

ANALISIS KANDUNGAN β -KAROTEN FUSAN INTRASPESES *Chlorella vulgaris* dan APLIKASINYA SEBAGAI PAKAN TAMBAHAN PADA POST LARVA STADIA 10 UDANG WINDU (*Penaeus monodon*).

Dwi Kristiyaningrum*, Hermin Pancasakti Kusumaningrum, Endang Kusdiyantini

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Tembalang, Semarang
50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

*Email: kristiyaningrum.dwi@gmail.com

Abstract

Carotenoids are one of pigment which needed for development of post-larvae tiger shrimp (*Penaeus monodon*), but the shrimp unable to synthesis carotenoids by themselves in the body so it takes a feed containing carotenoids. Carotenoids can be obtained from synthetic feed or natural feed. One of the natural feed is microalgae *Chlorella vulgaris*. β -carotene is the highest content of carotenoid in *C. vulgaris*, this content can be improved by protoplast fusion. The purpose of this study was to determine the amount of β -carotene in fusan intraspecies *C. vulgaris* and its application as supplement in the post-larvae stadia 10th tiger shrimp (*P. monodon*) Measurement of the amount of β -carotene using UV-Vis at a wavelength of 460nm. The feeding is done three times a day. The results showed that the amount of β -carotene on fusan *C. vulgaris* is greater than the wildtype of *C. vulgaris*. β -carotene in the fusan *C. vulgaris* is 14.88 μ g/g while the wildtype of *C. vulgaris* is 7.14 μ g/g. Additional applications *C. vulgaris* by 10×10^4 in 0.0225 g synthetys feed post-larvae stadia 10th shrimp (*P. monodon*) compared to the post-larvae shrimp fed only control showed that the feed given additional fusan of *C. vulgaris* increases the weight of shrimp at 39.9%, while the given wildtype of *C. vulgaris* increasing shrimp weight by 10.1%.

Keywords: β -carotene, *Chlorella vulgaris*, protoplast fusion, post larvae shrimp

Abstrak

Karotenoid merupakan pigmen yang dibutuhkan dalam perkembangan post larvae udang windu (*Penaeus monodon*), akan tetapi udang tidak mampu mensintesis sendiri karotenoid dalam tubuhnya sehingga dibutuhkan pakan yang mengandung karotenoid. Karotenoid bisa didapatkan dari pakan buatan maupun pakan alami. Salah satu pakan alami tersebut adalah mikroalga *Chlorella vulgaris*. β -karoten adalah kandungan tertinggi karotenoid pada *C. vulgaris*. Jumlah β -karoten dapat ditingkatkan dengan cara fusi protoplas. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jumlah kandungan β -karoten fusan intraspecies *C. vulgaris* dan aplikasinya sebagai pakan tambahan pada post larvae stadia 10 udang windu (*P. monodon*). Pengukuran jumlah β -karoten dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 460nm. Pemberian pakan dilakukan 3 kali sehari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah β -karoten pada fusan *C. vulgaris* lebih besar yaitu 14,88 μ g/g dibandingkan dengan induk *C. vulgaris* sebesar 7.14 μ g/g. Aplikasi penambahan *C. vulgaris* sebanyak 10×10^4 pada setiap 0,0225g pakan buatan post larvae stadia 10 udang windu (*P. monodon*) menunjukkan bahwa bila dibandingkan dengan kontrol maka pakan yang diberi tambahan fusan *C. vulgaris* telah meningkatkan bobot udang sebesar 39,9%, sedangkan dengan pakan yang ditambah induk *C. vulgaris* sebesar 10,1%.

Kata kunci : β -karoten, *Chlorella vulgaris*, fusi protoplas, post larvae udang

Pendahuluan

Chlorella vulgaris berdasarkan UU RI No. 9 tahun 1985 tentang Perikanan termasuk komoditas perikanan yang tergolong tumbuhan renik air berukuran 3 – 15 mikron. Mikroalga tersebut telah hidup di bumi sejak 2,5 milyar tahun yang lalu (Wirosaputro, 2002). Komposisi karotenoid pada *C. vulgaris* sama dengan tumbuhan tingkat tinggi yaitu -karoten, -karoten, neoxanthin, lutein, violaxanthin, antheraxanthin, dan zeaxanthin. Karotenoid tersebut merupakan karotenoid primer yang ada pada lamella kloroplas (Young, 1993 dalam Gouveia et al., 1996). *C. vulgaris* memiliki kandungan -karoten yang disintesis selama fase pertumbuhan logaritmik. Konsentrasi -karoten akan menurun ketika jalur karotenogenik sudah aktif. Jalur karotenogenik ini menunjukkan kemampuan beberapa transformasi oksidatif yang mengubah -karoten menjadi kantaxanthin, dan zeaxanthin/lutein (Gouveia et al., 1996).

Fase pertumbuhan udang yang mudah terserang penyakit pada udang adalah tahap post larva. Pertumbuhan dan ketahanan penyakit pada larva udang sangat ditentukan oleh pakan yang diberikan (Mujiman, 2003). Pakan udang ada dua macam, yaitu pakan alami dan pakan buatan. Pakan alami terdiri dari plankton, siput-siput kecil, cacing kecil, anak serangga dan detritus (sisa hewan dan tumbuhan yang membusuk). Salah satu unsur penting pada pakan alami adalah karotenoid. Udang tidak dapat menyusun karotenoid secara mandiri di dalam tubuhnya, tetapi udang mampu mengubah beta karoten dan mensintesis kantaxanthin pada pakan untuk dideposit dalam tubuh menjadi astaxanthin (Boonyaratpalin et al., 2001).

Keberadaan karotenoid dalam pakan sebagai sumber pigmen adalah esensial diperlukan karena ketidakmampuan udang mensintesis karotenoid. Selama proses pematangan gonad, karotenoid terakumulasi dalam

hepatopankreas. Selama vitelogenesis, karotenoid diangkut ke dalam hemolimpha sebagai karotenoglikolipoprotein yang terakumulasi dalam telur sebagai bagian dari protein lipovitelin (Adiwidjaya dkk, 2005).

Mengingat akan kebutuhan karotenoid yang tinggi, yang belum diimbangi dengan jumlah produksi yang mencukupi maka diperlukan upaya untuk meningkatkan ketersediaannya. Teknik fusi protoplas telah diaplikasikan oleh beberapa peneliti untuk meningkatkan kandungan karotenoid pada mikroalga misalnya pada *Dunaliella*, sebesar 200%, dan hasil fusi antara *Dunaliella* dengan *Phaffia rhodozyma* sebesar 346 % (Zainuri et al., 2008; Setiyawan, 2010)

Bahan dan Metode

Bahan Penelitian

Stok induk *C. vulgaris* media cair, stok fusan *C. vulgaris* media cair), alkohol, spiritus, aquades steril, kapas, tissue, media pupuk Walne, dan udang windu stadia pl-10.

Alat Penelitian

Spektrofotometer, erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, lampu spiritus, inkubator, autoklaf, oven, mikroskop, pipet ukur, pipet tetes, neraca sartorius atau ohaus, batang pengaduk, mikropipet, tip, gelas ukur, sentifuga, rak tabung reaksi, bekkor glass, gelas benda, gelas penutup, gelas benda cekung, mikroskop cahaya, haemocytometer, hand counter, selang, aerator, botol kultur, dan lampu.

Metode

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat-alat gelas disterilkan didalam autoklaf. Alat-alat seperti jarum preparat, ose, jarum tanam tajam disterilkan dengan pembakaran langsung di atas lampu spiritus. Aquades dan medium ditempatkan di dalam erlenmeyer lalu ditutup dengan kapas, dibungkus

dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang kasur. Kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dengan tekanan 2 atm. Gelas penutup dan gelas benda disterilkan secara kimia dengan menggunakan larutan alkohol 96% dan dipanaskan di atas lampu spiritus. Selang untuk kultur media cair disterilkan dengan menggunakan larutan alkohol 70% kemudian dikeringkan dengan oven. Media air laut disterilkan didalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit dengan tekanan 2 atm.

b. Kultivasi Fusan *C. vulgaris* dan *C. vulgaris* Induk

Air laut yang sudah disterilkan di dalam autoklaf dimasukkan ke dalam botol kultur. Perbandingan antara air laut dengan *C. vulgaris* induk maupun fusan *C. vulgaris* adalah 3:1. Sebelum inokulum dimasukkan, media kultur (air laut) dipupuk terlebih dahulu menggunakan pupuk Walne.

c. Penghitungan Sel *C. vulgaris*

Jumlah sel pada awal populasi adalah 23×10^4 sel/ml. Pemantauan populasi mikroalga ini dilakukan setiap hari selama 9 hari dengan cara mengambil 1 ml sampel kemudian ditetaskan pada grid counting haemocytometer dengan menggunakan pipet kemudian ditutup dengan cover glass dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dan dihitung dengan bantuan hand counter. Kepadatan mikroalga diketahui dengan cara menghitung mikroalga yang terdapat pada kotak yang dipilih secara acak. Apabila jumlah mikroalga yang didapat adalah N, maka kepadatannya adalah $N \times 10^4$ (Isnansetyo & Kurniastuty, 1995).

d. Pembuatan Pakan udang dari *C. vulgaris*

Pembuatan pakan dilakukan dengan pencampuran pelet (pakan pabrikan) dengan sel induk *C. vulgaris* dan sel fusan *C. vulgaris* masing-masing sebanyak 10×10^4 per 0,0225 g pakan (untuk konsumsi larva udang 3 kali dalam sehari). Pembuatan pakan dikhususkan untuk

udang tahap Post Larva (PL) yaitu dengan bobot tubuh larva udang 0,02 g – 0,2 g, jika diasumsikan bobot tubuh post larva udang yaitu 0,15 g, maka diperoleh 0,0225 g dari 15% bobot tubuhnya (Mujiman, 2003).

e. Pemberian pakan

Pemilihan benih dari tambak didapatkan dari Jepara, benih udang didapatkan sekitar 250 ekor langsung ditempatkan pada kolam dengan ukuran 0,5m x 1m, air pump/aerator ditempatkan sedemikian rupa sehingga aerasi dalam kolam tetap berjalan lancar. Pemberian pakan pada benih udang dilakukan tiga kali dalam sehari, pagi, siang, sore hari. Pemberian pakan dibagi menjadi tiga perlakuan berbeda, yaitu:

- A. Kolam pertama diberi pakan udang yang didapat dari pasar hasil produksi industri
- B. Kolam kedua diberi pakan buatan yang telah ditambah fusan *C. vulgaris*
- C. Kolam ketiga diberi pakan buatan yang telah ditambah induk *C. vulgaris*

f. Uji Kandungan Karotenoid dan Protein

Kandungan pigmen -karoten dan protein diuji menggunakan metode spektrofotometri menurut Nielsen (1995), yaitu sampel induk *C. vulgaris* dan fusan *C. vulgaris* diambil untuk mewakili keseluruhan sampel dan ditimbang sebanyak dengan jumlah berat basah yang sama. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan butil hidroksi toluene (BHT) 0,1 % dalam aseton dan diekstraksi dengan 5 ml tetrahidrofur (THF) menggunakan ultrasonik selama 10 menit, kemudian disaring. Proses ekstraksi diulangi hingga residu tidak berwarna. Kumpulan filtrat dipipet sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi baru lalu ditambahkan 2 ml BHT 0,1 % dalam aseton dan 8 ml akuades lalu dihomogenasi dengan vortex selama 20 detik. Kemudian dipipet kembali sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi baru lalu ditambahkan 1 ml alkohol 96 %, 2 ml BHT 0,1 % dalam aseton dan 5 ml PE lalu disentrifuge (5x10 menit). Setelah

terbentuk dua fasa, kedua fase dipisahkan. Kumpulan fase organik diukur dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 460 nm.

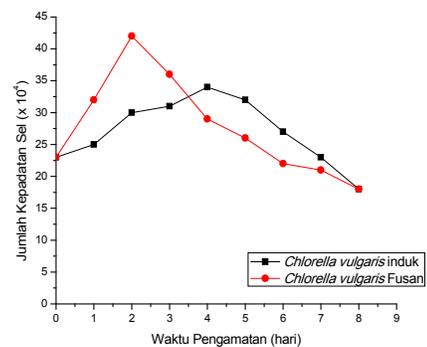
Kandungan protein diukur menggunakan metode Khejdahl yaitu dengan cara sampel didestruksi dengan asam sulfat dan dikatalisis dengan katalisator. Setelah itu bahan yang telah disiapkan, dimasukkan dalam labu. Kemudian ditambahkan 7,5 g kalium sulfat dan 0,35 g raksa (II) oksida dan 15 ml asam sulfat pekat. Semua bahan dipanaskan dalam labu Kjeldahl dalam lemari asam sampai berhenti berasap dan diteruskan pemanasan sampai mendidih dan cairan sudah menjadi jernih. Pemanasan ditambah kurang lebih 30 menit, pemanasan dimatikan dan dibiarkan sampai dingin. Selanjutnya ditambahkan 100 ml akuades ke dalam labu Kjeldahl yang didinginkan dalam air es dan beberapa lempeng Zn, ditambahkan 15 ml larutan kalium sulfat 4% (dalam air) dan akhirnya perlahan-lahan ditambahkan larutan natrium hidoksida 50% sebanyak 50 ml yang telah didinginkan dalam lemari es. Labu Kjeldahl dipasang dengan segera pada alat destilasi dan dipanaskan perlahan-lahan sampai dua lapis cairan tercampur, kemudian dipanaskan dengan cepat sampai mendidih. Destilasi ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan larutan baku asam klorida 0,1N sebanyak 50 ml dan indikator merah metil 0,1% b/v (dalam etanol 95%) sebanyak 5 tetes, ujung pipa kaca destilator dipastikan masuk ke dalam larutan asam klorida 0,1N. Kadar protein dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Protein} = \% \text{ N} \times \text{faktor konversi}$$

Hasil dan Pembahasan

Pertumbuhan Induk *C. vulgaris* dan Fusan

Pertumbuhan induk *C. vulgaris* dan fusan *C. vulgaris* hasil fusi pada penelitian ini diperlihatkan pada Gambar 4.1. Grafik pertumbuhan menunjukkan perbedaan pertumbuhan sel induk dan fusan. Puncak kepadatan sel induk *C. vulgaris* terlihat relatif lebih lambat dibandingkan dengan fusan *C. vulgaris*.



Gambar 4.1 Grafik Pertumbuhan induk *C. vulgaris* dan fusan

Berdasarkan grafik pertumbuhan *C. vulgaris* pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa puncak kepadatan induk *C. vulgaris* tertinggi berada pada hari ke-5 dengan kepadatan sel 34×10^4 sel/ml, sedangkan pada fusan puncak kepadatan tertinggi dicapai pada hari ke-3 dengan jumlah kepadatan yaitu 42×10^4 sel/ml. Fusan lebih cepat mencapai puncak kepadatan, akan tetapi lebih cepat juga mengalami penurunan jumlah kepadatannya dibandingkan dengan induk *C. vulgaris*. Penurunan kepadatan baik pada induk *C. vulgaris* maupun fusan terjadi sampai pada hari ke-9.

Ketersediaan nutrisi pada media dan stress pada sel merupakan faktor yang diduga menjadi penyebab pertumbuhan fusan lebih cepat dibandingkan sel induk. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Gouveia et al., (1996) dimana pertumbuhan *C. vulgaris* sangat bergantung pada umur sel, kekurangan nutrisi pada medium, stress oleh kondisi lingkungan seperti perubahan salinitas, suhu ketersediaan nitrogen, peningkatan intensitas cahaya dan stress lainnya.

Pertumbuhan sel dalam bentuk fusan menjadi suatu kondisi stress bagi *C. vulgaris* yang memicu pembelahan sel dan pertumbuhan yang lebih cepat dan lebih banyak dibandingkan sel induk. Satu sel induk akan menghasilkan empat sel anakan (Gouveia et al., 1996). Setelah periode tersebut maka pembelahan sel mulai berkurang namun ukuran sel akan membesar. Pada saat nutrisi dalam

medium mulai turun maka jumlah sel fusan akan lebih cepat turun akibat keterbatasan nutrisi. Penurunan jumlah akan diikuti dengan penurunan ukuran sel. Hal ini diperlihatkan bahwa pada saat hari keempat kultivasi pada media cair, terlihat fusan yang ditanam dalam media cair akan lebih cepat menurun pertumbuhannya dibandingkan dengan induknya sampai pada hari ke-10.

Kandungan β -karoten *Chorella vulgaris* dan Fusan

Kandungan β -karoten yang terdapat pada *C. vulgaris* induk dan fusan tertera pada tabel 4.1. Hasil analisis menunjukkan bahwa fusan *C. vulgaris* memiliki kandungan β -karoten yang lebih tinggi sebesar 14,88 $\mu\text{g/g}$ dibanding induk. *C. vulgaris* yaitu sebesar 7, 14 $\mu\text{g/g}$, atau dengan kata lain kandungan β -karoten dalam fusan mencapai 2x lipat dibandingkan dengan *C. vulgaris* induk.

Tabel 4.1 Kandungan β -karoten *C. vulgaris* induk dan fusan

Jenis	β -karoten
<i>C. vulgaris</i>	7.14 $\mu\text{g/g}$
Fusan	14.88 $\mu\text{g/g}$

Pembentukan karotenoid pada *C. vulgaris* bergantung pada umur sel, kekurangan nutrisi pada medium, kandungan logam berat dan stress lingkungan. Analisis menggunakan HPLC oleh Gouveia et al. (1996) memperlihatkan pada saat pertumbuhan sel *C. vulgaris* meningkat, karotenoid yang akan dihasilkan adalah neoxantin, violaxantin, lutein, klorofila, klorofil-b dan β -karoten. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian dimana kandungan β -karoten fusan memiliki konsentrasi hampir dua kali lipat dari induk karena jumlah sel pada saat pertumbuhan juga lebih besar.

Hasil analisis tambahan terhadap kandungan protein memperlihatkan konsentrasi yang lebih besar pada fusan yaitu 0,23% dibandingkan induk *C. vulgaris* sebesar 0,18%. Hasil yang

diperoleh ini membuktikan penelitian Gouveia et al., (1996) dan memperkuat dugaan bahwa pada saat sel berbentuk fusan, stress akibat proses yang dialami oleh sel telah membuat sel menghasilkan protein dalam jumlah yang lebih besar. Hasil analisis juga memperlihatkan bahwa aplikasi fusi protoplas pada *C. vulgaris* telah meningkatkan kandungan β -karoten dan protein.

Pertumbuhan Post Larva 10 Udang Windu

Aplikasi pakan fusan dan induk *C. vulgaris* dilakukan setelah kultivasi. Pakan hasil pencampuran fusan *C. vulgaris* dengan pelet ditunjukkan pada gambar 4.2.

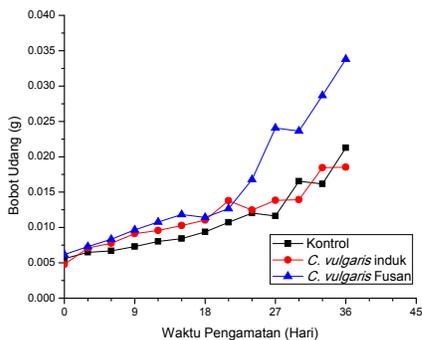
Pengujian daya apung dan daya tahan pakan pada penelitian ini telah dilakukan dan memperlihatkan pakan tersebut dapat tenggelam di dasar perairan dan dapat bertahan cukup lama di dalam air. Pengujian daya apung dan daya tahan pakan pada penelitian ini telah dilakukan dan memperlihatkan pakan tersebut dapat tenggelam di dasar perairan dan dapat bertahan cukup lama di dalam air. Pengujian daya apung dan daya tahan pakan pada penelitian ini telah dilakukan dan memperlihatkan pakan tersebut dapat tenggelam di dasar perairan dan dapat bertahan cukup lama di dalam air. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pakan memiliki daya tahan yang cukup baik.



Gambar 4.2 Pakan buatan dari fusan intraspecies *C. vulgaris*

Pengaruh penambahan pakan *C. vulgaris* dan fusan memperlihatkan hasil pengamatan bobot udang yang tertera

pada gambar 4.3. Tampak bahwa bobot udang dengan pakan yang ditambahi induk *C. vulgaris* maupun fusan lebih tinggi dibanding udang dengan pakan kontrol, Rata-rata peningkatan bobot udang yang diberikan pakan dengan penambahan *C. vulgaris* induk adalah 10,1%. Udang yang diberi pakan dengan penambahan fusan menunjukkan pertumbuhan yang jauh lebih cepat dibandingkan dengan udang yang diberi pakan induk *C. vulgaris* maupun pakan kontrol, dengan rata-rata peningkatan sebesar 39,9%.



Gambar 4.3 Grafik pertambahan bobot udang.

Pertumbuhan udang yang diberi pakan dengan penambahan *C. vulgaris* lebih cepat karena pada *C. vulgaris* terkandung karotenoid yang lebih banyak dibandingkan pada pakan biasa. Menurut Gouveia dan Empis (2002), pakan tambahan *C. vulgaris* akan meningkatkan imunoresistensi terhadap infeksi virus, bakteri, jamur dan parasit. Tacon (1981) juga memperlihatkan bahwa penambahan pakan berupa karotenoid dari yeast merah sebanyak 15% pada ikan rainbow trout mampu meningkatkan laju pertumbuhan sebesar 2.07. atau sebesar 1.30g/hari dan astaxantin juga mampu meningkatkan pertumbuhan pada ikan salmon setelah pemberian pakan tambahan menggunakan astaxantin selama 35 hari.



Gambar 4.4 Kolam pertumbuhan post-larvae udang.

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian pakan buatan ditambah fusan fusi *Dunaliella* - *Phaffia* mampu meningkatkan bobot udang sekitar 0.0067 g dari berat awal udang (Setiyawan, 2010). Penurunan yang terjadi pada hari ke 24 dimungkinkan karena *C. vulgaris* mulai memasuki fase kematian. Hasil penelitian yang diperoleh telah memperlihatkan bahwa penambahan pakan yang mengandung karotenoid baik induk *C. vulgaris* maupun fusan secara umum telah meningkatkan pertambahan bobot udang jika dibandingkan dengan rata-rata kenaikan bobot udang kontrol.

Kesimpulan

Fusan *C. vulgaris* memiliki kandungan -karoten yang lebih tinggi dibandingkan induknya Aplikasi hasil fusan *C. vulgaris* sebagai pakan tambahan post larva udang telah meningkatkan bobot post larvae udang windu.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Ibu Hermin Pancasakti Kusumaningrum, Bapak Muhammad Zainuri dan Ibu Endang Kusdiyantini yang telah memberi kesempatan pada penulis untuk terlibat dalam penelitian, dengan judul Pengembangan Produksi Karotenoid Alga *Dunaliella* dan Khamir *Phaffia rhodozyma* Melalui Teknik Fusi Protoplasma untuk Diversifikasi Pakan Akuakultur.

Daftar Pustaka

- Adiwidjaya, A., H. Triyono, A. Supramono dan Subiyanto, 2005. Manajemen Pakan dan Pendugaan Populasi Pada Budidaya Udang. DKP. Ditjen. Perikanan Budidaya. BPBAP. Jepara.
- Boonyaratpalin. M, S. Thongrod, K. Supamattaya, G. Britton, and L. E. Schlipalius. 2001. Effect of β -carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. *Aquaculture Research*. 32:182-190.
- Mujiman, A dan S. Suyanto. 2003. Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya. Jakarta
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton. Kanisius. Yogyakarta.
- Nielsen, S. S, 1995. Introduction to The Chemical Analysis of Food. Chapman and Hall. New York. USA.
- Gouveia. L, V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Novais, and J. Empis. 1996. Evolution of Pigment Composition in *Chlorella vulgaris*. *Biosources Technology*, Elsevier Science Limited, p. 157-163.
- Gouveia. L and J. Empis. 2002. Relative Stabilities of Microalgal Carotenoids in Microalgal Extracts, Biomass and Fish Feed: Effect of Storage Condition. *Innovative Food Science and Emerging Technologists*, p. 227-233
- Setiyawan, S.A. 2010. Perbandingan Pertumbuhan Larva Udang Windu Pasca Pemberian Pakan Rekombinan Fusi Protoplas Intraspecies dan Interspecies *Dunaliella salina* dan *Phaffia rhodozyma* Skala in vitro. Laporan Kerja Praktik. Universitas Diponegoro, Semarang
- Tacon, A. 1981. Speculative Review of Possible Carotenoid in Fish. *Prog. Fish Cult.* 43 (4). P. 205-208.
- Wirosaputro, S. 2002. *Chlorella* Untuk Kesehatan Global, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Young, A. J. 1993. Algae: Growth Techniques and Biomass Production. *Techniques in Bioproduction and Photoxynthesis*, ed. J. Coombs and D. O. Hall. Pergamon Press Oxford, p. 66-77
- Zainuri, M., H.P. Kusumaningrum and E. Kusdiyantini. 2009. Intraspecies Protoplast Fusion Process of *Dunaliella Salina*. Laporan Penelitian, DIKTI.