



Sintesis Biodiesel dari Minyak Mikroalga *Nannochloropsis* Sp. Melalui Transesterifikasi Menggunakan Katalis Basa

Riza Habibi ^a, Enny Fachriyah ^{a*}, Dewi Kusriani ^a

^a Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

* Corresponding author: enny.fachriyah@live.undip.ac.id

Article Info	Abstract
<p>Keywords: Biodiesel, <i>Nannochloropsis</i> sp., Transesterification, Alkaline Catalyst</p>	<p>A research on biodiesel synthesis from microalgae oil <i>Nannochloropsis</i> sp through transesterification using an alkaline catalyst has been conducted. Microalgae oil isolation was performed by soxhlet extraction method using n-hexane solvent which obtained oil extract in lipid fraction as much as 23,793 gram with yield of 5,28%. Synthesis of biodiesel/methyl ester of fatty acid was conducted through transesterification with variation of KOH and K₂CO₃ catalyst. The methyl esters formed were analyzed using ¹H NMR. The peak of the methoxy proton of methyl ester appeared at $\delta \pm 3.7$ ppm. The peak area showed the methoxy proton abundance of methyl ester in the use of a K₂CO₃ catalyst greater than that of KOH. The result of GC-MS analysis shows the composition of fatty acid constituents of microalgae oils are myristic acid, palmitoleat, palmitat, linolelaidat, elaidat, and stearat. Biodiesel B5 microalgae (blending 5% biodiesel and 95% pure diesel) have kinematic viscosity 40°C at 4,71 mm²s⁻¹ and density 15°C at 862 kg cm⁻³. The results of this analysis indicate that the properties of kinematic viscosity and biodiesel density of B5 microalgae are eligible within the standard limits of the Director General of Oil and Gas.</p>
<p>Kata kunci: Biodiesel, <i>Nannochloropsis</i> sp., Transesterifikasi, Katalis Basa</p>	<p>Abstrak</p> <p>Telah dilakukan penelitian tentang sintesis biodiesel dari minyak mikroalga <i>Nannochloropsis</i> sp. melalui transesterifikasi menggunakan katalis basa. Isolasi minyak mikroalga dilakukan dengan metode ekstraksi <i>soxhlet</i> menggunakan pelarut n-heksan, diperoleh ekstrak minyak dalam fraksi lipid sebanyak 23,793 gram dengan rendemen 5,28 %. Sintesis biodiesel/metil ester asam lemak melalui transesterifikasi dengan variasi katalis KOH dan K₂CO₃. Metil ester yang terbentuk dianalisis menggunakan ¹H NMR. Puncak proton metoksi dari metil ester tampak pada $\delta \pm 3,7$ ppm. Luas puncaknya menunjukkan kelimpahan proton metoksi dari metil ester pada penggunaan katalis K₂CO₃ lebih besar dari penggunaan KOH. Hasil analisis GC-MS menunjukkan komposisi asam lemak penyusun minyak mikroalga adalah asam miristat, palmitoleat, palmitat, linolelaidat, elaidat, dan stearat. Biodiesel B5 mikroalga (<i>blending</i> 5% biodiesel dan 95% solar murni) mempunyai sifat viskositas kinematik 40°C sebesar 4,71 mm².s⁻¹ dan density 15°C sebesar 862 kg.cm⁻³. Hasil analisis ini menunjukkan bahwa sifat viskositas kinematik dan density biodiesel B5 mikroalga memenuhi syarat dalam batasan standar Dirjen Migas.</p>

1. Pendahuluan

Mikroalga merupakan tanaman berukuran mikro yang biasa ditemukan di perairan baik di laut maupun

air tawar dan paling efisien dalam menangkap dan memanfaatkan energi matahari dan CO₂ untuk keperluan fotosintesis [1]. Aplikasi pemanfaatan dari

mikroalga antara lain, untuk industri farmasi, kosmetik, suplemen makanan, dan pakan ternak [2]. *Nannochloropsis sp.* merupakan salah satu jenis dari mikroalga yang menghasilkan produk utama lipid [3]. Pemanfaatan mikroalga jenis ini di Indonesia hanya sebatas sebagai pakan ternak ikan dan udang. Kandungan minyak dari *Nannochloropsis sp.* berkisar antara 31–68 % dari berat keringnya [4].

Penelitian tentang bahan bakar alternatif telah banyak dilakukan. Biodiesel merupakan salah satu sumber energi alternatif yang dapat disintesis dari berbagai macam minyak nabati. Biodiesel/metil ester asam lemak dapat disintesis melalui beberapa metode, salah satunya yaitu dengan reaksi transesterifikasi. Tipe katalis dalam reaksi transesterifikasi dapat digolongkan dalam katalis asam, katalis basa, dan katalis enzim. Laju reaksi transesterifikasi dengan katalis basa lebih cepat dibandingkan dengan katalis asam [5]. Kalium hidroksida dan kalium karbonat merupakan katalis basa yang biasa digunakan dalam industri pembuatan biodiesel [6].

Xu *dkk.* [7] telah melakukan sintesis biodiesel dari minyak mikroalga jenis *Chlorella protothecoides* menggunakan katalis asam dan diketahui bahwa hasilnya sesuai dengan standar ASTM (*American Society for Test and Material*), namun di sisi lain produk utama dari *Chlorella* adalah protein. Oleh karena itu pada penelitian ini akan digunakan minyak dari mikroalga jenis *Nannochloropsis sp.* untuk sintesis biodiesel dengan menggunakan katalis kalium hidroksida maupun kalium karbonat.

Pemakaian katalis basa dalam reaksi transesterifikasi sangat dipengaruhi oleh air dan asam lemak yang tinggi. Bila angka asam tinggi maka diperlukan basa yang lebih banyak untuk menetralkan asam lemak bebas. Keberadaan air dapat menghidrolisis metil ester yang terbentuk dan mengakibatkan terjadinya penyabunan [5]. Katalis kalium hidroksida akan menghasilkan produk samping air saat diaduk bersama alkohol, sedangkan katalis kalium karbonat akan menghasilkan produk samping bikarbonat. Diharapkan dengan pemakaian katalis basa ini pada kondisi minyak tanpa penurunan asam lemak bebas akan diketahui katalis basa yang paling optimum untuk sintesis biodiesel dari minyak mikroalga jenis *Nannochloropsis sp.*

Syarat suatu bahan bakar dapat digunakan di Indonesia, haruslah sesuai dengan standar yang dikeluarkan oleh Dirjen Migas. Biodiesel yang saat ini berada di pasaran merupakan biodiesel B5, yaitu campuran biodiesel 5% dan minyak solar 95%. Untuk mengetahui kesesuaian biodiesel mikroalga dengan spesifikasi solar sesuai standar Dirjen Migas, maka dilakukan verifikasi kelayakan biodiesel B5 mikroalga melalui uji standar ASTM [8].

2. Metodologi

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan adalah bubur mikroalga dengan kadar air yang sangat besar. Kadar air sampel dikurangi dengan pengeringan menggunakan oven pada temperatur $\pm 100^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh mikroalga dalam bentuk gel.

Isolasi Minyak dari Mikroalga

Sebelum isolasi minyak dilakukan, sampel digerus terlebih dahulu dengan penggerus bermotor untuk memecahkan dinding sel mikroalga. Proses penggerusan dinding sel dibantu dengan penambahan pasir halus untuk memperbesar luas permukaan kontak dengan dinding sel mikroalga (Wiltshire, 2000). Penambahan pasir sebanyak 1:3 terhadap berat mikroalga. Kemudian 200 g mikroalga (150 g mikroalga + 50 g pasir) dalam *thimble* dimasukkan ke dalam labu ekstraktor soklet untuk isolasi minyak dan diekstraksi sampai tetesan pelarut menjadi jernih. Pelarut yang digunakan adalah n-heksan. Ekstrak yang diperoleh lalu diuapkan pelarutnya dengan destilasi sehingga didapatkan minyak mikroalga.

Transesterifikasi

Proses transesterifikasi dilakukan variasi penggunaan katalis, yaitu kalium hidroksida (KOH) dan kalium karbonat (K_2CO_3). Reaksi transesterifikasi dilakukan dengan menggunakan rasio molar metanol/minyak 7:1, masing-masing dengan katalis KOH 1% b/b [9] dan K_2CO_3 3% b/b [6], waktu reaksi 2 jam, temperatur 50°C , dan kecepatan pengadukan dijaga konstan 150 rpm. Setelah reaksi berjalan 2 jam, pengadukan dihentikan, campuran yang terbentuk didiamkan pada temperatur kamar. Untuk memisahkan metil ester dari gliserol dan sisa katalis, dilakukan sentrifuse pada putaran 150 rpm selama 20 menit. Selanjutnya didistilasi sampai temperatur $74 - 80^{\circ}\text{C}$ untuk menghilangkan sisa metanol. Kemudian metil ester dikeringkan dengan penambahan Na_2SO_4 anhidrat.

Analisis Hasil

Komposisi biodiesel/metil ester asam lemak yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan GC-MS. Untuk mengetahui efektifitas penggunaan katalis KOH dan K_2CO_3 pada reaksi transesterifikasi dapat diketahui dari perbandingan luas puncak pada $\delta \pm 3,7$ ppm hasil analisis ^1H NMR yang mengindikasikan kelimpahan proton metoksi dari metil ester. Selanjutnya kualitas biodiesel diuji dengan mencampurkan 5% biodiesel dan minyak solar 95% (disebut B5). Untuk menetapkan kesesuaian biodiesel yang dihasilkan sebagai bahan bakar alternatif pengganti minyak solar, dilakukan analisis dengan beberapa metode uji ASTM yang tertera dalam spesifikasi bahan bakar minyak jenis minyak solar 48, meliputi viskositas kinematik 40°C (ASTM D 445), dan kerapatan spesifik $60/60^{\circ}\text{F}$ (ASTM D 1298) [8].

3. Hasil dan Pembahasan

Isolasi Minyak Mikroalga

Isolasi minyak dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksan (dalam hal ini minyak berada dalam fraksi lipid). Ekstrak n-heksan yang diperoleh berwarna kuning bening yang menandakan bahwa telah terisolasi fraksi lipid dan terlarut dalam n-heksan. Fraksi lipid yang terlarut dalam n-heksan dipisahkan menggunakan prinsip perbedaan titik didih dengan cara destilasi. Fraksi lipid yang diperoleh sebanyak 23,793 gram dengan rendemen 5,28 %. Sedikitnya fraksi lipid yang diperoleh dikarenakan fraksi lipid belum terisolasi seluruhnya, dimana secara terus menerus pada setiap soklet, terus menunjukkan adanya fraksi lipid yang terisolasi. Selain itu adanya dinding sel yang belum pecah dapat menyebabkan tidak terisolasinya kandungan lipid sebagian mikroalga. Senyawa-senyawa penyusun fraksi lipid dapat diketahui dari analisis GC-MS hasil transesterifikasi, antara lain asam lemak (penyusun trigliserida/minyak), asam flatat, hirdokarbon, terpen, dan siloksan.

Transesterifikasi Minyak Mikroalga

Pada penelitian ini, reaksi transesterifikasi dilakukan dengan variasi penggunaan katalis KOH dan K_2CO_3 untuk mengetahui pengaruh penggunaan katalis kalium hidroksida dan kalium karbonat pada proses transesterifikasi (tanpa penurunan asam lemak bebas) terhadap keberhasilan reaksi ditinjau dari hasil metil ester yang terbentuk. Prinsip dari reaksi ini adalah pengubahan triester (dari gliserol (trigliserida) menjadi ester lainnya melalui pertukaran gugus alkoksi. Transesterifikasi trigliserida (sebagai komponen utama lemak/minyak) dengan alkohol menggunakan bantuan katalis basa akan menghasilkan alkil ester dan gliserol. Untuk memperoleh hasil ester maksimal, reaksi dapat digeser ke arah pembentukan produk dengan cara menggunakan reaktan (alkohol) berlebih.

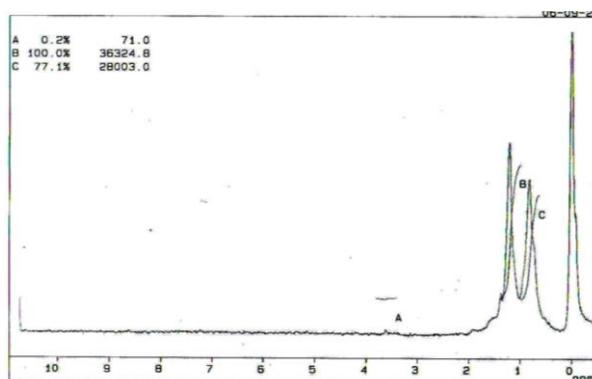
Pada pengadukan antara metanol dan KOH, pembentukan air sebagai hasil reaksi antara hidroksida dengan alkohol tidak dapat dihindari. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis terhadap trigliserida ataupun produk ester yang dihasilkan sehingga terbentuk sabun. Hasil transesterifikasi menunjukkan adanya 2 lapisan yang tidak saling campur, dimana metil ester berada pada lapisan atas dan lapisan bawah merupakan pengotor (campuran gliserol dan garam asam lemak). Metil ester yang terbentuk seberat 2,954 g dan pengotor (campuran gliserol dan garam asam lemak) seberat 1,379 g. Perbandingan antara metil ester dan pengotor yaitu 68,22 % : 31,85 %. Metil ester yang sedikit dan banyaknya pengotor menunjukkan adanya hidrolisis dan penyabunan akibat pembentukan air dan adanya pembentukan garam akibat tingginya asam lemak bebas. Hal ini diperkuat dengan hasil pengukuran angka asam yang menunjukkan hasil relatif tinggi yaitu 6,07 %.

Pengadukan antara metanol dan K_2CO_3 untuk menghasilkan ion metoksida akan menghasilkan bikarbonat sebagai hasil samping. Penggunaan katalis

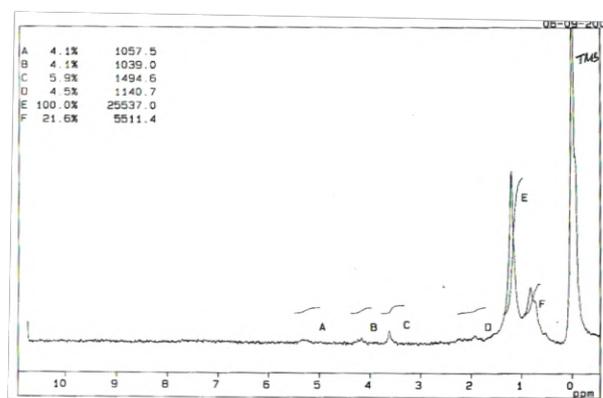
ini dapat mengurangi penyabunan, karena reaksi antara kalium karbonat dengan metanol akan tidak menghasilkan air. Hasil transesterifikasi menunjukkan adanya 2 lapisan yang tidak saling campur, dimana metil ester berada pada lapisan atas dan lapisan bawah merupakan pengotor (campuran gliserol dan garam asam lemak). Metil ester yang terbentuk seberat 3,1 g dan campuran gliserol dan garam asam lemak seberat 0,9 g. Perbandingan antara metil ester dan pengotor yaitu 77,5 % : 22,5 %. Metil ester yang terbentuk cukup banyak, hal ini mengindikasikan selama proses transesterifikasi tidak ada hidrolisis karena pada pengadukan antara metanol dan K_2CO_3 tidak menghasilkan air tetapi bikarbonat. Pengotor sebanyak 22,5 % mengindikasikan banyaknya garam asam lemak yang terbentuk akibat tingginya asam lemak bebas. Hal ini diperkuat dengan hasil pengukuran angka asam yang menunjukkan hasil relatif tinggi yaitu 6,07 %.

Pengaruh Katalis terhadap Produk Transesterifikasi

Analisis pembentukan biodiesel (metil ester) dilakukan dengan menggunakan 1H NMR (60 MHz). Spektra 1H NMR dari minyak hasil transesterifikasi disajikan pada gambar 3.1 dan 3.2. Untuk menentukan pengaruh penggunaan katalis, dilakukan dengan membandingkan kelimpahan puncak pada $\delta \pm 3,7$ ppm (*singlet*). Puncak pada $\delta \pm 3,7$ ppm merupakan proton metil ester yaitu proton pada CH_3 yang terikat pada OCOR.

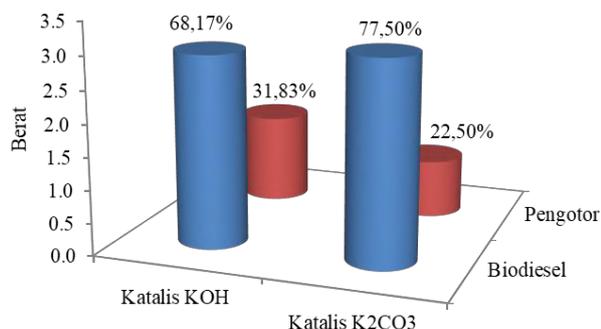


Gambar 1. Spektra 1H NMR hasil transesterifikasi dengan katalis KOH



Gambar 2. Spektra 1H NMR hasil transesterifikasi dengan katalis K_2CO_3

Spektra ¹H NMR dari reaksi transesterifikasi menggunakan katalis KOH dan K₂CO₃ menunjukkan adanya puncak pada δ ± 3,7 ppm yang mengindikasikan terbentuknya metil ester. Perbandingan luas puncak δ ± 3,7 ppm pada penggunaan katalis KOH dan K₂CO₃ adalah 71,0 : 1494,6, hal ini menunjukkan kelimpahan metil ester pada penggunaan katalis KOH jauh lebih kecil dari kelimpahan metil ester pada penggunaan katalis K₂CO₃. Kecilnya kelimpahan metil ester pada penggunaan katalis KOH disebabkan adanya hidrolisis terhadap produk metil ester.

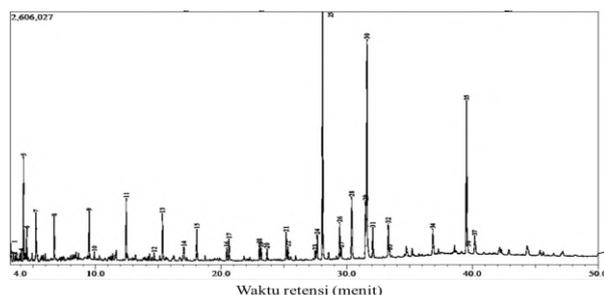


Gambar 3. Hubungan antara biodiesel dan pengotor yang terbentuk dengan katalis

Gambar di atas menunjukkan bahwa produk metil ester yang terbentuk pada transesterifikasi menggunakan katalis KOH lebih sedikit dan pengotor yang terbentuk lebih banyak daripada hasil transesterifikasi menggunakan katalis K₂CO₃. Hasil analisis menggunakan ¹H NMR diperkuat dengan hasil penimbangan berat terhadap produk transesterifikasi ini. Kondisi ini disebabkan terbentuknya air pada transesterifikasi menggunakan katalis KOH yang menyebabkan metil ester yang telah terbentuk terhidrolisis oleh air menjadi asam lemak bebas dan kemudian terkonversi menjadi garam asam lemak. Tingginya asam lemak bebas pada minyak ikut berperan dalam pembentukan garam asam lemak.

Analisis komposisi asam lemak penyusun minyak mikroalga

Untuk mengetahui komposisi asam lemak penyusun minyak mikroalga, dilakukan analisis GC-MS terhadap metil ester hasil transesterifikasi minyak mikroalga (katalis KOH). Pada analisis dengan GC, diperoleh tiga puluh tujuh (37) puncak seperti disajikan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Kromatogram GC metil ester hasil transesterifikasi minyak mikroalga dalam media metanol menggunakan katalis KOH

Analisis dengan MS menghasilkan fragmentasi yang khas untuk senyawa metil ester. Analisis MS menunjukkan bahwa dalam minyak terdapat 6 puncak metil ester yang menunjukkan asam lemak penyusun minyak mikroalga dan 31 puncak lainnya merupakan campuran puncak-puncak dari hidrokarbon, terpen, alkohol, asam ftalat dan siloksan.

Tabel 1. Komposisi asam lemak minyak mikroalga yang digunakan sebagai bahan baku

Asam lemak	Nama sistematik	Struktur ^a	Rumus molekul	Kadar %
Asam Miristat	Asam Tetradekanoat	14:0	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	0,74
Asam Palmitoleat	Asam 9-Heksadekanoat	16:1	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	1,57
Asam Palmitat	Asam Heksadekanoat	16:0	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	17,61
Asam linolelaidat	Asam 9,12-Octadekadienoat	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	3,99
Asam Elaidat	11-Oktadekanoat	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	15,49
Asam Stearat	Asam Oktadekanoat	18:0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1,94

^axx : y mengindikasikan bahwa jumlah karbon dalam asam lemak adalah xx dengan jumlah ikatan rangkap y

Tabel 1 menunjukkan bahwa asam lemak yang dominan dalam minyak mikroalga yang digunakan adalah asam palmitat (17,61 %) dan asam elaidat (15,49 %). Metil palmitat memiliki berat molekul 270 dengan rumus CH₃(CH₂)₁₄COOCH₃. Berdasarkan data komposisi metil ester minyak mikroalga maka dapat ditentukan bahwa berat molekul minyak mikroalga (dalam bentuk trigliseridanya) adalah 344,48 g.mol⁻¹.

Analisis Sifat Fisik Biodiesel Mikroalga (B5)

Beberapa karakter fisik biodiesel diuji menggunakan metode standar ASTM. Biodiesel yang terbentuk *diblending*/dicampur dengan solar menjadi biodiesel B5, yaitu campuran dengan perbandingan biodiesel terhadap solar adalah 5 % : 95%. Sifat biodiesel B5 mikroalga ini kemudian diuji menggunakan metode standar ASTM dan dibandingkan dengan hasil uji sifat fisik terhadap minyak yang lain, yaitu minyak solar, biodiesel B5 minyak sawit dan biodiesel B5 Pertamina. Hasil yang didapatkan dari analisis menggunakan ASTM ini digunakan untuk mengetahui apakah biodiesel mikroalga dapat digunakan atau tidak sebagai bahan bakar alternatif. Apabila karakter fisik biodiesel ini telah memenuhi spesifikasi standar maka biodiesel ini telah dapat digunakan sebagai pengganti bahan bakar diesel.

a. Viskositas kinematik

Nilai viskositas biodiesel telah diuji menggunakan metode analisis ASTM D 445 pada temperatur 40°C.

Tabel 2. Hasil uji sifat viskositas kinematik pada suhu 40°C

Sifat	Metode	Solar Murni	Biosolar Sawit (B5)	Biosolar Mikroalga (B5)	Biosolar Pertamina (B5)	Standar Dirjen Migas
Viskositas kinematik, 40°C (mm ² .s ⁻¹)	D 445	4,59	4,62	4,71	3,34	2,0 - 5,0

Berdasarkan nilai viskositas dari sampel yang diuji, menunjukkan bahwa dengan penambahan biodiesel akan menaikkan nilai viskositas. Semua biodiesel mempunyai viskositas yang lebih besar dari minyak diesel/solar [10]. Viskositas yang besar dikarenakan besarnya berat molekul dan struktur kimia [11]. Besarnya berat molekul biodiesel menyebabkan penambahan biodiesel pada solar akan menaikkan viskositas. Viskositas dari biodiesel mikroalga (B5) pada 40°C telah memenuhi batasan nilai viskositas solar sesuai spesifikasi Minyak Solar 48 menurut Dirjen Migas.

b. Kerapatan spesifik (*Specific Gravity*), 60/60°F

Uji kerapatan spesifik pada 60/60 °F atau density pada 15°C telah dilakukan terhadap semua sampel minyak dengan metode analisis ASTM D 1298.

Tabel 3. Hasil uji sifat density/berat jenis pada suhu 15°C

Sifat	Metode	Solar Murni	Biosolar Sawit (B5)	Biosolar Mikroalga (B5)	Biosolar Pertamina (B5)	Standar Dirjen Migas
Berat Jenis, 15°C (kg. cm ⁻³)	D 1298	858	860	862	853	815 - 870

Berdasarkan nilai berat jenis pada suhu 15°C dari sampel yang diuji, menunjukkan bahwa dengan penambahan biodiesel akan menaikkan nilai berat jenis. Nilai kerapatan spesifik/berat jenis tergantung dari komposisi asam lemak penyusun dan kemurniannya. Berat jenis dapat digunakan sebagai indikator angka cetana dan kalor pembakaran, karena mempunyai korelasi yang sama [12]. Berat jenis/density dari Biodiesel mikroalga (B5) pada suhu 15°C telah memenuhi batasan nilai berat jenis solar sesuai spesifikasi Minyak Solar 48 menurut Dirjen Migas, yaitu 815 – 870 kg.cm⁻³.

4. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Diperoleh ekstrak minyak dalam fraksi lipid sebanyak 23,793 gram dengan rendemen 5,28 %. Asam lemak penyusun minyak antara lain asam miristat, palmitoleat, palmitat, linolelaidat, elaidat, dan stearat dengan kandungan asam lemak tertinggi asam palmitat.
2. Penggunaan katalis K₂CO₃ pada transesterifikasi minyak mikroalga (kondisi tanpa penurunan asam lemak bebas) jauh lebih efektif daripada menggunakan katalis KOH. Produk metil ester yang terbentuk lebih banyak daripada produk metil ester pada penggunaan katalis KOH.
3. Biodiesel mikroalga (B5) mempunyai sifat fisik viskositas kinematik 40°C sebesar 4,71 mm².s⁻¹ dan density 15°C sebesar 862 kg.cm⁻³. Sifat fisik biodiesel mikroalga ini telah memenuhi spesifikasi minyak solar 48 (Dirjen Migas).

5. Daftar Pustaka

- [1] John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann, Paul Roessler, A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae, National Renewable Energy Laboratory, 328, (1998)
- [2] Diana J. Bowles, Micro- and macro-algae: utility for industrial applications : outputs from the EPOBIO project, CPL Press, 2007.
- [3] D. A. Feinberg, Fuel options from microalgae with representative chemical compositions, in, Solar Energy Research Inst., Golden, CO (USA), 1984.
- [4] Yusuf Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, 3, (2007) 294-306 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001>
- [5] Fangrui Ma, Milford A. Hanna, Biodiesel production: a review *Journal Series #12109*, Agricultural Research Division, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln.1, *Bioresource Technology*, 70, 1, (1999) 1-15 [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00025-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00025-5)
- [6] Ulf Schuchardt, Ricardo Sercheli, Rogério Matheus Vargas, Transesterification of vegetable oils: a review, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 3, (1998) 199-210
- [7] Han Xu, Xiaoling Miao, Qingyu Wu, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *Journal of Biotechnology*, 126, 4, (2006) 499-507 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>
- [8] ASTM, Annual Book of ASTM Standards 2006 - Section Five - Petroleum Products, Lubricants, and Fossil Fuels - Volume 05.05 (Test Methods for Rating Motor, Diesel, and Aviation Fuels; Catalysts; Manufactured Carbon and Graphite Products), ASTM International, 2006.

- [9] D. Darnoko, Munir Cheryan, Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 12, (2000) 1263-1267 <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-000-0198-y>
- [10] John A Kinast, *Production of biodiesels from multiple feedstocks and properties of biodiesels and biodiesel/diesel blends*, National Renewable Energy Laboratory USA, 2003.
- [11] Anjana Srivastava, Ram Prasad, Triglycerides-based diesel fuels, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 4, 2, (2000) 111-133 [http://dx.doi.org/10.1016/S1364-0321\(99\)00013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1364-0321(99)00013-1)
- [12] Mustafa E. Tat, Jon H. Van Gerpen, The kinematic viscosity of biodiesel and its blends with diesel fuel, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 12, (1999) 1511-1513 <http://dx.doi.org/10.1007/s11746-999-0194-0>