

# Kandungan Lipid Total *Nannochloropsis oculata* Pada Kultur dengan Berbagai Fotoperiod

Widianingsih<sup>1\*</sup>, Retno Hartati<sup>1</sup>, H. Endrawati<sup>1</sup>, Valentina R. Iriani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biologi Kelautan, Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK Universitas Diponegoro  
Jl. Prof. Dr. Soedharto, Tembalang, Semarang,  
E-mail: widia2506@yahoo.com

<sup>2</sup>Divisi Pembenihan Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung  
Jl. Yos Sudarso, Desa Hanura, Kec. Padang Cermin, Pesawaran Lampung 35454

## Abstrak

Fotoperiod memainkan peranan penting dalam proses fotosintesis pada mikroalga *Nannochloropsis oculata*. Fotoperiod akan mempengaruhi kadar total lipid pada berbagai jenis mikroalga. Penelitian ini bertujuan untuk determinasi kandungan lipid total mikroalga *Nannochloropsis oculata* yang dikultur pada berbagai kondisi fotoperiod. Rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan diterapkan pada penelitian ini. Perlakuan pada penelitian ini adalah fotoperiod 4 jam terang-20 jam gelap, 8 jam terang-16 jam gelap, 12 jam terang-12 jam gelap, dan 24 jam terang. *N. oculata* dikultur pada erlenmeyer 250 mL dengan sistem aerasi kontinyu dan pencahayaan 3000 lux, salinitas 33 ppt dan medium Conway. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan lipid total pada *N. oculata* tertinggi ditemukan pada perlakuan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap ( $31,8 \pm 3,03\%$ -dw) dan kemudian diikuti pada fotoperiod 8 jam terang-16 jam gelap ( $25,2 \pm 2,19\%$ -dw) dan fotoperiod 24 jam terang ( $23,2\%$ -dw). Pada perlakuan fotoperiod 8 jam terang-16 jam gelap dan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap pada media pemeliharaan *Nannochloropsis oculata* menunjukkan hasil kadar lipid total yang lebih besar pada fase stasioner dibandingkan dengan eksponensial.

**Kata kunci:** *Nannochloropsis oculata*, Lipid Total, fotoperiod

## Abstract

### Total Lipid Content of Culture of *Nannochloropsis oculata* at Different Photoperiod

Photoperiod has important role on the photosynthesis process of microalgae *Nannochloropsis oculata*. Photoperiod also influences on total lipid content of various microalgae. This research has purpose to examine the effect of nutrient phosphate and nitrate composition to the total lipid content of *Nannochloropsis oculata* belong to class Eustigmatophyceae. There were four treatments of photoperiod as follows; (a) photoperiod A (4:20 hour light:dark); (b) photoperiod B (8:16 hour light:dark); photoperiod C (12:12 hour light:dark); and (d) photoperiod D (24 hour light). There were three replicates for each treatment. The volume of culture medium was 250 mL for each treatment with continuously aeration and illumination (3000 lux). According to the research, the highest total lipid content of *Nannochloropsis oculata* had been found on the treatment of photoperiod 12:12 hour light:dark  $31,8 \pm 3,03\%$ -dw, and then followed by photoperiod 8:16 hour light:dark as amount  $25,2 \pm 2,19\%$ -dw and 24 hour light ( $23,2 \pm 1,99\%$ -dw), and then followed by photoperiod 24 hour light. Differences of photoperiod 8:16 hour light:dark and photoperiod 12:12 hour light:dark on culture medium of *Nannochloropsis oculata* showed result that there were differences of total lipid content on the stationary and exponential phase. The highest percentage of total lipid was found in cell of *N. oculata* grown under treatment of photoperiod 12:12 hour light:dark. The treatment of photoperiod 8:16 hour light:dark and 12:12 hour light:dark in the *Nannochloropsis oculata* culture showed result that the total lipid content on stationary phase was greater than exponential phase.

**Key words:** *Nannochloropsis oculata*, Total Lipid, Photoperiod

## Pendahuluan

*Nannochloropsis oculata* merupakan mikroalga yang banyak digunakan sebagai pakan alami pada hatchery dan balai-balai penelitian perikanan laut.

Sebagai picoplankton yang berukuran 2–5  $\mu\text{m}$ , *N. oculata* tergolong dalam kelas Eustigmatophyceae, memiliki 2 flagella dan salah satu flagela berambut tipis serta memiliki dinding sel yang tersusun dari selulosa (Tomas, 1997).

Studi tentang pengaruh fotoperiod telah banyak dilakukan untuk mengetahui aspek fisiologi mikroalga khususnya proses fotosintesis (Nielsen, 1997; Rost *et al.*, 2006; Ramakrishna *et al.*, 2010). Pada penelitian pengaruh fotoperiod terhadap proses fotosintesa *Emiliania huxleyi*, ditemukan bahwa laju fotosintesa maksimum spesifik didapati pada kultur dengan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap tiga kali lebih besar dibandingkan dengan fotoperiode yang kontinyu (24 jam) (Nielsen, 1997). *Nannochloropsis* sp memiliki kandungan total lipid yang cukup tinggi (31–68%dw) (Hu dan Gao, 2006). Adanya kandungan total lipid ini selain bermanfaat sebagai pakan alami juga sebagai salah satu kandidat sumber bahan biodiesel (Hu dan Gao, 2006, Schenk *et al.*, 2008).

Pemberian tekanan terhadap lingkungan (salinitas, suhu, fotoperiod, intensitas cahaya dan nutrisi) diketahui dapat mempengaruhi kandungan total lipid pada mikroalga (Qin, 2005). Fotoperiod mempunyai pengaruh yang sangat besar terhadap proses fotosintesis mikroalga yang menghasilkan energi yang sangat penting dalam produktivitas primer. Studi tentang pengaruh fotoperiod telah banyak dilakukan untuk mengetahui aspek fisiologi Rost *et al.*, 2006; Ramakrishna *et al.*, 2010). Penelitian Nielsen (1997) menemukan bahwa laju fotosintesis mikroalga khususnya proses fotosintesis (Nielsen, 1997; maksimum spesifik *Emiliania huxleyi* yang diperoleh pada kultur dengan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap tiga kali lebih besar dibandingkan dengan fotoperiod yang kontinyu (24 jam). Pada mikroalga *Botryococcus braunii* (China strain 1) dengan fotoperiod 12 jam terang dan 12 jam gelap menunjukkan pertumbuhan yang terbaik (Qin, 2005).

Fotoperiod juga berpengaruh pada produksi kandungan lipid dan fatty acid pada mikroalga (Ohta *et al.*, 1994; Vladislay *et al.*, 1994). Kandungan lipid total pada kelas Cyanobacteria (Cyanophyceae) pada kondisi inkubasi gelap lebih banyak dibandingkan dalam kondisi inkubasi terang (Al-Hasan, *et al.*, 1989). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh fotoperiod terhadap kandungan lipid total *Nannochloropsis oculata*.

## Materi dan Metode

Mikroalga *Nannochloropsis oculata* diperoleh dari kultur murni Balai Penelitian Perikanan Laut Lampung dan telah dikembangkan di Laboratorium Mikroalga Marine Field Station Teluk Awur, Jepara. Penelitian telah dilakukan pada bulan Januari–Februari 2010. Mikroalga dikultur pada elemenyer 250 ml dengan kepadatan awal  $500 \times 10^4$  sel/ml, suhu ruangan 25–30

°C, pencahayaan 3000 lux, pH 7–8, dan sistem aerasi kontinyu sesuai dengan metode Robert (2005). Pada penelitian ini digunakan media Conway dengan susunan nutrisi 45 g Na<sub>2</sub>EDTA, 1,3 g FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 33,6 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 20 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,36 g MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 100 g NaNO<sub>3</sub>, trace metal solution 1 ml, vitamin 1 ml (merupakan larutan yang terbuat dari 10 mg vitamin B12; 200 mg vitamin B1 yang dilarutkan dengan *aquabidest* 200 ml) dalam *aquadest* 1 liter. Media kultur pada penelitian ini menggunakan pupuk Conway dengan konsentrasi 1 ml per 1 liter media kultur.

Perlakuan fotoperiod dilakukan dengan 3 kali ulangan dan pengukuran total lipid dilakukan pada fase eksponensial dan stasioner. Perlakuan fotoperiod terdiri dari : (a) Fotoperiod A (4 jam terang-20 jam gelap); (b) Fotoperiod B (8 jam terang-16 jam gelap); (c) Fotoperiod C (12 jam terang-12 jam gelap); (d) Fotoperiod D (24 jam terang). Setiap hari dilakukan penghitungan terhadap kepadatan *N. oculata*, guna melihat perkembangan pertumbuhan. Pemanenan untuk analisa lipid total dilakukan pada fase eksponensial dan stasioner. Pada penelitian ini analisis lipid total menggunakan pelarut non-polar petroleum ether dengan metode Bethien-Diemar (1963) dalam Hermawan (2004). Anova satu arah digunakan untuk melihat pengaruh perbedaan fotoperiod terhadap kadar total lipid pada kultur *N. oculata* di fase stasioner dan eksponensial.

## Hasil dan Pembahasan

Fotoperiod merupakan salah satu faktor yang penting dalam penentuan tingkat keberhasilan fotosintesa mikroalga. Adanya perubahan fotoperiod pada kultur mikroalga *N. oculata* akan mempengaruhi laju pertumbuhan dan kepadatan mikroalga tersebut. Hal ini terlihat sangat jelas bahwa pada kondisi kultur *N. oculata* dengan penyinaran selama 24 jam menunjukkan nilai kepadatan yang paling tinggi, kemudian diikuti oleh fotoperiod 12 jam terang dan 12 jam gelap. Nilai kepadatan yang tertinggi ( $10.660 \times 10^4$  sel/ml) ditemukan pada kultur *N. oculata* dengan lama penyinaran 24 jam secara kontinyu pada fase stasioner (puncak) (Gambar 1.).

Pada fotoperiode 8 jam terang-16 jam gelap, nilai kepadatan puncak mencapai nilai  $4892 \times 10^4$  sel/ml. Kurva pertumbuhan *N. oculata* yang dikultur dengan fotoperiod 24 jam terang dan fotoperiode 12 jam terang-12 jam gelap menunjukkan pola kurva pertumbuhan yang hampir mirip (Gambar 1.). Begitu pula pada perlakuan fotoperiode 8 jam terang-16 jam gelap menunjukkan pola pertumbuhan *N. oculata* yang sama dengan perlakuan kultur pada fotoperiode 4 jam gelap-

20 jam terang. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Qin (2005), yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan laju pertumbuhan *B. braunii* yang signifikan pada perlakuan fotoperiode 24 jam terang dengan fotoperiode 12 jam terang-12 jam gelap. Sedangkan hasil penelitian Hoham *et al.*, 2009 menunjukkan bahwa perlakuan fotoperiod 24 jam terang menunjukkan penambahan densitas *Chloromonas chenangoensis* (*Chlorophyta volvocales*) melalui proses reproduksi seksual lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap.

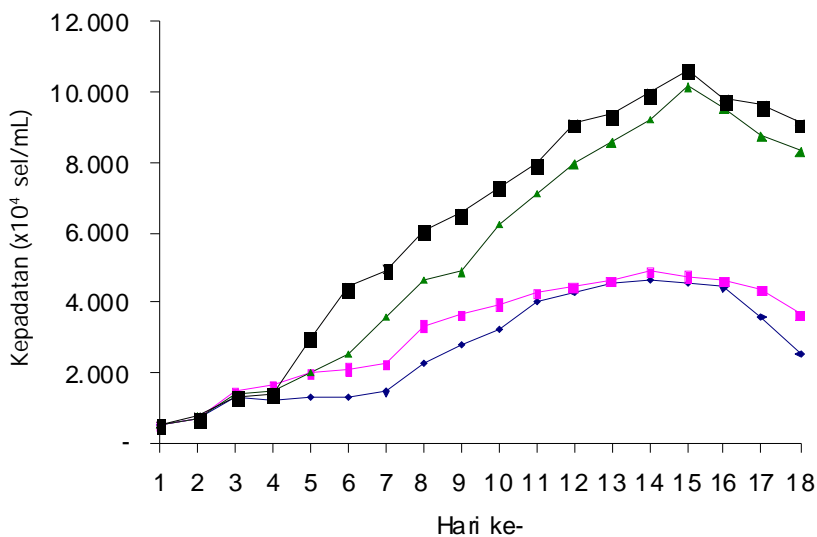
Lamanya periode penyinaran pada kultur *N. oculata* sangat mempengaruhi proses fotosintesa yang terjadi pada kultur *N. oculata*. Semakin besar laju fotosintesa pada mikroalga maka akan menunjukkan semakin besar pula biomass dan kepadatan sel yang dihasilkan pada kultur mikroalga (Becker, 1994). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dimana perlakuan fotoperiod 24 jam terang membuat *N. oculata* memiliki nilai kepadatan yang tinggi dibandingkan dengan perlakuan fotoperiod yang lainnya (Gambar 1.)

Berdasarkan pengamatan, kandungan lipid total terbesar ditemukan pada perlakuan fotoperiod 12 jam terang dan 12 jam gelap saat fase stasioner, yaitu  $31,8 \pm 3,03$  %dw, lalu diikuti oleh perlakuan fotoperiod B (8 jam terang-16 jam gelap) dan D (24 jam terang) sebesar  $25,2 \pm 2,19$  dan  $23,2 \pm 1,99$  %dw (Gambar 2). Renaud *et al.* (1991) menemukan kadar lipid total *N. oculata* yang dikultur pada fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap berkisar 22,1–35,8%dw sedangkan penelitian Griffiths dan Harrison (2009) mendapatkan kadar lipid total *N. oculata* 27-31%dw pada kondisi kultur dengan nutrisi yang tercukupi dengan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap.

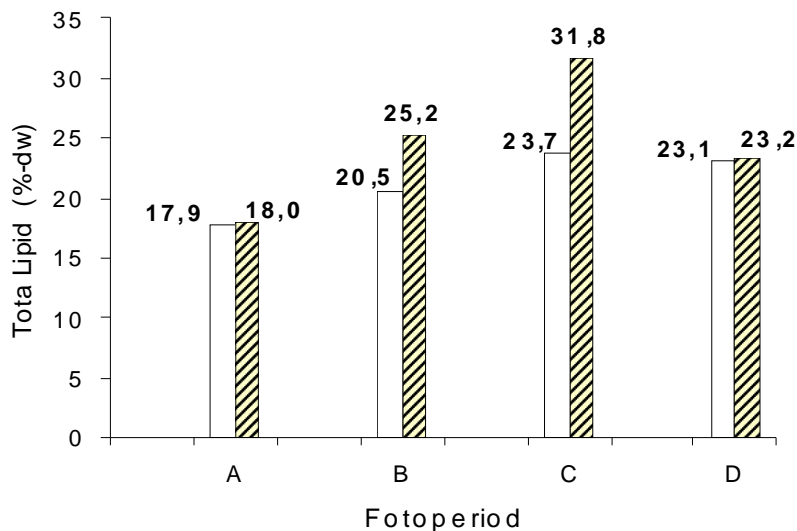
Hasil sama ditunjukkan pula pada penelitian Renaud *et al.*, (1991) yang menunjukkan kadar lipid total *N. oculata* yang dikultur pada fotoperiode 12 jam terang-12 jam gelap memiliki kisaran nilai 22,1 – 35,8 %-dw. Pada hasil pengamatan Griffiths dan Harrison (2009) kadar lipid total *N. oculata* memiliki nilai kisaran 27-31 %-dw dalam kondisi keterbatasan nutrien dengan fotoperiode 12 jam terang dan 12 jam gelap. Hal ini karena adanya pengaruh lingkungan yang dapat meningkatkan aktivitas enzim Acetil-CoA carboxylase dalam proses biosintesis lipid dalam sel mikroalga (Schenk *et al.*, 2008). Lebih kecilnya nilai lipid total pada perlakuan 24 jam terang, hal ini juga dapat disebabkan adanya proses *photoinhibition* pada kultur *N. oculata* sehingga dapat menyebabkan rusaknya sel-sel yang mengandung lipid. Hal ini yang menyebabkan tingginya nilai kepadatan pada kultur *N. oculata* pada perlakuan 24 jam terang (Schenk *et al.*, 2008; Griffiths and Harrison, 2009).

Hasil analisis anova satu arah menunjukkan adanya pengaruh fotoperiod terhadap kadar total lipid *N. oculata* pada fase stasioner ( $F_{(3,8)} = 6,261$ ;  $P < 0,01$ ). Sebaliknya pada fase eksponensial, tidak ada pengaruh fotoperiod terhadap kadar total lipid ( $F_{(3,8)} = 2,553$ ;  $P > 0,05$ ). Hal ini disebabkan pada fase ini kebutuhan nutrien masih tercukupi sehingga mikroalga mengalami pertumbuhan yang cepat dan optimum (Cotteau, 1996).

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa fase stasioner memiliki kadar total lipid yang lebih besar dibandingkan dengan fase eksponensial (Gambar 2.) Hal ini dapat dijelaskan bahwa besarnya total lipid pada fase stasioner dikarenakan pada fase ini telah terjadi penurunan pembelahan sel secara bertahap dan sel mulai menyimpan produknya dalam bentuk lipid (Guzman



**Gambar 1.** Pertumbuhan *Nannochloropsis oculata* pada media pemeliharaan dengan perlakuan fotoperiod. —◆— 4 jam terang 20 jam gelap, —■— 8 jam terang 16 jam gelap, —▲— 12 jam terang 12 jam gelap, —■— 24 jam terang



**Gambar 2.** Kadar rata-rata Total lipid (%dw) *Nannochloropsis oculata* pada perlakuan fotoperiod 4 jam terang-20 jam gelap (A); 8 jam terang-16 jam gelap (B); 12 jam terang 12 jam gelap (C); dan 24 jam terang (D)  
 □ Eksponensial ▨ Stasioner

et al., 2010). Besarnya kandungan lipid total pada mikroalga di fase stasioner dibandingkan dengan fase eksponensial juga telah ditunjukkan oleh hasil penelitian Guzman et al.(2010).

Hasil pengamatan pertumbuhan *N. oculata* menunjukkan bahwa pada perlakuan 24 jam terang menunjukkan nilai kepadatan yang tertinggi. Akan tetapi kadar lipid total terbesar dicapai pada perlakuan 12 jam terang-12jam gelap. Besarnya kepadatan (sel/ml) pada fotoperiode 24 jam terang dan fotoperiode 12 jam terang-12 jam gelap (Gambar 1 dan 2). Pada penelitian ini mikroalga *N. oculata* dari kelas Eustigmatophyceae menunjukkan respon bahwa tidak terlihat adanya pengaruh fotoperiode 12 jam terang-12 jam gelap dengan perlakuan fotoperiode 24 jam terang terhadap kepadatan yang dicapai pada kedua fotoperiode tersebut.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pada fase stasioner *N. oculata* memiliki kadar total lipid yang lebih besar dibandingkan dengan pada fase eksponensial (Gambar 2). Besarnya total lipid pada fase stasioner karena pada fase ini telah terjadi penurunan pembelahan sel secara bertahap dan sel mulai menyimpan produknya dalam bentuk lipid (Guzman et al. 2010). Penelitian Guzman et al.(2010) dan Widianingsih et al. (2011) juga menunjukkan hal yang sama, fotoperiode akan memberikan pengaruh terhadap peningkatan kandungan lipid total mikroalga pada fase stasioner serta mengurangi pembentukan sintesa n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) pada mikroalga (Renaud et al., 1991; Qin, 2005). Besarnya kadar total lipid pada perlakuan fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap tidak diikuti oleh besarnya nilai kepadatan pada

fase stasioner. Besarnya nilai kepadatan (sel/ml) pada fotoperiod 24 jam tidak diikuti oleh kadar lipid total.

## Kesimpulan

Fotoperiod memiliki pengaruh terhadap kadar total lipid *Nannochloropsis oculata* pada fase stasioner  $P < 0,01$ ). Sebaliknya untuk fase eksponensial, hasil analisa Anova satu arah menunjukkan tidak ada pengaruh fotoperiode terhadap kadar total lipid ( $P > 0,05$ ). Fotoperiode mampu memberikan pengaruh terhadap kepadatan *N. Oculata* ( $P < 0,01$ ). Total lipid pada *N. Oculata* terbesar ditemukan pada perlakuan fotoperiode 12 jam terang -12 jam gelap ( $31,8 \pm 3,03$  %-dw) lalu diikuti oleh perlakuan fotoperiod 8 jam terang -16 jam gelap dan fotoperiode 24 jam terang ( $25,2 \pm 2,19$  %-dw dan  $23,2 \pm 1,99$  %-dw). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa perlakuan fotoperiod pada media kultur *N. oculata* memberikan dampak nyata terhadap kepadatan dan kandungan lipid total. Selanjutnya untuk mendapatkan kandungan lipid total yang maksimal maka *Nannochloropsis oculata* harus dikultur pada fotoperiod 12 jam terang-12 jam gelap dengan panen pada saat kultur memasuki fase stasioner.

## Ucapan Terima Kasih

Kami mengucapkan terimakasih kepada Ditjen Dikti melalui LPPM Undip atas diberikannya Hibah Kompetensi Batch 2 dengan nomor kontrak Kontrak 234/SP2H/PP/DP2M/III/2010, tanggal 01 Maret 2010; Tak lupa disampaikan pula terima kasih kepada Pengelola Field Station Marine sciences, Jurusan Ilmu

Kelautan UNDIP, Jepara serta Prof. Dr. M. Zainuri, DEA dan Ir. Ria Azizah TN., MSI atas review dan sarannya demi perbaikan artikel ini.

## Daftar Pustaka

- Al-Hasan, R.H., A.M. Ali, & S.S. Radwan. 1989. Effect of Light and Dark Incubation on the Lipid and Fatty Acid Composition of Marine Cyanobacteria. *J. General Microbiol.* 135: 865-872.
- Converti, A., A.A. Cassazza, E.Y. Ortiz, P. Perego, & M.D. Borghi. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Proc. Intensification*, 48(6): 1146-1151.
- Cotteau, P. 1996. Microalgae. In: Lavens, P. & P. Sorgeloos (Eds.). Manual on Production and Use of Live Food for Aquaculture, FAO. Fisheries Technical Paper. Edition, Rome, Italia. Pp. 8-87.
- Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *J. Appl. Phycol.*, 21: 493-507.
- Gouveia, L. & A.N. Oliveira. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36: 269-274.
- He ´ctor, Mendoza, H.M. Guzman, A de la Jara Valido, A De Le Jara, L.C. Duarte, & K.F. Presmanes, 2010. Estimate by means of flow cytometry of variation in composition of fatty acids from *Tetraselmis suecica* in response to culture conditions. *Aquacult. Int.*, 18: 189-199.
- Hoham, R.W., Frey, F.M., Berman, J.D., Ryba, J.B., Duncan, J.E., Forbes, A.S., Goodridge, B.M. & Miller, PR. 2009. The effects of irradiance level, photoperiod, and cell density on sexual reproduction in the green snow alga, *Chloromonas chenangoensis* (Chlorophyta, Volvocales), from Upstate New York. *Nova Hedwigia*, 89 : 1-2 1-16
- Hermawan, A. 2004. The Protein, Lipid, and Fatty Acids Content of *Tetraselmis* sp. With Various Culture Media. Thesis. Graduate School. Kasetsart University. Thailand. 71 p.
- Hoek, C.V.D., D.G. Mann, & H.M. Jahns., 1995. Algae, an introduction to phycology . Cambridge University Press. Cambridge.
- Hu, H. & Gao, K. 2006. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Biotechnol. Lett.*, 28: 987-992
- Nielsen, M.V. 1992. Irradiance and Daylength effects on growth and chemical composition of *Gyrodinium aureolum* Hulburt in culture. *J. Plankton Res.*, 14: 811-820.
- Nur A., & Z. Arifin. 2004. Nutrisi dan formulasi pakan ikan. Departemen Kelautan dan Perikanan, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau, Jepara.
- Ohta, S., T.Chang, O. Aozasa, Y. Mase, & H. Miyata. 1994. Alternation in fatty acid Composition of Marine Red Alga *Porphyridium purpureum* by environmental factors. *Boranica Marina*, 36: 103-107 (Abstract only)
- Qin, J.G. 2005. Bio\_Hydrocarbon from algae: Impacts of temperature. Light and salinity on algae growth. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. RIRDC Publication No, 05/025.
- Ramakrishna, A., C. Dayananda, P. Giridhar, T. Rajasekara, & G.A. Ravishankar. 2010. Photoperiod influences endogenous indoleamines in culture green alga *Dunaliella bardawil*. *Indian J. Exp. Bio.*, 49:234-242.
- Reitan, K.I, J.R. Rainuzzo, & Y. Olsen. 2002. Effect of Nutrient Limitation On Fatty Acid and Lipid Content of Marine Microalgae. *J. Phycol.*, 30(6): 972-979.
- Renaud, S.M, D.L. Parryla, L-V. Thinh, C. Kuo, A. Padovanla, & N. Sammy. 1991. Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J. Appl. Phycol.*, 3: 43-53.
- Robert. A.A. 2005. Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press USA. Pp.25-26.
- Rodolfi L., G.C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, & M.R. Tredici. 2009. Microalga for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in low-cost photobioreactor. *Biotech. Bioengineering*, 102(1): 100-112.

- Rost, B, U. Riebesell, & D. Sültemeyer. 2006. Carbon acquisition of marine phytoplankton: Effect of photoperiod length. *Limnol. Oceanogr.*, 51(1): 12–20
- Schenk, PM., S.R. Thomas-Hall, E. Stephen, U.C. Marx, J.H. Mussgnug, C. Posten, O. Kruse, & B. Hankamer. 2008. Second Generation Biofuel: High-Efficiency Microalgae for Biofuel Production. *Bioenerg. Res.*, 1: 20-43.
- Sriharan, S., D. Bagga, & T.P. Sriharan. 1990. Effects of Nutrients and Temperature on Lipid and Fatty Acids Production in the Diatom *Hantzshia* DI-60. *App. Biochem. Biotechnol.* 24(25): 309-316.
- Wdianingsih, R. Hartati, H. Endrawati, E. Yadiati, V.R. Iriani. 2011. Pengaruh Pengurangan Konsentrasi Nutrient Fosfat dan Nitrat Terhadap Kandungan Lipid Total *N. Oculata*. 1b(1); 24-29
- Winarno, F.G. 1991. Kimia Pangan dan Gizi PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Vazquez-Duhalt, R., & B.Q. Arredondo-Vega. 1991. Oil production from microalgae under saline stress. Biomass for energy and industry 5 th E.C. conference. *Policy, Environment, Production and Harvesting* 1: 547-551.
- Vladislav C., & L. Jaromir. 1994. The Effect of high irradiances on growth, biosynthetic activities and the ultrastructure of the green alga *Botryococcus braunii* strain Droop 1950/807-1. *Archiv fur Hydrobiologie.*, Supp.: 115-131 (Abstract only).
- Volkman, J.K. 2003. Sterols in Microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 495-506.