

PENGARUH PERTUMBUHAN, LEMAK DAN PROFIL ASAM  
AMINO ESSENSIAL *Skeletonema costatum* DALAM KULTUR MASSAL  
MENGUNAKAN MEDIA KULTUR TEKNIS YANG BERBEDA

Vivi Endar Herawati<sup>1</sup> · Johannes Hutabarat<sup>1</sup>

**Ringkasan** *Skeletonema costatum* adalah pakan alami yang banyak digunakan khususnya dalam budidaya udang, kandungan gizi yang tinggi, ukuran yang sesuai dengan bukaan mulut larva merupakan keunggulan dari *Skeletonema costatum*. Tujuan penelitian ini adalah untuk menemukan perbedaan media kultur teknis (Walne dan Guillard) secara massal pada *Skeletonema costatum* terhadap pertumbuhan, lemak dan profil asam amino esensial. Metoda kultur yang digunakan adalah secara massal dengan dua media kultur teknis yang berbeda (Double Walne dan Guillard teknis), analisis lemak dilakukan dengan analisa proksimat dan profil asam amino esensial menggunakan HPLC Eurospher 100-5 C18, 250 x 4,6mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media kultur yang terbaik adalah Guillard teknis dimana pertumbuhan pada *Skeletonema costatum* yaitu  $86,75 \times 10^4$  sel/ml dengan lama fase stasioner 52 jam, lemak 7,74%, profil asam amino esensial tertinggi pada *Skeletonema costatum*, yaitu asam amino Threonin yaitu 2359,05 ppm.

**Keywords** *Skeletonema costatum*, Media kultur teknis Guillard dan Double Walne, Pertumbuhan, lemak dan asam amino esensial, Kultur massal

<sup>1</sup>)Program Studi Budidaya Perairan, Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro Jl Prof Soedharto, Semarang 50275  
E-mail: anshinvie@yahoo.com

Received: 25 Juni 2014

Accepted: 12 Juli 2014

## PENDAHULUAN

Pakan alami sebagai penunjang budidaya ikan dan sekaligus sebagai faktor pendukung keberhasilan budidaya semakin giat dibudidayakan [1]. Pakan alami sendiri merupakan pakan hidup yang berasal dari alam. *Skeletonema costatum* adalah diatom yang merupakan sumber pakan alami bagi larva ikan dan sangat baik untuk udang [2]. Hal ini karena kandungan nutrisi dan ukuran dari *S. costatum* sangat sesuai dengan bukaan mulut terutama larva udang stadia naupli sampai dengan mysis. *S. costatum* adalah diatom berbentuk rantai dengan ukuran sel berkisar antara 4-15  $\mu$ m [2]. Kelebihan dari diatom memiliki nilai nutrisi yang tinggi dengan kandungannya protein berkisar antara berkisar 21,63 - 32,05% [3] dan [4]. Kebutuhan larva khususnya udang akan *S. costatum* sebagai sumber pakan alami dalam jumlah yang banyak, oleh karena itu untuk memenuhi kebutuhan pakan alami tersebut kultur dalam skala massal *S. costatum* sangatlah mutlak untuk menunjang suatu usaha perbenihan khususnya udang.

Kebutuhan *S. costatum* sebagai pakan alami dalam kegiatan pembenihan dibutuhkan

an dalam jumlah yang besar, maka diperlukan suatu kultur masal dengan kepadatan yang tinggi dalam waktu yang lebih pendek. Selain untuk mendapatkan kelimpahan sel yang tinggi, maka dalam kultur masal diharapkan pula memperoleh kandungan nutrisi maksimal melalui lemak dan profil asam amino esensial.

Dalam rangka memperoleh pertumbuhan dan nutrisi yang baik, diperlukan media yang sesuai. Media kultur yang sering digunakan untuk mengkultur diatom adalah Guillard [5]; [6]; [7] dan double Walne [8]; [9]; [3]. Modifikasi media Walne (double Walne dan penambahan silikat) mampu meningkatkan pertumbuhan jumlah sel *S. costatum* 3-4 kali lipat [8] dan memacu pertumbuhan 4-5 kali lipat [3]. Pada penelitian ini dikaji secara lebih mendalam tentang penggunaan perbedaan media kultur teknis (Walne yang dimodifikasi dan Guillard) terhadap pertumbuhan, lemak dan profil asam amino esensial *Skeletonema costatum* yang dikultur secara massal.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan perbedaan media kultur teknis double Walne dan Guillard dalam kultur massal terhadap pertumbuhan, lemak dan profil asam amino esensial *Skeletonema costatum* dalam dua media kultur teknis yang berbeda.

## MATERI DAN METODE

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit *Skeletonema costatum* Media Kultur uji yang digunakan adalah pupuk Walne [6] dengan menggunakan komposisi double Walne dengan penambahan silikat [7] dan Guillard teknis [6]. Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah autoklaf, haemocytometer, bak fiber volume 2 ton, lux meter, water quality checker, mikroskop, planktonet, batu dan selang aerasi, elemeyer, HPLC Eurospher 100-5 C18, 250x4,6mm untuk analisa asam amino esensial.

Bibit Diatom diperoleh dari biakan murni Laboratorium Pakan Alami BBPBAP Jepara. Sebelum ditanam bibit *S. costatum*

**Tabel 1** Media kultur teknis double Walne dan Guillard yang digunakan untuk mengkultur *S. costatum*

Komposisi	Walne (gram)	Guillard (gram)
<b>Larutan nutrien:</b>		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20	10
NaNO <sub>3</sub>	100	84,2
Na <sub>2</sub> EDTA	5	10
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	40	50
MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,36	0,36
FeCl <sub>3</sub>	1,3	2,9
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	-
Akuades	1000 ml	1000 ml
<b>Larutan Trace metal:</b>		
ZnCl <sub>2</sub>	21	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>8</sub> Mo <sub>8</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,9	1,26
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	20	1,96
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3,15	3,15
Akuades	100 ml	
<b>Vitamin:</b>		
Vitamin B12	0,1	0,01
Thiamin	20	0,2
Biotin	0,1	0,01

**Tabel 2** Kualitas air media kultur penelitian

Parameter	Guillard	Walne	Pustaka
pH	8,31	8,17	7,2-8,5*
DO	2,96	2,96	2,00 – 4,00**
Suhu	30,20	30,53	25-31***
Salinitas	25-28	25-28	17-30****

Ket. :\* [5] ; [7]\*\* [5] \*\*\* [11]; [7] \*\*\*\* [11]; [12]

di aerasi selama 15 menit agar tidak mengendap. Bibit *S. costatum* kemudian ditanam dengan kepadatan awal 50.000 sel/mL.

Media kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah media kultur double Walne dan Guillard teknis untuk mengkultur secara massal *Chaetoceros calcitrans* dan *S. costatum* tersaji dalam tabel 1. Air media yang digunakan kultur dipersiapkan pada salinitas 28 ppt [9]. Kondisi lingkungan kultur tersaji dalam tabel 2.

Adapun tahap pelaksanaan penelitian yaitu membuat media dengan cara mencampur semua bahan kecuali vitamin, kemudian distirer hingga homogen. Setelah itu media di autoclave selama 2 jam. Menghitung volume media uji perlakuan, yai-

tu masing-masing 1500L untuk setiap perlakuan yang terdiri dari campuran pupuk dan air laut steril. Jumlah bibit yang diinginkan untuk penebaran awal dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran bibit sebagai berikut [2] :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2 \quad (1)$$

dimana:

$V_1$ : Volume bibit yang diperlukan untuk penebaran awal

$V_2$ : Volume air media yang akan ditebari bibit

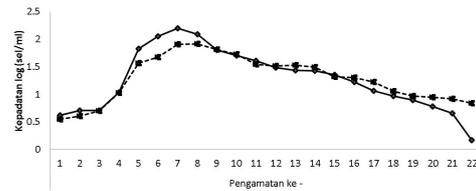
$N_1$ : Jumlah stock *S. costatum*

$N_2$ : Jumlah *S. costatum* yang diinginkan.

Setelah kepadatan awal diketahui, menghitung volume larutan stok kultur yang harus dimasukkan ke dalam media 1 L agar didapat kepadatan sel awal 50.000 sel/mL. Menghitung jumlah kepadatan dengan Hamocytometer dan pengamatan dilakukan setiap 4 jam untuk *S. costatum*.

Pemanenan *S. costatum* dilakukan dengan cara mengangkat aerasi kemudian disaring menggunakan planktonet, sehingga mendapatkan hasil panen *S. costatum* dikeringkan sehingga berbentuk serbuk.

Lemak dianalisis proksimat dengan menggunakan metode AOAC (1990) [4]. Analisis asam amino essensial dengan menggunakan HPLC dilakukan di Laboratorium Pengembangan dan Penelitian dan Pengujian Terpadu GajahMada, Yogyakarta, mengikuti prosedur LPPT Yogyakarta. Sampel ditimbang sampel  $\pm 2,5$  gram; dimasukkan dalam tabung reaksi kaca tertutup kemudian ditambahkan 15 ml HCl 6N, divortek hingga homogeny selanjutnya dihidrolisis menggunakan autoklaf pada suhu 110°C selama 12 jam kemudian didinginkan pada suhu ruang, lalu dinetralkan dengan NaOH 6N. Tambahkan 2,5 ml Pb Acetat 40 % dan 1 ml asam oksalat 15 %, Ditepatkan 50,0 mL menggunakan aquabidest. Selanjutnya diambil  $\pm 3$  ml saring millex 0,45. Untuk injeksi ke HPLC diambil larutan yang telah dimillex sebanyak 25  $\mu$ l + 475 $\mu$ L lar.OPAA,



**Gambar 1** Pertumbuhan *S. costatum* dalam media kultur double Walne dan Guillard. [2]

vortek. Direaksikan selama 3 menit. Kemudian diinjeksikan 30  $\mu$ L ke HPLC.

Analisa data dilakukan dengan menggunakan uji T, hal ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan kultur dengan menggunakan media kultur teknis double Walne dan Guillard teknis terhadap pertumbuhan *S. costatum*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan

Salah satu tujuan kultur algae adalah untuk mendapatkan kelimpahan sel yang tertinggi dengan kandungan nutrisi optimal [13], hal ini dikarenakan pakan alami merupakan pakan mutlak yang diberikan pada larva ikan dan udang karena kandungan nutrisi yang terdapat dalam pakan alami tidak dapat digantikan oleh pakan buatan apapun. pertumbuhan *S. costatum* hasil penelitian disajikan pada Gambar 1. Adapun fase pertumbuhan *S. costatum* dalam media kultur teknis yang berbeda untuk tiap fase tersaji pada tabel 3.

Pertumbuhan *S. costatum* dalam media kultur double Walne lebih cepat dibandingkan dalam media kultur teknis Guillard, hal ini dikarenakan kepekatan media kultur double Walne lebih pekat dibandingkan dengan media kultur Guillard. Penelitian [13], menyatakan bahwa kepekatan media kultur berpengaruh terhadap cepat atau lambatnya masa pertumbuhan mikroalga apabila tidak ada perbedaan media kultur maka pertumbuhan microalgae akan berjalan dengan cepat sebaliknya apabila ada perbe-

**Tabel 3** . Fase pertumbuhan *S. costatum* dalam media kultur teknis Walne dan Guillard

Perlakuan	Fase Lag (Sel/ml) $\pm$ sd	Fase Eksponensial (Sel/ml) $\pm$ sd	Fase Stasioner (Sel/ml) $\pm$ sd	Fase Kematian (Sel/ml) $\pm$ sd
Media Guillard	48,00 x 104 $\pm$ 0,018 <sup>b</sup>	70,25 x 104 $\pm$ 0,020 <sup>b</sup>	86,75 x 104 $\pm$ 0,022 <sup>b</sup>	6,70 x 104 $\pm$ 0,028 <sup>b</sup>
Media Walne	117,17 x 104 $\pm$ 0,032 <sup>b</sup>	160,83 x 104 $\pm$ 0,040 <sup>b</sup>	160,83 x 104 $\pm$ 0,040 <sup>b</sup>	122,25 x 104 $\pm$ 0,022 <sup>b</sup>

keterangan : b = berbeda nyata

daan maka *microalgae* akan membutuhkan waktu yang lama untuk pertumbuhannya.

Berdasarkan hasil uji statistik pada fase lag menunjukkan bahwa dengan media kultur teknis Walne dan Guillard berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan *S. costatum* hal ini diduga karena kepekatan media kultur teknis Walne hampir sama dengan cairan sel tubuh *S. costatum* sehingga pertumbuhan *S. costatum* dalam media kultur Walne lebih cepat dibandingkan *S. costatum* dalam media kultur teknis Guillard dan fase lag terjadi pada pengamatan ke 6 (setelah 24 jam penanaman *S. costatum* dalam media kultur). Selanjutnya hasil uji statistik pada fase eksponensial menunjukkan bahwa dengan media kultur teknis Walne dan Guillard berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap pertumbuhan *S. costatum* hal ini diduga cairan tubuh sel *S. costatum* hampir sama sehingga *S. costatum* dalam media kultur teknis Walne lebih cepat mengalami pembelahan sel hal ini mengakibatkan pertambahan sel persatuan waktu lebih besar daripada pertambahan waktu itu sendiri dan fase eksponensial terjadi pada jam ke 28 (pengamatan 7). Berdasarkan hasil uji statistik pada fase stasioner menunjukkan bahwa dengan media kultur teknis Walne dan Guillard berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap pertumbuhan *S. costatum*, Pertumbuhan *S. costatum*, kepadatan tertinggi terjadi pada *S. costatum* dalam media kultur teknis Walne, akan tetapi lama fase stasioner berlangsung bersamaan dengan fase eksponensial sehingga lama fase stasionernya tidak ada. Hal ini berbeda pada *S. costatum* dalam media kultur teknis Guillard yang mempunyai fase stasioner 4 jam lebih lama. Sehingga pada media kultur Guillard teknis lebih menguntungkan dalam budidaya pakan alami selain itu lamanya fase stasioner berkaitan erat dengan

penyerapan nutrient dalam media kultur oleh *S. costatum* Sehingga media kultur Guillard teknis adalah media kultur terbaik untuk *S. costatum*.

Adanya perbedaan kepekatan media kultur dengan cairan sel dalam *microalgae* akan berpengaruh terhadap pemulihan enzim dan konsentrasi substrat ke tingkat selanjutnya untuk pertumbuhan serta masuknya unsur hara dalam sel melalui proses difusi sebagai akibat perbedaan konsentrasi antar media kultur dengan cairan tubuh.

#### Lemak

Pada tabel 4 tersaji lemak *S. costatum* dalam media kultur Walne dan Guillard teknis. Analisis lemak tertinggi pada fase eksponensial yaitu 7,74% dalam media kultur teknis guillard, dan pada fase stasioner akhir 3,37%. Lemak merupakan faktor yang penting dalam pertumbuhan [2]. Perbedaan kandungan nutrisi *Skeletonema costatum* diakibatkan karena perbedaan komposisi nutrien dalam media kultur teknis Walne dan Guillard.

Nutrient yang berpengaruh terhadap perbedaan kandungan nutrisi *Skeletonema costatum* pada protein (asam amino) dan lemak (asam lemak) dalam media kultur teknis Walne dan Guillard adalah nitrogen dan Fe. Nitrat sebagai sumber nitrogen dalam media kultur di transport secara langsung ke dalam sel dengan adanya rangasang ATPase dari Cl, sebelum mengalami proses diasimilasi membentuk asam amino bergabung menjadi makromolekul atau protein inilah yang akan menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dengan reaksi enzim lipase. Pernyataan ini sejalan dengan [14], bahwa nitrogen merupakan makronutrient yang dapat mempengaruhi pertumbuhan melalui kegiatan metabolisme khususnya biosintesis protein, sehingga terjadi reaksi enzima

**Tabel 4** Lemak *S. costatum* dalam media kultur Walne dan Guillard teknis

Parameter	Media Guillard (%) Fase Stasioner		Media Walne (%) Fase Stasioner	
	Ekspensial ( $\pm$ sd)	Akhir ( $\pm$ sd)	Ekspensial ( $\pm$ sd)	Akhir ( $\pm$ sd)
Lemak	7,74 $\pm$ 0,040	3,37 $\pm$ 0,034	7,14 $\pm$ 0,035	4,45 $\pm$ 0,043

lipase yang dihasilkan protein yang kemudian dihidrolisis lemak menjadi asam lemak.

Selain nitrogen perbedaan komposisi Fe dimana pada media Guillard teknis lebih banyak dibandingkan media Walne teknis berpengaruh terhadap kandungan protein dan lemak *Chaetoceros sp.* dan *Skeletonema sp.* [7], menyatakan bahwa FeCl<sub>3</sub> (besi) memiliki kemampuan untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit kemudian mereduksi nitrit menjadi amonium. Amonium merupakan sumber nitrogen. Nitrogen merupakan nutrisi yang dibutuhkan paling banyak untuk pertumbuhan mikroalgae.

*Profil Asam Amino Essensial*

Pada Tabel 5 tersaji profil asam amino esensial dimana konsentrasi total asam amino esensial *S. costatum*. Hasil analisis kandungan asam amino esensial pada *S. costatum* dilihat pada tertinggi dalam media kultur Guillard. Berdasarkan kromatogram tertinggi, yaitu Threonin *S. costatum* 2359,05 ppm dalam media kultur Guillard teknis dan 2070,73 ppm pada media kultur teknis Walne. asam amino esensial pada *S. costatum* dilihat pada kromatogram terendah yaitu Isoleucine, yaitu 84,89 ppm dalam media kultur Guillard teknis dan 61,47 ppm pada media kultur teknis Walne.

Komposisi asam amino dari protein diatom sangat mirip antar spesies [15] dan relatif tidak terpengaruh oleh fase pertumbuhan serta kondisi cahaya. Berdasarkan hasil penelitian asam amino tertinggi *S. costatum* terdapat pada media kultur Guillard teknis. Dalam penelitiannya [15], mendapatkan hasil untuk diatom berkisar 1,83 ppm - 2,21 ppm, berdasarkan penelitian yang dilakukan mendapatkan hasil 2,05 ppm untuk *S. costatum*.

**Tabel 5** Profil asam amino essensial *S. costatum* dalam media kultur teknis double Walne dan Guillard

Parameter uji	<i>Skeletonema sp.</i> Guillard (ppm) ( $\pm$ sd)	<i>Skeletonema sp.</i> Walne (ppm) ( $\pm$ sd)	Selisih Nilai (ppm)
L-Histidine	173,72 $\pm$ 0,012	113,33 $\pm$ 0,015	60,39 (G)
L-Threonine	2359,05 $\pm$ 0,018	2070,73 $\pm$ 0,019	288,3 (G)
L-Arginine	339,55 $\pm$ 0,011	267 $\pm$ 0,019	72,55 (G)
L-Methionine	71,07 $\pm$ 0,037	51,86 $\pm$ 0,031	19,21 (G)
L-Valine+L-Thryptophan	124,37 $\pm$ 0,022	88,36 $\pm$ 0,016	36,01(G)
L-Phenylalanine	187,54 $\pm$ 0,019	145,99 $\pm$ 0,044	41,5 (G)
L-Isoleucine	84,89 $\pm$ 0,013	61,47 $\pm$ 0,017	23,42 (G)
L-Leucine	298,09 $\pm$ 0,037	220,9 $\pm$ 0,026	77,19 (G)
L-Lycine	331,65 $\pm$ 0,019	226,67 $\pm$ 0,011	104,98 (G)

Dari hasil kromatogram terdapat asam amino threonin yang tertinggi, adapun fungsi dari asam amino threonin sebagai kerangka dasar senyawa vitamin karena asam nukleat yang berfungsi sebagai pengikat ion logam yang diperlukan dalam reaksi enzimatik selain itu threonin juga berfungsi membantu pencegahan penumpukan lemak [4].

Selanjutnya dari hasil kromatogram terdapat asam amino valin dan triptofan berikatan hal ini dikarenakan triptofan merupakan asam amino esensial yang mempunyai rantai cabang aromatik dan valin merupakan asam amino esensial yang mempunyai rantai cabang alifatik. Dua asam amino yang berikatan melalui satu ikatan peptida dengan cara melepas molekul air ini sering disebut reaksi keseimbangan lebih ke arah hidrolisis dengan tidak memerlukan energi.

Asam – asam amino digabungkan oleh suatu ikatan peptida (-CONH-) dimana gugus karboksil suatu asam amino berkaitan dengan gugus amino dari molekul asam amino lain menghasilkan suatu dipeptida dengan melepaskan molekul air [16]. Dipeptida ini masih mempunyai gugus asam amino dan karboksil bebas sehingga dapat bereaksi dengan dipeptida dipeptida lain dan akhirnya membentuk suatu molekul protein.

## SIMPULAN

Media kultur terbaik adalah Guillard teknis hal ini berdasarkan pada pertumbuhan, lemak dan profil asam amino esensial.

**Acknowledgements** Terima kasih disampaikan kepada Dinas Perikanan dan Kelautan Maribaya Tegal dan Pemerintah Provinsi Jawa Tengah atas semua fasilitas yang telah diberikan pada saat penelitian. Seluruh staf Satker PPIP Sluke Rembang yang telah banyak membantu. Ucapan terimakasih penulis ucapkan pada ibu Antik Erlina, M.Si; Siska Apriliyanti., S.Pi dan semua staf Laboratorium Pakan Alami BBPBAP Jepara.

## Pustaka

- Herawati Endar, Johannes Hutabarat, S. Budi Prayitno, Ocky Karna Radjasa, YS. Darmananto. 2013. The Profile Essential Amino Acid, Fatty Acid and The Growth of *Chaetoceros gracilis* Using Technical Media Culture Guillard and Double Walne. FFTC-NTOU Joint International Seminar on Integrating of Promising Technology for Aquaculture and Fisheries.
- Herawati V.E., Johannes Hutabarat, S. Budi Prayitno. 2012. The Effect of Essential Amino Acid Profile, Fatty Acid Profile and To Growth of *Skeletonema costatum* using Technical Media Culture Guillard and Double Walne. J. Coast Dev. Vol 16 (1): 48-54.
- BBPBAP, 2010. "Pattern of Growth, Protein Content and Production Biomass *Skeletonema* sp At Various Levels of Gram". Litkayasa report. BBPBAP
- Herawati, V.E. 2013. "Analysis of Technical Culture Media *Chaetoceros calcitrans* and *Skeletonema costatum* To Improving Quality of Local *Artemia salina* as a Source of Natural Feeding Larvae of Shrimp Vanname (*Litopenaeus vannamei*).". [Dissertation]. Doctoral Program. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Anderson R. 2005. Algal Culturing Techniques. J. Aquat. Int. 15(4). 239-269.
- BBPBAP. 2007. "Application Medium 'Walne' 2 Dosage and Preparation Techniques Media On Culture *Chaetoceros* sp Laboratorium Scale and Semi Bulk". Litkayasa Report. BBPBAP
- Amsler. D. 2008. Alga Chemical Technology Department of Biology University of Alabama at Birmingham. Aquaculture 18(5): 105-116.
- Susanto, A., E. Sutanti dan A. Basyar, 2007. Provision of plankton biomass for shrimp hatcheries and aquaculture. Reports test results. Center for Development of Brackish Water Aquaculture, Jepara
- Rousch JM, Scott SE, Sommerfeld MR. 2008. Changes in Fatty Acids Profile of Intolerant Thermo and Tolerant Marine Diatoms During Temperature Stress. Journal Exp. Marine Biol. 39(5): 145-156 pp.
- Abdul gani, N., Zuhdi, A. and Sukresi. 2008. Potential *Skeletonema costatum* and *Spirulina* Microalgae as biodiesel feedstock. Journal Oceatek 5. 15-21
- Cahyaningsih, S., 2006. "Natural Forage Production Technical Instructions". Department of Marine and Fisheries
- Koniyo, Yuniarti. 2010. "Biology and Culture Method of Plankton For Natural Feeding Animals Water Larva". Faculty of Sciences. UNG. 3 (2): 1-6.
- Fogg, G.E. 1965. Algae Culture and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press. Madison Milk. Wauhe
- Agustini, N.W.S and Kabinawa, I. N. K. 2011. The Influence of Nitrate Concentration as a Nitrogen Resources and Culture Media Towards The Forming. Biotechnology and Research Center LIPI. Bogor
- Brown, M.R. 2002. "Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture." Symposium Internasional de Nutrition Acuicola. Mexico.
- Araujo, S and V. Garcia. 2010. "Growth and Biochemical Composition of the Diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* brightwell Under Different Temperature, Salinity and Carbon Dioxide Levels. 1. Protein, Carbohydrates and Lipids. J. Aquaculture. 24(6):40-48.