

TABEL 1. Penelitian terkait mikroorganisme penghasil *squalene* yang pernah dilakukan.

No	Sumber	Yield <i>Squalene</i> (mg/g <i>DCW</i>)	Referensi
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,04–1,6	Mantzouridou dan Tsimidou (2010)
2	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	0,24	Bhattacharjee dkk. (2001)
3	<i>Aurantiochytrium sp. Yonez 5–1</i>	317,74	Nakazawa dkk. (2014)
4	<i>Pseudozyma sp. JCC 207</i>	70,32	Chang dkk. (2008)
5	<i>Rubritalea squalenifaciens sp. nov.</i>	15	Kasai dkk. (2007)

ga *Aurantiochytrium* akan semakin dibutuhkan di banyak industri nutrisi kesehatan dan kosmetik. Mengingat relevansinya untuk masa depan industri strategis terkait di Indonesia, seyogyanya perlu riset mendalam yang lebih banyak dari isolat mikroalga *Aurantiochytrium* dari hutan bakau Indonesia.

KATA KUNCI *Aurantiochytrium*; *adjuvant* vaksin; covid-19; mikroalga; *squalene*

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Potensi mikroalga *Aurantiochytrium* telah lama dikaji sebagai sumber alternatif produksi lipid, *carotenoid* dan *terpenoid* untuk pangan, kosmetik dan obat-obatan (Bellou dkk. 2016; Fossier Marchan dkk. 2018; Hong dkk. 2011). Produk turunan dari hasil fermentasi menggunakan bahan baku mikroalga *Aurantiochytrium* telah dikaji aspek keamanannya untuk digunakan oleh makhluk hidup (Dillon dkk. 2020). Produksi *docosahexanoic acid* (DHA) skala industri oleh DSM dan Evonik semakin memantapkan peran penting mikroalga ini (Evonik 2018; Veramis 2017). Awalnya, produk berbahan baku mikroalga *Aurantiochytrium* diproduksi skala industri untuk pakan ikan sebagai pengganti pakan kaya omega-3 konvensional dari ikan tangkapan. Kemudian, produk kosmetik dan nutrisi dengan bahan baku mikroalga *Aurantiochytrium* juga telah banyak beredar di supermarket di Eropa (Byrne 2019). Terkini, mikroalga *Aurantiochytrium* memiliki peran penting untuk produksi *squalene* sebagai bahan *adjuvant* vaksin covid-19 yang umumnya diproduksi dari ikan hiu laut dalam (Evonik 2021).

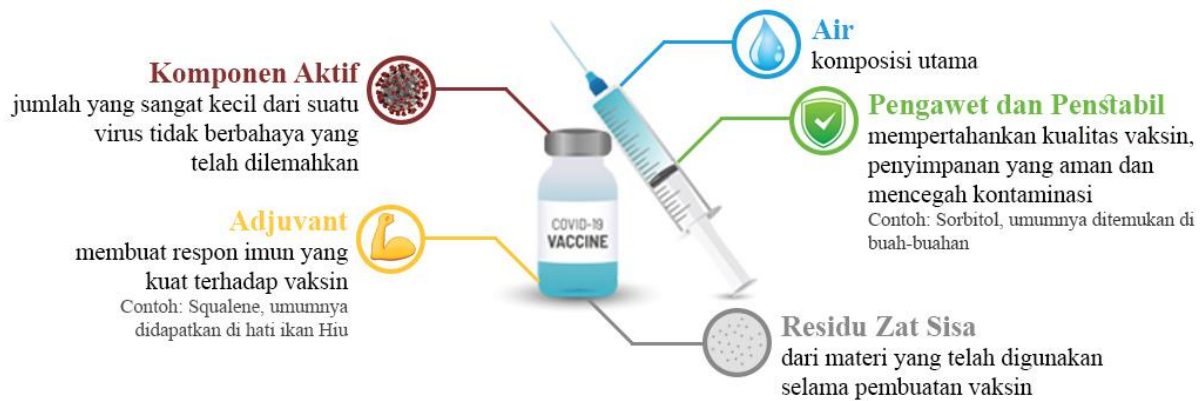
Tiga produk utama yang dapat dihasilkan oleh mikroalga *Aurantiochytrium* adalah *docosahexanoic acid* (DHA), *squalene* dan *astaxanthin* (Aasen dkk. 2016; Du dkk. 2021). Karena fungsi dan urgensinya, perkiraan serapan pasar dunia hingga 2019 untuk ketiga produk ini menunjukkan daya tarik ekonomi, masing-masing dengan nilai USD 4,3 milyar (omega-3), USD 177 juta (*squalene*) and USD 1,8 milyar (*astaxanthin*) (Aasen dkk. 2016). Ditinjau dari model bisnis, *value proposition* produk dari bahan baku mikroalga *Aurantiochytrium* sangat menarik untuk proyeksi bisnis masa depan dengan isu *non-fish products*, *environmental friendly*, *no-heavy metal* dan *high purity product*. Hal itu dikarenakan kemampuan produksi *squalene* dari mikroalga *Aurantiochytrium* yang relatif tinggi di banding sumber lainnya, seperti yang tertera pada Tabel 1. Sehingga pengembangan teknologi bioproses berbahan baku mikroalga *Aurantiochytrium* akan berpotensi menjadi teknologi yang dapat menggantikan teknologi konvensional yang ada, misalnya teknologi produksi omega-3 dari salmon dan *squalene* dari ikan hiu laut dalam.

Mikroalga *Aurantiochytrium* adalah mikroalga uniselu-

ler heterotropik yang laju pertumbuhan selnya tergantung faktor nutrisi yang diumpankan. Langkah pertama eksplorasi mikroalga *Aurantiochytrium* adalah isolasi pada habitat hutan bakau (Suhendra dkk. 2019). Meskipun Indonesia dikenal sebagai negara dengan hutan bakau terluas, sayangnya kajian tentang mikroalga *Aurantiochytrium* di Indonesia masih jarang. Referensi jurnal internasional menggunakan *Aurantiochytrium* strain lokal Indonesia belum ada selama ini. Mengacu peta keragaman hayati global, dari 6,534 strain yang ditemukan dalam publikasi, tidak ada satupun strain lokal dari Indonesia. Saat ini, kajian tentang mikroalga *Aurantiochytrium* di Indonesia masih sebatas kajian potensi di bidang pangan dan farmasi (Suhendra 2022; Suhendra dkk. 2021). Karenanya, publikasi ini disusun agar memberikan kontribusi akademis bagi pengembangan potensi mikroalga *Aurantiochytrium* yang berasal dari hutan bakau di Indonesia. Publikasi ini juga bertujuan melanjutkan kajian yang telah dipublikasikan sebelumnya (Suhendra dkk. 2019, 2021; Suhendra 2022). Bagian kerja pendahuluan dari tim ini sebelumnya telah melakukan analisa genetika *Aurantiochytrium sp. LR52*, strain lokal Indonesia, dan telah didaftarkan pada bank data *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (Hutari dkk. 2018).

Tulisan ini mempresentasikan gambaran awal penelitian tentang mikroalga *Aurantiochytrium* mulai dari teknik isolasi mikroalga dari habitatnya, gambaran produksinya, teknik analisa kualitatif *squalene* hingga analisa potensi ekonomi dan fungsinya untuk bahan baku *adjuvant* vaksin. Teknik isolasi menjadi langkah awal yang penting untuk dipresentasikan karena belum adanya *culture collection* di Indonesia terkait mikroalga jenis ini. Sementara, habitat asal mikroalga ini ada di hutan bakau dimana Indonesia adalah negara dengan hutan bakau terluas di dunia. Kajian teknik "mengambil" strain mikroalga *Aurantiochytrium* dari habitat hutan bakau Indonesia juga belum pernah dipublikasikan resmi di publikasi nasional maupun internasional. Tanpa teknik isolasi yang tepat sesuai kondisi alam dan pendukung yang ada, maka tidak akan pernah didapatkan strain mikroalga asli Indonesia. Secara teknis, hutan bakau di Indonesia rata-rata jauh dari laboratorium yang bisa langsung mengambil sample mikroalga yang diinginkan. Lokasi sampling yang dikaji di publikasi ini adalah hutan bakau Raja Ampat, Papua Barat yang dikenal memiliki kekayaan keanekaragaman hayati laut.

Gambaran teknik produksi biomassa dari mikroalga *Aurantiochytrium* beserta analisa komponen aktifnya diharapkan menjadi kajian menarik pada tulisan ini karena topik ini juga belum pernah ditampilkan pada jurnal nasional. Oleh karena itu, diharapkan publikasi ini dapat memberikan kontribusi pada potensi masa depan mikroalga *Aurantiochytri-*



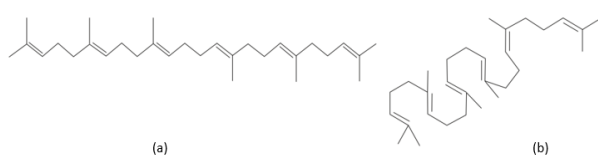
GAMBAR 1. Ilustrasi komponen vaksin.

um sebagai bahan baku bernilai tinggi di masa depan, seperti produksi untuk *adjuvant* vaksin dan produk lainnya.

1.2 Squalene sebagai *adjuvant* vaksin

Agar memahami teknologi hulu dan hilir dari vaksin, perlu adanya gambaran terkait komponen yang diperlukan dalam sebuah produk vaksin. Gambar 1 memberikan ilustrasi tentang komponen penting yang ada di dalam sebuah ampul (vial) vaksin. Seperti pada Gambar 1, komponen penting yang harus ada di dalam vaksin adalah komponen aktif yaitu jumlah yang sangat kecil suatu virus tidak berbahaya yang telah dilemahkan, air sebagai komposisi utama, pengawet dan penstabil untuk mempertahankan kualitas vaksin dan mencegah kontaminasi, serta *adjuvant* untuk menciptakan respon imun yang lebih kuat terhadap vaksin (Savoy 2020). Komponen-komponen tersebut harus ada di dalam suatu vaksin agar menghasilkan vaksin yang memiliki tingkat efikasi yang tinggi (Del Giudice dkk. 2006; Gorvett 2020).

Salah satu komponen penting yang ada di suatu vaksin adalah *adjuvant*. *Adjuvant* vaksin adalah komponen yang merangsang respon imun terhadap antigen dan memodulusinya menuju respon imun yang diinginkan (Shi dkk. 2019). Beberapa macam bahan baku yang dapat digunakan sebagai *adjuvant* vaksin adalah *aluminium-based material*, *squalene* dan *virosomes* (Xue dkk. 2019). Salah satu *adjuvant* yang dikenal saat ini adalah MF59 yang merupakan emulsi *squalene* yang sudah diujikan secara klinis sebagai vaksin influenza dan menunjukkan hasil efikasi yang baik, dimana setiap ampul vaksin mengandung sekitar 10 mg *squalene* (World Health Organization 2020). Beberapa vaksin COVID-19 juga menggunakan MF59 di dalam satu ampulnya dan menunjukkan konsistensi yang baik (Kalvodova 2010; Stelzner dkk.



GAMBAR 2. Struktur molekul *squalene* (a): linear (b): flat trigonal (diadopsi dari (National Center for National Center for Biotechnology Information Biotechnology Information 2020)).

2018). Kandidat vaksin lain yang juga menggunakan emulsi *squalene* adalah vaksin antraks (Spanggord dkk. 2006) dan flu burung (Lippi dkk. 2010; Pasquale dkk. 2015).

Squalene merupakan senyawa hidrokarbon triterpenik tak jenuh dengan rumus kimia $C_{30}H_{50}$, yang merupakan intermediet dari biosintesis *phytosterol* atau *cholesterol* yang terdapat pada tanaman, hewan dan manusia (Spanova dan Daum 2011). Gambar 2 menggambarkan struktur molekul *squalene*. Dinamai "*squalene*" pertama kali tahun 1916 oleh ahli kimia Jepang Mitsumaru Tsujimoto karena senyawa ini terdapat pada hati hiu laut dalam (*Squalus* spp) (Tsujimoto 1916). Sejak saat itu, minyak hati ikan hiu menjadi sumber *squalene* terbesar. Sumber lain *squalene* berasal dari tanaman seperti minyak zaitun (Beltrán dkk. 2016) dan mikroba seperti *Saccharomyces cerevisiae* (Thompson dkk. 2014), tetapi karena keterbatasan volume ketersediaannya umumnya digunakan untuk nutrisi herbal skala kecil dan menengah dan masih pada skala kesulitan untuk mencapai skala ekonomis industri (Spanova dan Daum 2011).

Sayangnya, kebutuhan tinggi dan mendesak untuk produksi *squalene* terkendala dengan pasokan bahan baku *squalene* yang terbatas. Umumnya, *squalene* berasal dari minyak hati ikan hiu yang berhabitat di laut dalam (Spanova dan Daum 2011). Kekhawatiran perburuan besar-besaran dan ancaman kepunahan hiu laut dalam muncul di berbagai media seiring dengan upaya menggenjot produksi vaksin COVID-19 besar-besaran karena mengorbankan sekitar setengah milyar ikan hiu (Change.org 2020; Emma Bowman 2020; Herald 2020; Melissa Cristina Marquez 2020; Herald 2020; Science The Wire 2020).

Karenanya, untuk memenuhi kebutuhan *squalene* yang bersifat *renewable* dan *sustainable*, mikroalga *Aurantiochytrium* menjadi salah satu sumber bahan baku alternatif untuk produksi *squalene* yang memiliki prospek menjanjikan. Kekhawatiran produsen vaksin Pfizer akan pasokan *squalene* memutuskan untuk menjalin kerjasama dengan Evonik yang memproduksi *emulsified oil* yang telah memproduksi lipid dari mikroalga pada skala industri (Evonik 2021).

Beberapa produk vaksin COVID-19 memerlukan *squalene* sebagai *adjuvant* yang saat ini ketersediaannya terbatas (Cotterill 2020; Melody M. Bomgardner 2020; Xu dkk. 2016). Umumnya, *adjuvant* vaksin flu, vaksin antraks, termasuk

TABEL 2. Kajian mikroalga *Aurantiochytrium* di beberapa negara yang telah dilakukan.

No	Spesies	Asal	Yield Squalene	Referensi
1	<i>Aurantiochytrium</i> sp. TWZ-97	China	188,6 g/L	(Zhang dkk. 2019)
2	<i>Aurantiochytrium</i> sp. Yonez 5-1	Jepang	317,74 mg/g _{DCW}	(Nakazawa dkk. 2014)
3	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W-13a	Jepang	198 mg/g _{DCW}	(Kaya dkk. 2011)
4	<i>Aurantiochytrium</i> sp. T66	USA	71,54 mg/g _{DCW}	(Patel dkk. 2020)
5	<i>Aurantiochytrium</i> sp. 18W-13a	Jepang	171 mg/g _{DCW}	(Nakazawa dkk. 2012)

vaksin COVID-19, mengandung *squalene* yang diproduksi dari hati ikan hiu laut dalam yang jumlahnya semakin terbatas. Sumber *squalene* terbesar lain dari tanaman yaitu dari tanaman zaitun (Beltrán dkk. 2016) dan mikroba, seperti *yeast* (Xu dkk. 2016). Sayangnya, kedua alternatif sumber *squalene* tersebut tidak memenuhi kriteria kuantitas untuk skala ekonomi industri besar dalam produksi bahan baku obat dan vaksin saat ini (Gohil dkk. 2019).

Karenanya, penelitian tentang produksi *squalene* sebagai *adjuvant* vaksin kini menawarkan solusi penggunaan mikroalga *Aurantiochytrium* sebagai bahan baku alternatif pengganti bahan baku dari hati ikan hiu sebagai bahan *adjuvant* vaksin COVID-19 (Fossier dkk. 2018; Morabito dkk. 2019; Wai dkk. 2010). Penggunaan mikroalga *Aurantiochytrium* sebagai sumber bahan baku terbarukan pengganti bahan baku hati ikan hiu laut dalam diperkirakan akan mencegah perburuan sekitar setengah miliar ekor ikan hiu akibat kebutuhan *squalene* yang sangat banyak di sektor farmasi dan obat (Herald 2020; Science The Wire 2020).

Kajian kultivasi sebelumnya telah dilakukan pada skala laboratorium, menggunakan *shake flask* (Li dkk. 2009) maupun strategi teknis pada fermenter (Gohil dkk. 2019). Kajian tentang *scale-up* dari hasil laboratorium dipresentasikan untuk mempercepat pemanfaatan *squalene* di masa pandemi (Phan dkk. 2020). Kajian teknik ekstraksi *squalene* yang dipertimbangkan meliputi ekstraksi menggunakan pelarut organik, *cold press*, dan ekstraksi menggunakan *supercritical fluid* (Hoang dkk. 2014; Rosales-Garcia dkk. 2017). Untuk skala industri, ekstraksi menggunakan pelarut organik (umumnya heksana) lebih banyak digunakan.

Sayangnya, mikroalga *Aurantiochytrium* dari Indonesia untuk produksi *squalene* belum pernah dikaji sebelumnya. Seperti yang tersaji dalam Tabel 2, beberapa spesies *Aurantiochytrium* yang telah dikaji untuk produksi *squalene* sebagian besar dari Jepang dan sebagian lainnya dari China dan USA. Sehingga kajian tentang mikroalga *Aurantiochytrium* asli Indonesia perlu dilakukan. Kajian variasi keanekaragaman hayati dari strain *Aurantiochytrium* yang berasal dari habitat yang berbeda memiliki perbedaan karakteristik dan komposisi komponen produk yang dihasilkan (Jaritkhan dan Suanjit 2018). Perbedaan tersebut antara lain pada jenis asam lemak yang dihasilkan, misalkan ada satu strain dominan penghasil asam palmitat, strain lainnya dominan menghasilkan asam linoleat, sementara strain lainnya dominan asam dokosaheksanoat, dan lain sebagainya. Dengan luasnya hutan bakau yang dimiliki Indonesia, maka akan berpotensi memiliki kekayaan keanekaragaman hayati tinggi dan perbedaan karakteristik baik sesama strain lokal maupun strain negara lainnya.

Selain itu, hal mendasar yang menjadi urgensi dalam ka-

jian mikroalga *Aurantiochytrium* lokal Indonesia adalah agar suatu saat bila kita mau memproduksi skala komersial maka kita secara legal boleh menggunakan strain tersebut tanpa terkena klaim dari negara manapun. Oleh karena itu, diharapkan kajian ini dapat berkontribusi sebagai referensi untuk pemanfaatan mikroalga *Aurantiochytrium* sebagai bahan baku *adjuvant* vaksin, baik vaksin COVID-19 maupun vaksin lainnya.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Penyiapan sampel

Tahap awal penelitian ini adalah mengumpulkan sampel daun bakau yang sudah berjatuh. Sampel daun bakau yang diambil sebanyak 5 daun yang terdiri dari 1 daun berwarna kuning kecoklatan, 1 daun berwarna coklat, 2 daun berwarna kuning kecoklatan dan 1 daun berwarna kuning. Daun bakau yang sudah terkumpul diletakkan didalam plastik zip yang kemudian diisi dengan sedikit air laut dan ditutup rapat. Sampel daun bakau selanjutnya disimpan di dalam kotak pendingin yang telah diisi es. Proses penanaman dilakukan sesegera mungkin di Laboratorium Biomedik, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Selanjutnya, dilakukan proses isolasi terhadap sampel tersebut.

2.2 Teknik isolasi

Pada penelitian ini proses isolasi mikroalga *Aurantiochytrium* dilakukan dengan menggunakan teknik *direct plating*. Teknik ini dilakukan dengan memotong daun bakau seluas 1 cm², kemudian potongan daun tersebut diletakkan di atas permukaan medium agar pada cawan petri. Proses isolasi mikroalga dilakukan dengan menggunakan 2 variasi medium agar. Untuk variasi pertama berisikan 14 g nutrisi agar, 1 g glukosa, 250 ml aquades, serta 250 ml air laut. Untuk variasi yang kedua berisikan 7 g agar; 2,5 g glukosa; 2,5 g *yeast extract*, dan pepton 1 g. Potongan daun bakau kemudian ditanam pada medium agar dan diinkubasi pada suhu ruangan selama 1-2 hari di tempat yang gelap. Setelah didapatkan isolat dari daun bakau yang ditanam pada medium agar, isolat tersebut dicek dengan menggunakan mikroskop untuk mengindikasikan isolat tersebut mengandung mikroalga *Aurantiochytrium* yang diinginkan atau tidak. Setelah terindikasi mikroalga jenis *Aurantiochytrium*, *streaking* isolat tersebut pada medium agar untuk mendapatkan *single colony*. Gambar 3A menunjukkan pertumbuhan isolat pada daun bakau yang telah ditanam pada medium agar, sementara Gambar 3B menunjukkan beberapa sampel yang telah di-*streaking* pada medium agar.

Setelah dilakukan *streaking*, 5 sampel pada cawan petri tersebut diamati morfologinya secara mikroskopik untuk memastikan bahwa terdapat mikroalga yang diinginkan di



GAMBAR 3. (A): Pertumbuhan sampel daun bakau pada medium agar yang ditumbuhi koloni mikroalga pada tepinya; (B) *streaking* koloni mikroalga pada medium agar.

dalamnya. Morfologi mikroalga yang tumbuh pada isolat dicocokkan dengan morfologi mikroalga *Aurantiochytrium* yang sesungguhnya. Hal ini bertujuan untuk menapis isolat yang berisi mikroalga *Aurantiochytrium*.

Setelah didapatkan *single colony* dilakukan proses purifikasi isolat mikroalga dengan teknik *streak plate* berulang ulang hingga isolat murni didapatkan, serta pengamatan mikroskop dilakukan kembali. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa isolat mikroalga yang didapatkan benar-benar murni (hanya terdapat mikroalga *Aurantiochytrium*). Sebelum dilakukan penyimpanan isolat yang murni, isolat tersebut di-*shaking* dengan menggunakan medium *broth*.

2.3 Kultivasi dan preparasi biomassa

Komponen nutrisi yang umum digunakan untuk kultivasi (pembinaan) skala laboratorium adalah *glucose anhydrous* dari MERCK^(R), medium agar, *yeast extract*, pepton, air distilasi dan air laut (Chandrasekaran dkk. 2018). Selain itu, antibiotik seperti *penicillin* dan *streptomycin* serta anti jamur seperti *nystatin* ditambahkan untuk mencegah pertumbuhan koloni bakteri maupun jamur (Burja dkk. 2006). Produksi biomassa dilakukan dalam tiga tahap, yaitu tahap *standing culture*, *pre-culture* dan *main culture*. Komposisi media bervariasi pada tiap tahapnya, masing-masing *standing culture* 2 g/L *yeast extract*, 9 g/L glukosa *anhydrous*, dan campuran air laut dan aquades dengan perbandingan 1:1. Media tiap tahap *standing culture* 10 g/L; *pre-culture yeast extract*, 25 g/L glukosa *anhydrous*, dan campuran air laut dan aquades dengan perbandingan 1:1 dan *main culture* 25 g/L *yeast extract*, 100 g/L glukosa *anhydrous*, dan campuran air laut dan aquades dengan perbandingan 1:1.

Pada tahap *standing culture* dan *pre-culture* media pertumbuhan yang sudah disiapkan dengan kadar yang telah ditentukan dimasukkan isolat murni *Aurantiochytrium*. Proses tersebut dilakukan di *Laminar Air Flow* yang sebelumnya sudah disterilisasi dengan UV untuk meminimalisir terjadinya kontaminasi pada isolat maupun media. Selanjutnya media yang telah di masukkan isolat di-*shaking* selama 2 hari pada kecepatan 200 rpm pada media *standing culture* dan *pre culture*. Pada tahap akhir adalah produksi biomassa pada *main culture* dengan proses *shaking* selama 5 hari pada kecepatan 210 rpm.

2.4 Analisis kualitatif *squalene*

Biomassa yang dihasilkan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Biomassa kemudian disaring menggunakan kain *screen* T200 kemudian dibilas menggu-

nakan aquades. Setelah itu, biomassa ditiriskan sebentar yang selanjutnya dipindahkan ke wadah. Supernatan kemudian dimasukkan ke dalam wadah terpisah. Setelah itu, biomassa basah dikeringkan ke dalam lemari pengering menggunakan *dehumidifier* yang diatur pada suhu 30 °C selama 24 jam. Biomassa kering kemudian dimasukkan ke dalam tabung *falcon* lalu ditambahkan pelarut n-heksana. Sampel kemudian disonikasi selama 30 menit. Sampel yang telah disonikasi kemudian dipekatkan menggunakan *evaporator Buchi Rotavapor R-300*, dengan pengaturan vakum di angka 240 mbar, rotasi 80 rpm, suhu *waterbath* 51 °C dan suhu *chiller* 12 °C. Setelah selesai dipekatkan, sampel kemudian dilarutkan menggunakan aseton dan etil asetat dengan perbandingan 1:1 sebanyak 20 ml.

Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) kemudian disiapkan dan dipotong dengan ukuran 5 x 2 cm. Pada bagian bawah diberi tanda garis menggunakan pensil dengan jarak 0,75 cm dari tepi bawah. Pada bagian atas diberi tanda garis menggunakan pensil berjarak 0,25 cm dari tepi atas. Kemudian, pada garis bagian bawah, diberikan dua titik menggunakan pensil untuk menandai lokasi penaruhan sampel dan senyawa standar *squalene*. Jarak kedua titik antara 0,5-1 cm. Kedua titik kemudian diberi kode untuk keterangan titik penaruhan senyawa standar *squalene* dan larutan sampel. Senyawa standar *squalene* lalu diteteskan pada titik pertama hingga warna titik jelas terlihat. Begitupun dengan larutan sampel juga dilakukan hal yang sama.

Bejana KLT kemudian disiapkan. Sikloheksan sebagai eluen dituangkan dengan kedalaman 0,75 cm. Selanjutnya potongan panjang kertas saring dimasukan sampai menyentuh tutup bejana. Kertas saring digunakan untuk mengamati kejenuhan di dalam bejana KLT dengan indikasi eluen menaiki kertas saring hingga sampai atas. Plat sampel kemudian dimasukan ke dalam bejana KLT. Posisi plat sampel diatur agar bersandar pada dinding bejana. Bejana KLT ditutup dan ditunggu beberapa saat sampai eluen naik pada plat sampel hingga menyentuh garis bagian atas. Ketika eluen telah mencapai garis atas, plat sampel kemudian diambil dan angin-anginkan. Plat sampel yang telah selesai dikembangkan di dalam bejana KLT kemudian dihangatkan di atas *hot plate*. Selanjutnya akan terlihat noda pada senyawa standar *squalene* maupun pada larutan sampel. Indikasi adanya *squalene* secara kualitatif ditunjukkan pada plat yang akan terlihat titik noda yang segaris dengan senyawa standar *squalene*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Isolat Yang dihasilkan

Penelitian bioteknologi mikroalga terus berkembang karena sebagian besar lingkungan laut masih belum banyak dikaji seiring dengan kebutuhan manusia terhadap produk-produk nutrisi, kosmetik dan obat-obatan. Termotivasi pertimbangan tersebut, penelitian ini berupaya mengeksplorasi penggunaan mikroalga dari hutan bakau sebagai bahan baku produksi bahan biokimia aktif, khususnya *squalene*, yang bernilai ekonomi tinggi. Mengingat belum ada standar referensi ideal pada publikasi sebelumnya terkait komposisi media tumbuh untuk isolasi mikroalga *Aurantiochytrium* dari hutan bakau Indonesia, maka keberhasilan teknik isolasi yang dipresentasikan pada tulisan ini diharapkan menjadi

TABEL 3. Hasil pengamatan mikroskopik morfologi isolat yang terindikasi mikroalga *Aurantiochytrium*.

Sampel	Penilaian	Sampel	Penilaian
RAM1-01	Tidak Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>	RAM2-01	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>
RAM1-02	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>	RAM2-02	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>
RAM1-03	Tidak Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>	RAM2-03	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>
RAM1-04	Tidak Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>	RAM2-04	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>
RAM1-05	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>	RAM2-05	Terindikasi <i>Aurantiochytrium</i>

langkah awal untuk melakukan eksplorasi mikroalga *Aurantiochytrium* agar dapat digunakan sebagai bahan baku bernilai ekonomi tinggi. Proses hulu tahap isolasi sel mikroalga diilustrasikan sebagai upaya "penambangan" bahan baku biokimia dari sebuah "tambang tak terbatas" yang berupa hutan bakau (Xie dkk. 2017).

Karenanya, salah satu inisiatif awal dilakukan dan dipresentasikan pada tulisan ini adalah untuk mendapat isolat murni mikroalga *Aurantiochytrium*. Selain itu, karena mikroalga *Aurantiochytrium* tumbuh secara heterotropik dengan pemberian nutrisi untuk pertumbuhan, maka perlu ditentukan secara eksperimental komposisi ideal media tumbuh dan rangkaian teknik isolasi yang dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi dan memudahkan mendapatkan isolat murni sel mikroalga yang diharapkan.

Pada penelitian ini, teknik isolasi dari sampel daun bakau yang telah jatuh di hutan bakau Raja Ampat telah dipresentasikan pada tulisan ini. Teknik *direct plating* untuk isolasi mikroalga *Aurantiochytrium* dari daun bakau telah digunakan pada penelitian ini dengan modifikasi nutrisi pada medium pertumbuhan sampel. Pada proses isolasi mikroalga *Aurantiochytrium*, penggunaan nutrisi pada medium agar dapat mempengaruhi tumbuh kembang mikroalga *Aurantiochytrium* yang dihasilkan. Dari 10 sampel yang telah diisolasi, terdapat 6 sampel yang terindikasi mikroalga jenis *Aurantiochytrium*. Hasil pengamatan mikroskopik, morfologi isolat yang terindikasi sebagai mikroalga *Aurantiochytrium* dapat dilihat pada Tabel 3.

Gambar 4 menunjukkan isolat mikroalga yang terkontaminasi mikroba lainnya. Kontaminasi yang dimaksud di sini adalah kontaminasi media kultur atau pembibitan mikroalga saat penumbuhan dari sampel daun bakau yang dipakai. Adanya mikroba yang tumbuh diduga karena proses *streaking* tidak dilakukan secara aseptis. Bila kontaminasi terlalu besar, maka sampel daun bakau yang dipakai dipisahkan atau diisolasi sel mikroalganya hingga mendapat kultur isolat murni sel mikroalga *Aurantiochytrium*. Setelah melakuk-

an proses purifikasi isolat mikroalga dengan teknik *streaking* diperoleh isolat murni. Hasilnya diperoleh 4 isolat murni seperti ditampilkan pada Gambar 5.

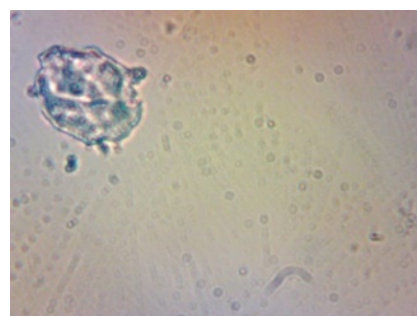
Berdasarkan hasil penelitian pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa sampel dengan isolat murni mikroalga *Aurantiochytrium* adalah sampel RAM2-01, RAM2-03, RAM2-04 dan RAM2-05. Sebanyak 75% sampel dengan isolat murni mikroalga *Aurantiochytrium* adalah sampel yang tumbuh pada medium agar 2. Hal ini dapat disimpulkan bahwa sampel yang tumbuh pada medium agar 2 dapat bertahan hidup lebih baik daripada sampel yang tumbuh pada medium agar 1. Salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya hal tersebut adalah kandungan yang terdapat dalam medium agar tersebut. Medium agar 1 terdapat kandungan *yeast extract* sebesar 2,0% (w/v), pepton sebesar 5,0% (w/v), agar sebesar 15,0% (w/v). Sedangkan medium agar 2 terdapat kandungan *yeast extract* sebesar 12,5% (w/v), pepton sebesar 5,0% (w/v), agar sebesar 70,0% (w/v).

Yeast extract berguna untuk memberikan suplai nutrisi organik yang diperlukan serta beberapa mineral untuk pertumbuhan sel mikroalga. Pepton berfungsi sebagai sumber nitrogen dan protein serta berguna untuk memisahkan mikroalga dari jamur, dimana terjadi pertumbuhan mikroalga yang lebih cepat dibandingkan dengan jamur. Sedangkan media agar berfungsi sebagai pematat medium. Berdasarkan data di atas dapat disimpulkan bahwa medium agar 2 memiliki formulasi yang lebih baik dibanding dengan medium agar 1 untuk berkembangnya mikroalga *Aurantiochytrium*. Kandungan *yeast extract* pada medium agar 2 lebih banyak daripada medium agar 1 sehingga nutrisi mikroalga *Aurantiochytrium* lebih tercukupi.

Secara umum, bentuk morfologi mikroalga yang diperoleh pada penelitian ini berbentuk bulat dengan warna dominan kuning. Ciri morfologi pada penelitian sebelumnya dijadikan acuan sel mikroalga *aurantiochytrium* yang dihasilkan pada penelitian ini. Kajian tentang keanekaragaman hayati mikroalga *aurantiochytrium* menunjukkan bahwa secara

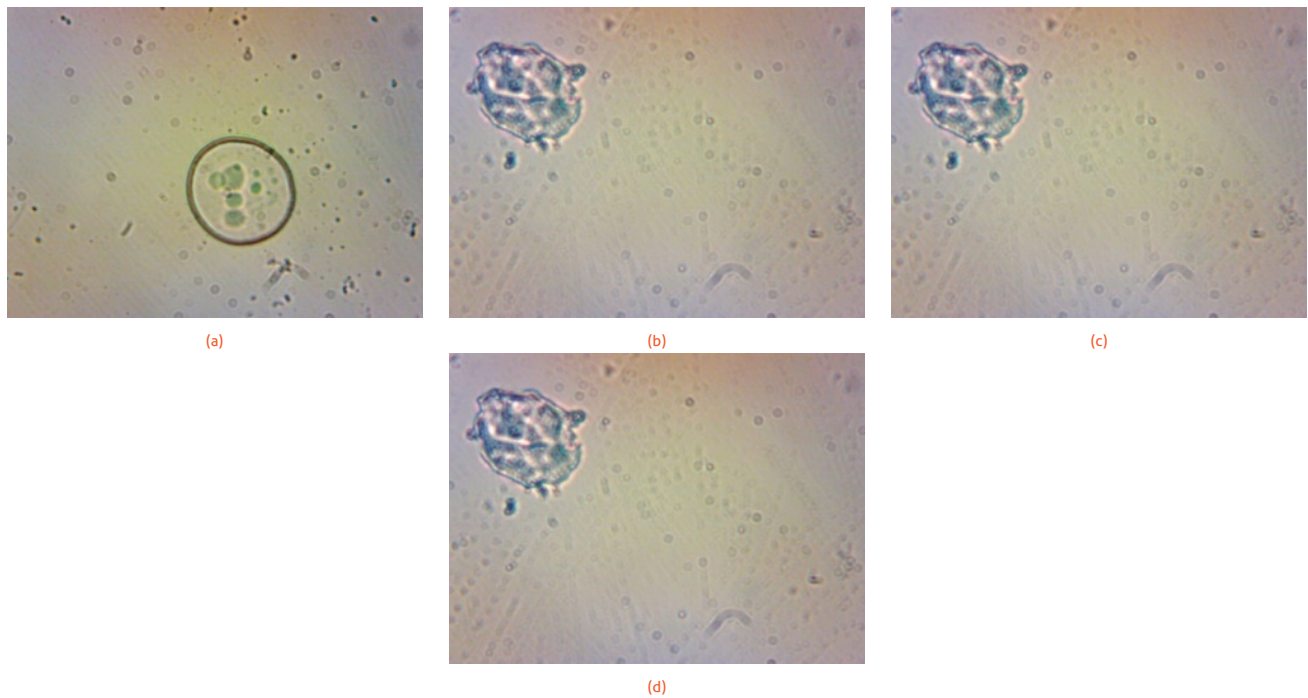


(a)



(b)

GAMBAR 4. Contoh isolat yang terkontaminasi mikroba.



GAMBAR 5. Isolat murni mikroalga *Aurantiochytrium*. Keterangan: (a) RAM2-01; (b) RAM2-03; (c) RAM2-04; (d) RAM2-05.

umum mikroalga *Aurantiochytrium* berukuran sekitar 5 – 20 μm (Jaritkhuan dan Suanjit 2018). Hasil awal dari penelitian ini nantinya perlu ditunjang penelitian selanjutnya berupa analisis genetika dan pembentukan pohon filogenetik untuk menjadi acuan strain lokal Indonesia.

3.2 Karakteristik biomassa *Aurantiochytrium*

Dalam penelitian ini, mikroalga laut dari spesies *Aurantiochytrium* telah diisolasi. Gambar 6 menampilkan ilustrasi tahapan yang dilakukan pada penelitian ini. Isolat mikroalga *Aurantiochytrium* yang diperoleh dibudidayakan untuk memperoleh biomassa. Gambar 6A menampilkan hasil produk setelah melewati fermentasi bertahap, mulai dari *standing culture*, *pre-culture* hingga *main culture*. Setelah 120 jam kultivasi, produk yang dihasilkan berwarna kuning cerah beraroma amis seperti aroma khas minyak ikan yang menjadi salah satu indikasi adanya asam lemak tak jenuh rantai panjang omega-3. Selain kekhasan produk asam lemak tak jenuh, produk biomassa dari mikroalga *Aurantiochytrium* memiliki potensi menghasilkan *squalene* (Du dkk. 2021).

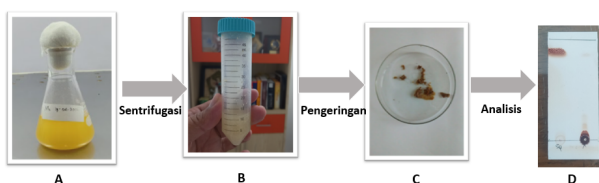
Komponen nutrisi yang umum digunakan untuk kultivasi (pembinaan) mikroalga *Aurantiochytrium* skala laboratorium adalah sumber karbon, medium agar, *yeast extract*, pep-

ton, air distilasi, NaCl, air laut (baik dalam bentuk *brine water* sintesis atau air laut asli), sumber fosfat (dalam bentuk *orthophosphate*) dan urea (Chandrasekaran dkk. 2018). Selain itu, antibiotik seperti *penicillin* dan *streptomycin* serta anti jamur seperti *nystatin* ditambahkan untuk mencegah pertumbuhan koloni bakteri maupun jamur (Burja dkk. 2006).

Mikroalga *Aurantiochytrium* dikenal sebagai *oleaginous microalgae* karena kemampuan menghasilkan kandungan lipid yang tinggi. Produk biomassa seperti Gambar 6A memiliki potensi kandungan lipid yang hingga 55% (Chandrasekaran dkk. 2018). Selanjutnya sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan biomassa basah dengan kandungan lipid tinggi dari fasa cair curahnya (Gambar 6B). Biomassa basah yang dihasilkan kemudian dikeringkan (Gambar 6C).

Pada penelitian ini adanya *squalene* sebagai hasil dari kultivasi mikroalga *Aurantiochytrium* dianalisis secara kualitatif dengan KLT. Sel mikroalga *Aurantiochytrium* pada biomassa kering seperti pada Gambar 6C terlebih dahulu dipecahkan isi selnya dengan sonifikasi. Selanjutnya ekstraksi dengan solven non-polar dilakukan agar senyawa *squalene* terpisah. Keberadaan *squalene* ditentukan secara kualitatif menggunakan KLT dengan penanda (*marker*) *squalene*. Gambar 6D memperlihatkan bahwa metode yang diajukan pada penelitian ini secara kualitatif menunjukkan adanya kandungan *squalene* pada produk yang dihasilkan dari mikroalga *Aurantiochytrium* dengan isolat murni dari Raja Ampat.

Hasil ini memberikan potensi untuk pengembangan lebih lanjut mengingat potensi mikroalga dari isolat lokal Indonesia mampu menghasilkan *squalene*. Di masa depan perlu dilanjutkan kajian baik skala laboratorium, *pilot plant* hingga skala komersial agar menghasilkan *squalene* sesuai keperluan nasional akan produk nutrisi, kosmetik dan bahan baku obat. Selain itu, proses yang ekonomis dan efektif juga merupakan pertimbangan penting untuk pengembangan kajian masa depan agar dapat diaplikasikan pada industri berbasis



GAMBAR 6. Ilustrasi proses dan hasil pada penelitian ini. A: produk biomassa yang dihasilkan. B: hasil proses sentrifugasi memisahkan biomassa basah. C: hasil kering biomassa. D: plat KLT yang telah dikembangkan, dimana tanda di bagian kiri atas adalah senyawa standar *squalene* yang digunakan sedangkan bagian kanan bawah adalah sampel.

mikroalga *Aurantiochytrium* yang memiliki daya saing secara ekonomis.

Kajian untuk menurunkan biaya produksi salah satunya adalah mengoptimasi pilihan bahan baku yang digunakan, misalkan dengan menggunakan bahan baku yang harganya murah dari hasil samping produk pertanian atau industri pangan (Abdel-Wahab dkk. 2022). Selain itu, komponen biaya hilir juga perlu dioptimasi karena berpotensi menghabiskan sekitar 20-60% dari keseluruhan biaya proses. Optimasi komponen biaya hilir dengan cara meningkatkan efisiensi ekstraksi komponen dan daur ulang lebih lanjut dari residu biomassa yang dihasilkan agar mendapat nilai tambah secara ekonomi. Tinjauan ini bertujuan untuk memberikan gambaran seara global aspek bioteknologi produksi biomassa dari mikroalga *Aurantiochytrium* agar memberikan informasi latar belakang bagi para peneliti berikutnya.

3.3 Potensi riset di Indonesia

Gagasan agar bangsa Indonesia memperkuat penguasaan teknologi vital pada industri obat dan vaksin menemukan momentumnya dengan wabah pandemi COVID-19. Terkini, program vaksinasi yang sedang berjalan juga menyadarkan kita akan darurat penguasaan teknologi vaksin di masa depan, mulai dari industri hulu hingga hilirnya karena semua vaksin yang digunakan di tanah air adalah impor, misal vaksin Sinovac maupun Astrazeneca.

Sayangnya, mikroalga *Aurantiochytrium* dari hutan bakau Indonesia sebagai kajian untuk *adjuvant* vaksin COVID-19 belum ada hingga saat ini. Padahal, Indonesia merupakan negara yang kaya akan biodiversitas mikroalga *Aurantiochytrium*. Kajian awal untuk penentuan metode isolasi mikroalga *Aurantiochytrium* dari hutan bakau Kulonprogo telah dimulai di Universitas Ahmad Dahlan (Suhendra 2020). Usulan rancang bangun industri omega-3 berbasis mikroalga *Aurantiochytrium* telah diusulkan sebelumnya (Suhendra dkk. 2019). Kandungan mikroalga *Aurantiochytrium* umumnya terdiri dari lipid (23% dry cell weight). Lipid yang diekstrak mengandung sekitar 72% hidrokarbon, 13% trigliserida dan 15% lipida polar (Kaya dkk. 2011). Kandungan *squalene* yang dihasilkan sekitar 1 - 3 g/liter volume kultur yang dapat dihasilkan dari fermentasi selama 4-12 hari (Nakazawa dkk. 2014).

Sejauh ini, rangkaian penelitian tentang mikroalga *Aurantiochytrium* mulai dari isolasi mikroalga, gambaran produksinya, teknik analisa kualitatif *squalene* hingga analisa untuk bahan baku *adjuvant* vaksin dari mikroalga dari hutan bakau di Indonesia akan menjadi penelitian pertama. Oleh karena itu, hasil dari penelitian ini perlu kajian intensif berikutnya untuk mengembangkan teknologi produksi *squalene* agar peluang berkontribusi di dunia sains dan teknologi vaksin dunia dan nasional dapat dimanfaatkan di masa depan.

Selain sebagai *adjuvant* vaksin di industri farmasi, *squalene* juga dimanfaatkan di bidang industri kosmetik dan suplemen makanan (Popa dkk. 2015; Lozano-Grande dkk. 2018). 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, antibakteri dan lain-lain (Research Grand View 2014). *Squalene* juga terbukti

sebagai peningkat imunitas tubuh (Fox dkk. 2011; Phillips dkk. 2009), anti peradangan (Cárdeno dkk. 2015) dan pengobatan anti kanker (Cirmena dkk. 2018).

Dengan peningkatan kebutuhan vaksinasi COVID-19, suplemen peningkat imunitas dan obat-obatan lain yang menggunakan *squalene*, maka kebutuhan akan *squalene* semakin tinggi. Karena keterbatasan bahan baku dasar *squalene* dari hati ikan hiu, maka alternatif bahan baku produksi *squalene* dari mikroalga hutan Indonesia diharapkan memberikan kontribusi keamanan pasokan bahan baku *squalene* di masa depan.

Selain itu, penelitian untuk tujuan bahan baku *adjuvant* vaksin ini akan menggunakan mikroalga *Aurantiochytrium* dari hutan bakau Indonesia yang merupakan topik riset yang belum pernah dikaji sebelumnya. Karenanya, hasil dari penelitian ini juga diharapkan menggairahkan penelitian berikutnya untuk mengkaji keanekaragaman hayati dari hutan bakau Indonesia.

4. KESIMPULAN

Tulisan ini memberikan gambaran awal penelitian potensi mikroalga *Aurantiochytrium* mulai dari isolasi mikroalga pada habitat asalnya, gambaran produksinya hingga analisis kualitatif biomassa yang dihasilkan. Teknik isolasi mikroalga *Aurantiochytrium* yang digunakan pada riset ini adalah dengan *direct plating method* dengan mengambil sampel daun hutan bakau yang telah jatuh di perairan hutan bakau Raja Ampat, Papua Barat. Teknik isolasi yang digunakan pada penelitian ini pada akhirnya terbukti mampu mendapatkan isolat murni mikroalga *Aurantiochytrium* dari habitatnya. Selain itu, gambaran produksi biomassa dari isolat murni telah ditampilkan pada tulisan ini dilanjutkan dengan teknik analisis kualitatif pengujian keberadaan *squalene*. Teknik kultivasi dan formulasi media dan nutrisi yang dibuat telah terbukti menghasilkan produk biomassa yang diinginkan yang berwarna kuning cerah dan beraroma amis seperti aroma minyak ikan. Dengan hasil uji *squalene* yang positif pada biomassa yang dihasilkan, maka mikroalga *Aurantiochytrium* lokal Indonesia berpotensi digunakan sebagai bahan baku untuk produksi bahan bernilai ekonomi tinggi yang memerlukan *squalene*, seperti industri vaksin. Hasil penelitian ini semoga menjadi landasan awal untuk penelitian berikutnya. Selain itu, potensi mikroalga *Aurantiochytrium* semakin dibutuhkan di masa depan pada industri nutrisi, kosmetik dan farmasi. Mengingat hal ini, perlu pengkajian lebih banyak dari mikroalga *Aurantiochytrium* dari isolat hutan bakau Indonesia di masa depan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini mendapat dukungan dana hibah riset dari (<https://lppm.uad.ac.id/>) Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Ahmad Dahlan. Karenanya, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada LPPM UAD yang memberikan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Aasen IM, Ertesvåg H, Heggeset TMB, Liu B, Brautaset T, Vaddstein O, Ellingsen TE. 2016. Thraustochytrids as production organisms for docosahexaenoic acid (DHA), squalene

- lene, and carotenoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(10):4309–4321. doi:10.1007/s00253-016-7498-4.
- Abdel-Wahab MA, El-Samawaty AERM, Elgorban AM, Bahkali AH. 2022. Utilization of low-cost substrates for the production of high biomass, lipid and docosahexaenoic acid (DHA) using local native strain *Aurantiochytrium* sp. YB-05. *Journal of King Saud University - Science*. 34:102224. doi:10.1016/j.jksus.2022.102224. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1018364722004050>.
- Bellou S, Triantaphyllidou IE, Aggeli D, Elazzazy AM, Baeshen MN, Aggelis G. 2016. Microbial oils as food additives: Recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology*. 37:24–35. doi:10.1016/j.copbio.2015.09.005.
- Beltrán G, Bucheli ME, Aguilera MP, Belaj A, Jimenez A. 2016. Squalene in virgin olive oil: Screening of variability in olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 118(8):1250–1253. doi:10.1002/ejlt.201500295.
- Bhattacharjee P, Shukla VB, Singhal RS, Kulkarni PR. 2001. Studies on fermentative production of squalene. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17(8):811–816. doi:10.1023/A:1013573912952.
- Burja AM, Radianingtyas H, Windust A, Barrow CJ. 2006. Isolation and characterization of polyunsaturated fatty acid producing *Thraustochytrium* species: Screening of strains and optimization of omega-3 production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72(6):1161–1169. doi:10.1007/s00253-006-0419-1.
- Byrne J. 2019. German retailer puts algal oil fed salmon on shelves. <https://www.feednavigator.com/Article/2019/01/31/German-retailer-puts-algal-oil-fed-salmon-on-shelves>.
- Cárdeno A, Aparicio-soto M, Paz SMd, Bermudez B, Muriana FJG, Alarcón-de-la lastra C. 2015. Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *Journal of Functional Foods*. 14:779–790. doi:10.1016/j.jff.2015.03.009.
- Chandrasekaran K, Roy RK, Chadha A. 2018. Docosahexaenoic acid production by a novel high yielding strain of *Thraustochytrium* sp. of Indian origin: Isolation and bioprocess optimization studies. *Algal Research*. 32(October 2017):93–100. doi:10.1016/j.algal.2018.03.011.
- Chang MH, Kim HJ, Jahng KY, Hong SC. 2008. The isolation and characterization of *Pseudozyma* sp. JCC 207, a novel producer of squalene. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78(6):963–972. doi:10.1007/s00253-008-1395-4.
- Changeorg. 2020. Stop using sharks in COVID-19 vaccine - use EXISTING sustainable options. <https://www.change.org/p/us-fda-food-and-drug-administration-of-the-united-states-of-america-stop-using-sharks-in-covid-19-vaccine-use-existing-sustainable-options>.
- Cirmena G, Franceschelli P, Isnaldi E, Ferrando L, Mariano D, Ballestrero A, Zoppoli G. 2018. Squalene epoxidase as a promising metabolic target in cancer treatment. *Cancer Letters*. doi:10.1016/j.canlet.2018.03.034.
- Cotterill BM. 2020. COVID-19 vaccine might require compounds from shark liver:1–7. <https://canadiangeographic.ca/articles/covid-19-vaccine-might-require-compound-s-from-shark-liver/>.
- Del Giudice G, Fragapane E, Bugarini R, Hora M, Henriksson T, Palla E, O'Hagan D, Donnelly J, Rappuoli R, Podda A. 2006. Vaccines with the MF59 adjuvant do not stimulate antibody responses against squalene. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13(9):1010–1013. doi:10.1128/CVI.00191-06.
- Dillon GP, Keegan JD, Moran CA. 2020. Toxicological evaluation of an unextracted *Aurantiochytrium limacinum* biomass, a novel docosahexaenoic acid rich feed ingredient. *Food and Chemical Toxicology*. 141(April):111397. doi:10.1016/j.fct.2020.111397.
- Du F, Wang YZ, Xu YS, Shi TQ, Liu WZ, Sun XM, Huang H. 2021. Biotechnological production of lipid and terpenoid from *thraustochytrids*. *Biotechnology Advances*. 48(February):107725. doi:10.1016/j.biotechadv.2021.107725.
- Emma Bowman. 2020. A Coronavirus vaccine could kill half a million sharks, conservationists warn. <https://www.npr.org/sections/coronavirus-live-updates/2020/10/10/922398246/a-coronavirus-vaccine-could-kill-half-a-million-sharks-conservationists-warn>.
- Evonik. 2018. DSM and Evonik establish Veramaris joint venture. [https://corporate.evonik.com/en/dsm-und-evonik-establish-veramaris-joint-venture-25327.html#:~:text=DSMandEvonikhaveestablished,CampusinDelft\(Netherlands\)](https://corporate.evonik.com/en/dsm-und-evonik-establish-veramaris-joint-venture-25327.html#:~:text=DSMandEvonikhaveestablished,CampusinDelft(Netherlands)).
- Evonik. 2021. Evonik stärkt strategische Partnerschaft mit BioNTech bei Covid-19 Impfstoff. <https://corporate.evonik.com/de/evonik-starkt-strategische-partnerschaft-mit-biotech-bei-covid-19-impfstoff-152785.html#:~:text=HealthCare-,EvonikstärktstrategischePartnerschaftmitBioNTechbeiCovid-19Impfstoff,seinenStandortenHanauundDossenheim>.
- Fossier L, Lee KJ, Nichols PD, Mitchell WJ, Polglase JL, Gutierrez T. 2018. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of *thraustochytrids*: A review. *Biotechnology Advances*. 36(1):26–46. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.003.
- Fossier Marchan L, Lee Chang KJ, Nichols PD, Mitchell WJ, Polglase JL, Gutierrez T. 2018. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of *thraustochytrids*: A review. *Biotechnology Advances*. 36(1):26–46. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.003.
- Fox CB, Baldwin SL, Duthie MS, Reed SG, Vedvick TS. 2011. Immunomodulatory and physical effects of oil composition in vaccine adjuvant emulsions. *Vaccine*. 29(51):9563–9572. doi:10.1016/j.vaccine.2011.08.089.
- Gohil N, Bhattacharjee G, Khambhati K, Braddick D. 2019. Engineering strategies in microorganisms for the enhanced production of squalene: advances, challenges and opportunities. 7(March):1–24. doi:10.3389/fbioe.2019.00050.
- Gorvett BZ. 2020. The surprising ingredients found in vaccines. <https://www.bbc.com/future/article/20201027-what-is-added-to-vaccines>.
- Herald M. 2020. Here's why shark researchers are concerned about a potential COVID-19 vaccine:12–15. <https://phys.org/news/2020-10-shark-potential-covid-vaccine.html>.
- Hoang MH, Ha NC, Thom LT, Tam LT, Anh HTL, Thu NTH, Hong DD. 2014. Extraction of squalene as value-added product from the residual biomass of *Schizochytrium mangrovei*

- PQ6 during biodiesel producing process. *Journal of Bio-science and Bioengineering*. 118(6):632–639. doi:[10.1016/j.jbiosc.2014.05.015](https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.05.015).
- Hong DD, Anh HTL, Thu NTH. 2011. Study on biological characteristics of heterotrophic marine microalgae *Schizochytrium mangrovei* pq6 isolated from phu quoc island, kien giang province, vietnam. *Journal of Phycology*. 47(4):944–954. doi:[10.1111/j.1529-8817.2011.01012.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01012.x).
- Hutari A, Hidayati W, Mustopa A, Neubauer P. 2018. Aurantiochytrium sp. isolate LR52 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. Technical report. National Center for Biological Information (NCBI).
- Jaritkhuan S, Suanjit S. 2018. Species diversity and polyunsaturated fatty acid content of thraustochytrids from fallen mangrove leaves in Chon Buri province, Thailand. *Agriculture and Natural Resources*. 52(1):24–32. doi:[10.1016/j.anres.2018.05.002](https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.05.002).
- Kalvodova L. 2010. Biochemical and biophysical research communications squalene-based oil-in-water emulsion adjuvants perturb metabolism of neutral lipids and enhance lipid droplet formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 393(3):350–355. doi:[10.1016/j.bbrc.2009.12.062](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.062).
- Kasai H, Katsuta A, Sekiguchi H, Matsuda S, Adachi K, Shindo K, Yoon J, Yokota A, Shizuri Y. 2007. *Rubritalea squalenifaciens* sp. nov., a squalene-producing marine bacterium belonging to subdivision 1 of the phylum 'Verrucomicrobia'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(7):1630–1634. doi:[10.1099/ijs.0.65010-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.65010-0).
- Kaya K, Nakazawa A, Matsuura H, Honda D, Inouye I, Watanabe MM. 2011. Thraustochytrid *aurantiochytrium* sp. 18W-13a accumulates high amounts of squalene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 75(11):2246–2248. doi:[10.1271/bbb.110430](https://doi.org/10.1271/bbb.110430).
- Li Q, Chen GQ, Fan KW, Lu FU, Aki T, Jiang Y. 2009. Screening and characterization of squalene-producing thraustochytrids from Hong Kong mangroves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(10):4267–4272. doi:[10.1021/jf9003972](https://doi.org/10.1021/jf9003972).
- Lippi G, Targher G, Franchini M. 2010. European journal of internal medicine vaccination, squalene, and anti-squalene antibodies: facts or fiction? *European Journal of Internal Medicine*. 21(2):70–73. doi:[10.1016/j.ejim.2009.12.001](https://doi.org/10.1016/j.ejim.2009.12.001).
- Lozano-Grande MA, Gorinstein S, Espitia-Rangel E, Dávila-Ortiz G, Martínez-Ayala AL. 2018. Plant sources, extraction methods, and uses of squalene. *International Journal of Agronomy*. 2018:1–13. doi:[10.1155/2018/1829160](https://doi.org/10.1155/2018/1829160).
- Mantzouridou F, Tsimidou MZ. 2010. Observations on squalene accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* due to the manipulation of HMG2 and ERG6. *FEMS Yeast Research*. 10(6):699–707. doi:[10.1111/j.1567-1364.2010.00645.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00645.x).
- Melissa Cristina Marquez. 2020. Are Sharks Being Killed For Coronavirus Vaccines? <https://www.forbes.com/sites/melissacristinamarquez/2020/10/12/are-sharks-being-killed-for-covid19-vaccines/?sh=7c2820607e64>.
- Melody M Bomgardner. 2020. On the hunt for alternatives to shark squalene for vaccines. *Chemical & Engineering News*:21–23. doi:[10.47287/cen-09847-feature2](https://doi.org/10.47287/cen-09847-feature2).
- Morabito C, Bournaud C, Maës C, Schuler M, Aiese R, Dellero Y, Maréchal E, Amato A, Rébeillé F. 2019. Progress in lipid research The lipid metabolism in thraustochytrids. *Progress in Lipid Research*. 76(May):101007. doi:[10.1016/j.plipres.2019.101007](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.101007).
- Nakazawa A, Kokubun Y, Matsuura H, Yonezawa N, Kose R, Yoshida M, Tanabe Y, Kusuda E, Van Thang D, Ueda M, Honda D, Mahakhant A, Kaya K, Watanabe MM. 2014. TLC screening of thraustochytrid strains for squalene production. *Journal of Applied Phycology*. 26(1):29–41. doi:[10.1007/s10811-013-0080-x](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0080-x).
- Nakazawa A, Matsuura H, Kose R, Kato S, Honda D, Inouye I, Kaya K, Watanabe MM. 2012. Optimization of culture conditions of the thraustochytrid *Aurantiochytrium* sp. strain 18W-13a for squalene production. *Bioresource Technology*. 109:287–291. doi:[10.1016/j.biortech.2011.09.127](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.127).
- National Center for National Center for Biotechnology Information Biotechnology Information. 2020. PubChem Compound Summary for CID 638072, Squalene. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Squalene>.
- Pasquale AD, Preiss S, Fleming A. 2015. Vaccine Adjuvants : from 1920 to 2015 and Beyond:320–343. doi:[10.3390/vaccines3020320](https://doi.org/10.3390/vaccines3020320).
- Patel A, Rova U, Christakopoulos P, Matsakas L. 2020. Mining of squalene as a value-added byproduct from DHA producing marine thraustochytrid cultivated on food waste hydrolysate. *Science of the Total Environment*. 736:139691. doi:[10.1016/j.scitotenv.2020.139691](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139691).
- Phan T, Devine C, Laursen ED, Simpson A, Kahn A, Khandhar AP, Mesite S, Besse B, Mabery KJ, Flanagan EI, Fox CB. 2020. Squalene emulsion manufacturing process scale-up for enhanced global pandemic response. *Pharmaceuticals*. 13:168. doi:[doi:10.3390/ph13080168](https://doi.org/10.3390/ph13080168).
- Phillips CJ, Matyas GR, Hansen CJ, Alving CR, Smith TC, Ryan MAK. 2009. Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness. 27:3921–3926. doi:[10.1016/j.vaccine.2009.03.091](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.091).
- Popa O, Băbeanu NE, Popa I, Niță S, Dinu-Pârvu CE. 2015. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. *BioMed Research International*. 2015:1–16. doi:[10.1155/2015/367202](https://doi.org/10.1155/2015/367202).
- Research Grand View. 2014. Squalene market size and share global industry report, 2016-2024. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/squalene-market>.
- Rosales-Garcia T, Jimenez-Martinez C, Davila-Ortiz G. 2017. Squalene extraction: biological sources and extraction methods. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 2(4):1662–1670. doi:[10.22161/ijeab/2.4.26](https://doi.org/10.22161/ijeab/2.4.26).
- Savoy M. 2020. What's New in Vaccine Science. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 47(3):517–528. doi:[10.1016/j.pop.2020.05.006](https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.05.006).
- Science The Wire. 2020. Could mass-producing a covid-19 vaccine kill half a million sharks? <https://science.thewire.in/health/sharks-covid-19-vaccine-adjuvant-squalene/>.
- Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. 2019. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 37(24):3167–3178. doi:[10.1016/j.vaccine.2019.04.055](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055).
- Spanggord RJ, Sun M, Lim P, Ellis WY. 2006. Enhancement of an analytical method for the determination of squalene

- in anthrax vaccine adsorbed formulations. 42:494–499. doi:[10.1016/j.jpba.2006.04.009](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.04.009).
- Spanova M, Daum G. 2011. Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 113(11):1299–1320. doi:[10.1002/ejlt.201100203](https://doi.org/10.1002/ejlt.201100203).
- Stelzner JJ, Behrens M, Behrens Se, Mäder K. 2018. Squalene containing solid lipid nanoparticles, a promising adjuvant system for yeast vaccines. *Vaccine*:1–7. doi:[10.1016/j.vaccine.2018.03.019](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.03.019).
- Suhendra. 2020. Isolation of Marine Microalgae. <https://www.youtube.com/watch?v=91cvOZ1A4I8>.
- Suhendra, E S, H Z, A H. 2019. Kajian Singkat Rancang Bangun Pabrik Docohexanoic Acid dari Mikroalga Species *Aurantiochytrium* dari Hutan Bakau Indonesia. *Konversi*. 8(1):33–44.
- Suhendra S. 2022. Bioprocess of of astaxanthin production as functional food from *aurantiochytrium* microalgae: A review. *CHEMICA: Jurnal Teknik Kimia*. 8(2):123. doi:[10.26555/chemica.v8i2.21954](https://doi.org/10.26555/chemica.v8i2.21954).
- Suhendra S, Pantooyo T, Fazlia S, Sulistiawati E, Evtasari RT. 2021. Bioprocess potentials of squalene from *thraustochytrids* microalgae for nutraceuticals in new normal era isolated from indonesian mangroves: A review. *CHEMICA: Jurnal Teknik Kimia*. 8(1):18. doi:[10.26555/chemica.v8i1.19121](https://doi.org/10.26555/chemica.v8i1.19121).
- Thompson A, Kwak S, Jin Ys. 2014. Squalene Production using *Saccharomyces cerevisiae*. *i-ACES*. 1(1):57–63. <https://core.ac.uk/download/pdf/29168323.pdf>.
- Tsujimoto M. 1916. A HIGHLY UNSATURATED HYDROCARBON IN SHARK LIVER OIL. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry*. 8(10):889–896. doi:[10.1021/i500010a005](https://doi.org/10.1021/i500010a005).
- Veramis. 2017. Evonik and DSM select Blair, Nebraska, as manufacturing site for innovative, new omega-3 fatty acids production. <https://animal-nutrition.evonik.com/en/evonik-and-dsm-select-blair-nebraska-as-manufacturing-site-for-innovative-new-omega-3-fatty-acids-pr-100430.html>.
- Wai K, Tsunehiro F, Feng A. 2010. Enhanced production of squalene in the *thraustochytrid* *Aurantiochytrium mangrovei* by medium optimization and treatment with terbinafine:1303–1309. doi:[10.1007/s11274-009-0301-2](https://doi.org/10.1007/s11274-009-0301-2).
- World Health Organization. 2020. Safety of squalene. Technical Report June 2006.
- Xie Y, Sen B, Wang G. 2017. Mining terpenoids production and biosynthetic pathway in *thraustochytrids*. *Bioresource Technology*. 244:1269–1280. doi:[10.1016/j.biortech.2017.05.002](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.002). <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417306417>.
- Xu W, Ma X, Wang Y. 2016. Production of squalene by microbes: an update. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(12). doi:[10.1007/s11274-016-2155-8](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2155-8).
- Xue L, Li J, Wei L, Ma C, Tan S. 2019. Adjuvant option for effective SARS-CoV-2 vaccine advanced techniques in biology & medicine. (Table 1):1–7. doi:[10.4172/2379-1764.1000274](https://doi.org/10.4172/2379-1764.1000274).
- Zhang A, Xie Y, He Y, Wang W, Sen B, Wang G. 2019. Bio-based squalene production by *Aurantiochytrium* sp. through optimization of culture conditions, and elucidation of the putative biosynthetic pathway genes. *Bioresource Technology*. 287(April):121415. doi:[10.1016/j.biortech.2019.121415](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121415).