

PENGARUH DARI MACAM DAN DOSIS BAHAN PENGKAYA TERHADAP KUALITAS NUTRISI ROTIFERA *Brachionus rotundiformis* KHUSUSNYA n3-HUFA

Effect of Kind and Dosage of Enrichment Materials on the Nutritional Quality of Rotifers Especially n3-HUFA

M. A. Suprayudi¹

¹Jurusan Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor (16680), Indonesia

ABSTRACT

This experiment was conducted to evaluate the quality of rotifer enriched with four kinds of enrichment materials from the stand point of essential fatty acids. Rotifer was enriched at 24 - 25°C for 18 hours at a density of 1000 ind./ml. Rotifers were treated by four kinds of enrichment materials such as oleic acid (R-OA), two different density of *Nannochloropsis oculata*, (4×10^7 and 16×10^7 cell/ml; R-N18 and R-N42) two different levels of eicosapentaenoic acids (EPA) triglyceride type (EPA-TAG) (20 and 40 µl/ml; R-E20, R-E40) and two different level of EPA ethyl ester (EPA-EE) (R-EE25 and R-EE50%) respectively. Rotifers enriched with *Nannochloropsis oculata* and EPA-EE type have a similar profile of essential fatty acid especially on n3-HUFA that dominated by EPA, while DHA was in a trace amount or not detected. In addition *Nannochloropsis oculata* as an enrichment material showed the highest population density of rotifers during enrichment periods. Rotifer enriched with EPA-TAG has a more complete of essential fatty acid profile compared to other enrichment materials due to their contained both of EPA and DHA. We conclude that rotifer enriched with EPA-TAG as enrichment material showed the best nutritional quality of rotifers from the stand point of essential fatty acid.

Key words : Rotifers, enrichment, eicosapentaenoic acid, docosaheksaenoic acid, n3-HUFA

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil asam lemak rotifera yang diperkaya dengan berbagai macam jenis dan dosis pengkaya. Rotifera dengan kepadatan 1000 ind./ml diperkaya dengan berbagai bahan pengkaya seperti asam oleat (R-OA); *Nannochloropsis oculata* dengan kepadatan 4×10^7 dan 16×10^7 sel/ml (R-N18 dan R-N42); eicosapentaenoic acid (EPA) tipe triglicerida (EPA-TAG) dengan dosis 20 dan 40 µl (R-E20 dan R-E40) dan EPA tipe ethyl ester (EPA-EE) dengan dosis 25 dan 50 µl per liter (R-EE25 and R-EE50%). Rotifera diperkaya selama 18 jam pada suhu 24-25°C. Rotifera yang diperkaya dengan *Nannochloropsis oculata* serta EPA-EE memiliki kesamaan profil asam lemak terutama pada incorporasi EPA, sedangkan DHA terkandung pada jumlah yang kecil atau tidak terdeteksi. Adapun rotifera yang diperkaya dengan EPA-TAG memiliki profil asam lemak yang lebih lengkap terutama ditinjau dari kandungan EPA dan docosaheksaenoic acid (DHA) nya. Selanjutnya rotifera yang diperkaya dengan *Nannochloropsis oculata* memiliki populasi yang tertinggi dibanding perlakuan lainnya. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pengkayaan dengan EPA-TAG memiliki kualitas rotifera yang terbaik ditinjau dari sisi kelengkapan kandungan asam lemaknya.

Kata kunci : Kualitas rotifera, pengkayaan, asam eikosapentaenoik, asam dokosaheksaenoik, n3-HUFA

PENDAHULUAN

Larva ikan laut dan krustasea membutuhkan asam lemak tak jenuh berantai carbon panjang (rantai karbon -20) dari n-3 group (n-3 HUFA) khususnya eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) dan docosaheksaenoic acid (DHA, 22:6n-3) untuk pertumbuhan dan kelangsungan hidupnya (Koven *et al.* 1989; Watanabe 1993). Sampai saat ini, pakan alami masih merupakan pakan utama untuk larva ikan laut dan krustasea dan belum dapat digantikan secara total oleh pakan buatan (Baragi & Lovel 1986). Rotifer tipe *S Brachionus rotundiformis* telah lama dan secara luas digunakan sebagai pakan alami untuk larva-larva ikan laut dan krustasean yang baru menetas karena ukurannya sesuai dengan bukaan mulut larva serta teknologi produksi massalnya sudah dikuasai dan terus dikembangkan (Sorgeloos 1998). Rotifer mempunyai

kemampuan untuk mensintesa beberapa jenis n-3 HUFA dari rantai carbon 18 (C-18) asam lemak tak jenuh -n3, akan tetapi laju sintesanya sangat rendah sehingga tidak dapat memenuhi kebutuhan larva ikan laut dan krustasea pada fase pertumbuhan yang sangat cepat. Rendahnya kandungan EPA serta DHA ditemukan dalam jumlah yang relatif kecil (*trace*), membuat kualitas nutrisi dari rotifer sangat rendah (Watanabe 1993).

Berkaitan dengan hal yang telah diuraikan sebelumnya, usaha telah dilakukan untuk meningkatkan kualitas nutrisi dari rotifer, dengan jalan meningkatkan kandungan n-3 HUFA rotifera melalui pemberian alga sebelum rotifer diberikan kepada larva, pemberian emulsi n-3 HUFA kepada ragi roti *Saccharomyces cerevisiae* atau pemberian emulsi n-3 HUFA secara langsung kepada rotifer (Watanabe *et al.* 1978). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa kandungan

asam lemak esensial dari rotifer ditentukan oleh jenis bahan pengkaya, lama waktu pengkayaan dan macam dari zat pengkaya. Ke tiga hal tersebut sangat menentukan profil dari asam lemak esensial yang terkandung dalam rotifera, khususnya EPA dan DHA sebagai penentu kualitas nutrisi dari rotifera tersebut (Takeuchi *et al.* 1988; Watanabe *et al.* 1978).

Penelitian ini ditujukan untuk membandingkan efektifitas dari *Nannochloropsis oculata*, EPA tipe gliserida (EPA-TAG) dan EPA ethyl ester (EPA-EE) sebagai bahan pengkaya terhadap profil dari asam lemak esensial rotifer.

BAHAN DAN METODE

Kultur dan Pengkayaan Rotifera

Rotifera tipe S (*Brachionus rotundiformis*) dikultur secara massal dengan menggunakan *Chlorella* air tawar dan ragi roti dalam tangki fiber kapasitas 5 ton pada kisaran suhu dan salinitas 24-26 promil dan 27- 29 °C di "Japan Sea Farming Association". Rotifera dikultur dengan kepadatan awal 800-1.000 individu/ml (secara sampling). Setelah mencapai kepadatan 2.000-3.000 individu/ml rotifera dipanen, dicuci dengan air laut dan dipindahkan kedalam tangki berukuran 100 l dengan kepadatan 1.500 individu/ml pada suhu kamar dan dipuasakan selama 7 jam. Setelah dipuasakan rotifer dipanen, dibilas dengan air tawar dan dipindahkan kedalam ember plastik dengan kapasitas 5 l dengan kepadatan 1.000 ind./l pada suhu 24-25 °C. Setelah itu rotifer diberi pakan alga atau emulsi minyak secara langsung. Sekitar 18 jam setelah pemberian pakan rotifera dipanen dan dibilas dengan air tawar, setelah itu rotifera disimpan didalam lemari pendingin bersuhu - 80°C.

Tabel 1. Bahan pengkayaan rotifera (*Brachionus rotundiformis*)

No. Perlakuan	Bahan Pengkaya			
	OA (µl) ¹	N (sel/ml) ²	EPA-TAG (µl) ³	EPA-EE (µl) ⁴
1	100	–	–	–
2	–	4x10 ⁷	–	–
3	–	16x10 ⁸	–	–
4	–	–	20	–
5	–	–	40	–
6	–	–	–	25
7	–	–	–	50

1. Asam oleat

2. *Nannochloropsis aculata*

3. Asam eikosapentaenoik tipe gliserida

4. Asam eikosapentaenoik tipe etil ester

Pembuatan Emulsi Lemak

Sebanyak 0,5 ml minyak dicampur dengan 100 ml air destilasi dan 0,1 g kuning telur mentah dan setelah itu di homogenized selama 2 menit pada 10 000 rpm (rotasi per menit). Dengan mungunkan mikroskop dengan pembesaran 400 terlihat jelas bahwa butiran minyak terbungkus kuning telur dengan ukuran 20-30 mikron. Kemudian emulsi minyak tersebut diberikan secara langsung ke rotifer sebanyak 0,1 ml lemak setiap 1 l media pengkayaan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan 7 perlakuan dan setiap perlakuan di ulang tiga kali. Perlakuan 1, sebagai kontrol negatif rotifer diperkaya dengan menggunakan asam oleat (OA, 18:1n-9) sebanyak 100 µl per liter media pengkayaan. Perlakuan 2 dan 3 rotifer diperkaya dengan alga bersel tunggal (*Nannochloropsis oculata*) sebanyak 4x10⁷ dan 16x10⁷ sel/ml. Perlakuan 4 dan 5 rotifer diperkaya dengan EPA tipe trigliceirda (EPA-TAG) dengan merek dagang EPA 28 G (Nippon Kagaku Shiryō Co., LTD, Japan; mengandung 27,63% EPA and 8,61% DHA) dengan dosis 20 dan 40 µl per liter media pengkayaan. Perlakuan 6 dan 7 rotifer diperkaya dengan EPA tipe ethyl ester (EPA-EE, Nippon Suisan Co., Ltd. Japan, kemurnian lebih dari 95%) dengan dosis 25 dan 50 µl per liter media pengkayaan. Pada semua perlakuan yang menggunakan minyak dosisnya disesuaikan menjadi 100 µl per liter media pengkayaan dengan menambahkan asam oleat untuk rotifera yang diperkaya dengan EPA-EE dan minyak jagung untuk rotifera yang diperkaya dengan EPA-TAG. Keseluruhan perlakuan dapat dilihat pada Table 1.

Analisis Kimia

Lemak diekstraksi dengan menggunakan metoda Folch *et al.* (1957) dimana sampel dari rotifera dihaluskan dengan menggunakan homogeniser pada kecepatan 1.500 rpm selama 5 menit dalam chloroform-metanol (2:1, v/v). Lemak kemudian disaponifikasi dengan menggunakan 1 ml KOH (50%) dalam ethanol (15 ml) pada suhu 80°C selama 40 menit. Bahan yang telah tersaponifikasi kemudian diesterifikasi dengan menggunakan BF₃ (6,7%) dalam methanol selama 20 menit pada suhu 80°C. Asam lemak metil ester kemudian dianalisis dengan menggunakan Gas Liquid Chromatografi (Shimadzu, GC 14B) yang dilengkapi dengan kolom kapiler silika (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm *film thickness*; SUPELCO, Bellefonte, USA). Gas helium digunakan sebagai karier dengan tekanan 100 kPa. Temperatur pada kolom, tempat injeksi dan detektor ditetapkan pada suhu 205, 250 dan 250°C. Selanjutnya asam lemak metil ester diidentifikasi dengan cara membandingkan dengan standar.

Analisis Statistik

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 7 perlakuan dan setiap perlakuan diulang 3 kali. Data yang didapat kemudian ditampilkan dalam bentuk nilai tengah. Untuk melihat adanya perbedaan antar perlakuan dilakukan analisis varian, kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey's untuk membandingkan nilai tengah. Keseluruhan uji statistik dilakukan dengan menggunakan program statistik SPSS 11.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kualitas Nutrisi Rotifer

Kandungan lemak dan asam lemak dari rotifera yang diperkaya dengan *Nannochloropsis* dan berbagai emulsi minyak disajikan dalam Tabel 2. Kandungan lemak terendah didapat pada rotifera yang diperkaya dengan oleic acid (perlakuan ke-1; R-OA; 10.2%) sedangkan perlakuan ke-5 (R-E40) memiliki kandungan lemak tertinggi (15.8%) ($p < 0.05$).

Rotifer yang diperkaya dengan EPA-TAG (R-E20 dan R-E40) dan alga bersel tunggal (R-N18 dan R-N42) memiliki kandungan total asam lemak jenuh yang sama, akan tetapi lebih besar dari kandungan total asam lemak rotifer yang diperkaya dengan EPA-EE (R-EE25 dan R-EE50) ($p < 0.05$). Total kandungan asam lemak berikatan rangkap satu (total monoena) pada rotifer yang diperkaya dengan EPA-TAG (R-E20 dan R-E40) dan alga bersel tunggal (R-N18 dan R-N42) lebih rendah dari rotifer yang diperkaya dengan EPA-EE.

Hal yang sama juga terlihat pada kandungan asam oleat ($p < 0.05$) (Tabel 2).

Kandungan asam linoleat (LA) dan linolenat (LNA) pada rotifera yang diperkaya dengan TAG (5.55 dan 0.87%) lebih besar dibandingkan dengan rotifera yang diperkaya oleh bahan pengkaya lainnya. Berbeda dengan kandungan LA dan LNA, kandungan asam arachidonat (AA) pada rotifera yang diperkaya oleh minyak etil ester (OA, R-EE25 dan R-EE50) lebih rendah dibanding dengan rotifera yang diperkaya dengan alga atau TAG (Tabel 2).

Kandungan EPA pada perlakuan R-EE50 lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan R-EE20, R-EE40, R-EE25 dan R-N18, akan tetapi kandungan EPA tersebut lebih rendah dibandingkan dengan R-N42. Selanjutnya pada perlakuan OA, EPA terkandung dalam jumlah yang sangat kecil (*trace*). Berbeda dengan kandungan EPA, kandungan DHA hanya didapat pada perlakuan R-E20G dan R-E40G (Tabel 2).

Pertumbuhan Populasi Rotifera

Kelimpahan rotifera selama pengkaya menunjukkan bahwa rotifera yang diperkaya dengan etil ester terlihat lebih rendah dibandingkan dengan rotifer yang diperkaya dengan EPA-TAG dan alga bersel tunggal (Tabel 3). Selanjutnya terlihat bahwa pemberian *Nannochloropsis* memberikan pertumbuhan populasi yang tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya ($p < 0.05$).

Pembahasan

Dari penelitian ini terlihat bahwa pengkaya rotifera dengan berbagai macam lemak dan pada berbagai level memberikan pengaruh yang berbeda terhadap performan rotifera khususnya kadar lemak, asam lemak dan kelangsungan hidup (Rainuzzo *et al.* 1989). Pada penelitian ini, total lemak pada rotifera secara umum lebih tinggi pada rotifera yang diperkaya dengan TAG, dan diikuti oleh EPA EE, *Nannochloropsis* dan OA EE. Rendahnya kandungan lemak pada rotifera yang diberi OA sebagai kontrol negatif diduga ketidakmampuan rotifera yang terkait dengan aktivitas enzimatis untuk proses lipogenesis yang berasal dari OA. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Rodrigues *et al.* (1996) dan Zhukova *et al.* (1998).

Pada umumnya kandungan asam lemak pada rotifera, mencerminkan profil asam lemak dari bahan pengkaya. Hasil penelitian ini, sejalan dengan hasil penelitian tersebut dimana terlihat kandungan asam oleat (OA) pada rotifera yang diperkaya dengan OA dan kombinasi antara OA dan EPA EE lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya (Tabel 2.). Akan tetapi, incorporasi asam lemak tertentu dari asam lemak yang berbeda dapat terjadi. Hal ini mungkin disebabkan oleh aktifitas metabolisme atau dapat pula disebabkan oleh aktivitas enzimatis (Sargent *et al.*

Tabel 2. Kandungan asam lemak tertentu dari rotifera (*Brachionus rotundiformis*) setelah di perkaya pada setiap perlakuan

	Perlakuan						
	OA	R-N18	R-N42	R-E20	R-E40	R-EE25	R-EE50
Lemak	10.2 ± 1.0 ^a	12 ± 0.6 ^b	14.3 ± 0.5 ^{cd}	14.93 ± 0.2 ^{de}	15.8 ± 0.4 ^e	12.8 7 ± 0.4 ^{bc}	13.2 ± 0.3 ^{bc}
Total Saturated	1.92 ± 0.29 ^a	3.02 ± 0.08 ^b	3.92 ± 0.05 ^c	3.32 ± 0.20 ^{bc}	3.56 ± 0.43 ^{bc}	2.25 ± 0.12 ^a	2.26 ± 0.10 ^a
Total Monoene	3.73 ± 0.56 ^{bc}	2.18 ± 0.02 ^a	4.22 ± 0.29 ^{cd}	3.26 ± 0.03 ^b	3.33 ± 0.08 ^{bc}	4.93 ± 0.31 ^{de}	5.17 ± 0.44 ^e
oleic	3.00 ± 0.33 ^d	1.05 ± 0.03 ^a	1.68 ± 0.13 ^{ab}	2.71 ± 0.09 ^{bc}	2.60 ± 0.08 ^{bc}	2.83 ± 0.06 ^{cd}	3.31 ± 1.18 ^d
Lanoleic	0.93 ± 0.13 ^a	2.50 ± 0.14 ^b	1.18 ± 0.28 ^a	5.55 ± 0.09 ^c	5.15 ± 0.01 ^c	1.19 ± 0.07 ^a	1.32 ± 0.19 ^a
linolenic	0.53 ± 0.08 ^b	0.73 ± 0.06 ^{bcd}	0.23 ± 0.10 ^a	0.83 ± 0.03 ^{cd}	0.87 ± 0.01 ^d	0.67 ± 0.05 ^{bc}	0.62 ± 0.12 ^{bcd}
Arachidonic	0.07 ± 0.01 ^a	0.23 ± 0.01 ^{cd}	0.41 ± 0.03 ^d	0.17 ± 0.01 ^b	0.19 ± 0.01 ^{bc}	0.07 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.03 ^a
n3-HUFA	0.18 ± 0.02 ^a	1.55 ± 0.04 ^d	2.87 ± 0.08 ^f	0.80 ± 0.02 ^b	1.36 ± 0.03 ^c	1.22 ± 0.02 ^c	2.07 ± 0.03 ^f
EPA ¹	tr	1.04 ± 0.11 ^d	2.23 ± 0.26 ^f	0.35 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.06 ^{ab}	0.93 ± 0.07 ^{bc}	1.74 ± 0.08 ^e
DHA ²	tr	tr	tr	0.14 ± 0.03 ^a	0.29 ± 0.03 ^b	tr	tr

* perbedaan hurup pada kolom menunjukkan berbeda secara statistik ($p < 0.05$)

1. Eicosapentaenoic acid

2. Docosahexaenoic acid

*OA: oleic acid; R-N18: rotifera diperkaya dengan *Nannochloropsis* selama 18 jam; R-N42: rotifera diperkaya dengan *Nannochloropsis* selama 42 jam; RE-20: rotifera diperkaya dengan EPA-TAG sebanyak 20 mikro liter; RE-40: rotifera diperkaya dengan EPA-TAG sebanyak 40 mikro liter; REE-25: rotifera diperkaya dengan EPA-Ethil Esther sebanyak 25 mikro liter; REE-50: rotifera diperkaya dengan EPA-ethyl ester sebanyak 50 mikro liter

Tabel 3. Populasi rotifera (*Brachionus rotundiformis*) selama proses pengkayaan

	Perlakuan						
	OA	R-N18	R-N42	R-E20	R-E40	R-EE25	R-EE50
Sebelum pengkayaan	980 ± 40	1010 ± 40	970 ± 40	990 ± 30	1100 ± 30	980 ± 60	1010 ± 90
Sesudah pengkayaan	760 ± 50 ^a	1210 ± 30 ^c	1410 ± 40 ^d	1030 ± 50 ^b	1010 ± 30 ^b	750 ± 30 ^a	730 ± 40 ^a

Perbedaan hurup pada nilai disetiap kolom menunjukkan berbeda secara statistik ($p < 0.05$)

1999). Sebagai contoh kandungan monoena akan pada rotifera yang diperkaya dengan minyak EE sama dengan yang diperkaya dengan TAG, walaupun secara umum kandungan monoena pada EE group jauh lebih tinggi dari TAG (Rodrigues *et al.* 1996). Penelitian ini juga menunjukkan bahwa efisiensi incorporasi asam lemak sangat ditentukan oleh jenis bahan pengkaya. Rotifera yang diperkaya dengan EPA-TAG menunjukkan incorporasi EPA yang lebih tinggi sebesar 52% dibandingkan dengan EPA-EE. Rendahnya nilai incorporasi EPA dari tipe EE ini diduga oleh kurang optimalnya kemampuan rotifera untuk memanfaatkan EE atau kemungkinan lain adalah EPA ini dikonversi menjadi sumber energi. Pemanfaatan EPA sebagai sumber energi diduga karena rendahnya ketersediaan energi dibandingkan oleh EPA-TAG. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Furuita *et al.* (1996).

Profil asam lemak pada rotifera sangat menentukan kualitas rotifera, dan hal ini pada umumnya ditunjukkan oleh kandungan total n3-HUFA serta perbandingan antara kandungan EPA dan DHA (Watanabe 1993). Pada penelitian ini, rotifera yang diperkaya EPA-EE dan *Nannochloropsis* mengandung n3-HUFA yang tertinggi dibanding perlakuan lainnya (Tabel 2). Dengan kandungan n3-HUFA yang demikian (diatas 0.8%) maka kedua bahan pengkaya ini dapat dijadikan sebagai bahan pengkaya untuk larva krustasea dan larva

ikan laut (Suprayudi *et al.* 2003; Takeuchi *et al.* 1994; Watanabe 1993). Dilain pihak kedua bahan pengkaya ini (*Nannochloropsis* dan EPA-EE) masih kurang sempurna, terutama pada hal kandungan DHA. Seperti diketahui bahwa DHA merupakan asam lemak yang sangat berperan pada perkembangan otak dan mata untuk larva ikan laut, dimana kekurangan atau ketidak beradaannya berpengaruh negatif terhadap perkembangan larva atau bahkan berakhir dengan kematian (Furuita *et al.* 1998; Bell *et al.* 1995)

Pertumbuhan populasi rotifera selama pengkayaan terlihat sangat bervariasi dan sangat dipengaruhi oleh jenis dan dosis bahan pengkaya. *Nannochloropsis* sebagai bahan pengkaya memperlihatkan pertumbuhan populasi yang tertinggi dibandingkan dengan bahan pengkaya lainnya. *Nannochloropsis* dilaporkan memiliki kandungan TAG yang tinggi. TAG ini merupakan sumber energi yang siap pakai oleh hewan air. Disamping kandungan TAG *Nannochloropsis* merupakan alga bersel tunggal yang memiliki kandungan nutrisi yang cukup lengkap seperti protein, mineral dan vitamin (Lavens & Sorgeloos 1996). Vitamin B12 merupakan salah satu unsur nutrisi penting untuk perkembangbiakan rotifera (Yu *et al.* 1989). Rendahnya populasi rotifera yang diperkaya dengan EE type di duga disamping karena rendahnya ketersediaan energi siap pakai (TAG), juga rotifera

kurang mampu memebolisme EE ester ini (Takeuchi *et al.* 1994).

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *Nannochloropsis* dan EPA-TAG dapat dijadikan bahan pangkaya karena memiliki efektifitas yang tinggi serta memiliki profil asam lemak yang baik ditinjau dari ketersediaan n-3HUFA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Toshio Takeuchi dan Katsuyuki Hamasaki atas dukungan yang diberikan terhadap penelitian ini. Terima kasih juga ditujukan kepada semua pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Baragi, V.J. & R.T. Lovell. 1986. Digestive enzyme activities in stripped bass from the first feeding through larval development. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115: 478-484.
- Bell, M.V., R.S. Batty, J.R. Dick, J.R. Fretwell, J.C. Navarri & J.R. Sargent. 1995. Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensity in juvenile herring *Clupea harengus* L. *Lipids*, 30: 443-449.
- Folch, J., M. Lee & G.H. Sloane-Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of totals lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 226: 477-509.
- Furuita, H., T. Takeuchi, M. Toyota & T. Watanabe. 1996. EPA and DHA requirements in early juvenile red sea bream using HUFA-enriched *Artemia nauplii*. *Fisheries Sci.*, 62: 246-251.
- Koven, W.M., D.G. Kissil & A. Tandler. 1989. Lipid and n3-HUFA requirement for *Sparatus aurata* larvae during starvation and feeding. *Aquaculture*, 79: 185-191.
- Lavens, P. & P. Sorgeloos. 1996. *Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture*. FAO, Rome. 295pp.
- Rainuzo, J.R., Y. Olsen & G. Rosenlund. 1989. The effect of enrichment diet on the fatty acids composition of rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*. 79: 157-161.
- Rodriguez, C., J.A. Perez, M.S. Izquierdo, R.J. Cejaz, A. Bolanos & A. Lorenzo. 1996. Improvment of the nutritional value of rotifer by varying the type and concentration of oil and enrichment period. *Aquaculture*, 147: 93-105
- Sargent, J., L. McEvoy, A. Estevez, G. Bell, M. Bell, J. Henderson & D. Tocher. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179: 217-229.
- Sorgeloos, P. 1998. Progress in live food production and use in fish and shellfish hatcheries. *Suisanzosoku*, 46: 409-410.
- Suprayudi, M.A., T. Takeuchi, K. Hamasaki, & J. Hirokawa. 2002. The effect of n-3HUFA content in rotifers on the development and survival of mud crab, *Scylla serrata*, larvae. *Suisanzoshoku* 50: 205-212.
- Takeuchi, T., M. Toyota & T. Watanabe. 1994. Comparison of lipid and n-3 higly unsaturated fatty acid incorporation between *Artemia* enriched with various tyupes of oil by direct method. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 277-281.
- Takeuchi, T., M. Toyota & T. Watanabe. 1988. Dietary value of *Artemia* enriched with various type of oil for larval stripped knifejaw and red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 283-289.
- Watanabe, T. 1993. Importance of docosahexaenoic acid in marine larval fish. *J. World Aquacult. Soc.*, 24: 152-161.
- Watanabe, T., C. Kitajima, T. Arakawa, K. Fukusho & S. Fujita. 1978. Nutritional quality of rotifer *Brachionus plicatilis* as a living feed from the viewpoint of essential fatty acids for fish. *Bull. Jap. Soc. Scien. Fish.*, 44: 1109-1114.
- Yu, J.P., A. Hino & M. Ushiro. 1989. Function of bacteria as vitamin B12 producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 1799-1806.
- Zhukova, V.N., A.B. Imbs & L.F. Yi. 1998. Diet-induced changes in lipid and fatty acid composition of *Artemia salina*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 120: 499-506.