *squalene* yang disekresikan berkisar antara 125 sampai 475 mg / hari, tergantung pada individu dan makanannya [52].

2.2. Penghasil Squalene

Squalene telah menarik banyak industri dan kelompok penelitian untuk menemukan sumber yang melimpah di alam. Berdasarkan ilustrasi yang ditampilkan pada Gambar 3, minyak hati hiu laut dalam telah lama menjadi sumber utama penghasil *squalene* dengan keperluan sekitar tiga ribu ekor hiu untuk menghasilkan sekitar satu ton *squalene* [53], [24], [54]. Namun dikarenakan jumlahnya yang semakin lama semakin berkurang dan terancam punah, maka untuk memenuhi kebutuhan industri diperlukan sumber *squalene* dari sumber lain, seperti dari mikroorganisme yang mempunyai tingkat pertumbuhan yang cepat.



Gambar 3. Sumber Potensi *Squalene* Selama ini Selain *Thraustochytrids* (Modifikasi dari [23])

Pada umumnya selain dari hati ikan hiu laut dalam, *squalene* juga dapat diekstrak dari berbagai macam mikroorganisme termasuk ragi seperti *Saccharomyces cerevisiae* [55] dan *Torulaspora*

delbrueckii [56], *Aurantiochytrium sp* [57-59], *Euglena* [60], *Archaea Halobacterium cutirubrum*, dan beberapa spesies lainnya yang memiliki kemampuan alami dalam menghasilkan *squalene*. Mikroorganisme eukariotik jenis *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) dilaporkan menghasilkan sejumlah *squalene*, sebesar 1,6 mg / g berat sel kering (DCW) [55], [61]. Selain itu, jamur yang dapat menghasilkan *squalene* diantaranya adalah *Torulasporea delbrueckii* (0,24 mg / g DCW) [56], *Aspergillus nidulans* (0,3 mg / g DCW) [62], dan *Kluyveromyces lactis* [63].

Beberapa tanaman juga dikenal dapat menghasilkan *squalene*, terutama bayam [64], [65], [61] dan tanaman zaitun [66-69] dengan produktivitas masing-masing sekitar 0,04 mg/ mg biomassa yang dihasilkan. Akan tetapi, meskipun dapat diperoleh dari mikroba dan tumbuhan, sulitnya produktivitas serta mahalnya langkah pemurnian dapat membatasi penggunaannya sebagai sumber dalam aplikasi skala industri maupun biomedis [44], [70].

Tabel 1 berikut ini merupakan beberapa jenis mikroorganisme yang dapat menghasilkan *squalene* dengan jumlah *yield* yang tinggi seperti *Gordonia amicalis* (HS-11) 480 mg/ l, *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 dengan *yield* 28,4 ± 1,08 mg/l [71] untuk data yang lebih lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Untuk meningkatkan produktivitasnya, beberapa penelitian melakukan upaya modifikasi genetika dari mikroorganisme tersebut [72]-[73].

Tabel 1. Beberapa Contoh Mikroorganisme Penghasil *Squalene*

Strain	Jenis Mikroba	Asal	Yield	Referensi
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741	Ragi	Germany	28,4 ± 1,08 mg/l	[71]
<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Bakteri	USA	5,1 mg/l	[74]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fungi	France	1.614 mg/l	[75]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> TWZ-97	Mikroalga	China	188,6 mg/l	[40]
<i>Gordonia amicalis</i> (HS-11)	Bakteri	USA	480 mg/l	[76]

2.3. Nutrisi Fungsional dari *Squalene*

Squalene telah teruji sebagai antioksidan untuk melindungi tubuh dari radikal bebas dan stres oksidatif lingkungan [77]. Penggunaan *squalene* semakin populer karena memberikan efek farmakologis positif pada kesehatan tubuh, antara lain sebagai anti-oksidan [78],[79], anti-kanker [80], anti-penuaan [81], kemopreventif [82-84], anti-bakteri [85], sebagai bahan *adjuvant* untuk vaksin dan pembawa obat (*drug carrier*) [86], [87], dan detoksifikasi [88]. Di Jepang *squalene* dikenal dengan istilah khusus yaitu “*Tokubetsu no Miyage*” yang berarti sebuah hadiah yang berharga. Penduduk lokal di semenanjung Izu telah menggunakan *squalene* untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Oleh sebab itu mereka menyebut *squalene* sebagai “*Samedawa*” yang berarti menyembuhkan segalanya [24].

Salah satu pertimbangan dalam peningkatan permintaan *squalene* sebagai nutrisi fungsional adalah temuan efek farmakologis penting dari *squalene* untuk pencegahan penyakit karena kelainan fungsi jantung, terutama untuk mencegah penyakit tekanan darah tinggi [47]. Selain itu, aplikasi nutrisi fungsional untuk kesehatan adalah penggunaan dalam manajemen diet pencegah kegemukan (*obesitas*), membantu gangguan metabolisme, meningkatkan kadar oksigen darah, mempertajam daya penglihatan dan mencegah katarak, meningkatkan produksi hormon insulin, mencegah mutasi gen akibat paparan radiasi UV yang karsinogenis, mempercepat penyembuhan inflamasi (peradangan dan luka), meningkatkan imunitas tubuh dan kebugaran [17], [80], [81], [83], [89], [90] [17], [25].

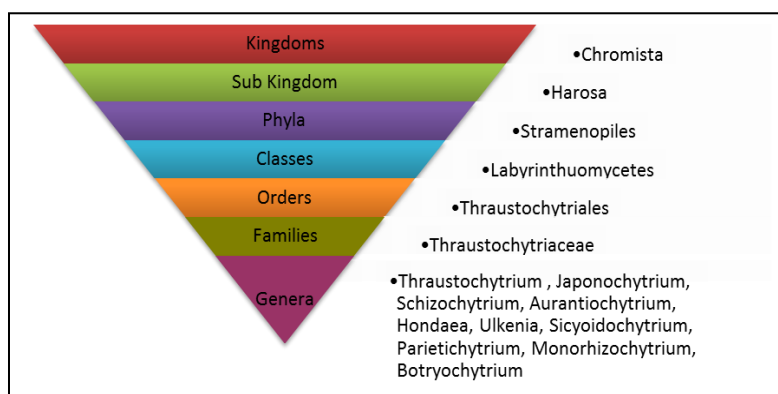
3. Mikroalga *Thraustochytrids*

3.1. Habitat dan taksonomi

Thraustochytrids pertama kali ditemukan pada tahun 1934 dan sejak tahun 1960 protista ini mulai banyak diteliti untuk mengetahui manfaat dan efek yang dihasilkannya [91]. Jenis *thraustochytrids* yang pertama kali ditemukan ialah *Thraustochytrium proliferum*. *Thraustochytrids* bersifat eukariotik, uniseluler dan heterotropik, tersedia melimpah di wilayah perairan laut dan sedimen [92], [93].

Pada awalnya *thraustochytrids* diidentifikasi sebagai keluarga *phycomycetes* karena kemampuannya untuk menghasilkan *zoospora* dan untuk mengembangkan struktur mirip *rhizoid* yang biasa dikenal dengan istilah jaringan ektoplasm (EN) [94]. Namun setelah ditinjau lebih lanjut

oleh Cavalier Smith tahun 1994, menunjukkan bahwa *thraustochytrids* bukan termasuk jenis jamur ataupun *oomycetes* tetapi *chromista* [91]. Gambar 4 merunut taksonomi dari *thraustochytrids*. Menurut Cavalier Smith et al. (1994), *thraustochytrids* termasuk dalam filum *stramenopile* atau biasa disebut dengan istilah heterokonta, dan kelas *Labyrinthulomycetes* [91].



Gambar 4. Taksonomi dari *Thraustochytrids* (Modifikasi dari [95])

3.2. Contoh Strain Penghasil Squalene

Berdasarkan beberapa riset sebelumnya, *thraustochytrids* dapat mensintesis sejumlah besar *docohexanoic acid* (DHA/ omega-3) serta senyawa nutrasetikal lainnya seperti *squalene* dalam kompartemen selulernya [96]. Beberapa *strain* utama dari *family thraustochytrids* yang digunakan pada kajian sebelumnya dilihat pada Tabel 2. *Strain family thraustochytrids* tersebut utamanya berasal dari *species Schizochytrium* [97], [57], [98] dan *Aurantiochytrium* [99], [100], [37], [101].

Tabel 2. Strain *Thraustochytrids* Penghasil Squalene

Strain	Asal	Referensi
<i>Aurantiochytrium sp.</i> TWZ-97	China	[40]
<i>Schizochytrium mangrovei</i> PQ6	Vietnam	[97]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> T66 (ATCC PRA-276)	Portugal	[96]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> Yonez 5-1	Japan	[58]
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	USA	[102]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> 18W-13a	Japan	[101], [37]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> T66	USA	[103]
<i>Schizochytrium sp.</i> HX-308(CCTCC M 209059)	China	[104]
<i>Schizochytrium sp.</i> MYA1381	USA	[105]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> 18 W-13a	Japan	[37]

Seperti ditampilkan pada Tabel 2, *strain Aurantiochytrium sp.* TWZ-97 yang berasal dari pantai Selatan Cina mencatatkan produktivitas yang relatif tinggi dengan mengoptimalkan kondisi operasi medium seperti glukosa, monosodium glutamat, ekstrak ragi dan NaCl yang beroperasi pada suhu 28 °C di dalam fermenter 5 liter. Hasil yang diperoleh maksimum 188,6 mg/liter *squalene* selama dua hari waktu kultivasi.

Sementara *strain* lain, *Schizochytrium mangrovei* PQ6, digunakan untuk memproduksi *squalene* dari limbah sisa produksi *biodiesel* dan produksi asam dokoheksanoat (DHA/omega-3) dari *strain* yang sama sehingga diklaim akan memberikan nilai ekonomis bila diintegrasikan dengan produksi omega-3 dan *biodiesel*.

Parameter penting dalam produksi optimum *squalene* dari *Schizochytrium mangrovei* PQ6 antara lain volume fermenter 150 liter, suhu 28 °C, pH awal 7,0 dan salinitas 1,5%. Hasil yang diperoleh adalah 1019 mg/ liter selama empat hari dalam fermenter 150 liter.

Selain aspek ramah lingkungan, *squalene* yang dihasilkan dari *thraustochytrids* ini mempunyai banyak kelebihan lain seperti kandungan *squalene* yang tinggi, tidak mengandung racun, pertumbuhan heterotropiknya cepat dan juga dapat diproduksi dalam skala komersial [33],[35]–[38], [106].

4. Bioproses Produksi *Squalene* dari *Thraustochytrids*

4.1. Kultivasi

Thraustochytrids merupakan mikroorganisme eukariotik penghasil *squalene* yang tumbuh dengan cepat ketika sumber nutrisi tersedia dengan cukup, terutama karbon organik dari lingkungan. Secara umum, *thraustochytrids* telah dikenal sebagai mikroalga yang telah sukses dikultivasi hingga skala industri untuk produksi omega-3, misalnya oleh sebuah *joint venture* perusahaan terkemuka Belanda dan Jerman, DSM dan Evonik [107], [108].

Di sisi lain, meski kajian tentang visi masa depan produksi *squalene* dari *Thraustochytrids* telah banyak oleh peneliti terdahulu, akan tetapi skala industri masih tetap dalam kajian. Tabel 3 menampilkan beberapa contoh parameter bioproses produksi *squalene* dari *thraustochytrids*.

Tabel 3. Parameter Bioproses Terpilih pada Produksi *Squalene* dari *Thraustochytrids*

Strain	Nutrient	Yield	Durasi (Hari)	Ref.
<i>Aurantiochytrium sp.</i> TWZ-97	40 g/L glukosa, 3 g/L MSG, 25 g/L yeast extract, dan 6 g/L NaCl.	0,054 g/L.hari dalam 5 L bioreactor	3.5	[40]
<i>Schizochytrium mangrovei</i> PQ6	90 g/L Glukosa, 10 g/L yeast extract, 17.5 g/L artificial seawater (ASW).	0,25 g/L.hari dan 0,255 g/L hari dalam 30 dan 150 L bioreactor	4	[97]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> T66 (ATCC PRA-276)	50% artificial seawater (ASW), 30 g/L glukosa, yeast extract C : N ratio of 10 : 1 (g / g).	0,18 g/L.hari ± 0,0012 g/L hari dalam kultivasi flask, dan 0,25 g/L.hari ± 0,0015 g/L.hari dalam bioreaktor	4	[96]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> Yonez 5-1	2.0% glukosa, 1.0% tryptone, 0.5% yeast extract dan 50% artificial sea water (ASW).	0,27 g/L.hari	4	[58]
<i>Schizochytrium limacinum</i> SR21	60 g/L glukosa, 50% artificial seawater (ASW).	0,31 ± 0.0022 g/L.hari	3	[102]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> T66	Glukosa (30 g/L), Fruktosa (9.89 g/L)	0,21 g/L.hari	5	[103]
<i>Aurantiochytrium sp.</i> 18W-13a	2.0 - 6% glukosa, 25 - 50% konsentrasi air laut dalam media GPY (glucose -peptone - yeast) pada suhu 25°C	Antara 0,075 – 0,32 g/L.hari	4 - 12	[101], [58], [37], [109], [110], [112], [113], [129], [130]
<i>Schizochytrium sp.</i> MYA 1381	100 mL fermentation broth, 5 mL methanol	510.2 ± 33.8 µg/g dcw dalam kontrol, 610.6 ± 80.0 µg/g dcw dalam fluconazole	3	[105]

Dari Tabel 3 tersebut diperoleh kesamaan terkait nutrisi, *trend* fermenter serta kisaran *yield* yang dihasilkan. Nutrisi yang diperlukan untuk kultivasi antara lain glukosa, yeast ekstrak, pepton dan NaCl. Dalam *patent* (WO/2012/159979) dijelaskan bahwa untuk menemukan proses produksi *squalene* dari spesies mikroalga *thraustochytriales* diperlukan media yang kaya akan vitamin B₁₂, B₁, dan/atau B₆ pada suhu operasi 30 °C [111]. Dengan media dan kondisi tersebut diperoleh *squalene* antara 20 hingga 120 mg / g DCW [112].

Mengacu pada Tabel 3, produktivitas *strain Schizochytrium limacinum* SR21 dan *Schizochytrium mangrovei* PQ6 tercatat memproduksi *squalene* sebesar 0,32 g/ liter dan 0,27 g/ liter per harinya. Parameter yang sensitif terhadap produktivitas adalah konsentrasi sumber karbon yang bersumber dari glukosa dan sumber nitrogen yang berasal dari yeast ekstrak dan peptone. Sumber karbon penting untuk pertumbuhan sel dan produksi lipid, sementara sumber nitrogen berperan dalam pertumbuhan sel dan produksi *squalene*. Sumber karbon optimum berdasar Tabel 3 adalah 50 g/ liter glukosa, sementara sumber nitrogen optimum adalah 5 g/ liter ekstrak ragi dan 30 g/ liter pepton, untuk kondisi operasi suhu ruangan dan pengadukan 5 rpm dengan menggunakan *strain Aurantiochytrium sp.* 18W-13a. Kondisi salinitas dijaga pada rentang 20-50% media air laut [99]. Selain mengoptimalkan *supply* nutrisi dan kondisi operasi, *squalene* dari mikroorganisme dapat

ditingkatkan produktivitasnya melalui 3 cara yaitu dengan cara penggunaan fermentasi dengan kondisi tambahan yang dioptimalkan [99-101], manipulasi genetik atau pengenalan gen penghasil *squalene* dalam jalur biosintesis *squalene* asli [113-115], dan penambahan inhibitor, contohnya seperti *terbinafine* yang dapat memblokir jalur kompetitif sehingga memungkinkan terjadinya akumulasi *squalene* [23].

Karena *thraustochytrids* dikenal sebelumnya sebagai produsen omega-3, maka pada penelitian terbaru untuk mengintensifkan produksi *squalene* secara ekonomis diusulkan produksi terintegrasi dengan omega-3 [96]. Integrasi proses ini juga perlu memperhatikan strategi pemilihan media nutrisi fermentasi agar mengurangi biaya produksi, salah satunya dengan pencarian umpan sumber karbon berasal dari limbah biomassa [102], [37], [97].

4.2. Pemurnian (Purifikasi)

Tantangan berikutnya produksi *squalene* adalah modal ekstraksi dan purifikasi *squalene* yang dihasilkan. Pada skala lab, biasa digunakan *chloroform* dan *methanol* seperti pada [101] dan *hexane* seperti pada [40]. Akan tetapi, pada skala industri perlu diperhatikan aspek keamanan (*safety*) dari pelarut yang mungkin tertinggal, kompleksitas alat, biaya investasi alat, ramah lingkungan dan keselamatan proses (*environmental and process safety*). Pilihan yang ada untuk ekstraksi *squalene* antara lain ekstraksi pelarut, kristalisasi, kromatografi, distilasi dan ekstraksi fluida superkritis. Pilihan dengan ekstraksi menggunakan pelarut adalah pilihan umum yang digunakan. Selain dari sisi biaya relatif terjangkau juga operasi alat tidak terlalu kompleks. Masalah utama dari penggunaan pelarut adalah aspek lingkungan dan kekhawatiran akan keamanan sisa pelarut apabila digunakan sebagai bahan yang dikonsumsi manusia.

Berbeda dengan penggunaan ekstraksi fluida superkritis, seperti superkritis karbondioksida, meskipun aman secara bahan karena produk akhir tidak terkontaminasi bahan berbahaya, tetapi kendala kompleksitas dan biaya investasi menjadi kendala pemilihan fluida superkritis untuk ekstraksi *squalene*. Karenanya, penelitian terbaru mengembangkan alternatif ekstraksi ramah lingkungan antara lain adalah menggunakan ekstraksi *solvent* berdaya gesek tinggi (*high shear-assisted solvent*) [133], ekstraksi non-destruktif [134], ekstraksi dengan bantuan *ultrasound* [135] dan metode *freeze and thawing drying* [136] serta kombinasi antara *ultrasound* dan *freeze and thawing drying*. Pada akhirnya, upaya aplikasi skala industri harus berfokus pada minimalisasi kehilangan produk serta penurunan biaya investasi alat dan energi yang diperlukan untuk ekstraksi dan pemurnian.

5. Peluang Massa Depan

Trend squalene dapat diprediksi akan mengalami peningkatan, karena banyaknya peminat nutrasetikal saat ini dan di era normalitas baru. Selain itu, *trend* positif permintaan *squalene* juga digunakan pada bidang farmasi, industri kosmetik, dan suplemen makanan [24], [70]. Hingga kini, industri kosmetik menyerap 64,2% total pendapatan di pasar *squalene* pada tahun 2015 dan terus meningkat dengan semakin meningkatnya kepedulian terhadap suplemen dan krim anti-penuaan dan peremajaan, serta digunakan juga pada detoksifikasi, pelembab, sifat antibakteri dan lain-lain [121], [138].

Karenanya, patut dipertimbangkan tahapan ini bilamana kebijakan pengembangan teknologi produksi *squalene* ini menjadi pilihan strategis untuk produk farmasi dan pangan fungsional di Indonesia. Tahapan pengembangan tahun pertama adalah periode untuk pemilihan *strain* terbaik dan menguatkan fondasi strategi bioproses yang akan diaplikasikan pada tahap selanjutnya. Langkah awal tentang pengujian metode yang tepat untuk isolasi mikroalga *thraustochytrids* telah dimulai sebelumnya oleh tim program studi Teknik Kimia Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta di Kulonprogo [140].

Setelah itu, pada tahun kedua, budidaya dengan teknologi fermentasi di dalam bioreaktor dilakukan. Pada awal tahun ketiga diharapkan sudah diperoleh fondasi teknologi hilir terkait ekstraksi dan optimasi produk akhir, sehingga sepanjang tahun ketiga akan dilakukan *scale-up pilot project* yang lebih besar untuk mendapatkan data rancangan pabrik skala komersial. Dengan *trend* yang ada, karena mayoritas *thraustochytrids* diproyeksikan untuk bahan baku omega-3, maka produksi *squalene* mengarah pada integrasi proses produksi omega-3 dan *squalene*. Alternatif

lainnya, *thraustochytrids* menghasilkan lipid yang relatif tinggi dibanding mikroalga lainnya, maka produksi *squalene* akan diintegrasikan di masa yang akan datang dengan produksi *biodiesel*.

6. Kesimpulan

Tulisan ini bertujuan mengkaji potensi produksi *squalene* untuk nutrasetikal dengan bahan baku dari mikroalga *thraustochytrids* yang diperoleh dari wilayah hutan bakau Indonesia. *Squalene* yang diperoleh dari mikroalga *thraustochytrids* ini diharapkan dapat menggantikan proses berbahan baku hati ikan hiu laut dalam sehingga dapat menghasilkan proses yang ramah lingkungan dan ekonomis.

Di Indonesia penelitian tentang *squalene* dari mikroalga *thraustochytrids* masih belum mendapatkan publisitas yang intensif pada level nasional maupun internasional. Mengingat pentingnya fungsi *squalene* ini diharapkan di masa yang akan datang kajian nutrasetikal dan nutrisi fungsional berbahan baku *squalene* dari mikroalga *thraustochytrids* akan semakin menarik dilakukan [112].

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia, yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] D. Pradhan, P. Biswasroy, G. Ghosh, and G. Rath, "REVIEW ARTICLE A Review of Current Interventions for COVID-19 Prevention," *Arch. Med. Res.*, vol. 1, 2020.
- [2] R. Djalante *et al.*, "Progress in Disaster Science Review and analysis of current responses to COVID-19 in Indonesia : Period of January to March 2020 ☆," vol. 6, 2020.
- [3] Y. Liu, R. Kuo, and S. Shih, "ScienceDirect COVID-19 : The first documented coronavirus pandemic in history," *Biomed. J.*, no. xxxx, pp. 1–6, 2020.
- [4] F. Hemmati, S. Saedi, M. Hemmati-dinarvand, and M. Zarei, "Mysterious Virus: A Review on Behavior and Treatment Approaches of the Novel Coronavirus , 2019-nCoV," *Arch. Med. Res.*, 2020.
- [5] S. Hamid, M. Y. Mir, and G. K. Rohela, "Novel coronavirus disease (COVID-19): a pandemic (epidemiology , pathogenesis and potential therapeutics)," *New Microbes New Infect.*, vol. 35, p. 100679, 2020.
- [6] M. Zhao, M. Wang, J. Zhang, J. Ye, and Y. Xu, "Biomedicine & Pharmacotherapy Advances in the relationship between coronavirus infection and cardiovascular diseases," vol. 127, no. March, 2020.
- [7] P. Cao, S. Wu, T. Wu, Y. Deng, Q. Zhang, and K. Wang, "The important role of polysaccharides from a traditional Chinese medicine- Lung Cleansing and Detoxifying Decoction against the COVID-19 pandemic," *Carbohydr. Polym.*, vol. 240, no. April, p. 116346, 2020.
- [8] J. Weng, "Plant Solutions for the COVID-19 Pandemic and Beyond: Historical Reflections and Future Perspectives," *Mol. Plant*, 2020.
- [9] T. Capell, R. M. Twyman, V. Armario-najera, J. K. Ma, S. Schillberg, and P. Christou, "Potential Applications of Plant Biotechnology against SARS-CoV-2," *Trends Plant Sci.*, pp. 1–9, 2020.
- [10] J. S. Mani *et al.*, "Natural product-derived phytochemicals as potential agents against coronaviruses : A review," *Virus Res.*, vol. 284, no. April, p. 197989, 2020.
- [11] Y. Impact, "The Fight to Replace Shark-Based Vaccine Ingredients With Sustainable , Plant-Based Sources," pp. 1–6, 2020.
- [12] H. Nazih and J. Bard, *Microalgae in Human Health : Interest as a Functional Food*. Elsevier Inc., 2018.
- [13] H. N. Bhilwade *et al.*, "The Adjuvant Effect of Squalene , an Active Ingredient of Functional Foods , on Doxorubicin- Treated Allograft Mice The Adjuvant Effect of Squalene , an Active Ingredient of Functional Foods ," *Nutr. Cancer*, vol. 0, no. 0, pp. 1–12, 2019.
- [14] T. Casagrande *et al.*, "Microalgae biomass intake positively modulates serum lipid profile and antioxidant status," *J. Funct. Foods*, vol. 58, no. April, pp. 11–20, 2019.

- [15] A. Maria *et al.*, “Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in omega-3,” *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 0, no. 0, p. 000, 2016.
- [16] K. L. Low, A. Idris, and N. M. Yusof, “Novel protocol optimized for microalgae lutein used as food additives,” *Food Chem.*, p. 125631, 2019.
- [17] H. N. Bhilwade, N. Tatewaki, H. Nishida, and T. Konishi, “Squalene as Novel Food Factor,” pp. 875–880, 2010.
- [18] H. M. Dionisi, M. Lozada, and N. L. Olivera, “Bioprospection of marine microorganisms : biotechnological applications and methods,” pp. 49–60, 2012.
- [19] S. Bellou, I. E. Triantaphyllidou, D. Aggeli, A. M. Elazzazy, M. N. Baeshen, and G. Aggelis, “Microbial oils as food additives: Recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 37, pp. 24–35, 2016.
- [20] A. Hauvermale, J. Kuner, B. Rosenzweig, D. Guerra, S. Diltz, and J. G. Metz, “Fatty Acid Production in *Schizochytrium* sp .: Involvement of a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase and a Type I Fatty Acid Synthase,” vol. 41, no. 8, pp. 739–747, 2006.
- [21] M. Venegas-calderón, O. Sayanova, and J. A. Napier, “Progress in Lipid Research An alternative to fish oils : Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 49, no. 2, pp. 108–119, 2010.
- [22] E. M. Van Schothorst *et al.*, “Induction of lipid oxidation by polyunsaturated fatty acids of marine origin in small intestine of mice fed a high-fat diet,” vol. 11, pp. 1–11, 2009.
- [23] N. Gohil, G. Bhattacharjee, K. Khambhati, D. Braddick, and V. Singh, “Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: Advances, challenges and opportunities,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. MAR, pp. 1–24, 2019.
- [24] O. Popa, N. Elena, I. Popa, S. Nit, and C. E. Dinu-pârvu, “Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources,” vol. 2015, 2015.
- [25] F. E. Güneş, “Medical Use of Squalene as a Natural Antioxidant,” no. January, 2014.
- [26] M. Tsujimoto, “A highly unsaturated hydrocarbon in shark liver oil,” *Ind. Eng. Chem.*, vol. 8, no. 10, pp. 889–896, 1916.
- [27] J. F. Remme and W. E. Larsen, “Bioactive lipids in deep-sea sharks,” no. July, 2005.
- [28] B. M. Cotterill, “COVID-19 vaccine might require compounds from shark liver,” pp. 1–7, 2020.
- [29] L. News, “Could Mass-Producing a COVID-19 Vaccine Kill Half a Million Sharks?,” 2020.
- [30] P. K. Updates, “Stop Using Sharks in COVID-19 Vaccine - Use EXISTING Sustainable Options,” pp. 1–6, 2020.
- [31] B. Y. J. Meneguzzi, “Why a COVID-19 vaccine could further imperil deep- sea sharks,” pp. 12–15, 2020.
- [32] M. P. In, “On the hunt for alternatives to shark squalene for vaccines,” pp. 1–7, 2020.
- [33] W. Xu, X. Ma, and Y. Wang, “Production of squalene by microbes: an update,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, no. 12, 2016.
- [34] M. R. Miller, P. D. Nichols, and C. G. Carter, “Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp . L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets,” vol. 148, pp. 382–392, 2007.
- [35] M. Otagiri, A. Khalid, S. Moriya, and H. Osada, “Novel squalene-producing thraustochytrids found in mangrove water,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 8451, no. August, pp. 1–4, 2017.
- [36] I. M. Aasen *et al.*, “Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene , and carotenoids,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, no. 1, pp. 4309–4321, 2016.
- [37] K. KAYA, A. NAKAZAWA, H. MATSUURA, D. HONDA, I. INOUE, and M. M. WATANABE, “ Thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a Accumulates High Amounts of Squalene ,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 75, no. 11, pp. 2246–2248, 2011.

- [38] A. Saengwong, W. Yongmanitchai, and D. Chonudomkul, "Screening and Optimization of Squalene Production from Microalgae *Aurantiochytrium* sp .," vol. 45, no. 2, pp. 680–691, 2018.
- [39] W. K. Hong *et al.*, "Characterization of a squalene synthase from the Thraustochytrid microalga *Aurantiochytrium* sp. KRS101," *J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 23, no. 6, pp. 759–765, 2013.
- [40] A. Zhang, Y. Xie, Y. He, W. Wang, B. Sen, and G. Wang, "Bio-based squalene production by *Aurantiochytrium* sp. through optimization of culture conditions, and elucidation of the putative biosynthetic pathway genes," *Bioresour. Technol.*, vol. 287, no. May, p. 121415, 2019.
- [41] C. Darwin, S. Raghukumar, and O. M. Ecosystems, "Origin and Evolution of Marine Fungi," pp. 293–307, 2017.
- [42] S. Raghukumar, B. O. Division, and D. Paula, "Marine Biology," vol. 169, pp. 165–169, 1992.
- [43] S. Raghukumar, V. Sathe-pathak, and S. Sharma, "Thraustochytrid and fungal component of marine detritus . 111 . Field studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata*," vol. 9, no. Moss 1986, pp. 117–125, 1995.
- [44] M. Spanova and G. Daum, "Squalene - biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, no. 11, pp. 1299–1320, 2011.
- [45] A. Rani, R. Meghana, and A. Kush, "Squalene production in the cell suspension cultures of Indian sandalwood (*Santalum album* L.) in shake flasks and air lift bioreactor," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, vol. 135, no. 1, pp. 155–167, 2018.
- [46] National Center for National Center for Biotechnology Information Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 638072, Squalene," 2020. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Squalene>. [Accessed: 15-Nov-2020].
- [47] N. I. Ibrahim, S. Fairus, M. S. Zulfarina, and I. N. Mohamed, "The Efficacy of Squalene in Cardiovascular Disease Risk - A Systematic Review," 2020.
- [48] World Health Organization, "Safety of squalene," 2020. [Online]. Available: https://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/adjuvants/squalene/Jun_2006/en/. [Accessed: 10-Oct-2020].
- [49] A. Di Pasquale, S. Preiss, and A. Fleming, "Vaccine Adjuvants : from 1920 to 2015 and Beyond," pp. 320–343, 2015.
- [50] C. B. Fox, "Squalene Emulsions for Parenteral Vaccine and Drug Delivery," no. Figure 1, pp. 3286–3312, 2009.
- [51] N. Nicolaides, "Skin lipids: Their biochemical uniqueness," *Science (80-)*, vol. 186, no. 4158, pp. 19–26, 1974.
- [52] T. Nikkari, P. H. Schreiberman, and E. H. Ahrens, "In vivo studies of sterol and squalene secretion by human skin," *J. Lipid Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 563–573, 1974.
- [53] A. L. Ronco and E. de Stéfani, "Squalene: A multi-task link in the crossroads of cancer and aging," *Funct. Foods Heal. Dis.*, vol. 3, no. 12, pp. 462–476, 2013.
- [54] T. Rosales-Garcia, C. Jimenez-Martinez, and G. Davila-Ortiz, "Squalene Extraction: Biological Sources and Extraction Methods," *Int. J. Environ. Agric. Biotechnol.*, vol. 2, no. 4, pp. 1662–1670, 2017.
- [55] F. Mantzouridou and M. Z. Tsimidou, "Observations on squalene accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* due to the manipulation of HMG2 and ERG6," *FEMS Yeast Res.*, vol. 10, no. 6, pp. 699–707, 2010.
- [56] P. Bhattacharjee, V. B. Shukla, R. S. Singhal, and P. R. Kulkarni, "Studies on fermentative production of squalene," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 17, no. 8, pp. 811–816, 2001.
- [57] Y. Jiang, K. W. Fan, R. T. Y. Wong, and F. Chen, "Fatty Acid Composition and Squalene Content of the Marine Microalga *Schizochytrium mangrovei*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 5, pp. 1196–1200, 2004.

- [58] A. Nakazawa *et al.*, "TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production," *J. Appl. Phycol.*, vol. 26, no. 1, pp. 29–41, 2014.
- [59] S. . A. L. L. (F.) Bernard Pora , Wuhan (CN) ; Yun Qian , Wuhan (CN) ; Bernard Caulier , Fretin (FR) ; Serge Comini , La Gorgue (FR) ; Philippe Looten , Lomme (FR) ; Laurent Segueilha, "Method For The Preparation and Extraction of Squalene From Microalgae," vol. 2, 2014.
- [60] G. O. Claude Andinq, Roger D. Brandt, "Sterol Biosynthesis in *Euglena gracilis* Z. Sterol Precursors in Light-Grown and Dark-Grown *Euglena gtaeilis* Z.," *Eur. J. Biochem*, vol. 24, pp. 259–263, 1971.
- [61] E. Naziri, F. Mantzouridou, and M. Z. Tsimidou, "Enhanced squalene production by wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strains using safe chemical means," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 18, pp. 9980–9989, 2011.
- [62] I. Goldberg and I. Shechter, "Occurrence of squalene in methanol-grown bacteria," *J. Bacteriol.*, vol. 135, no. 2, pp. 717–720, 1978.
- [63] E. Drozdíková, M. Garaiová, Z. Csáky, M. Obernauerová, and I. Hapala, "Production of squalene by lactose-fermenting yeast *Kluyveromyces lactis* with reduced squalene epoxidase activity," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 61, no. 1, pp. 77–84, 2015.
- [64] C. K. Lyon and R. Becker, "Extraction and refining of oil from amaranth seed," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 64, no. 2, pp. 233–236, 1987.
- [65] S. Czaplicki, D. Ogrodowska, D. Derewiaka, M. Tańska, and R. Zadernowski, "Bioactive compounds in unsaponifiable fraction of oils from unconventional sources," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 113, no. 12, pp. 1456–1464, 2011.
- [66] T. Gutfinger and A. Letan, "Studies of unsaponifiables in several vegetable oils," *Lipids*, vol. 9, no. 9, pp. 658–663, 1974.
- [67] N. Frega, F. Bocci, and G. Lercker, "Direct gas chromatographic analysis of the unsaponifiable fraction of different oils with a polar capillary column," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 69, no. 5, pp. 447–450, 1992.
- [68] N. Nenadis and M. Tsimidou, "Determination of squalene in olive oil using fractional crystallization for sample preparation," *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 79, no. 3, pp. 257–259, 2002.
- [69] G. Beltrán, M. E. Bucheli, M. P. Aguilera, A. Belaj, and A. Jimenez, "Squalene in virgin olive oil: Screening of variability in olive cultivars," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 118, no. 8, pp. 1250–1253, 2016.
- [70] M. A. Lozano-Grande, S. Gorinstein, E. Espitia-Rangel, G. Dávila-Ortiz, and A. L. Martínez-Ayala, "Plant Sources, Extraction Methods, and Uses of Squalene," *Int. J. Agron.*, vol. 2018, 2018.
- [71] K. Paramasivan and S. Mutturi, "Regeneration of NADPH Coupled with HMG-CoA Reductase Activity Increases Squalene Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 37, pp. 8162–8170, 2017.
- [72] "Genetic and bioprocess engineering to improve squalene production in Yarro-.pdf." .
- [73] D. Joy, K. Yoneda, and I. Suzuki, "Genetic modification of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. 18W-13a for cellobiose utilization by secretory expression of β -glucosidase from *Aspergillus aculeatus*," *Algal Res.*, vol. 40, no. December 2018, p. 101503, 2019.
- [74] B. Pattanaik, E. Englund, N. Nolte, and P. Lindberg, "Introduction of a green algal squalene synthase enhances squalene accumulation in a strain of *Synechocystis* sp. PCC 6803," *Metab. Eng. Commun.*, vol. 10, no. February, p. e00125, 2020.
- [75] Y. Y. Huang *et al.*, "Enhanced squalene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica* based on metabolically engineered acetyl-CoA metabolism," *J. Biotechnol.*, vol. 281, no. February, pp. 106–114, 2018.
- [76] H. Sowani, A. Deshpande, V. Gupta, M. Kulkarni, and S. Zinjarde, "Biodegradation of squalene and n-hexadecane by *Gordonia amicalis* HS-11 with concomitant formation of biosurfactant and carotenoids," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 142, no. May, pp. 172–181, 2019.

- [77] Y. Kohno, Y. Egawa, S. Itoh, S. ichi Nagaoka, M. Takahashi, and K. Mukai, "Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol," *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.*, vol. 1256, no. 1, pp. 52–56, 1995.
- [78] Fatma Esra Gunes, "Medical use of squalene as a natural antioxidant," *J. Marmara Univ. Inst. Heal. Sci.*, no. January, p. 1, 2013.
- [79] R. Amarowicz, "Squalene: A natural antioxidant?," *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 111, no. 5, pp. 411–412, 2009.
- [80] S. K. Kim and F. Karadeniz, *Biological Importance and Applications of Squalene and Squalane*, 1st ed., vol. 65. Elsevier Inc., 2012.
- [81] Z. R. Huang, Y. K. Lin, and J. Y. Fang, "Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology," *Molecules*, vol. 14, no. 1, pp. 540–554, 2009.
- [82] A. Aioi, T. Shimizu, and K. Kuriyama, "Effect of squalene on superoxide anion generation induced by a skin irritant, lauroylsarcosine," *Int. J. Pharm.*, vol. 113, no. 2, pp. 159–164, 1995.
- [83] A. Budiyo et al., "Protective effect of topically applied olive oil against photocarcinogenesis following UVB exposure of mice," *Carcinogenesis*, vol. 21, no. 11, pp. 2085–2090, 2000.
- [84] T. J. Smith, "Squalene: Potential chemopreventive agent," *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 9, no. 8, pp. 1841–1848, 2000.
- [85] Z. Kopicová and S. Vavreinová, "Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish," *Czech J. Food Sci.*, vol. 25, no. 4, pp. 195–201, 2007.
- [86] G. Del Giudice et al., "Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene," *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1010–1013, 2006.
- [87] A. Di Pasquale, S. Preiss, F. T. Da Silva, and N. Garçon, "Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond," *Vaccines*, vol. 3, no. 2, pp. 320–343, 2015.
- [88] S. Ivanova, V. Tonchev, N. Yokoi, M. C. Yappert, D. Borchman, and G. A. Georgiev, "Surface properties of squalene/meibum films and NMR confirmation of squalene in tears," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 9, pp. 21813–21831, 2015.
- [89] T. J. Smith, "Expert Opinion on Investigational Drugs Squalene : potential chemopreventive agent," pp. 1841–1848, 2000.
- [90] G. Lippi, G. Targher, and M. Franchini, "European Journal of Internal Medicine Vaccination , squalene and anti-squalene antibodies : Facts or fiction?," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 21, no. 2, pp. 70–73, 2010.
- [91] L. Fossier Marchan, K. J. Lee Chang, P. D. Nichols, W. J. Mitchell, J. L. Polglase, and T. Gutierrez, "Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 1, pp. 26–46, 2018.
- [92] S. Raghukumar, "Ecology of the marine protists, the labyrinthulomycetes (thraustochytrids and labyrinthulids)," *Eur. J. Protistol.*, vol. 38, no. 2, pp. 127–145, 2002.
- [93] P. Singh, Y. Liu, L. Li, and G. Wang, "Ecological dynamics and biotechnological implications of thraustochytrids from marine habitats," pp. 5789–5805, 2014.
- [94] B. B. Ellenbogen, S. Aaronson, S. Goldstein, and M. Belsky, "Polyunsaturated fatty acids of aquatic fungi: Possible phylogenetic significance," *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 29, no. 2, pp. 805–811, 1969.
- [95] C. Morabito et al., "The lipid metabolism in thraustochytrids," *Prog. Lipid Res.*, vol. 76, no. September, p. 101007, 2019.
- [96] A. Patel, U. Rova, P. Christakopoulos, and L. Matsakas, "Simultaneous production of DHA and squalene from *Aurantiochytrium sp.* grown on forest biomass hydrolysates," *Biotechnol. Biofuels*, vol. 12, no. 1, pp. 1–12, 2019.

- [97] M. H. Hoang *et al.*, "Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 118, no. 6, pp. 632–639, 2014.
- [98] C. J. Yue and Y. Jiang, "Impact of methyl jasmonate on squalene biosynthesis in microalga *Schizochytrium mangrovei*," *Process Biochem.*, vol. 44, no. 8, pp. 923–927, 2009.
- [99] G. Chen *et al.*, "Optimization of nitrogen source for enhanced production of squalene from thraustochytrid *Aurantiochytrium sp.*," *N. Biotechnol.*, vol. 27, no. 4, pp. 382–389, 2010.
- [100] K. W. Fan, T. Aki, F. Chen, and Y. Jiang, "Enhanced production of squalene in the thraustochytrid *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1303–1309, 2010.
- [101] A. Nakazawa *et al.*, "Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium sp.* strain 18W-13a for squalene production," *Bioresour. Technol.*, vol. 109, pp. 287–291, 2012.
- [102] A. Patel, S. Liefeldt, U. Rova, P. Christakopoulos, and L. Matsakas, "Co-production of DHA and squalene by thraustochytrid from forest biomass," *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2020.
- [103] A. Patel, U. Rova, P. Christakopoulos, and L. Matsakas, "Mining of squalene as a value-added byproduct from DHA producing marine thraustochytrid cultivated on food waste hydrolysate," *Sci. Total Environ.*, vol. 736, p. 139691, 2020.
- [104] X. M. Sun, L. J. Ren, X. J. Ji, S. L. Chen, D. S. Guo, and H. Huang, "Adaptive evolution of *Schizochytrium sp.* by continuous high oxygen stimulations to enhance docosahexaenoic acid synthesis," *Bioresour. Technol.*, vol. 211, pp. 374–381, 2016.
- [105] J. Li *et al.*, "The role of fluconazole in the regulation of fatty acid and unsaponifiable matter biosynthesis in *Schizochytrium sp.* MYA 1381," *BMC Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–13, 2019.
- [106] K. Tong, H. Kong, P. Road, and H. Kong, "Fatty Acid Composition and Squalene Content of the Marine Microalga *Schizochytrium mangrovei*," pp. 1196–1200, 2004.
- [107] K. Barang, "Squalene Omega 369 Minyak ikan Omega 369 jaga kesehatan Jantung 100 softgel Informasi Pelapak," pp. 1–4, 2020.
- [108] S. Omega, "SQUALENE Omega salmon," pp. 1–5, 2020.
- [109] A. Nakazawa, Y. Kokubun, H. Matsuura, N. Yonezawa, and R. Kose, "TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production," pp. 29–41, 2014.
- [110] K. Kaya, A. Nakazawa, H. Matsuura, D. Honda, I. Inouye, and M. M. Watanabe, "Thraustochytrid *Aurantiochytrium sp.* 18W-13a Accumulates High Amounts of Squalene of Squalene," vol. 8451, no. April, pp. 11–14, 2017.
- [111] S. Andre and L. Lille, "(12) Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2014 / 0088201 A1," vol. 1, no. 19, 2014.
- [112] W. (CN); Y. Q. Bernard Pora, F. Wuhan (CN); Bernard Caulier, L. G. (FR): (FR); Serge Comini, L. (FR); L. Philippe Looten, and S. A. L. L. (FR) Segueilha, "Method For The Preparation And Extraction Of Squalene From Microalgae," vol. 1, no. 19, 2014.
- [113] A. W. Bunch and R. E. Harris, "The manipulation of micro-organisms for the production of secondary metabolites," *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 4, no. 1, pp. 117–144, 1986.
- [114] V. Singh, D. Braddick, and P. K. Dhar, "Exploring the potential of genome editing CRISPR-Cas9 technology," *Gene*, vol. 599, pp. 1–18, 2017.
- [115] V. Singh, N. Gohil, R. Ramírez García, D. Braddick, and C. K. Fofié, "Recent Advances in CRISPR-Cas9 Genome Editing Technology for Biological and Biomedical Investigations," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 1, pp. 81–94, 2018.
- [116] M. H. Hoang *et al.*, "Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei* PQ6 during biodiesel producing process," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. xx, no. xx, 2014.

- [117] A. Krs, "High shear-assisted solvent extraction of lipid from wet biomass of," vol. 227, no. May, 2019.
- [118] B. A. Jackson, P. A. Bahri, and N. R. Moheimani, "Non-destructive extraction of lipids from *Botryococcus braunii* and its potential to reduce pond area and nutrient costs," vol. 47, no. January, 2020.
- [119] C. Tzia, "LWT - Food Science and Technology Evaluation of ultrasound assisted and conventional methods for production of olive pomace oil enriched in sterols and squalene," vol. 99, no. June 2018, pp. 209–216, 2019.
- [120] T. H. A., M. Rochak, and R. K. S. M. . Chandrasekhar Jampani, "Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis* .pdf," vol. 31, pp. 239–251, 2018.
- [121] "Squalene Market Size and Share _ Global Industry Report, 2016-2024." .
- [122] G. V. Research, "Squalene Market Size, Share & Trends Analysis Report By Raw Material (Vegetable, Synthetic, Animal), By Application (Cosmetics, Pharmaceuticals), By Region, And Segment Forecasts, 2016 - 2024," 2016. .
- [123] Suhendra, "Isolation of Marine Microalgae," 2020. [Online]. Available: <https://www.youtube.com/watch?v=91cvOZ1A4I8>. [Accessed: 15-Oct-2020].