

STUDI TENTANG PERTUMBUHAN MIKROALGA *Chlorella Vulgaris* YANG DIKULTIVASI BERDASARKAN SUMBER CAHAYA YANG BERBEDA

Teni Novianti¹⁾, Muhammad Zainuri²⁾, dan Ita Widowati³⁾
Universitas Diponegoro

ABSTRAK

Chlorella vulgaris termasuk salah satu jenis fitoplankton dalam kelas *Chlorophyceae* (alga hijau) yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen dan pakan alami. Untuk memaksimalkan pertumbuhan *Chlorella vulgaris* yang dapat menghasilkan biomassa membutuhkan sumber cahaya buatan terbaik.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pola pertumbuhan *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada sumber cahaya yang berbeda.

Hasil penelitian menunjukkan penggunaan sumber cahaya neon yang ditambahkan LED berwarna merah, hijau dan biru dengan kepadatan awal inokulum 100×10^4 sel/ml memperoleh hasil pertumbuhan *Chlorella vulgaris* tertinggi pada sumber cahaya LED merah sebesar 11.500×10^4 sel/ml. Hasil pengukuran kualitas air selama penelitian yaitu DO berkisar antara 6-7 ppm, suhu air berkisar antara 27-29 °C, pengukuran salinitas pada media kultur *Chlorella vulgaris* berkisar antara 30-32 ppt dan pH berkisar antara 7-8.

Kata Kunci : *Chlorella vulgaris*, Sumber Cahaya, LED, Pertumbuhan

PENDAHULUAN

Chlorella vulgaris merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas *Chlorophyceae*, terdapat di perairan Indonesia dan sudah dapat dibudidayakan untuk dikonsumsi oleh ikan, udang, kerang dan ikan hias sebagai pakan alami (Gusrina, 2008). Selain memiliki nilai gizi yang baik dan mudah dicerna oleh larva, penambahan pakan alami *Chlorella vulgaris* terhadap post larva udang Windu dapat meningkatkan bobot udang serta meningkatkan daya tahan tubuh sehingga larva udang Windu (*Penaeus monodon*) dapat memiliki kemampuan hidup yang lebih baik dan lebih mampu bertahan pada kematian (Kusumaningrum dan Zainuri, 2013) Hal ini dikarenakan *Chlorella vulgaris* memiliki senyawa-senyawa bioaktif alami seperti karotenoid, senyawa fenol, sulfat polisakarida dan vitamin yang salah satu fungsi dari senyawa bioaktif tersebut dapat mempengaruhi regulasi sel, respon kekebalan tubuh dan sebagai antioksidan (de Fretes *et al.*, 2012).

Chlorella vulgaris bersifat fotoautotrof sehingga membutuhkan cahaya sebagai sumber energi untuk pertumbuhan sel dan sintesis berbagai substansi penting yang terlibat di dalamnya. Karakteristik sumber cahaya seperti panjang gelombang dan intensitas menjadi salah satu faktor kritis yang memengaruhi produksi *Chlorella vulgaris* maupun mikroalga pada umumnya (Blanken *et al.*, 2013). Kualitas cahaya merupakan faktor yang dapat mempengaruhi kehidupan mikroalga, salah satunya adalah jenis atau sumber cahaya yang memiliki panjang gelombang antara 400-700 nm (Facta *et al.*, 2006).

Penggunaan gelombang cahaya tertentu yang dominan dalam proses fotosintesis maupun kombinasinya memberikan peluang yang menjanjikan untuk meningkatkan produksi (biomassa) maupun kualitas (kandungan nutrisi, pigmen, senyawa bioaktif) mikroalga, sekaligus merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi energi (Yan *et al.*, 2013 ; Zhao *et al.*, 2013). *Light emitting diode* (LED) merupakan kandidat sumber cahaya

artifisial yang ideal. Beberapa karakteristik penting LED sebagai sumber cahaya artifisial dalam produksi mikroalga antara lain masa penggunaan lebih lama, bebas merkuri, lebih hemat energi, dan menghasilkan cahaya monokromatis dengan panjang gelombang tertentu (Blanken *et al.*, 2013; Teo *et al.*, 2014).

Produksi mikroalga dalam skala komersial umumnya menggunakan cahaya matahari sebagai sumber pencahayaan. Cahaya matahari dapat diperoleh secara bebas dan terdapat dalam jumlah melimpah sehingga dapat menekan biaya produksi. Meskipun demikian, penggunaannya dibatasi oleh siklus harian siang-malam, kerentanan terhadap perubahan cuaca dan musim, serta karakteristik lokasi (Blanken *et al.*, 2013). Dinamika faktor-faktor tersebut dapat memengaruhi produktivitas dan kualitas produk yang dihasilkan.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pola pertumbuhan yang dikultivasi pada sumber cahaya yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

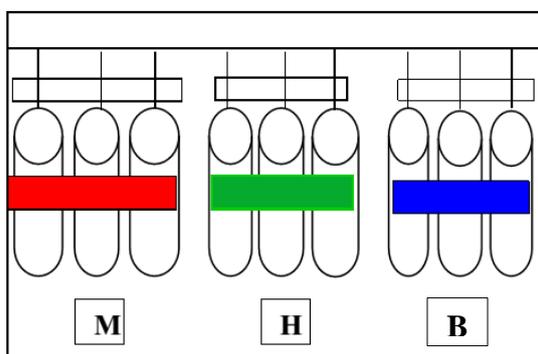
Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Juni 2017, bertempat di Laboratorium budidaya perikanan, Fakultas Teknologi Kelautan dan Perikanan, Universitas Nahdlatul Ulama Cirebon dan PT. Indocemen Cirebon.

Organisme Uji

Chlorella vulgaris diperoleh dari kultur murni Laboratorium Pakan Alami Budidaya Air Payau, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPAP) Jepara, Jawa Tengah dan selanjutnya ditumbuhkan dalam medium Walne (Zainuri *et al.*, 2014).

Perlakuan Uji

Chlorella vulgaris dengan kepadatan awal inokulum 100×10^4 sel/ml dikultur dalam botol kaca (*becker glass*) dengan volume media 3000 ml, intensitas cahaya sekitar 2.000-4000 lux. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan masing-masing tiga ulangan. Perlakuan uji yang diberikan adalah sumber cahaya buatan menggunakan 3 lampu neon putih (Phillips TL-D 36 W) sekitar 2000 lux penyinaran selama pengamatan dan penambahan LED merah (M) dengan panjang gelombang 630-700 nm, LED hijau (H) dengan panjang gelombang 490-560 nm dan LED biru (B) dengan panjang gelombang 430-490 nm (CE ROHS/Emico 16 W) diinduksi sebagai stres cahaya dengan fluks 1000-2000 lux dilakukan selama 12 jam/hari.



Gambar 1. Skema penelitian : perlakuan neon yang ditambahkan LED merah (M) ; perlakuan LED hijau (H) ; perlakuan LED biru (B)

Kepadatan Sel

Kepadatan sel *Chlorella vulgaris* dihitung dengan bantuan hemositometer Neubauer Improved dan mikroskop Olympus pada perbesaran lensa objektif 40x. Sampel sebanyak 1

ml diambil dari bagian tengah dengan kedalaman 20 cm dari permukaan. Pengamatan sel pada hemositometer dilakukan empat kali ulangan pada setiap bidang pandang hemositometer. Kepadatan sel dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$N = n \times 10^4$$

di mana :

N = kelimpahan fitoplankton (sel/ml) ;

n = Jumlah organisme

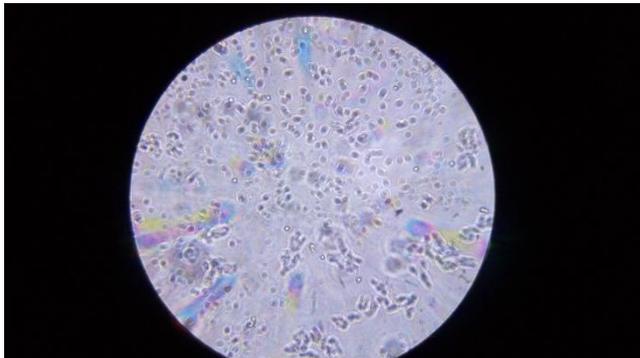
Analisis Data

Hasil dari data keseluruhan dilakukan pengolahan data menggunakan analisis ragam atau *analysis of variance* (ANOVA) yang sebelumnya terlebih dahulu dilakukan uji normalitas, uji homogenitas dan uji additivitas. Selanjutnya apabila ada perbedaan maka diuji lanjut dengan uji Tukey berdasarkan nilai signifikansi $p < 0,05$ atau pada tingkat kepercayaan 95%. Dalam pengolahan data menggunakan SPSS 20.0 for windows

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi *Chlorella vulgaris*

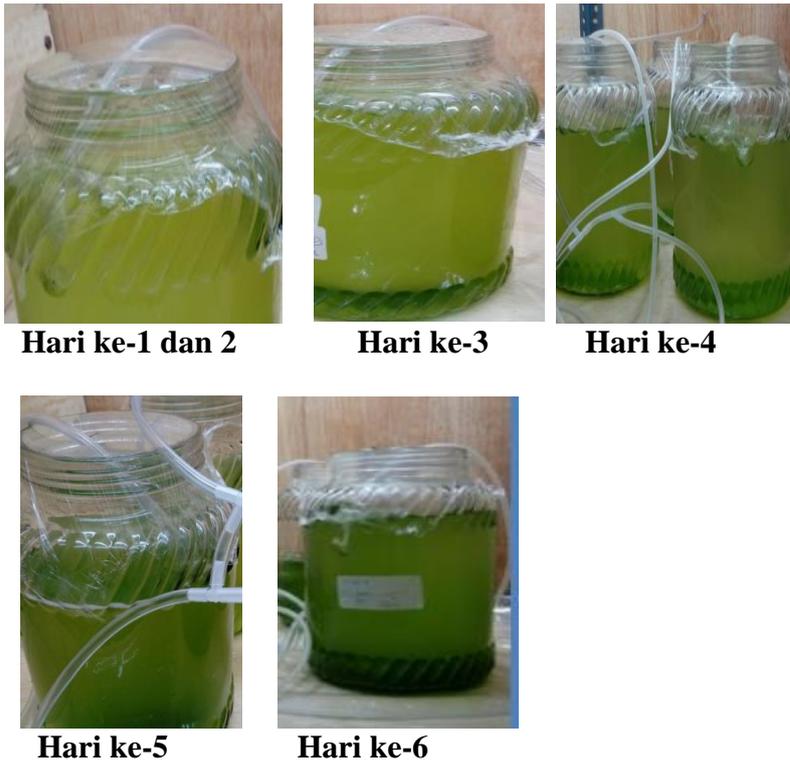
Mikroalga *Chlorella vulgaris* merupakan alga bersel tunggal (*uniceluler*), diameter selnya berkisar antara 2-8 mikron, bentuk sel bulat seperti telur, berwarna hijau karena memiliki pigmen klorofil yang dominan dibandingkan pigmen yang lain. *Chlorella vulgaris* dapat bergerak tetapi sangat lambat sehingga pada pengamatan seakan-akan tidak bergerak. Morfologi *Chlorella vulgaris* berdasarkan hasil pengamatan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Sel *Chlorella vulgaris* perbesaran 10x40

Pertumbuhan *Chlorella vulgaris*

Perkembangan kepadatan sel *Chlorella vulgaris* yang teramati dalam penelitian ini meliputi fase *lag* (adaptasi), fase eksponensial (fase logaritmik), fase penurunan laju pertumbuhan (fase deklinasi), dan fase stasioner. Pada setiap fase nya mikroalga *Chlorella vulgaris* mengalami perubahan warna pada media kultur. Adapun pengamatan perubahan warna tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengamatan Perubahan Warna *Chlorella vulgaris* pada media kultur

Pada umur kultur hari ke-1 dan 2, media *Chlorella vulgaris* terlihat masih berwarna hijau bening, setelah hari ke 3 media *Chlorella vulgaris* sudah mulai terlihat perubahan warna menjadi hijau muda dengan adanya biomassa yang mengendap di bawah atau dasar media kultur. Pada umur kultur hari ke-4 dan ke-5 terjadi perubahan warna hijau muda menjadi hijau lebih tua dari sebelumnya. Setelah hari ke-5 warna semakin hijau mendekati pekat dengan biomassa yang semakin terlihat jelas dan banyak di sekitar dasar media kultur.

Selain itu hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur *Chlorella vulgaris* pada media walne mengalami peningkatan kelimpahan sel yang tinggi pada perlakuan sumber cahaya LED merah dibandingkan dengan LED hijau dan biru. Rerata kelimpahan sel *Chlorella vulgaris* selama penelitian pada masing-masing perlakuan sumber cahaya yang berbeda dapat dilihat pada tabel 1. Rerata kelimpahan sel *Chlorella vulagris* dengan pemberian LED merah sebesar 11.500×10^4 sel/ml dihari keempat kultur.

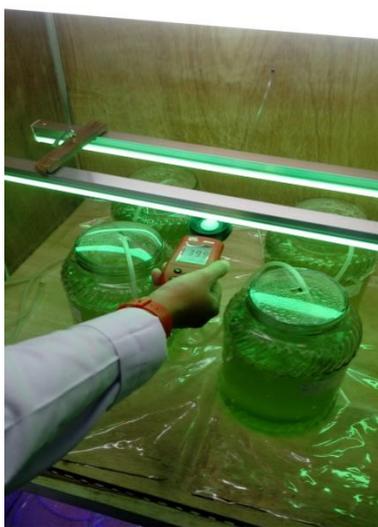
Tabel 1. Rerata Hasil Kepadatan Pertumbuhan Sel *Chlorella vulgaris* pada Sumber Cahaya yang Berbeda

Kode	Umur Kultur Hari Ke-		
	1	2	3
M	2500×10^4	2750×10^4	10.000×10^4
H	2500×10^4	2625×10^4	5250×10^4
B	2500×10^4	2550×10^4	5500×10^4
Kode	Umur Kultur Hari Ke-		
	4	5	6
M	11.500×10^4	8750×10^4	9000×10^4
H	10.125×10^4	6250×10^4	7250×10^4
B	10.000×10^4	7500×10^4	7750×10^4

Keterangan : M = LED Merah, H = LED Hijau ; B = LED Biru

Berdasarkan hasil pengamatan, sel hampir tidak mengalami fase adaptasi, hal ini dikarenakan pada saat dilakukan kultivasi stok kultur berada pada fase logaritmik, sehingga sel-sel yang diinokulasikan beradaptasi terhadap media kultur yang baru. Pertumbuhan sel yang diamati setiap hari hingga mencapai fase stasioner, yaitu hari ke-6. Setelah kultur mencapai fase stasioner dilakukan pemanenan, hal ini dikarenakan pada fase ini pembentukan senyawa metabolit sekunder seperti fenol, alkaloid, karotenoid, dll yang dapat berpotensi sebagai senyawa antioksidan telah mencapai maksimum (Barriyah *et al.*, 2013).

Hasil pengamatan pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dengan perlakuan sumber cahaya neon (sebagai sumber cahaya tetap) yang ditambahkan sinar LED berwarna merah, hijau dan biru berpengaruh signifikan terhadap kepadatan sel ($P < 0,05$). Hasil penelitian memperlihatkan perlakuan pencahayaan LED merah konsisten memberikan hasil terbaik dengan kisaran intensitas cahaya 2000-4000 lux. Adapun pengukuran intensitas cahaya (Gambar 4) menggunakan lux meter HS 1010 dengan resolusi 1 lux.



Gambar 4. Pengukuran intensitas cahaya

Media kultur air laut yang menggunakan media Walne dengan perlakuan sumber cahaya biru menunjukkan jumlah pertumbuhan sel yang signifikan, hal ini dikarenakan *Chlorella vulgaris* masih mengalami fase adaptasi. Pertumbuhan signifikan mulai terjadi pada hari ketiga, yang berarti proses pembelahan sel yang terjadi mulai optimal. Setelah proses pembelahan sel mencapai puncak, maka tidak terjadi proses pembelahan sel lagi, yang artinya laju pertumbuhan seimbang dengan laju kematian. Tahap stasioner mulai terjadi pada hari ke-6 dikarenakan jumlah pertumbuhan sel fitoplankton dalam media kultur semakin banyak, namun jumlah kandungan nutrisi dalam media semakin menurun. Selain itu pada tahap stasioner foton cahaya yang dihasilkan tidak mampu diserap atau dimanfaatkan secara maksimal oleh mikroalga. Selanjutnya *Chlorella vulgaris* mengalami tahap kematian, yaitu penurunan jumlah sel dikarenakan laju kematian sel lebih tinggi daripada laju pertumbuhan sel sehingga kepadatan populasi semakin menurun.

Menurut Kimball (2000), proses fotosintesis yang dihasilkan oleh mikroalga dengan cara mereaksikan karbondioksida dan air menjadi gula dengan bantuan energi cahaya matahari dan klorofil. Fotosintesis merupakan proses biologi yang kompleks, proses ini menggunakan nutrisi dan energi cahaya yang dapat dimanfaatkan oleh klorofil yang terdapat dalam kloroplas. Hasil penggunaan sinar LED dengan warna merah, hijau dan biru menghasilkan pertumbuhan tertinggi dengan LED merah karena warna merah dapat menghasilkan karoten a yang dapat mempercepat proses pertumbuhan. Hal ini sesuai

dengan hasil penyelidikan Thomas-Hill *et al.*, (2007) yang menyinari mikroalga *Chlorella* berganti-ganti dengan sinar merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila dan ungu maka hasil fotosintesis yang tertinggi adalah sinar merah. Untuk itu penelitian ini sesuai dengan apa yang dilakukan Thomas-Hill *et al.*, (2007) bahwa pertumbuhan mikroalga dengan memberikan sinar merah akan tumbuh dengan cepat dibandingkan dengan sinar lainnya.

Hal tersebut diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Facta *et al.*, (2006) bahwa keseimbangan spektrum lampu neon sangat baik bila dibandingkan dengan lampu pijar. Bentuk lampu memungkinkan penyebaran cahaya yang baik, dengan panas yang dikeluarkan relatif rendah. Diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Koc *et al* (2013), menunjukkan cahaya yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga adalah pada spektrum cahaya merah menggunakan sumber cahaya LED dengan panjang gelombang berkisar 630-700 nm.

Ditinjau dari aspek efisiensi pemanfaatan cahaya oleh kloroplas mikroalga, diketahui bahwa mikroalga menyerap semua cahaya yang diterima walaupun tidak semua foton dapat dimanfaatkan (Park dan Lee,2000). Hal tersebut tercermin pada hasil penelitian yang memperlihatkan variasi pada setiap perlakuan yang diujikan. Jumlah foton pada panjang gelombang biru atau merah yang dapat ditangkap oleh molekul klorofil mikroalga bergantung pada struktur sel, komposisi pigmen dan susunan kloroplas (Schulze *et al.*, 2014).

Komposisi pigmen pada *light-harvesting proteinpigment (LHP) complexes* kloroplas sianobakteria, terutama pada kelompok yang tidak memiliki klorofil, didominasi klorofil α (panjang gelombang maksimum yang diserap 430 nm dan 680 nm) dan fikobiliprotein tambahan seperti fikoeritrin (panjang gelombang maksimum yang diserap 550 nm), serta fikosianin (panjang gelombang maksimum yang diserap 620 nm) (Marriot dan Blankenship, 2011). Akibatnya, sianobakter mampu memanfaatkan spektrum cahaya merah, kuning, dan hijau, serta biru pada proporsi yang lebih rendah (Chen *et al.*, 2011;Itoh *et al.*, 2014). Spektrum cahaya biru dan hijau yang terpapar pada *Chlorella vulgaris* tidak dikonversi menjadi senyawa kimiawi atau energi untuk metabolisme, tetapi cenderung dipantulkan kembali atau diserap dalam proporsi yang rendah. Hal tersebut menjelaskan bahwa spectrum merah lebih efektif dimanfaatkan oleh *Chlorella vulgaris* dalam proses fotosintesis sehingga menghasilkan performa produksi terbaik dengan kepadatan sel tertinggi dibandingkan sumber cahaya yang lain.

Pengamatan Kualitas Air

Hasil pengamatan parameter kualitas air meliputi parameter suhu, salinitas, pH dan oksigen terlarut selama pemeliharaan disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengamatan Kisaran Kualitas Air

No	Kualitas Air	Rata-rata	Kisaran optimal
1	pH	7-8	4,5-9,3
2	Salinitas	30-32 ppt	30-35 ppt
3	Suhu	27-29 °C	25-30 °C
4	DO	6-7 ppm	5-7 ppm

Hasil tersebut menunjukkan kisaran optimal dan variabel kualitas air mendukung dalam pola pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris*. Suhu pada penelitian ini diukur menggunakan termometer, kisaran suhu pada medium penelitian berkisar antara 27-29 °C, menurut Isnansetyo dan Kurniastuti (1995) bahwa kisaran suhu optimal mikrolaga yaitu berkisar antara 25-30 °C. Salinitas pada penelitian ini diukur menggunakan *hand*

refractometer, salinitas pada medium penelitian berkisar antara 30-32 ppt, menurut Kawaroe (2010) kisaran salinitas optimal pada mikrolaga yaitu berkisar antara 30-35 ppt. Parameter pH pada penelitian ini diukur menggunakan pH meter dan mendapatkan hasil kisaran pH 7-8, menurut Effendi (2003) kisaran pH optimal pada mikroalga adalah 4,5-9,3. Parameter oksigen terlarut pada penelitian ini berkisar antara 6-7 ppm, menurut Facta *et al* (2006) kisaran oksigen terlarut optimal untuk mikroalga adalah 5-7 ppm.

SIMPULAN

Pengamatan parameter kualitas air meliputi parameter suhu, salinitas, pH dan oksigen terlarut menunjukkan kisaran optimal dan variabel kualitas air mendukung dalam pola pertumbuhan sel *Chlorella vulgaris*. Perbedaan sumber pencahayaan berpengaruh secara signifikan terhadap aspek produksi yaitu kepadatan sel *Chlorella vulgaris*. Pencahayaan menggunakan neon kombinasi LED merah secara konsisten menghasilkan produksi *Chlorella vulgaris* tertinggi dibandingkan perlakuan pencahayaan neon dengan LED hijau dan LED biru. Secara umum, LED merah layak diterapkan sebagai sumber pencahayaan alternatif dalam produksi *Chlorella vulgaris*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bariyyah, S.K., A.G. Fasya., M.Abidin dan A.Hanapi. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga Chlorella sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge*. Jurnal Alchemy UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Vol 2 (2). 150-204.
- Blanken, W., M. Cuaresma., R. H.Wijffels dan M. Janssen. 2013. *Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost*. Mikroalgal. Res, 2: 333-340.
- Chen, C.Y., K.L. Yeh., R. Aisyah., D.J. Lee., dan J.S. Chang. 2011. *Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review*. Bioresource Technology. 102. 71–81.
- De Fretes, H., AB. Susanto., B. Prasetyo dan L.Limantara. 2012. *Karotenoid dari Mikroalga dan Makroalga : Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Vol. XXIII (2), 221-228.
- Effendi, 2003. *Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan Perairan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Facta, M., M. Zainuri., Sudjadi dan E. P. Sakti. 2006. *Pengaruh Pengaturan Intensitas Cahaya yang Berbeda Terhadap Kelimpahan Dunaliella sp. dan Oksigen Terlarut dengan Simulator TRIAC dan Mikrokontroler AT89S52*. Jurnal Ilmu Kelautan Vol. 11 (2) : 67 – 71. ISSN 0853 – 7291.
- Gusrina. 2008. *Budidaya Ikan Jilid 2*. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Fitoplankton dan Zooplankton. Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Kanisius. Yogyakarta.
- Itoh, K.I., Nakamura, K., Aoyama, T., Kakimoto, T., Murakami, M., and Takido, T. 2014. *The influence*

of wavelength of light on cyanobacterial asymmetric reduction of ketone. Tetrahedron Lett., 55, 435-437.

Kawaroe, M., T. Prartono, W. Sari and Augustine. 2010. *Fatty Acid Content of Indonesian Aquatic Microalgae*. Hayati Journal of Bioscience. Vol 17 (4) : 196-200.

Kimball, J.W. 2000. *Biologi. Edisi Kelima Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.

Koc, C., G. A. Anderson and A. Kommareddy. 2013. *Use of Red and Blue Light-Emitting Diodes (LED) and Fluorescent Lamps to Grow Microalgae in a Photobioreactor*. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah, IJA_65.2013.797. 8 pages. ISSN 0792 - 156X.

Kusumaningrum, H.P dan M. Zainuri. 2013. *Aplikasi Pakan Alami Kaya Karotenoid untuk Post Larvae Penaeus monodon Fab*. Jurnal Ilmu Kelautan Vol. 18 (3) : 143-149. ISSN 0853-7291.

Marriott, M.F.H., and Blankenship, R.E. 2011. *Evolution of photosynthesis*. Annu. Rev. Plant Biol., 62, 515-548.

Park, K.H., and Lee, C.G. 2000. *Optimization of algal photobioreactors using flashing lights*. J. Biotechnol. Bioprocess Eng., 5, 186-190.

.Schulze, P.S.C., Barreira, L.A., Pereira, H.G.C. Perales, J.A., & Varela, J.C.S. 2014. *Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production*. Trends in Biotechnology, 32(8), 422-430.

Teo, C.L., A. Idris., S. Wahidin dan L.W. Lai. 2014. *Effect of Different Light Wavelength on the Growth of Marine Microalgae*. Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering) 67 (3) : 97–100.

Thomas-Hall, S., J.H. Mussgnug., J. Rupprecht., A. Foo., V. Klassen., A. McDowall., P. M. Schenk., O. Kruse and B. Hankamer. 2007. *Engineering Photosynthetic Light Capture Impact On Improved Solar Energy to Biomass Conversion*. Plant Biotechnol 5 : 802-814.

Yan, C., L. Zhang., X. Luo., dan Z. Zheng. 2013. *Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios*. Ecol. Eng 51 : 24-32.

Zainuri, M., H. P. Kusumaningrum and E. Kusdiyantini. 2014. *Microbiological and Ecophysiological Characterisation of Green Algae Dunaliella sp. for Improvement of Carotenoid Production*. Jurnal Natur Indonesia 10 (2) : 66-69.

Zhao, Y., J. Wang., H. Zhang., C. Yan dan Y. Zhang. 2013. *Effects of various LED light wavelengths and intensities on microalgae-based simultaneous biogas upgrading and digestate nutrient reduction process*. Bioresource Technology 136 : 461-468.