

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING
Tahun Anggaran 2011**



Pengembangan Usaha Budidaya untuk
Meningkatkan Pendapatan Petani Tambak
melalui Diversifikasi Pakan Akuakultur dengan
Kandungan Karotenoid Tinggi
Hasil Fusi Protoplasma Alga *Dunaliella* dan
Khamir *Phaffia rhodozyma*

Peneliti :

**Drs. HERSUGONDO, MM.
Dr. HERMIN PANCASAKTI KUSUMANINGRUM, S.Si., M.Si.
Prof. Dr. Ir. MUHAMMAD ZAINURI, DEA.**

Dibiayai oleh Kopertis Wilayah VI, Kementerian Pendidikan Nasional,
sesuai dengan surat perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Multi TA 2011
No: 011/O06.2/PP/SP.HB/2011 tanggal 11 April 2011

**UNIVERSITAS STIKUBANK SEMARANG
2011**

**HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING**

1. Judul : Pengembangan Usaha Budidaya untuk Meningkatkan Pendapatan Petani Tambak melalui Diversifikasi Pakan Akuakultur dengan Kandungan Karotenoid Tinggi Hasil Fusi protoplasma Alga *Dunaliella* dan Khamir *Phaffia rhodozyma*

2. Ketua Peneliti

2.1 Data Pribadi

a. Nama Lengkap : Drs. Hersugondo, MM.
b. Jenis Kelamin : Laki-laki
c. NIP/Golongan : 131809487/4a
d. Strata/Jab. Fungsional : S2/Lektor Kepala
e. Jabatan Struktural : -
f. Fakultas/Jurusan : Ekonomi/Ekonomi Manajemen
g. Bidang Ilmu : Ekonomi Manajemen
h. Alamat Kantor : Jl. Kendeng V Bendhan Ngisor. Semarang. 50213
i. Telpon/Faks/E-mail : 024-8414970/024-8441738/gandasakti@yahoo.com
j. Alamat Rumah : Jl. Kendeng Barat VI/28 Semarang.50232
k. Telepon/Faks : 024-8444958 hp. 08157721165

2.2 Mata Kuliah yang Diampu dan Jumlah sks

a. Mata Kuliah I	: Studi Kelayakan Proyek	3 sks
b. Mata Kuliah II	: Statistik	3 sks
c. Mata Kuliah III	: Lingkungan Bisnis	2 sks
d. Mata Kuliah IV	: Etika Bisnis	3 sks

2.3 Penelitian Terakhir

a. Judul Penelitian I : Analisis Eva dan Kinerja Konvensional yang Berpengaruh terhadap Return Saham di Bursa Efek Indonesia
b. Judul Penelitian II : Pengaruh Kinerja Perusahaan terhadap Trading Volume Activity di Bursa Efek Indonesia
c. Judul Penelitian III : Studi Komparatif Usaha Petani Tebu dan Bawang Merah di Brebes Jawa Tengah
d. Judul Penelitian IV : Studi Kelayakan Proyek Budidaya Udang Windu di Kabupaten Brebes Jawa Tengah

5. Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun

6. Lokasi Penelitian : Laboratorium Ekonomi UNISBANK, Laboratorium Genetika FMIPA UNDIP dan Laboratorium Oseanografi FPIK UNDIP

7. Pembiayaan

	Biaya diajukan ke Dikti	Biaya dari Instansi Lain
- Biaya Tahun ke 1	Rp. 30.800.000,-	Rp. 0,-
- Biaya Tahun ke 2	Rp. 45.000.000,-	Rp. 0,-
	Rp. 75.800.000,-	Rp. 0,-

Mengetahui :
Dekan FE UNISBANK

Semarang, 27 Juli 2011
Ketua Peneliti

Dr. Alimuddin Rizal, SE, MM.

Drs. Hersugondo, MM.
NIP. 196503271989011001

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Stikubank

Dr. Dra. Lieliana, M. M.Si.

DAFTAR ISI

	Halaman
1. URAIAN UMUM	1
2. ABSTRAK	2
3. TUJUAN KHUSUS	3
4. PENTINGNYA PENELITIAN YANG DIRENCANAKAN	3
5. STUDI PUSTAKA / KEMAJUAN YANG TELAH DICAPAI DAN STUDI PENDAHULUAN YANG SUDAH DILAKSANAKAN	4
6. METODE PENELITIAN	13
7. JADWAL PENELITIAN	20
8. RINCIAN ANGGARAN PENELITIAN	21
9. HASIL PENELITIAN PENDAHULUAN <i>in vitro</i>	22
10. HASIL PENELITIAN TAHUN II	24
11. KESIMPULAN	31
12. PUSTAKA ACUAN	32
LAMPIRAN	
1. BIOGRAFI/DAFTAR RIWAYAT HIDUP PENELITI	36

1. ABSTRAK RENCANA PENELITIAN

ABSTRAK

Selama ini pendapatan petani tambak cenderung statis sehingga diperlukan suatu upaya secara tepat dan efisien salah satunya melalui diversifikasi pakan. Sejauh ini usaha untuk mengamati pola introduksi suatu pakan baru, aplikasi dan dampaknya terhadap budidaya dan pendapatan petani tambak belum pernah terukur. Diversifikasi pakan menggunakan pakan kaya karotenoid alami sangat dibutuhkan dalam budidaya perikanan karena terbukti dapat meningkatkan keloloshidupan dan menambah bobot hewan budidaya. Karotenoid juga memiliki aktivitas antikanker dan mencegah penyakit kronis manusia. Produksi karotenoid penting astaxantin dan β -karoten secara alami sangat terbatas, tidak dapat tersedia setiap waktu dan sangat bergantung pada siklus alam. *Dunaliella* menghasilkan karotenoid β -karoten terbesar sedangkan khamir *Phaffia rhodozyma* menghasilkan astaxantin terbesar. Kedua jenis karotenoid dapat digabungkan melalui proses fusi protoplasma sehingga lebih murah, cepat dan efisien untuk diversifikasi dan pengembangan pakan kaya karotenoid. Tujuan khusus penelitian ini adalah pengembangan usaha budidaya untuk meningkatkan pendapatan petani tambak melalui diversifikasi pakan akuakultur dengan kandungan karotenoid tinggi hasil fusi protoplasma alga *Dunaliella* dan khamir *Phaffia rhodozyma*. Penelitian ini memiliki implikasi ilmiah lain karena penggabungan dua jalur biosintesis karotenoid yang berbeda melalui teknik tersebut selain dapat meningkatkan produksi dan jenis karotenoid, juga memungkinkan terbentuknya jenis karotenoid baru. Hal ini akan lebih mendukung upaya diversifikasi pakan yang berakibat pada peningkatan pendapatan petani tambak dengan melakukan analisis rugi laba, cost and benefit rasio, IRR dan NPV dan dari analisis tersebut introduksi pakan baru berpengaruh signifikan terhadap pendapatan petambak.

3. TUJUAN KHUSUS

Penelitian ini bertujuan khusus untuk pengembangan usaha budidaya guna meningkatkan pendapatan petani tambak melalui diversifikasi pakan akuakultur dengan kandungan karotenoid tinggi hasil fusi protoplasma alga *Dunaliella* dan khamir *Phaffia rhodozyma*. Dengan adanya penelitian ini dimaksudkan untuk melakukan diversifikasi pakan dengan menggunakan teknik fusi protoplasma karena lebih mudah dan murah. Secara khusus, teknik fusi protoplasma antar strain telah terbukti meningkatkan kemampuan produksi karotenoid sampai 30%, tingkat keloloshidupan dan bobot hewan budidaya. Tujuan jangka panjang dari penelitian ini adalah meningkatkan produksi pakan unggul kaya karotenoid untuk skala industri dan menghasilkan komposisi dan formulasi pakan buatan untuk berbagai hewan budidaya yang tidak bisa mensintesis karotenoid *de novo*.

4. PENTINGNYA PENELITIAN YANG DIRENCANAKAN

Analisis produksi dan analisis untung rugi untuk mengamati pola introduksi suatu pakan baru, aplikasi dan dampaknya terhadap budidaya dan pendapatan petani tambak belum pernah terukur. Introduksi suatu teknologi baru seperti teknik fusi protoplasma dalam menghasilkan pakan memiliki potensi ekonomi tinggi karena teknik ini lebih murah, mudah dan aman dibandingkan teknologi yang lain. Capaian yang diperoleh juga menguntungkan secara ekonomi karena produksi karotenoid menggunakan metode tersebut telah meningkat dua sampai tiga kali lipat (Kusumaningrum, 2006).

Penelitian ini mempunyai implikasi praktis dan aplikatif secara ekonomi dalam hal peningkatan pendapatan petani tambak, yaitu dengan melakukan analisis produksi dan analisis untung rugi terhadap pakan rekombinan hasil fusi. Dengan demikian jika pakan unggul dapat dihasilkan maka diharapkan nantinya aras produksi pakan dapat ditingkatkan pada skala industri. Sejauh yang diketahui, penelitian semacam ini belum pernah dilakukan.

Dunaliella merupakan alga hijau penghasil karotenoid β -karoten dalam jumlah besar sampai 8000 $\mu\text{g/g}$. *P. rhodozyma* merupakan produsen astaxantin terbesar sekitar 500 μg total karotenoid per gram berat kering sel khamir. Meskipun demikian kebutuhan kedua jenis karotenoid sangatlah tinggi, misalnya kebutuhan astaxantin komersial adalah 3000 $\mu\text{g/g}$. Teknik fusi protoplasma dipilih secara intensif untuk meningkatkan

kemampuan organisme karena mereka mempunyai sifat poliploid sehingga tidak mudah dilakukan hibridisasi seksual, mutagenesis maupun aplikasi teknologi DNA rekombinan. Disisi lain, alga memiliki kemampuan untuk berkembang biak secara seksual dan aseksual. Fusi protoplasma intrastrain, interstrain, antar spesies maupun beda spesies dalam satu jenis organisme sudah sering dilakukan. Nilai kebaruan yang memiliki *scientific merit* yang sangat menonjol dalam penelitian ini adalah fusi protoplasma antara alga dan khamir yang sangat berbeda spesiesnya merupakan hal yang belum pernah dilakukan sejauh ini. Kedua organisme sama-sama merupakan organisme bersel tunggal dan eukariot. Nilai ilmiah dan kebaruan lain yang sangat berharga adalah karena jenis karotenoid yang dihasilkan oleh kedua organisme berbeda yaitu astaxantin dan β -karoten.

5. STUDI PUSTAKA / KEMAJUAN YANG TELAH DICAPAI DAN STUDI PENDAHULUAN YANG TELAH DILAKSANAKAN.

5.1. Teknik Analisis Untung Rugi

Laporan analisis untung rugi digunakan sebagai bahan evaluasi terhadap kinerja usaha yang sedang dilakukan. Apakah usaha yang sudah dilakukan kondisinya menguntungkan atau malah sebaliknya. Data yang diperlukan dalam pembuatan analisis untung rugi terbagi menjadi tiga komponen utama, yaitu variable biaya, besarnya produksi, dan hasil penjualan. Variabel biaya terdiri dari biaya investasi, biaya tetap, dan biaya tidak tetap. Biaya investasi adalah biaya yang harus dikeluarkan oleh pengusaha untuk pengadaan sarana dan prasarana usaha, seperti tanah, bangunan, peralatan utama, dan modal kerja. Biaya tetap adalah beban atau pengeluaran yang harus dikeluarkan oleh pengusaha, dimana besarnya relatif tetap dan tidak dipengaruhi oleh perubahan tingkat kegiatan. Contoh dari biaya tetap antara lain biaya penyusutan alat, bunga bank, dan pajak. Biaya tidak tetap adalah beban yang harus dikeluarkan oleh pengusaha dan besarnya tidak tetap, tergantung dari tingkat usaha yang dilakukan. Contoh dari biaya tidak tetap adalah biaya produksi yang meliputi biaya untuk memperoleh bahan baku, peralatan, upah, dan lain-lain. Biaya tetap dan biaya tidak tetap sering dinyatakan sebagai biaya produksi. Variable berikutnya yang diperlukan dalam pembuatan analisis untung rugi adalah informasi produksi. Produksi merupakan hasil yang diperoleh dari suatu kegiatan usaha, baik berupa barang atau jasa. Hal ini relatif sulit dilakukan untuk produksi berbentuk jasa; sedangkan untuk produksi berbentuk barang dapat dengan

mudah dilakukan. Informasi mengenai penjualan merupakan variable lain yang juga diperlukan dalam pembuatan analisis untung rugi. Informasi mengenai penjualan dapat diperoleh berdasarkan jumlah produk yang terjual dan harga produk.

Berdasarkan data ketiga komponen utama tersebut, selanjutnya dapat dilakukan analisis untung rugi dengan menentukan Break Event Point (BEP), R/C, B/C, NPV, dan Internal Rate of Return (IRR) atau nilai pengembalian modal. BEP dapat dibagi menjadi BEP harga dan produksi. BEP harga merupakan rasio antara biaya operasional dengan total produksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan harga produk minimal yang harus diberlakukan agar dapat mencapai BEP. Adapun BEP produksi merupakan rasio antara biaya produksi dengan harga jual produk. Hasil yang diperoleh menunjukkan tingkat produksi minimal yang harus dihasilkan agar tercapai BEP. B/C rasio merupakan perbandingan antara hasil penjualan (benefit) dengan biaya operasional (cost). R/C rasio merupakan perbandingan antara hasil (revenue) dengan biaya operasional.

Net Present Value (NPV) adalah nilai uang saat sekarang. Nilai NPV diperoleh dari data keuntungan (benefit), biaya (cost), dan keuntungan bersih (net benefit) yang telah dikoreksi oleh bunga bank (*discount factor*). Data yang dibutuhkan untuk menghitung NPV adalah data *time series* selama lima tahun atau lebih. Pengembalian modal (Internal Rate of Return; IRR) adalah waktu yang diperlukan oleh pengusaha untuk mengembalikan modal investasinya. Nilai IRR dapat diperoleh melalui perbandingan antara keuntungan bersih dan biaya tetap dengan modal investasi. Nilai yang diperoleh dapat digunakan untuk menduga berapa lama modal investasi yang ditanamkan akan kembali. Cashflow merupakan arus kas masukan dan keluaran suatu perusahaan. Pembuatan cash flow tergantung dari tujuannya. Ada cash flow berdasarkan jenis kegiatan, waktu, kebutuhan tenaga kerja, bahan, peralatan, dan dana.

5.2. Teknik analisis ekonomi

Pada prinsipnya, teknik analisis ekonomi meliputi analisis penentuan segmen pasar, rantai pemasaran, dan tingkat permintaan. Tujuan utama dalam penentuan segmen pasar adalah untuk mengetahui segmen pasar yang sudah terisi dan segmen pasar mana yang belum terisi. Penentuan segmen pasar dilakukan karena adanya keragaman di pasar yang berkaitan dengan konsumsi suatu produk atau jasa. Penentuan segmen pasar dapat dilakukan berdasarkan kelompok usia, tingkat sosial ekonomi, pendapatan, pendidikan, dan berbagai dasar pembagian lain yang sesuai dengan usaha pembuatan wadah dan peralatan budidaya ikan. Pengusaha dapat menggunakan hasil analisis segmen pasar

untuk menentukan sikap, apakah akan masuk ke dalam segmen pasar yang telah terisi dan melakukan persaingan dengan pengusaha yang sudah ada atau menghindari persaingan dengan mengisi segmen pasar yang belum dimanfaatkan oleh pengusaha lain. Dalam menentukan segmen pasar yang akan dipilihnya, pengusaha perlu mengevaluasi potensi yang dimilikinya, sehingga dapat menentukan target dan *positioning*. Pengusaha dianjurkan untuk memilih segmen pasar dimana mereka yakin dapat memuaskan keinginan konsumennya, karena keberhasilan suatu usaha ditentukan oleh kepuasan konsumennya. Pengusaha dapat memasuki lebih dari satu segmen apabila merasa mampu untuk memuaskan konsumen disegmen tersebut. Informasi mengenai produk yang dihasilkan sangat penting untuk disampaikan kepada konsumen, karena mereka mungkin telah memiliki berbagai informasi dari produk sejenis. Minimnya informasi yang tersedia akan menyebabkan produk kurang dikenal oleh masyarakat. Informasi dapat disampaikan secara verbal, menggunakan spanduk, kemasan, iklan, atau media lainnya. Rantai pemasaran merupakan komponen analisis ekonomi yang perlu diperhatikan oleh pengusaha. Rantai pemasaran sangat berpengaruh terhadap daya saing produk yang dipasarkan. Makin panjang rantai pemasaran akan menyebabkan makin tinggi biaya produksi dan harga jual, sehingga daya saing produk yang dipasarkan menjadi menurun. Analisis ekonomi juga mencakup penentuan tingkat permintaan konsumen terhadap produk yang akan dipasarkan. Tingkat permintaan konsumen terhadap suatu produk sangat ditentukan oleh kualitas produk, harga, informasi yang tersedia, kemudahan diperoleh, layanan purna jual dan sebagainya.

Berdasarkan ketiga komponen yang tercakup dalam analisis ekonomi, pengusaha dapat menentukan peluang secara ekonomis dari produk yang akan di pasarkan. Apabila secara ekonomis produk yang akan dipasarkan tidak dapat bersaing, maka sebaiknya dilakukan perbaikan terlebih dahulu.

5.3. Fusi Protoplasma

Salah satu perkembangan penting dalam bidang rekayasa genetik adalah rekombinasi dengan metode fusi protoplasma. Terdapat beberapa teknik rekombinasi lain yaitu transformasi, transduksi, konjugasi dan transformasi. Fusi protoplasma menawarkan keunggulan karena prosedurnya relatif lebih mudah dan ekonomis dibandingkan dengan yang lain dan segera menghasilkan rekombinan baru yang dikehendaki untuk perbaikan mutu dan sifat dalam waktu yang singkat. Metode fusi protoplasma juga memungkinkan didapatkannya jenis-jenis yang diinginkan melalui persilangan yang tidak dapat terjadi

secara alami. Aplikasi fusi protoplasma juga telah menghasilkan beberapa macam enzim, hasil metabolit dan antibiotik.

Prinsip dasar proses fusi protoplasma adalah pelepasan dinding sel bakteri dengan bantuan enzim dan membentuk suatu bangunan yang disebut protoplasma. Protoplasma adalah struktur sel lengkap tanpa dinding sel dan mengandung membran sel serta seluruh komponen intra sel. Penambahan senyawa kimia tertentu akan merangsang penggabungan protoplasma sel-sel dari spesies yang sama atau berbeda untuk membentuk kombinasi gen yang baru (Prentis, 1990).

Teknik fusi protoplasma terdiri atas isolasi protoplasma, proses fusi protoplasma dan regenerasi dinding sel. Protoplasma diisolasi dengan menghilangkan dinding sel melalui aktivitas enzim dalam larutan penstabil osmotik agar protoplasma tidak pecah. Fusi protoplasma dimulai dengan perlekatan erat membran kedua sel sehingga isi sitoplasma bergabung menjadi satu bulatan yang mengandung inti kedua sel induk. Selanjutnya protoplasma akan kembali ke bentuk normal dengan tumbuh dan membentuk dinding sel yang baru.

Fusi protoplasma banyak digunakan secara intensif untuk meningkatkan kemampuan strain khamir karena mereka umumnya bersifat poliploidi, tidak mudah melakukan hibridisasi seksual maupun mutagenesis dan sulit dilakukan aplikasi teknologi DNA rekombinan. Chun *et al.* pada tahun 1992 telah melakukan fusi protoplasma antar induk *P. rhodozyma* strain CBS 5905, CBS 6938 dan Ant 1-4^d yang menghasilkan astaxantin sebesar 1600 µg karotenoid/gr khamir dan membentuk hibrid yang mampu menghasilkan astaxantin sebesar > 2000 µg/gr khamir namun menemui kesulitan dalam pengujian fusan karena setiap induk memiliki karakteristik yang berbeda.

5.4. Karotenoid

Karotenoid adalah suatu pigmen berwarna kuning oranye yang terdapat secara alami pada tumbuhan, bakteri, beberapa jamur, khamir dll. Karotenoid dibutuhkan untuk meningkatkan nilai gizi, ketahanan terhadap penyakit, meningkatkan derajat pigmentasi serta prekursor berbagai senyawa metabolit.

Sintesis karotenoid secara kimiawi sangat kompleks dan mahal, sedangkan karotenoid yang disintesis mikroorganisme mudah dimanipulasi dan murah operasionalnya. Produksi karotenoid alami secara komersial baru terbatas dari khamir *Phaffia rhodozyma* dan alga *Haematococcus pluvialis*, sedangkan produksi β-karoten komersial berasal dari alga *Dunaliella* (Johnson dan Schroeder, 1997).

Masalah yang sering dihadapi adalah walaupun sintesis karotenoid melalui mikroorganisme mudah dimanipulasi dan murah operasionalnya namun cara ini belum pernah menghasilkan produk melebihi produk yang dihasilkan secara sintesis pada skala komersial. Sebagai gambaran adalah produksi astaxantin alami pada *Phaffia rhodozyma* sebesar $< 500 \mu\text{g}$ total karotenoid per gram berat kering sel khamir (Johnson dan Schroeder, 1996) sedang kebutuhan akan astaxantin secara komersial sebesar $3000 \mu\text{g/g}$.

5.5. *Dunaliella*

Dunaliella merupakan alga hijau penghasil pigmen karotenoid dalam jumlah besar yaitu sampai beberapa ratus milligram per gram berat kering sel. *Dunaliella* menghasilkan karotenoid β -karoten, antioksidan yang mampu mencegah kehilangan penglihatan. Produksi karotenoid *Dunaliella* menggunakan jalur non-MVA. *Dunaliella* biasa dijumpai pada habitat berkadar garam tinggi sampai 300 ppt melebihi konsentrasi garam di laut yang normalnya 35 ppt. Algae ini juga mampu hidup pada konsentrasi garam $< 0.5 - 5 \text{ M}$ dengan menggunakan gliserol yang merupakan produk fotosintetik utamanya, sebagai larutan osmoregulator internal terhadap lingkungan luar yang berkadar garam tinggi. Konsentrasi gliserol internal sampai lebih dari 4 M. Amots dan Avron (1990) menyatakan produksi β -karoten pada *D. bardawil* yang menghasilkan lebih dari 80% β -karoten dari berat keringnya. *Dunaliella* tidak memiliki vakuola kontraktil kecuali mereka yang ditumbuhkan pada konsentrasi garam rendah dan ada yang memiliki ataupun tidak memiliki stigmata tempat pembentukan pigmen merah β -karoten. Pigmen muncul bila *Dunaliella* ditumbuhkan pada konsentrasi garam dan cahaya tinggi, dengan pH, konsentrasi nitrogen dan phosphor rendah (Loeblich, 1982 dalam Wynne 1985).

Karotenoid alga digunakan untuk pelindung terhadap iradiasi berlebihan. Karotenoid juga digunakan untuk dapat beradaptasi terhadap lingkungan dan menjaga kelangsungan hidupnya. Karotenoid merupakan antioksidan terhadap radikal bebas yang berbahaya dan racun lainnya yang masuk ke dalam tubuh alga. Karotenoid alga memiliki beberapa keunggulan dibandingkan karotenoid tanaman. Karotenoid alga melebihi jenis yang terdapat dalam tanaman, struktur bervariasi, waktu perkembangbiakan lebih cepat, isolasi dan kultivasi lebih mudah serta produksi karotenoid lebih banyak. Karotenoid alga terdiri dari trans- β -karoten dan 9-cis- β -karoten. 9-cis- β -karoten mampu menyerap cahaya pada spektrum yang lebih luas sepuluh kali lipat lebih kuat dan aktif dibandingkan karotenoid buah-buahan dan sayur-sayuran (Ben-Amotz, 1993). Karotenoid alga lebih mudah terurai dibandingkan karotenoid tanaman, sehingga karotenoid alga menjadi lebih

mudah dicerna dan diserap dibanding tanaman (Katz *et al.*, 1995; Johnson dan Schroeder, 1996; Lichtenthaler, 2000). Karotenoid alga 55% lebih kuat dibanding β -karoten tanaman dalam menghambat pertumbuhan sel kanker kulit.

5.6. *Phaffia rhodozyma*

P. rhodozyma (dikenal juga sebagai *Xanthophyllomyces dendrorhous*) adalah khamir penghasil astaxantin alami sebagai pigmen utama dengan produksi sebesar 85% dari seluruh pigmen yang dihasilkan. Produksi astaxantin menggunakan jalur biosintesis MVA (Verdoes, 1997). Habitat alami *P. rhodozyma* adalah guguran dedaunan basah dari pepohonan di daerah pegunungan Jepang, Pasifik dan Rusia. Isolat *P. rhodozyma* yang pertama diperoleh tahun 1967. Karakteristik *P. rhodozyma* adalah sel dengan beberapa sel tunas, adanya ko-enzim Q-10 xylose pada dinding sel mempunyai urutan 18SrRNA yang khusus dan mampu menghasilkan pigmen karotenoid diantaranya astaxantin yaitu < 500 μg total karotenoid per gram khamir (Johnson & Schroeder, 1996).

Astaxantin (3,3'-dihydroxy- β,β -karotena-4,4-dione) adalah pigmen karotenoid yang paling banyak digunakan dan dibutuhkan akhir-akhir ini. Molekul karotenoid lain yang sering digunakan pada sektor akuakultur adalah β -karoten, kantaxantin dan astacena (Johnson dan An, 1991). Astaxantin merupakan pigmen merah oranye pada alga, mikroorganisme, crustaceae, ikan dan burung. Astaxantin dibutuhkan sebagai makanan tambahan untuk pigmentasi hewan-hewan, seperti ikan salmon, udang dan hewan-hewan yang tidak bisa mensintesa β -karoten sendiri (Verdoes, 1997). Pigmen karotenoid ini akan meningkatkan nilai gizi, ketahanan terhadap penyakit, meningkatkan derajat pigmentasi dan nilai estetika hasil budidaya akuakultur. Konsumsi karotenoid pada manusia akan mencegah dan mengobati berbagai penyakit kronis seperti arteriosklerosis, jantung, katarak dll. Selain itu karotenoid mempunyai sifat sebagai provitamin A dan dapat berfungsi sebagai antikanker (Iwasaki dan Murakoshi, 1992). Astaxantin biasanya diproduksi melalui sintesis kimiawi, namun karena molekulnya sangat kompleks sehingga sukar sekali disintesis maka harganya pun sangat mahal. Para industriawan kemudian beralih untuk mencari sumber astaxantin alami. Astaxantin alami dapat ditemukan pula pada *Mycobacterium lacticola*, *Brevibacterium* dan *Chlamydomonas nivalis*. Produksi astaxantin *P. rhodozyma* secara alami < 500 μg total karotenoid per gram berat kering sel khamir (Johnson & Schroeder, 1996). Sedangkan kebutuhan akan astaxantin yang diharapkan dari *P. rhodozyma* jauh lebih tinggi yaitu 3000 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Penelitian untuk menghasilkan suatu strain khamir baru *P. rhodozyma* melalui teknik fusi protoplasma intraspecies yang mempunyai kemampuan untuk menghasilkan astaxanthin yang tinggi secara alami telah dilakukan. Rekombinan yang dihasilkan mampu meningkatkan produksi astaxantin 2,03 kali lipat dibandingkan induk (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Penelitian rekayasa genetik untuk meningkatkan produksi karotenoid juga telah dilakukan terhadap bakteri *Erwinia uredovora* dan *E. coli*. Sebagian gen penyandi karotenoid jalur MVA dari *E. uredovora* dimasukkan pada vektor plasmid ke dalam inang *E. coli* (Kusumaningrum, 2004). Jalur isoprenoid non-MVA yang dimiliki *E. coli* dan pengandungan plasmid rekombinan telah menyebabkan *E. coli* mampu menghasilkan karotenoid zeaxantin sebanyak 3 kali lipat dibandingkan *E. uredovora* (Kusumaningrum, 2008).

Penelitian tentang kinetika pertumbuhan dan produksi karotenoid juga telah dilakukan pada khamir karotenogenik *Phaffia rhodozyma* dari beberapa aspek. Peranan sumber karbon sangat penting untuk optimalisasi produksi pigmen ini (Kusdiyantini, 1998; Okagbue dan Lewis, 1984). Diantara sejumlah banyak sumber karbon yang digunakan, produktivitas karotenoid mencapai optimum dengan adanya D-selobiosa, mannitol dan skarosa (Johnson dan Lewis, 1979). Penelitian yang dilakukan oleh Meyer *et al.*, (1993) pada mutan *P.rhodozyma* J4-3 menunjukkan bahwa manitol dan suksinat yang digunakan sebagai sumber karbon mampu menghasilkan astaxantin dengan konsentrasi 1973 µg/g dan 1926 µg/g per gram berat kering sel. Penggunaan gliserol sebagai sumber karbon dan energi merupakan alternatif pemanfaatan bahan murah (Kusdiyantini *et al.*, 1998a). Demikian juga penggunaan molase terhadap optimalisasi pertumbuhan dan produksi pigmen karotenoid dari khamir *P.rhodozyma* telah dilakukan dan menghasilkan konsentrasi pigmen total sebesar 39 µg, 205 µg dan 62 µg per gram berat kering sel berturut-turut untuk batch, fed batch dan continuous fermentation (Kusdiyantini dkk, 2000-2001 DCRG-URGE).

Studi pendahuluan berkaitan dengan optimalisasi pertumbuhan dan pembuatan pakan telah dilakukan pada *P.rhodozyma* untuk udang windu. Penambahan pigmen karotenoid dari khamir *P.rhodozyma* terhadap pakan buatan udang windu (*Penaeus monodon* Fabricus) menunjukkan serapan pigmen dan pertumbuhan yang cukup tinggi (Zainuri dkk, 2002). Uji berupa penambahan konsentrasi pigmen sebesar 0, 48 gram selama lima minggu terhadap PL-60 udang windu dengan berat awal 0,3-0,5 gram. Perbandingan dengan kontrol pakan alami *Dunaliella* sp. memberikan pertumbuhan

sebesar 0,13 gram. Peningkatan berat badan yang dicapai dengan penambahan konsumsi astaxantin pada udang ini sebesar 346 %. Hasil tersebut diperkuat dengan peningkatan tingkat kelangsungan hidup yang mencapai 89% dibandingkan pakan alami yang hanya 65 %. Hal ini diduga bahwa kandungan pigmen yang tinggi menunjang proses pergantian kulit, deposit materi dan sintesis pada penambahan jaringan, sebelum kulit udang yang baru mengeras.

5.7. Road Map Penelitian

Berdasarkan kepada hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya maka dapat disusun roadmap penelitian dan kaitannya dengan penelitian ini sebagai berikut :

6. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dilakukan dengan pendekatan eksperimen murni (*True experimental*) dan kilas depan (*Prospective*). Hal ini didasarkan atas pemikiran bahwa masalah yang akan diteliti belum pernah diungkapkan sebelumnya sehingga pendekatan yang tepat adalah secara eksperimental murni. Penelitian ini diharapkan akan membuka wawasan baru mengenai biologi molekular jasad hidup yang berimplikasi pada pemahaman dan pengungkapan potensi mikroorganisme. Dengan demikian penelitian ini memiliki gatra kilas depan. Pendekatan secara eksperimental murni mempunyai keunggulan karena memberikan peluang bagi pengungkapan fenomena-fenomena baru yang seringkali tidak dapat diprediksi sebelumnya.

Penelitian ini direncanakan akan berlangsung selama dua (2) tahun dan terdiri atas beberapa tahapan. Rencana tahapan penelitian dapat dilihat pada diagram alir sebagai berikut :

Tahap-tahap penelitian

6.1. Kultivasi organisme

Phaffia rhodozyma (*Xanthophyllomyces dendrorhous*, Golubev) didapatkan dari BCCM (Belgian Co-Ordinated Collections of Microorganism). Khamir ditumbuhkan dan disimpan dalam medium dengan komposisi sebagai berikut : glukosa 10 g/l, pepton 5 mg/l, ekstrak yeast 3 g/l dan agar 20 g/l. Suhu penyimpanan 4°C. Starter/inokulum ditumbuhkan pada Erlenmeyer 250 ml yang mengandung medium dengan komposisi sebagai berikut: glukosa 10 g/l, pepton 5 g/l, yeast ekstrak 3 g/l malt ekstrak 3 g/l pada pH 5 dan temperatur ruangan. Kultur diinkubasi selama 18-24 jam pada *rotary shaker* dengan kecepatan 180 rpm. Starter diambil 5 % (v/v) yang digunakan untuk inokulasi pertumbuhan *batch fermentation*. *P. rhodozyma* untuk pertumbuhan *batch fermentation* ditumbuhkan pada erlenmeyer 1 liter yang berisi medium dengan komposisi sama pada pertumbuhan starter. Kultur diinkubasi selama 5 hari pada temperatur ruangan. Pemanenan kultur dilakukan dengan cara sentrifugasi.

Media pertumbuhan cair untuk *Dunaliella* adalah media Walne dengan komposisi : EDTA 45 g/L, FeCl₃.6H₂O 1.3 mg/L, H₃BO₃ 33.6 g/L, MnCl₂.4H₂O 0.36 g/L, NH₄NO₃ 100 g/L, Na₂PO₄ 20 g/L, B₁₂ vitamin 0.001 ppm, air steril sampai 1 l. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit 15 lb/in² (103 kPa and 120°C). Medium digunakan dengan menambahkan 0.5 ml medium dalam 1l air laut (Bidwell, J.P. dan Spotte S. 1983). Semua bahan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU UGM, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM dan Laboratorium Mikrobiogenetika Jurusan Biologi FMIPA UNDIP. Kultur alga ditumbuhkan dalam 250 ml labu erlenmeyer yang berisi 100 ml medium cair dengan menggunakan aerator 2-4 ppm dan illuminasi homogen sebesar 1000-2000 lux dan agitasi 200rpm sesuai metode Rabbani *et al.*(1998).

6.2. Fusi protoplasma

Isolasi protoplasma. Protoplasma diisolasi dengan menggunakan metode modifikasi Chun *et al*, 1992. Sel dengan kepadatan 10^7 direndam dalam larutan buffer sodium suksinat (pH 4,5); 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,6 M KCl dan 0,1 M 2-mercaptoethanol. Protoplasma diperoleh dengan menambahkan 2-3 mg/ml Novozyme 234 selama 2-3 jam.

Proses Fusi protoplasma. Protoplasma kedua sel difusikan dengan cara dicampur dalam larutan buffer fosfat (pH 6) yang mengandung 35% polyethylene glycol 0.1 CaCl_2 selanjutnya diinkubasi selama 45 menit.

Regenerasi protoplasma. Regenerasi protoplasma dilakukan dengan menumbuhkan mutan pada medium agar lunak dan diinkubasi selama 5-7 hari.

Analisis rekombinan hasil fusi. Rekombinan dianalisis dengan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya filtrat diambil dan ditambah n-heksana lalu dikocok. Pigmen yang terkandung dalam n-heksana ditambah dengan air distilasi untuk menghilangkan aseton. Air dalam ekstrak dihilangkan dengan melakukan penambahan 5-10 gram $\text{Na}_2\text{SO}_4/100$ ml (Chien dan Jeng, 1992). Ekstrak ini diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 470 nm ($E^{1\%}_{1\text{cm}} = 1600$). Pengukuran pigmen dinyatakan sebagai konsentrasi dalam mg pigmen per gr berat kering sel.

6.3. Analisis Produksi karotenoid

Pembuatan kurva pertumbuhan dan produksi pigmen. Produksi pigmen dilakukan pada media YM pH 6 yang telah disterilkan dengan autoklaf selama 20 menit pada suhu 115°C dan tekanan 1 atm. Media sebanyak 100 ml diinokulasi dengan 5% v/v starter yang memiliki kepadatan 10^7 - 10^8 sel/ml. Setiap biakan diinkubasi pada “rotary shaker” dengan kecepatan 180 rpm (Kusdiyantini *et al*, 2001) selama 120 jam. Pengukuran pertumbuhan dan produksi pigmen dilakukan setiap 12 jam inkubasi.

Pengukuran pertumbuhan secara gravimetri. Kultur sebanyak 1,0 ml dimasukkan dalam tabung eppendorf yang telah diketahui berat keringnya. Kultur selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 4500 rpm (Vazques *et al*, 1998). Pelet yang

diperoleh dikeringkan dengan oven pada suhu 80⁰C sampai beratnya konstan. Berat akhir dikurangi berat tabung merupakan berat kering sel.

Pengukuran produksi pigmen. Pigmen total diekstraksi dengan metode Sedmak *et al* (1990). Kultur sebanyak 2 ml dimasukkan dalam tabung eppendorf lalu disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 4500 rpm lalu dibuang supernatnya. Pelet dicuci dengan akuades dan ditambah dengan 0,1 M sodium phosphat pH 7 sebanyak 1 ml dan dimethyl sulfoxide (DMSO sebanyak 1 ml yang telah dipanaskan pada suhu 55⁰C. Campuran dikocok selama 15 menit kemudian ditambah 2 ml pelarut organik (diethyl eter) lalu dikocok kembali kemudian disentrifugasi. Pigmen yang terdapat pada fasa atas diambil, selanjutnya dievaporasi untuk menghilangkan pelarut organik. Setelah kering ditambahkan pelarut organik (methanol dengan volume sesuai dengan jumlah pigmen yang dihasilkan. Pengukuran pigmen total dilakukan menurut metode dari An *et al* (1989). Pigmen total ditentukan dengan koefisien ekstinsi 1 % ($E_{1cm}^{1\%} = 1600$) dengan formulasi sebagai berikut :

$$X = ((V) (A-480)(100)) / ((E_{1cm}^{1\%})(P))$$

dimana :

X = pigmen total yang dihasilkan

V = volume larutan pigmen (ml)

$A-480$ = densitas optikal pada panjang gelombang 480

$E_{1cm}^{1\%}$ = koefisien ekstinsi 1% (ml)

P = berat kering sel (gr/ml)

6.4. Pembuatan pakan

Sel rekombinan yang dihasilkan dipersiapkan dengan mengeringkan (*Freeze drying*). Komposisi pakan buatan sebagai berikut :

- Tepung ikan tongkol/tuna : 66,8 %
- Tepung terigu : 18 %
- Minyak ikan : 5 %
- Tepung tulang : 5 %
- Aquamix : 5 %
- Sel rekombinan (konsentrasi : 40, 60, 80 dan 100 mg/ 100 gr pakan)

6.5. Pemeliharaan hewan uji udang windu (*Penaeus monodon* Fabricius)

Penelitian ini menggunakan udang windu berumur 60 hari (PL – 60), dengan berat diantara 0,2 – 0,5 gram. Pakan yang digunakan pada penelitian ini ada 2 jenis, yaitu: pakan buatan (A), berupa pelet dengan sel rekombinan dan pakan alami *Dunaliella* (B). Pakan alami *Dunaliella* sp. menggunakan kepadatan 2700 individu per ml. Pakan buatan merupakan formulasi pakan udang, dengan penambahan variasi konsentrasi rekombinan. Biota yang diuji adalah udang windu PL-60 dengan berat awal 0,2 – 0,5 gram. Pemeliharaan dilakukan dalam akuarium berukuran 25 x 60 x 35 cm, dengan volume air 10 liter. Kepadatan setiap akuarium adalah 5 ekor. Pemberian pakan dilakukan sejumlah 5 % dari berat tubuh, dan diberikan dua kali sehari untuk pakan buatan. Pakan alami tetap dengan kepadatan 2700 individu per ml. Pemeliharaan dilakukan selama lima minggu. Pengukuran kualitas air media meliputi salinitas, temperatur, oksigen terlarut dan pH dilakukan setiap hari.

6.6. Pengukuran pigmen udang windu (*Penaeus monodon* Fabricius)

Sampel udang dibedakan antara karapak, kepala dan badan, diberi nitrogen cair dan dihancurkan dalam ruangan gelap atau dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian diekstraksi dengan aseton sampai tidak berwarna. Ekstrak ini disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Filtrat diambil dan ditambah dengan n-hexana, dikocok. Pigmen yang terkandung dalam n-hexana ditambah dengan air distilasi untuk menghilangkan aseton. Untuk menghilangkan air dalam ekstrak ini dilakukan penambahan 5-10 gram $\text{Na}_2\text{SO}_4/100$ ml (Chien and Jeng, 1992). Ekstrak ini diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 470 nm ($E^{1\%}_{1\text{cm}} = 2115$). Pengukuran pigmen dinyatakan sebagai konsentrasi dalam mg pigmen per Kg berat basah jaringan (sampel).

6.7. Analisis Untung Rugi

Data yang dicari dalam pembuatan analisis untung rugi adalah variable biaya, besarnya produksi, dan hasil penjualan. Variabel biaya terdiri dari biaya investasi, biaya tetap, dan biaya tidak tetap. Variable berikutnya yang akan dicari adalah informasi produksi. Informasi mengenai penjualan merupakan variable lain yang juga akan dicari untuk pembuatan analisis untung rugi. Informasi mengenai penjualan dapat diperoleh berdasarkan jumlah produk yang terjual dan harga produk.

Berdasarkan data ketiga komponen utama tersebut, selanjutnya dapat dilakukan analisis untung rugi dengan menentukan Break Event Point (BEP), R/C, B/C, NPV, dan Internal Rate of Return (IRR) atau nilai pengembalian modal. BEP dapat dibagi menjadi BEP harga dan produksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan harga produk minimal yang harus diberlakukan agar dapat mencapai BEP. BEP produksi merupakan rasio antara biaya produksi dengan harga jual produk. Hasil yang diperoleh menunjukkan tingkat produksi minimal yang harus dihasilkan agar tercapai BEP. B/C rasio merupakan perbandingan antara hasil penjualan (benefit) dengan biaya operasional (cost). R/C rasio merupakan perbandingan antara hasil (revenue) dengan biaya operasional.

Net Present Value (NPV) akan diperoleh dari data keuntungan (benefit), biaya (cost), dan keuntungan bersih (net benefit) yang telah dikoreksi oleh bunga bank (*discount factor*). Data yang akan digunakan untuk menghitung NPV adalah data *time series* selama lima tahun atau lebih. Pengembalian modal (Internal Rate of Return; IRR) adalah waktu yang diperlukan oleh pengusaha untuk mengembalikan modal investasinya. Nilai IRR akan diperoleh melalui perbandingan antara keuntungan bersih dan biaya tetap dengan modal investasi. Nilai yang diperoleh akan digunakan untuk menduga berapa lama modal investasi yang ditanamkan akan kembali. Cash flow akan dicari berdasarkan jenis kegiatan, waktu, kebutuhan tenaga kerja, bahan, peralatan, dan dana.

6.8. Analisis ekonomi

Analisis ekonomi yang akan dilakukan meliputi analisis penentuan segmen pasar, rantai pemasaran, dan tingkat permintaan. Penentuan segmen pasar akan dilakukan berdasarkan tingkat sosial ekonomi, pendapatan, dan skala budidaya. Informasi produk akan disampaikan secara verbal, menggunakan kemasan. Analisis ekonomi juga akan mencakup penentuan tingkat permintaan konsumen terhadap produk yang akan dipasarkan.

7. JADWAL PENELITIAN

Tahun pertama

No	Kegiatan	Tahun I											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Kultivasi <i>Dunaliella</i> sp. dan <i>P. rhodozyma</i>	■	■										
2	Fusi protoplasma		■	■									
3	Analisis produksi karotenoid				■	■							
4	Pembuatan pakan						■	■					
5	Diversifikasi pakan							■	■	■			
6	Aplikasi dan seleksi pakan							■	■	■			
7	Analisis Data							■	■	■	■	■	
8	Pembuatan Laporan										■	■	■
9	Pembuatan publikasi Tahun I										■	■	■

Tahun kedua

No	Kegiatan	Tahun II											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	Seleksi pakan	■	■										
2	Analisis untung rugi pakan			■	■	■							
3	Pengembangan produksi						■	■	■				
4	Analisis ekonomi dan pendapatan									■	■	■	
5	Analisis data									■	■	■	
6	Pembuatan laporan										■	■	
5	Pembuatan publikasi Tahun II										■	■	■

8. LUARAN PENELITIAN

Kegiatan penelitian ini diharapkan akan memperoleh analisis ekonomi, analisis untung rugi, analisis pendapatan dan pakan unggul hasil fusi protoplasma alga *Dunaliella* dan khamir *P. rhodozyma* yang memiliki kemampuan menghasilkan karotenoid dalam jenis dan jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan kedua induknya. Selanjutnya formulasi pakan akan diaplikasikan pada budidaya ikan dan udang sehingga akan diperoleh pakan yang lebih baik dan murah untuk meningkatkan hasil budidaya. Pada jangka panjang, pakan unggul

akan ditingkatkan pada skala massal untuk industri. Hasil-hasil penelitian diharapkan dapat dipublikasikan pada jurnal ilmiah berskala internasional atau jurnal nasional terakreditasi.

10. HASIL PENELITIAN TAHUN II

Produksi pakan alami menggunakan teknik fusi protoplasma memiliki potensi ekonomi tinggi karena teknik ini lebih murah, mudah dan aman dibandingkan teknologi yang lain serta menguntungkan secara ekonomi. Penelitian pendahuluan pada tahun ke 2 telah dilakukan untuk melihat produksi karotenoid pakan alami unggul rekombinan dan potensi aplikasi pakan alami di pembudidaya. Fusi protoplasma juga telah dilakukan terhadap kedua induk sebagai kontrol.

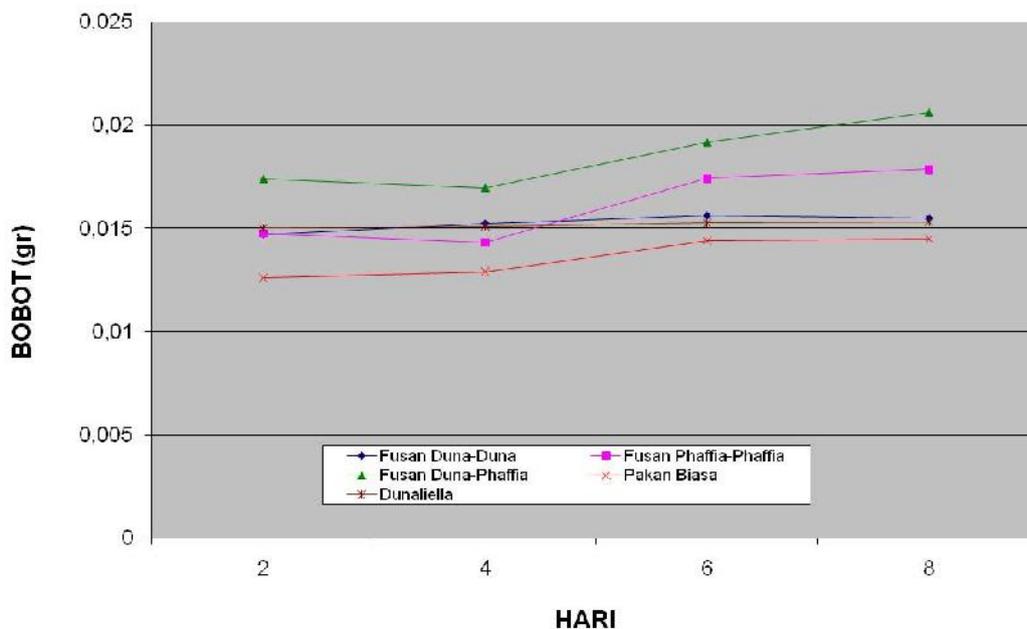
10.1. Seleksi Pakan

Hewan akuakultur yang dicobakan dalam penelitian ini adalah larva udang. Larva udang dipilih sebagai hewan uji coba karena proses ganti kulit pada udang yang merupakan kondisi rentan terhadap perubahan lingkungan dan serangan patogen juga rentan terhadap pemangsa udang yang lebih besar. Sesuai dengan jadwal penelitian tahun II maka pada tahap awal penelitian akan dilakukan seleksi pakan alami unggul. Tahap penelitian juga akan melihat menganalisis pengaruh penggunaan rekombinan yang paling unggul sebagai pakan alami untuk hewan akuakultur dibandingkan dengan kedua induknya. Pakan alami rekombinan hasil fusi protoplas akan diuji dan diseleksi untuk melihat pengaruhnya terhadap daya hidup, ketahanan terhadap serangan penyakit dan peningkatan bobot larva udang. Hal ini khususnya dilihat selama larva udang menjalani siklus hidupnya.

Siklus hidup udang dimulai saat udang betina mengeluarkan 50.000 hingga 1 juta telur yang akan menetas menjadi larva (nauplius) setelah 24 jam. Nauplius berukuran 0,31 - 0,33 mm dan pada stadia ini terjadi pergantian kulit sebanyak 6 kali. Nauplius kemudian memasuki fase ke dua yaitu zoea dengan bentuk badan lurus ukuran 1,2 -2,5 mm. Setelah beberapa hari udang akan menjadi mysis berukuran 3,5-4,56 mm. Setelah tiga sampai empat hari kemudian mereka memasuki tahap postlarva berukuran 5 mm yaitu udang muda yang sudah memiliki ciri-ciri hewan dewasa. Seluruh proses memakan waktu sekitar 10 - 12 hari dari pertama kali menetas (Poernomo, 1976). Pada tahap ini, udang budidaya siap untuk diperdagangkan, dan disebut sebagai benur. Benur atau bibit udang berukuran 1,5-2 cm.

Udang windu bersifat omnivor, pemakan detritus dan sisa-sisa organik baik hewani maupun nabati. Udang windu merupakan organisme yang aktif mencari makan pada malam hari (nocturnal). Jenis makanannya sangat bervariasi tergantung pada tingkatan umur. Udang ini mempunyai sifat dapat menyesuaikan diri dengan makanan yang tersedia di lingkungannya (Dall dalam Toro dan Soegiarto, 1979). Pakan udang pada tingkat mysis berupa campuran diatom, zooplankton seperti balanus, veligere, copepod dan trehophora (Vilalez dalam Poernomo, 1976). Pakan utama udang pada stadia benih adalah plankton (fitoplankton dan zooplankton). Udang windu dalam usaha budidaya, mendapatkan makanan alami yang tumbuh di tambak, yaitu klekap, lumut, plankton, dan benthos. Udang windu akan bersifat kanibal bila kekurangan makanan (Soetomo, 2000).

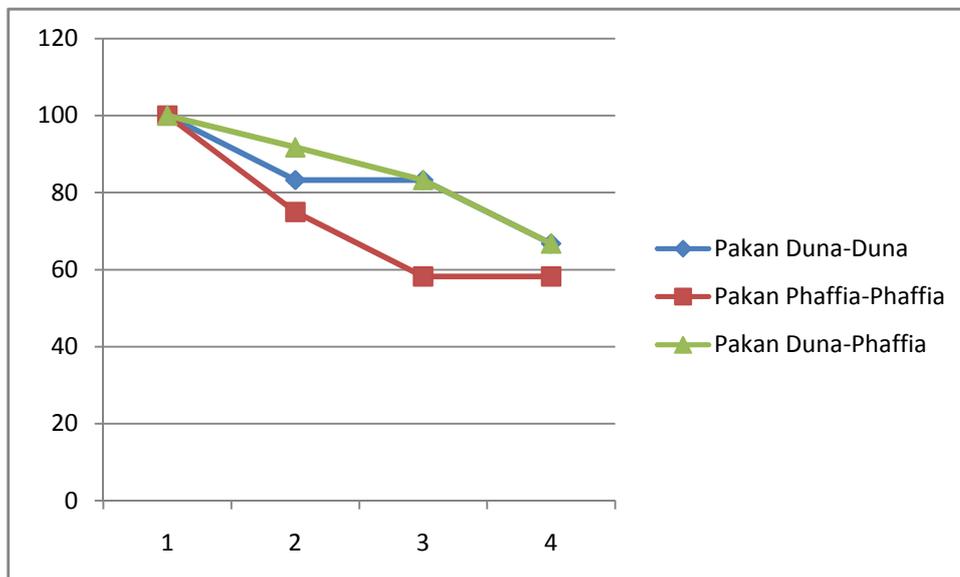
Penelitian dilakukan melalui seleksi pakan dengan pemberian berbagai variasi rekombinan terhadap larva udang *Penaeus monodon* Fab. pl 200. Seleksi pakan unggul dilakukan dengan cara menambahkan setiap jenis rekombinan yang berbeda hasil fusi protoplas baik intraspecies maupun interspecies. Seleksi pakan alami yang dilakukan adalah penambahan pakan buatan dengan rekombinan hasil fusi protoplas interspecies *Dunaliella salina*, pakan interspecies *Phaffia rhodozyma* dan pakan antar genus mikroalga *D. salina* dan khamir *P. rhodozyma*. Seluruh jenis pakan rekombinan dibandingkan dengan pakan biasa seperti disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik kenaikan berat badan larva udang windu pasca pemberian diversifikasi pakan hasil fusi protoplas

Hasil pengukuran bobot udang pada grafik (Gambar 1.) memperlihatkan bahwa keseluruhan bobot udang memperlihatkan kenaikan pada pemberian berbagai pakan hasil fusi protoplas dibanding pakan biasa. Hasil penelitian yang telah diperoleh tersebut mengindikasikan bahwa semua jenis rekombinan yang telah diperoleh dari hasil fusi protoplas berpotensi sebagai pakan unggul kaya karotenoid dan dapat digunakan sebagai suplemen pada pakan buatan.

Hasil penelitian terdahulu juga memperlihatkan kenaikan berat badan hampir 4 kali lipat pada pemberian pakan hasil fusi *Dunaliella* dibanding pakan buatan. Pemberian pakan *Dunaliella* saja meningkatkan kenaikan berat hampir 5 kali lipat. Pemberian pakan hasil fusi *Dunaliella* memberikan kenaikan berat badan sekitar 2 kali lipat. Selain peningkatan bobot udang, pakan tersebut juga telah terbukti mampu meningkatkan daya hidup larva udang. Gambar 2 memperlihatkan prosentase daya hidup larva udang pasca pemberian pakan hasil fusi selama empat hari. Hasil penelitian juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Niu *et al.* (2009) yang memperlihatkan bahwa karotenoid astaxantin sangat membantu pertumbuhan dan daya hidup postlarva udang *L. vannamei*, dengan penambahan 100 mg dan 200 mg/kg per diet.



Gambar 2. Grafik daya hidup larva udang windu pasca pemberian pakan hasil fusi protoplas

10. 2. Analisis untung rugi pakan

Pertumbuhan hewan akuakultur dipengaruhi oleh kualitas pakan dan kualitas lingkungan. Kondisi lingkungan yang baik bagi pertumbuhan adalah suhu yang stabil dan pH. Suhu idealnya berkisar 25-26°C dengan pH 6,5-7. Tingkat kelulushidupan hewan akuakultur akan tinggi saat suhu dan pH stabil diikuti sirkulasi dan kualitas air yang baik.

Pengamatan terhadap kualitas dan keamanan pakan alami unggul hasil penelitian dilakukan dengan pemberiannya terhadap larva udang pada skala *in vitro*. Setiap dua hari larva udang ditimbang bobot badannya di laboratorium untuk melihat perkembangan dan kenaikan bobot udang sebagai efek dari pemberian diversifikasi pakan hasil fusi protoplas.

Berdasarkan gambar hasil penelitian pendahuluan memperlihatkan pembuktian penelitian yang direncanakan dan ditingkatkan produksinya pada skala lebih besar pada tahun I. Pada tahun I yang juga akan dilakukan diversifikasi perbandingan pakan terbaik sehingga diperoleh pakan unggul. Hasil penelitian pendahuluan tahun I juga memperlihatkan peluang untuk dapat dilaksanakannya rencana penelitian pada tahun kedua dengan tahapan seleksi pakan diikuti analisis untung rugi. Pada tahun kedua perolehan pakan unggulan akan dikembangkan produksinya diikuti analisis ekonomi dan pendapatan petani tambak.

10.2.1 Analisis rugi-laba pakan

Tabel 1
PERHITUNGAN RUGI-LABA PER MUSIM TANAM
PEMBESARAN LARVA UDANG MENJADI BENUR

No	Uraian	Jumlah
	PERHITUNGAN RUGI-LABA	
	PENDAPATAN (QxP) (80.000 benur PL 20 @ Rp. 25)	Rp. 2.000. 000.
	BIAYA-BIAYA (C)	
	BIAYA VARIABEL (VC)	
	Larva Udang (100.000 Larva @ Rp. 7)	Rp. 700.000.
	Tenaga Kerja 15 hari (15 X beban per petak/hrXRp.10.000)	Rp. 150.000.
	TOTAL BIAYA VARIABEL(TVC)	Rp. (850.000.)
	Contribution Margin (CM)	Rp. 800.000.
	BIAYA TETAP (FC)	

	Pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella 1 Lt	Rp. 250.000.
	Sewa Lahan (Rp. 1500.000/5petak/10xmasa tanam efektif)	Rp. 30.000.
	Persiapan Lahan 3 hari @ Rp. 30.000.	Rp. 90.000.
	Biaya lain-lain	Rp. 100.000.
	TOTAL BIAYA TETAP (TVC)	Rp. (370.000.)
	LABA(RUGI)	Rp. 710.000.

Data yang dibutuhkan dalam pembuatan analisis untung rugi adalah biaya variable, besarnya produksi, dan hasil penjualan. Biaya terdiri dari biaya investasi, biaya tetap, dan biaya tidak tetap. Variable berikutnya yang akan dicari adalah informasi produksi. Informasi mengenai penjualan merupakan variable lain yang juga akan digunakan untuk menghitung analisis untung rugi. Informasi mengenai penjualan dapat diperoleh berdasarkan jumlah produk yang terjual dan harga produk.

Pada uji coba lapangan pemanfaatan pakan hasil fusi dilakukan pada tambak pemeliharaan pada skala tradisional dengan luas lahan 30 m x 10 m. Persiapan lahan berupa perbaikan tanggul tambak dan pengeringan lahan untuk mendapatkan kondisi lahan yang ideal, perbaikan saluran air dan sebagainya. Dalam pembuatan analisis untung rugi adalah besarnya produksi diukur dari berapa banyak larva udang yang ditebar pada lahan tambak, dalam uji coba pertama ditebar 100.000. larva udang, dan hasil penjualan didapat dari penjualan benur yang berhasil hidup sebanyak 80.000. (tingkat hidup 80%) dengan harga jual pada PL 20 seharga Rp. 25. Biaya-biaya dikelompokkan kedalam biaya tetap, dan biaya tidak tetap (variabel), Biaya tetap terdiri dari biaya sewa lahan, persiapan lahan, pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella dll , sampai lahan siap untuk ditebar larva yang dibebankan pada setiap periode masa tanam/pemeliharaan. Satu hal yang sangat spesifik dimana pakan yang secara umum masuk kategori biaya variabel, tetapi dalam konteks pemeliharaan larva udang menjadi benur pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella masuk kategori biaya tetap, karena pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella ini adalah makhluk hidup (mikroba) yang akan terus hidup pada media air dan akan terus berkembang biak, tetapi perkembangbiakannya tergantung pada daya dukung lingkungan. Ketika daya dukung lingkungan baik maka perkembangbiakannya akan semakin baik.. Biaya variabel terdiri dari biaya pengadaan larva udang, biaya tenaga operasional harian lainnya. Dari data-data tersebut

diatas maka dapat diketahui pada setiap masa tanam/pemeliharaan larva udang menjadi benih udang (benur) dihasilkan keuntungan sebesar Rp. 710.000.

10.2.2. Analisis Break Event Point (BEP) pakan

Berdasarkan data diatas dapat dilakukan analisi Break Event Point (BEP) untuk melihat berapa besar tingkat produksi yang menghasilkan keuntungan non (tidak untuk tidak rugi) atau titik impas. Menunjuk data perhitungan Laba/Rugi diatas maka dapat dihitung besarnya Break Event Point (BEP) adalah:

Break Event Quantity $FC/(P-V) = 850000/(25-10,625) = 850000/14,375 = 59.130$ benur, artinya pembudidaya benih udang (benur) tidak mendapatkan untung maupun rugi ketika benih larva udang yang ditebar 100.000 larva yang hidup 59.130 atau 59,13%. Sedangkan Break Event dalam nilai jual = $FC:(1-V/P) = 850.000: (1-10,625/25) = 850.000: 0,575 = \text{Rp. } 1478260$ artinya pembudidaya benih udang (benur) tidak mendapatkan untung maupun rugi ketika benih larva udang yang ditebar 100.000 larva dapat menghasilkan penjualan Rp. 1478260. Memang analisis ini hanya bisa digunakan dengan asumsi harga jual dan biaya variabel per unit konstan, biaya operasional dapat dikelompokkan variabelitasnya, produk yang dihasilkan tunggal dan ada kepastian dalam penentuan biaya variabel dan harga jual. Faktor terakhir yang menyangkut certainty inilah dalam dunia usaha terkadang sulit untuk didapat.

10.2.3. Analisis Cost and Benefit pakan

Analisis ini pada dasarnya adalah membandingkan antara biaya dan pengembangan/pembudidayaan dari larva udang menjadi bibit udang (benur) keuntungan (Benefit) dan biaya (cost) baru dilihat aspek kuantitatif yaitu dari satuan rupiah. Dari aspek kuantitatif dengan satuan rupiah bisa dilihat dari perhitungan rugi laba dimana cost lebih kecil dari benefitnya, sehingga analisis Cost and Benefit adalah positif. Analisis Cost and Benefit Pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella bisa dilihat dari nilai kualitatif, tetapi kami belum melakukan identifikasi secara kualitatif. Secara simpel yang sebenarnya sangat banyak keuntungan dari proyek ini terutama aspek lingkungan, aktivitas ini adalah aktivitas yang betul-betul ramah lingkungan.

10.2.4. Analisis NPV dan IRR

Net Present Value (NPV) akan diperoleh dari data keuntungan (benefit), biaya (cost), dan keuntungan bersih (net benefit) yang telah dikoreksi oleh bunga bank (*discount factor*).

Data yang akan digunakan untuk menghitung NPV adalah data *time series* selama lima tahun atau lebih. Pengembalian modal (Internal Rate of Return; IRR) adalah waktu yang diperlukan oleh pengusaha untuk mengembalikan modal investasinya. Nilai IRR akan diperoleh melalui perbandingan antara keuntungan bersih dan biaya tetap dengan modal investasi. Nilai yang diperoleh akan digunakan untuk menduga berapa lama modal investasi yang ditanamkan akan kembali. Cash flow akan dicari berdasarkan jenis kegiatan, waktu, kebutuhan tenaga kerja, bahan, peralatan, dan dana. Analisis ini belum bisa dilakukan karena mensyaratkan aktivitas bisnis harus dilakukan selama masa investasi, kalau dalam konteks ini minimal masa investasi didasarkan pada masa penyewaan lahan yang akan digunakan untuk usaha. Kalau sewa lahan adalah satu tahun, dan berapa kali lahan tersebut dipakai untuk pemeliharaan (melihat siklus produksi), data itulah yang digunakan untuk melakukan analisis NPV dan IRR.

10.2.5. Analisis ekonomi dan pendapatan

Analisis ekonomi yang akan dilakukan meliputi analisis penentuan segmen pasar, rantai pemasaran, dan tingkat permintaan. Penentuan segmen pasar akan dilakukan berdasarkan tingkat sosial ekonomi, pendapatan, dan skala budidaya. Informasi produk akan disampaikan secara verbal, menggunakan kemasan. Analisis ekonomi juga akan mencakup penentuan tingkat permintaan konsumen terhadap produk yang akan dipasarkan.

4. Kesimpulan

Penelitian pendahuluan pada tahun I memperlihatkan pakan hasil fusi protoplas telah meningkatkan berat badan udang dan kelulushidupannya dibandingkan pakan buatan dan pakan alami saja. Penelitian yang akan dilakukan pada tahap kedua berpotensi untuk meningkatkan pendapatan petani tambak berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan pada Tahun II.

11.1. Analisis Untung Rugi

Pada uji coba lapangan pemanfaatan pakan hasil fusi pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella, informasi mengenai penjualan dan variabel- variable lain yang digunakan untuk menghitung analisis untung rugi. Dari data-data tersebut diatas maka dapat diketahui pada setiap masa tanam/pemeliharaan larva udang menjadi benih udang (benur) dihasilkan keuntungan sebesar Rp. 710.000. (lihat tabel 1)

11.2. Analisis Break Event Point (BEP)

Berdasarkan data variabilitas biaya, selanjutnya dapat dilakukan analisis Break Event Point (BEP). Dengan segala keterbatasan yang kami jelaskan di atas maka Break Event Quantity atau titik impas dilihat dari sudut pandang jumlah produksi pembesaran larva udang menjadi bibit udang (benur) dengan pemberian pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella pada lahan uji coba dengan jumlah larva tebar sebanyak 100.000. mencapai Break Event Point (BEP). 59.130 atau 59,13%. Sedangkan Break Event dalam nilai jual = $FC:(1-V/P) = 850.000:(1-10,625/25) = 850.000: 0,575 = \text{Rp. } 1.478.260$. ,artinya pembudidaya benih udang (benur) tidak mendapatkan untung maupun rugi ketika benih larva udang yang ditebar 100.000 larva dapat menghasilkan penjualan Rp. 1.478.260.

11.3. Analisis Cost and Benefit pakan

Analisis B/C rasio merupakan perbandingan antara hasil penjualan (benefit) dengan biaya operasional (cost). R/C rasio merupakan perbandingan antara hasil (revenue) dengan biaya operasional pada uji coba Pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella, dapat dilihat dari perhitungan rugi laba dimana cost lebih kecil dari benefitnya, sehingga analisis Cost and Benefit adalah positif. Analisis Cost and Benefit Pakan Rekombinan Fusi Protoplas khamir-Dunaliella bisa dilihat dari nilai kualitatif, tetapi kami belum melakukan identifikasi secara kualitatif. Secara simpel yang sebenarnya sangat banyak keuntungan dari proyek ini terutama aspek lingkungan, aktivitas ini adalah aktivitas yang betul-betul ramah lingkungan.

11.4. Analisis NPV dan IRR

Analisis ini belum bisa dilakukan karena mensyaratkan aktivitas bisnis harus dilakukan selama masa investasi, kalau dalam konteks ini minimal masa investasi didasarkan pada masa penyewaan lahan yang akan digunakan untuk usaha. Kalau sewa lahan adalah satu tahun, dan berapa kali lahan tersebut dipakai untuk pemeliharaan (melihat siklus produksi), data itulah yang digunakan untuk melakukan analisis NPV dan IRR.



12. PUSTAKA ACUAN

- Aquacop, 1983. Algal Food Cultures At The Centre Oceanologique du Pacifique. In McVey, J.P and J.R. Moore. CRC Handbook of Mariculture : Vol. I. Crustacean Aquaculture. CRC Press.
- Ausubel, F., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl. 1995. Short Protocols in Molecular Biology. A Compedium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed . Wiley & Sons. Inc. USA. 2-10.
- Chien YH and SC Jeng. 1992. Pigmentation of Kuruma Prawn, *Penaeus monodon* Bate, by various pigment sources and levels and feeding regimes. *Aquaculture* 102: 333-346
- Craven, D.W. 1982. **Strategic marketing**. Richard D. Irwin, Inc.Homewood, Illinois.
- Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. 1997/1998. **Dampak periklanan terhadap kehidupan masyarakat**. Departemen Pendidikan danKebudayaan, Direktorat Jenderal Kebudayaan, Direktorat Sejarah dan Nilai Tradisional. Bagian Proyek Pengkajian dan PembinaanKebudayaan Masa Kini, Jakarta.
- Djarajah, A.S. 1995. **Pakan ikan alami**. Kanisius, Yogyakarta.
- FAO. 1991. **Pedoman Manajemen Usahatani**. FAO Regional Office for Asia and The Far East, Bangkok.
- Fang T.J. and Y-S Cheng 1993. Improvement of astaxantin production by *Phaffia rhodozymba* through mutation and optimization of culture conditions. J. Ferment and Bioeng. Vol 75, no. 6, 466 – 469.

- Iwasaki R and M.Murakoshi. 1992. Palm oil yields carotene for world markets.*Inform* vol 3 No 2 :210-217
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik kultur phytoplankton dan zooplankton*. Kanisius, Yogyakarta.
- Ikatan Akuntan Indonesia. 1994. *Prinsip akuntansi Indonesia 1984*. Edisi II. Penerbit Rineka Cipta, Jakarta.
- Geffroy, E.K. 1994. *200 cara menjual lebih baik*. Alih bahasa : AgusPriatna. Bina Rupa Aksara, Jakarta.
- Johnson, E.A and WA Schroeder. 1996. Microbial Carotenoids: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Edited by A. Fiechter. 141-145
- Kusdiyantini E., P. Gaudin, G. Goma and P. Blanc (1998a). Growth kinetics and astaxantin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. *Biotechnol. Lett.*, vol. 20, no.10, 929 – 934.
- Kusdiyantini, E., Widjanarko, M Zainuri, Joedoro Soedarsono and Triwibowo Yuwono. 2003. Potensi Produksi Karotenoid Khamir *Phaffia rhodozyma* Dengan Sumber Karbon Glukosa dan Molase pada Fermentasi Batch untuk Akuakultur (*Penaeus monodon* Fabricius). *Ilmu Kelautan* 8 (2) : 83 – 88, Juni 2003
- Kusumaningrum H.P. 1992. Fusi Protoplasma antara bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. Skripsi. Universitas Diponegoro.
- _____. 2003. Cloning and transformation of *Erwinia uredovora* Carotenoid Genes on *E.coli* JM109 and *E.coli* DH5 α . Research Progress report First Year 2003-2004 Doctoral Program, SEAMEO-SEARCA, DAAD Scholarship. February.
- _____, S.R. Ferniah. 2003. Profil Kromosom Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) Mutan dengan Mutagen Ultraviolet . Laporan Penelitian. DP3M DEPDIKNAS
- _____, E. Kusdiyantini., Wijanarka. 2003. Produksi Astaxantin *Phaffia rhodozyma* melalui Teknik Fusi Protoplasmat. Artikel Ilmiah Penelitian Dasar Dirjen Dikti. DEPDIKNAS
- _____, H.P., E. Kusdiyantini., Wijanarka. 2003. Produksi Astaxantin *Phaffia rhodozyma* melalui Teknik Fusi Protoplasma. Seminar Nasional Hasil Penelitian Dasar 2003. Dirjen Dikti. DEPDIKNAS. Jakarta, 12 – 14 Juli 2004
- _____, H.P., E. Kusdiyantini., Wijanarka. 2003. Aplikasi Teknik Fusi Protoplasmt untuk meningkatkan Produksi Astaxantin. Poster.
- _____, H.P., E. Kusdiyantini., Wijanarka. 2003. Improvement of Astaxantin Production from *Phaffia rhodozyma* by Protoplasma Fusion. Indonesian Journal of Biotechnology. ISSN : 0853 – 8654. June 2003. p. 627 – 633

- Kusumaningrum, H.P., 2008. Karakterisasi Alga Hijau *Dunaliella* sp. dan Isolat Sianobakteria serta Deteksi gen DXS Penyandi Enzim Kunci Biosintesis Karotenoid. Disertasi. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Lee P.C. and C. Schmidt-Dannert. 2002. Metabolic Engineering Towards Biotechnical Production of Carotenoids in Microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60 : 1 –11
- Lichtenthaler H.K 1999. The 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Fosphate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1. 50 : 47-65.
- _____. H.K. 2000. Non-mevalonate Isoprenoid Biosynthesis : Enzymes, Genes and Inhibitors. *Biochemical Society Trans. Germany.* 28 : 785-789.
- Lois L.M., Campos N., S.R. Putra, K. Danielsen, M. Rohmer, A. Boronat. 1998. Kloning and Characterization of a Gene from *Escherichia coli* Encoding a Transketolase-like Enzymes That Catalyzes the Synthesis of 1-Deoxy-D-Xylulose 5-Fosphate, a Common Precursor for Isoprenoid, Thiamin and Pyridoxol Biosynthesis. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.* 95 : 2105 – 2110.
- Misawa N., S. Yamano, H. Linden, M.R.de Felipe, M. Lucas, H. Ikenaga, and G. Sandmann., 1993. Functional Expression of the *Erwinia uredovora* Carotenoid Biosynthesis gene *crtI* in Transgenic Plants showing an Increase of β -carotene Biosynthesis Activity and Resistance to the Bleaching Herbicide Norflurazon. *The Plant Journal* 4(5) : 833-840.
- Okagbue R.N. and M.J. Lewis. 1984. Use of alfalfa residual juice as a substrate for propagation of the red yeast *Phaffia rhodozyma*. *Appl. Microbiol. Iotecol.* Vol, 20, 33 – 39.
- Penafiorida, V.D. 1989. An evaluation of indigenous protein source potential component in the diet formulation for tiger prawn, *Penaeus monodon*, using Essential Amino Acid Index (EAAI). *Aquaculture*, 83, 319-330.
- Rye, D.E. 1996. ***Tool for executives, Entrepreneur***. PT. Prenhallindo, Jakarta.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
- Sandman G., M. Albrecht, G. Schnurr, O. Knorz and P. Boger. 1999. The Biotechnological Potential and Design of Novel Carotenoids by Gene Combination in *Escherichia coli*. *TIBTECH.* 17 : 233 – 237.
- _____. G. 2001. Genetic Manipulation of Carotenoid Biosynthesis : Strategies, Problems and Achievements. *TRENDS in Plant Science.* Vol 6. No.1 January : 14–17
- Sprenger G.A., U. Schorken, T. Wiegert, S. Grolle, A.A. de Graaf, S.V. Taylor, T.P. Begley, S. Bringer-Meyer, and H. Sahm. 1997. Identification of Thiamin-Dependent synthase in *Escherichia coli* Required for the Formation of The 1-deoxy-d-xylulose 5-fosphate Precursor to Isoprenoid, Thiamin and Pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94(24): 12857-12862

- Umar, H. 2003. Studi Kelayakan Bisnis. Teknik Menganalisis Kelayakan Rencana Bisnis secara Komprehensif. Gramedia Jakarta
- Zainuri, M, Endang Kusdiyantini, Widjanarko, Joedoro Soedarsono and Triwibowo Yuwono. 2003. Preliminary Study on the Use of Yeast *Phaffia rhodozyma* as pigment source on the Growth of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Ilmu Kelautan* 8 (1) : 47-52, Maret 2003
- Zainuri, M, Endang Kusdiyantini, Widjanarko, Joedoro Soedarsono and Triwibowo Yuwono. 2003. Study of Yeast *Phaffia rhodozyma* as Pigment Source to The Carotenoid Contents of Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) *Ilmu Kelautan* 8 (2) : 109 – 113, Juni 2003
- Niu, J., Tian, L.-X., Liu, Y.-J., Yang, H.-J., Ye, C.-X., Gao, W. and Mai, K.-S. (2009), Effect of Dietary Astaxanthin on Growth, Survival, and Stress Tolerance of Postlarval Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40: 795–802. doi: 10.1111/j.1749-7345.2009.00300.x