

KAJIAN KADAR TOTAL LIPID DAN KEPADATAN *NITZSCHIA SP.* YANG DIKULTUR DENGAN SALINITAS YANG BERBEDA

Widianingsih; Retno Hartati; Hadi Endrawati dan Hilal M.

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Kampus UNDIP Tembalang Semarang E-mail: Widia2506@Yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kadar total lipid dan kepadatan pada mikroalga *Nitzschia sp.* Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan salinitas 15, 20, 25, 30, dan 35 ppt (3 kali ulangan). *Nitzschia sp.* dikultur pada skala laboratorium dengan pupuk F/2 dan dilakukan pemanenan setelah mencapai fase stasioner untuk kemudian diukur kadar total lipid. Perlakuan salinitas menunjukkan bahwa rata-rata kepadatan *Nitzschia sp.* tertinggi pada salinitas 20 ppt ($37,32 \times 10^6$ sel/mL) dan rata-rata kepadatan terendah pada salinitas 30 ppt ($18,62 \times 10^6$ sel/mL). Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh nilai rata-rata persentase kadar total lipid tertinggi terdapat pada salinitas 35 ppt ($71,51 \pm 5,35$ %-dw) dan persentase rata-rata kadar total lipid terendah terdapat pada salinitas 15 ppt ($13,26 \pm 0,47$ %-dw). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *Nitzschia sp.* dapat tumbuh pada salinitas 15 – 35 ppt dengan kepadatan tertinggi pada salinitas 20 ppt dan rata-rata persentase kadar total lipid tertinggi pada salinitas 30 ppt.

Kata-kata kunci: *Nitzschia sp.*, densitas, salinitas, kadar total lipid.

Abstract

This research aimed to study the growth and total lipid content in microalgae *Nitzschia sp.* This study used a Complete Randomized Design with treatments of salinity (15, 20, 25, 30, and 35 ppt (3 replications)). *Nitzschia sp.* were cultured on laboratory scale and harvested after reaching stationary phase and then analyzed for total lipid content. The result showed that the average density of *Nitzschia sp.* was highest at 20 ppt salinity (37.32×10^6 cells/mL) and an average density of the lowest at 30 ppt salinity was 18.62×10^6 cells/mL. Based on observations obtained an average percentage of total lipid levels was highest in the salinity of 35 ppt ($71.51 \pm 5.35\%$ dw) and the average percentage of the lowest levels of total lipids contained in the salinity of 15 ppt ($13.26 \pm 00:47$ %-dw). From the results of this study concluded that *Nitzschia sp.* can growth in salinity 15 - 35 ppt with optimal level of density in 20 ppt and the average percentage of optimal levels of total lipid present in 30 ppt salinity.

Keywords: *Nitzschia sp.*, density, salinity, total lipid.

PENDAHULUAN

Nitzschia sp. merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas Bacillariophyceae (Tomas, 1997). *Nitzschia sp.* mempunyai peran yang penting dalam ekosistem perairan sebagai produsen primer. Mikroalga ini banyak digunakan sebagai pakan alami bagi larva organisme laut seperti krustacea, bivalvia, dan ikan (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Selain sebagai pakan alami bagi organisme laut, mikroalga *Nitzschia* juga salah satu jenis organisme penghasil lipid yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan dasar pembuatan biodiesel (Campbell *et al.*, 2008). Pengembangan mikroalga sebagai

sumber biodiesel mempunyai beberapa keunggulan, yaitu kecepatan pertumbuhan yang tinggi sehingga masa panennya cepat (Andersen, 2005) dibandingkan dengan tanaman perkebunan lainnya seperti jarak dan sawit, mikroalga mempunyai kandungan lipid yang tinggi (Christi, 2007), bersifat ramah lingkungan, nilai emisinya rendah, dan dapat diperbarui.

Salah satu jenis mikroalga yang potensial sebagai bahan dasar biodiesel adalah *Nitzschia sp.* Mikroalga ini mempunyai kecepatan pertumbuhan yang tinggi, mudah dilakukan pembudidayaan, dan memiliki kadar lipid yang cukup tinggi (Chisti, 2007). Hal ini terkait dengan senyawa karbon yang

terkandung dalam ekstrak lipidnya sebagian besar disimpan dalam bentuk minyak (trigliserida) maupun asam lemak jenuh (Thorn, 2007).

Penelitian mengenai mikroalga laut sebagai penghasil lipid perlu dilakukan untuk mencari jenis mikroalga laut yang potensial dan memiliki kandungan lipid yang besar untuk pengembangan biodiesel. Namun demikian terdapat beberapa kesulitan untuk menemukan strain mikroalga yang mengandung lipid tinggi dengan pertumbuhan cepat sehingga biaya operasional pemanenan rendah dan diperoleh sistem kultur yang efektif.

Beberapa mikroalga dapat hidup dalam kondisi lingkungan yang penuh dengan tekanan. Hal ini berarti mikroalga dapat dieksploitasi secara bioteknologi. Faktor lingkungan yang sangat berpengaruh terhadap produksi lipid adalah salinitas (Derenne *et al.*, 1992), fotoperiod, dan intensitas cahaya (Brenckmann *et al.*, 1985), nitrogen, dan suhu (Lupi *et al.*, 1991). Oleh karena itu perlu ditetapkan kondisi lingkungan yang memadai agar didapatkan pertumbuhan mikroalga dan kadar lipid yang optimum.

Nitzschia sp. mengandung protein 33 %; lemak 21 %; dan karbohidrat 28 % (Ben-Amotz and Fishler, 1990). Lipid berfungsi sebagai sumber energi cadangan apabila sel kekurangan karbohidrat sebagai sumber energi utama. Walaupun sedikit kandungan dari total lipid, namun salah satu penelitian Salah satu cara untuk meningkatkan kandungan lipid pada *Nitzschia* sp. adalah dengan memanipulasi faktor lingkungan, salah satunya adalah dengan perlakuan salinitas dalam kultur mikroalga. Media kultur yang didukung dengan media, suhu, nutrien dan cahaya yang baik diharapkan dapat menghasilkan pertumbuhan yang optimal dan kadar lipid tinggi. Al-Hasan *et al.*, (1990) dan Renaud & Perry, (1994) melaporkan

bahwa salinitas mempunyai pengaruh besar terhadap kandungan lipid yang dihasilkan mikroalga. Maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh salinitas media kultur terhadap pertumbuhan dan kadar total lipid. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari dan mengetahui pengaruh salinitas yang berbeda terhadap kepadatan sel dan kadar total lipid pada mikroalga *Nitzschia* sp.

Bahan dan Metoda

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli – Agustus 2011. Pelaksanaan penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi laut, Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro. *Nitzschia* sp. Yang digunakan dalam penelitian ini merupakan stok murni Laboratorium Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung (BBPBL), dengan kepadatan $13,50 \times 10^6$ sel/mL.

Sebelum dilakukan penelitian terlebih dahulu dilakukan sterilisasi ruang, peralatan dan media kultur. Air laut yang akan digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan klorin 60 ppm (mg/L) dan diaerasi selama 24 jam, kemudian untuk menetralkan kadar klorin pada air laut digunakan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Natrium Thiosulfat) 30 mg/L dan diaerasi selama 24 jam ppm, kemudian air laut tersebut disterilisasi dengan dipaparkan UV selama 2-3 jam.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan perlakuan salinitas 15, 20, 25, 30, 35 ppt dengan 3 kali pengulangan. Pada penelitian ini media kultur dipupuk dengan pupuk F/2 dengan komposisi (Tabel 1.); Larutan stok nutrien dibuat dengan menambahkan 1 liter air laut yang telah disterilisasi.

Tabel 1. Komposisi Nutrien F/2 pada Media Kultur *Nitzschia* sp.

Komponen	Jumlah
NaNO_3	84,148 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 g
Na_2SiO_3	30 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2,9 g
Na_2EDTA	10 g
Larutan trace metal	1 mL

Larutan trace metal dibuat dengan menambahkan komponen Trace Metal yang meliputi ZnSO₄.7 H₂O (2 g) ; CuSO₄.5 H₂O (1,96 g) ; CoCl₂.6 H₂O (2 g) (NH₄)₆ Mo₇O₂₄.4 H₂O (1,26 g). Larutan stok vitamin dibuat dengan menambahkan vitamin pada 100 mL air destilasi dengan komposisi; Vitamin B1 (Thiamin HCl) 0,2 mg; Vitamin B12 (Cobalamin) 10 mg dan Vitamin H (Biotin) 10 mg

Media kultur disiapkan pada erlenmeyer yang bervolume 500 mL sebanyak 200 mL

$$\text{Jml sel/mL} = \frac{\text{Jml sel dalam 4 kotak}}{\text{Jml kotak (4)}} \times 10^4$$

Pengambilan sampel untuk kadar total lipid dilakukan setelah mikroalga *Nitzschia* sp. mencapai fase stasioner atau kepadatan puncak yang jatuh pada hari kedelapan. Dimana setelah penghitungan kepadatan terakhir, sampel *Nitzschia* sp. diambil 100 mL untuk dilakukan

$$\% \text{ Total lipid} = \frac{(A - B)}{C} \times 100$$

Keterangan;

A = Berat labu + berat lipid setelah dilakukan ekstrasi (mg)

B = Berat labu sebelum dilakukan ekstrasi (mg)

C = Berat kering sampel.

Kadar total lipid dinyatakan dalam persentase kadar total lipid. Selanjutnya hasil analisis dibandingkan antar perlakuan dengan Anova satu arah SPSS versi 16,0 yang sebelumnya dilakukan uji normalitas untuk mengetahui distribusi data bersifat normal. Hal ini dilakukan agar tepat dalam menentukan pemilihan uji statistik yang digunakan. Uji homogenitas adalah uji mengenai sama tidaknya variansi dua buah distribusi atau lebih (Fowler *et al.*, 1998). Serta dilanjutkan dengan Uji Tukey HSD dilakukan setelah mendapatkan hasil analisa varian.

dengan perlakuan salinitas 15, 20, 25, 30 dan 35 ppt (3 x ulangan) yang sebelumnya telah diberi pupuk dengan konsentrasi 1 mL/L. Kepadatan awal (t_0) *Nitzschia* sebesar 4,50 x 10⁶ sel/mL. Pencahayaan secara kontinyu dengan lampu TL 40 watt/m² dengan fotoperiod 24 jam. Aerasi juga dilakukan kontinyu selama 24 jam. Perhitungan kepadatan dilakukan dengan bantuan mikroskop binokuler dan alat Haemocytometer dengan perbesaran 400 x dengan rumusan Seafdec (1985) dalam Taw (1990) yaitu:

perlakuan analisis kadar total lipid, sedangkan sisa 100 mL masih tetap dilakukan kultur untuk hari selanjutnya.

Analisa kadar total lipid dilakukan sesuai dengan metode Bethien – Diemar (1963) dalam Hermawan 2004. dengan menggunakan pelarut non-polar petroleum ether. Perhitungan prosentase berat kering total lipid sebagai berikut:

Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Salinitas Terhadap Kepadatan *Nitzschia* sp.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata kepadatan *Nitzschia* sp. tertinggi pada salinitas 20 ppt (37,32 x 10⁶ sel/ml) dan terendah pada salinitas 30 ppt (18,62 x 10⁶ sel/ml). Kepadatan *Nitzschia* sp. mencapai puncak pada fase eksponensial yaitu hari ke-5 sedangkan pada hari ke-6 menunjukkan penurunan kepadatan populasi. Hal ini sesuai dengan pertumbuhan kultur mikroalga pada skala laboratorium umumnya mencapai masa panen pada hari ke 7 – 10 (Kawaroe, 2007).

Pada salinitas 20 ppt mikroalga *Nitzschia* sp. mengalami pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan salinitas yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa pada salinitas tersebut *Nitzschia* sp. tumbuh dengan baik.

Pada media bersalinitas 20 ppt menunjukkan jumlah kepadatan sel yang tinggi sedangkan pada salinitas 35 ppt jumlah kepadatannya rendah. Hal ini menunjukkan bahwa pada salinitas yang lebih tinggi terdapat hambatan dalam proses pertumbuhan dan reproduksi *Nitzschia* sp. Vazquez-Duhalt dan Arredondo-Vega (1991) melaporkan penurunan kadar protein dan biomassa sementara karbohidrat dan lipid tidak mengalami perubahan selama adaptasi yang dilakukan *Botryococcus braunii*. Hart *et al.* (1991) menunjukkan penurunan pertumbuhan pada salinitas yang lebih tinggi yang disebabkan karena menurunnya proses fotosintesis. Naiknya salinitas akan menghambat proses fotosintesis (Mironyuk dan Einer, 1986), proses respirasi serta menghambat pembentukan sel anakan (Soeder & Stengel, 1974). Hal ini merupakan

bentuk adaptasi yang dilakukan organisme terhadap salinitas yang lebih tinggi. Begitu juga dengan *Nitzschia* sp. yang hidup pada kondisi yang berbeda dengan habitat asalnya, maka akan melakukan proses adaptasi untuk bisa bertahan hidup.

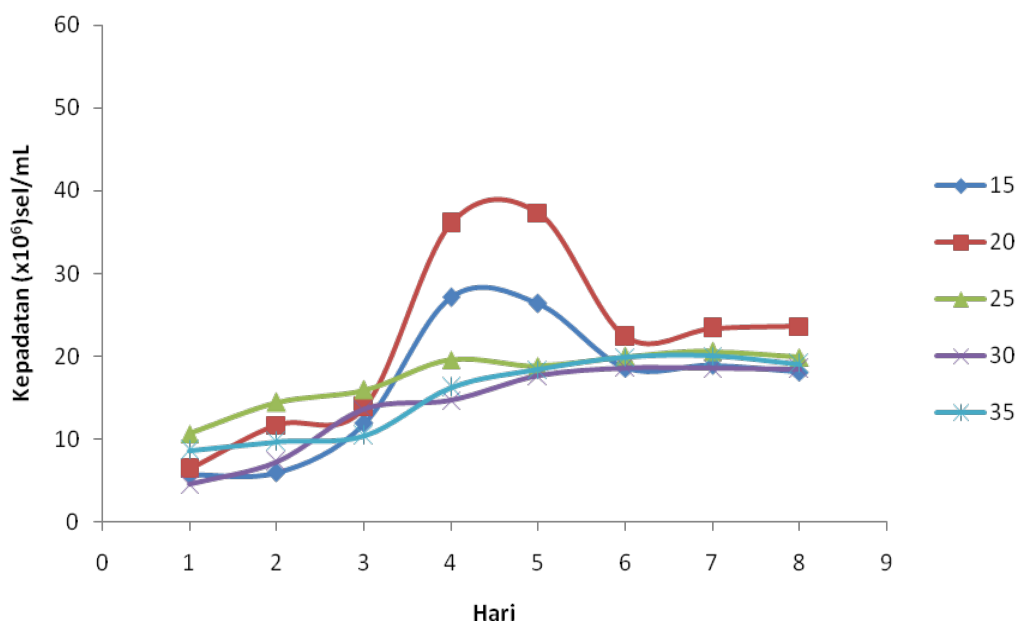
Salinitas merupakan salah satu sifat kimia air yang secara langsung maupun tidak langsung dapat mempengaruhi pertumbuhan dan kehidupan organisme air. *Nitzschia* sp. dapat tumbuh pada salinitas antara 0-35 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 20-25 ppt (Sudjiharno, 2002). Kemampuan masing-masing mikroalga dalam melakukan adaptasi berbeda-beda tergantung jenis dan perubahan salinitas dari habitat asalnya. Semakin tinggi perbedaan salinitas dengan habitat asal maka adaptasi yang dilakukan mikroalga akan semakin berat begitu pula sebaliknya. Akibat dari proses adaptasi yang berat yaitu proses pertumbuhan dan reproduksi mikroalga tersebut terganggu.

Tabel 2. Kepadatan rata-rata *Nitzschia* sp. Pada Berbagai Tingkat Salinitas ($\times 10^6$ sel/mL)

Hari ke	Salinitas (ppt)				
	15	20	25	30	35
0	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00	4,50 ± 0,00
1	5,72 ± 0,452	6,41 ± 0,368	10,63 ± 0,563	4,55 ± 0,156	8,62 ± 0,784
2	5,98 ± 0,163	11,72 ± 1,657	14,47 ± 4,633	7,33 ± 0,493	9,7 ± 0,181
3	11,91 ± 1,339	13,85 ± 1,453	15,93 ± 0,951	13,59 ± 1,533	10,41 ± 1,928
4	27,13 ± 1,324	36,05 ± 1,444	19,58 ± 2,182	14,67 ± 2,694	16,2 ± 2,737
5	26,4 ± 3,527	37,32 ± 1,156	18,85 ± 2,095	17,66 ± 2,9	18,38 ± 2,615
6	18,57 ± 2,165	22,36 ± 0,759	19,98 ± 0,125	18,62 ± 1,054	19,87 ± 0,85
7	18,89 ± 2,07	23,37 ± 1,72	20,58 ± 0,56	18,55 ± 1,083	20,04 ± 0,658
8	18,12 ± 1,043	23,60 ± 1,484	19,89 ± 0,156	18,43 ± 0,463	19,07 ± 0,862

Hal ini dapat dipahami bahwa naik turunnya salinitas berpengaruh terhadap tekanan osmose dan mekanisme osmoregulasi yang secara langsung akan mempengaruhi proses metabolisme yang berakibat terhadap penurunan pertumbuhan populasi. Variasi

salinitas dalam suatu perairan dapat mempengaruhi organisme melalui perubahan berat jenis air laut dan tekanan osmotik. Pengaturan osmose cairan bertujuan untuk menyamakan konsentrasi garam internal dengan konsentrasi garam lingkungan sekelilingnya.



Gambar 1. Kepadatan rata-rata *Nitzschia* sp. (sel/mL) selama masa pengamatan terhadap salinitas yang berbeda.

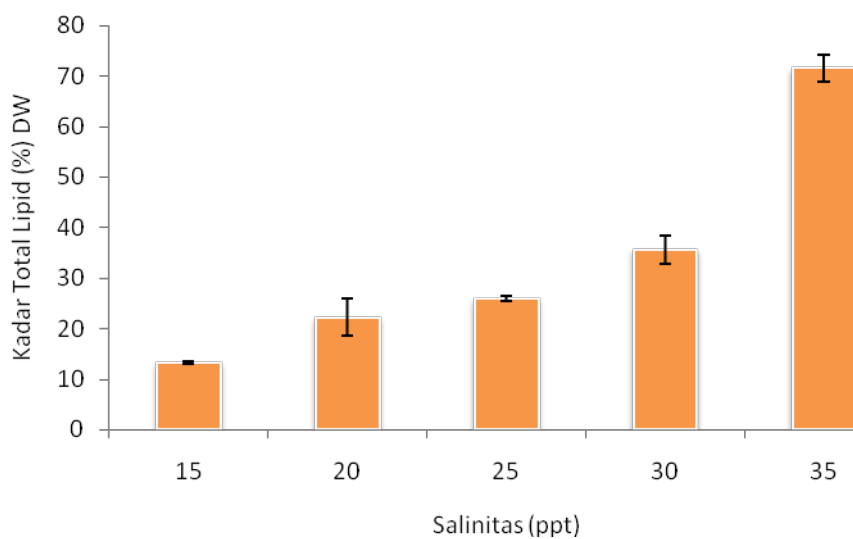
Pengaruh Salinitas Terhadap Kadar Total Lipid *Nitzschia* sp.

Hasil pengamatan terhadap kadar total lipid *Nitzschia* sp. dengan perlakuan perbedaan salinitas menunjukkan bahwa nilai kadar total lipid terbesar terdapat pada salinitas 35 ppt dengan persentase rata-rata 71,51%-dw dan terendah pada salinitas 15 ppt dengan persentase rata-rata 13,26%-dw. Hasil ini menunjukkan bahwa *Nitzschia* sp. mengandung

lipid dalam jumlah besar pada saat salinitas meningkat atau dapat juga dikatakan persentase kandungan lipid naik seiring dengan meningkatnya salinitas (Douglas *et al.*, 2004; Vazquez-Duhalt *et al.*, 1991a; Hook *et al.*, 1995; Hanhua & Kunshan, 2006; Rao *et al.*, 2007). Hasil penelitian kadar total lipid menunjukkan perbedaan yang sangat nyata dengan perubahan salinitas.

Tabel 2. Kadar Total Lipid yang Dihasilkan *Nitzschia* sp. pada Berbagai Tingkat Salinitas yang Berbeda

Ulangan	Kadar total lipid (%-dw) pada tiap-tiap perlakuan salinitas				
	15 ppt	20 ppt	25 ppt	30 ppt	35 ppt
1	12,94	33,05	27,73	31,68	79,22
2	12,87	17,78	25,90	30,05	63,49
3	13,97	15,79	24,23	41,21	71,83
Rata-rata SD	13,26 ± 0,47	22,21 ± 7,23	25,95 ± 1,19	35,63 ± 5,58	71,51 ± 5,35



Gambar 2. Rata-rata Kadar Total Lipid *Nitzschia* sp. Pada Berbagai Salinitas yang Berbeda

Salinitas merupakan salah satu faktor yang mempunyai pengaruh besar terhadap pertumbuhan dan kadar lipid *Nitzschia* sp. (Al-Hasan *et al.*, 1990 ; Renaud and Parry, 1994). Kondisi salinitas yang optimum sangat penting untuk mendapatkan nilai produktifitas *Nitzschia* sp. yang tinggi. Pada salinitas tinggi nutrisi digunakan untuk tumbuh tetapi tidak optimum hal ini dikarenakan pada salinitas tersebut *Nitzschia* sp. melakukan adaptasi dengan melakukan proses osmoregulasi sehingga tidak banyak mengeluarkan energi, dan energi tersebut tersimpan. Proses adaptasi tersebut bertujuan untuk mempertahankan hidup karena berada pada lingkungan yang ekstrim atau diluar salinitas yang optimal untuk tumbuh, adaptasi tersebut dilakukan dengan cara energi yang dihasilkan ini digunakan untuk bertahan hidup sehingga pertumbuhan cenderung lambat dan energi tersebut tersimpan dalam jumlah besar. Sedangkan pada salinitas 20 ppt merupakan salinitas optimal sehingga diduga dapat melakukan adaptasi dengan baik terhadap salinitas dengan energi yang digunakan untuk tumbuh sehingga pada proses pertumbuhannya mengeluarkan banyak energi. Disini juga dapat dilihat bahwa salinitas secara signifikan memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan dan kadar lipid mikroalga. Dengan peningkatan salinitas dapat menstimulasi kadar lipid yang dihasilkan mikroalga (Vazquez-Duhalt *et al.*, 1991b). Hasil analisis varian kadar total lipid *Nitzschia* sp. menunjukkan bahwa $F_{hit} = 5,675$

lebih besar dari $F_{tabel (4;10;5\%) = 4,07$ atau $\alpha < 0,05$ dengan dB (4,10). Hal ini menunjukkan bahwa salinitas berpengaruh terhadap kandungan lipid *Nitzschia* sp. Berdasarkan uji lanjut menggunakan uji Tukey HSD, diketahui bahwa perbedaan terjadi antara perlakuan 15 dengan perlakuan 30, perlakuan 15 dengan perlakuan 35. Pada perlakuan 35 ppt dengan perlakuan 15 ppt, 20 ppt, 25 ppt dan 30 ppt menunjukkan perbedaan sangat nyata.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan salinitas pada media kultur berpengaruh terhadap kadar total lipid *Nitzschia* sp. Salinitas merupakan parameter lingkungan yang berperan penting dalam pertumbuhan dan metabolisme *Nitzschia* sp. Salinitas diperoleh dengan memodifikasi lingkungan media, salinitas juga berperan dalam mekanisme osmoregulasi melalui tekanan osmotik yang dilakukan *Nitzschia* sp. Hasil penelitian juga menunjukkan pentingnya dalam uji coba perlakuan salinitas pada media kultur *Nitzschia* sp. untuk mendapatkan lipid dalam jumlah besar.

Kesimpulan

Perbedaan kadar salinitas pada media kultur memberikan pengaruh yang nyata terhadap kandungan total lipid dan kepadatan dari *Nitzschia* sp. Kandungan total lipid terbesar ditemukan pada *Nitzschia* sp yang dikultur pada media dengan salinitas media kultur 35 ppt

sebesar 71,51% - dw dan terendah pada salinitas 15 ppt sebesar 13,26 % - dw. Sedangkan kepadatan optimum diperoleh pada kadar salinitas 20 ppt dengan nilai $37,32 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke 5, sedangkan terendah pada salinitas 30 ppt sebesar $18,62 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke 6. Kadar salinitas pada media kultur mempengaruhi kadar total lipid dan kepadatan *Nitzschia* sp.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti (melalui LPPM Undip) yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Kompetensi Batch 2 (**Nomor Nomor: 353/SP2H/PL/Dit.Litabmas/IV/2011, tanggal 14 April 2011**). Terima kasih juga disampaikan kepada Pengelola Field Station Marine Sciences, Jurusan Ilmu Kelautan UNDIP, Jepara atas peminjaman sarana laboratorium serta Prof.Dr. Ir. M. Zainuri, DEA atas review dan sarannya demi perbaikan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

AACC. 1987. Method 46-11, approved methods of the AACC (American Association of Cereal Chemists). Inc. St Pau, minn

Andersen , R.A. 2005. Algal Culturing Technique. Elsevier Academic Press. Uk.

Al-Hasan, R.H., Ali, A.M., Ka'wash, H.H., Radwan, S.S. 1990. Effect of salinity on the lipid and fatty acid composition of the halophyte *Navicula* sp.: potential in mariculture. *J. Appl Phycol.*, 2: 215-222.

Brenckmann, F., C. Largeau, E. Casadevall, B. Corre and C. Berkaloff. 1985. Influence of light intensity on hydrocarbon and total biomass production of *Botryococcus braunii*. Relations with photosynthetic characteristics. In: Paiz, W.; Coombs, J. And Hall, D.O. (Eds.): Energy from Biomass, p. 722-726. Elsevier Appl. Sci. Publ., London

Campbell, M, N. 2008. Biodiesel: Algae as renewable source for liquid fuel. *Guelph Engineering Journal.*, (1): 2-7

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.

De La Noue, J. and N. De Pauw. 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*, 6, 725-770.

Derenne, S., P. Metzger, C. Largeau, P.F. Van Berge, J.P. Gatellier, J.S.S Damste, J.W. De Leeuw and C. Berkaloff. 1992. Similar morphological and chemical variations of in Ordovician sediments and cultured *Botryococcus braunii* as a response to changes in salinity. *Organic geochemistry*. Oxford etc. 19, 299-313.

Douglas R. Tocher, John D. Castell, James R. Dick and John R. Sargent. 1994. Effects of salinity on the fatty acid compositions of total lipid and individual glycerophospholipid classes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) cells in culture. *Fish Physiology and Biochemistry Journal*. 14: 125 – 137.

Erlina, A. 2007. Produksi Pakan Hidup. (Pelatihn Pembenuhan Udang). Laboratorium Pakan Alami. Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara.

Fowler. J., L. Cohen., P. Jarvis. 1998. Pratical Statistic for Field Biology. Jhon Wiley & Sons Ltd. England UK. Pp. 259

Hanhua, H. and Kunshan, G. 2006. Response of growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO2 concentration. *Biotechnology Letters*, 28: 987-992.

Hermawan A., 2004. The Protein, Lipids and Fatty Acids contents of *Tetraselmis* sp. with Various culture media. Master of Science (Aquaculture). Major Field : Departement of Aquaculture. Thesis Advisor : Assistant Professor Sunan Patarajinda, M. S. Kasetsart University, Bangkok, Thailand. 71 pages

- Holba, A. G., E. W. Tegelaar, B. J. Huizinga, J. M. Moldowan, M. S. Singletary, M. A. McCaffrey, & L. I. P. Dzou. 1998. 24-norcholestanes as age-sensitive molecular fossils. *Geology*, 26 (9): 783-786.
- Isnansetyo, A dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton; Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 106 hal.
- Kawaroe, M. 2007. The Prospect of Marine Microalgae as Biofuel (Oilgae) for Future Alternative of Energy Source. In Proceeding Indonesian Aquaculture 2007, Bali, Indonesia, 30 Juli-2 Agustus 2007.
- Koistra, W. H., & L. K. Medlin. 196. Evolution of the diatoms (*Bacillariophyta*). IV. A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Mol. Phylogenet. E*, 6 (3), 391 – 407.
- Lupi, F.M., H.M.L. Fernandes, I. Sa-Correia, and J.M. Novais. 1991. Temperature profiles of cellular growth and exopolysaccharide synthesis by *Botryococcus braunii* Kütz. UC 58. *J. Appl. Phycol.* 3, 35-42.
- Mujiman, A. 1984. Makanan Ikan. Cetakan 14. Penebar Swadaya. Jakarta. Prescott, G. W. 1978. How to Know The Freshwater Algae. Wne. Brown Company Publisher.
- Nur A. dan Z. Arifin. 2004. Nutrisi dan Formulasi Pakan Ikan. Departemen kelautan dan Perikanan Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara, 6-66.
- Ramachandra, T.V.,D. M. Mahapatra, B. Karthick, & R. Gordon. 2009. Milking Diatoms for sustainability Energy: BIOchemical Engineering versus Gasoline-Secreting Diatom Solar Panels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 48 (19)
- Rampen, S. W., S. Scchouten, B. Abbas, F. E. Panoto, G. Muyzer, C. N. Campbell, J. Fehling, & J. S. Sinninghe Damste'. 2007. On the origin of 24-norcholestanes and their use as age-diagnostic biomarkers. *Geology*, 35 (5): 419-422.
- Rao, R.A., C. Dayananda, R. Sarada, T.R. Shamala, G.A. Ravishankar. 2007. Effect of salinity on growth of green algae *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technol* 98:560-564
- Renaud, S.M., and D.L Parry. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J. Appl Phyco.* 6: 347-356.
- Robert A. A. 2005. Algal culturing Techniques. Elsevier Academic Press, USA, 25-26.
- Roberts, K., E. Granum, R.C. Leegood, & J. A. Raven. 2007. Carbon acquisition by diatoms. *Photosynth. Res.* 93 : 79 - 88
- Sheehan J, T. Dunahay, and J. Benemann. 1998. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory.
- Slyvester, B., D. D. Nely dan Sudjiharno. 2002. Persyaratan Budidaya Fitoplankton Dalam Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Balai Budidaya Laut Lampung Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Sudjiharno, 2002. Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Departemen kelautan dan Perikanan Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya, Balai Budidaya Laut Lampung.
- Sutomo. 2005. Pengaruh Salinitas dan Jenis Mikroalga (*Chaetoceros gracillis* dan *Nannochloropsis oculata*) Terhadap Perkembangan Naupli dan Pertumbuhan Kapepoda *Trigriopus brevicornis*. *Oseanologi dan Limnologi*, 38 : 47 - 67
- Taw, N.D.R. 1990. Petunjuk pemeliharaan kultur murni dan massal mikroalga. Proyek

- Pengembangan Budidaya Udang: United Nations Development Programme Food and Agriculture Organization of the United Nations, US, 32 hlm. (diterjemahkan oleh: Budiono Martosudarmo dan Indah Wulani).
- Thorn, J. 2007. Algae : A Renewable Energy Source.
<http://alpha.chem.umb.edu/chemistry/ch471/documents/Algae.pdf>
- Tjahjo, W., L. Erawaty, S. Hanung. 2002. Biologi Fitoplankton Dalam Budidaya Fitoplankton dan Zooplankton. Balai Budidaya Laut Lampung Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya Departemen Kelautan dan Perikanan.
- Tomas, C. R. 1977. Identifying Marine Phytoplankton Academic press. 858p USA
- Vazquez-Duhalt, R. and B.Q. Arredondo-Vega. 1991. Haloadaptation of green alga *Botryococcus braunii* (Race A). *Phytochemistry*, 30 (9): 2919-2925
- Webber, H. 1991. Marine Biology. Second Edition. Harper Collins Publisher. Hlm : 65-70.
- Widianingsih, R. Hartati, H. Endrawati dan E. Yudiati. 2010. Panduan Kultur Monospesies Mikroalga. FPIK Universitas Diponegoro. Semarang.
- Zuhdi. 2003. Biodiesel sebagai alternatif pengganti bahan bakar fosil pada motor diesel. (Laporan) Riset RUT VIII Bidang Teknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Kementerian Riset dan Teknologi RI.