

**EFEKTIVITAS PENAMBAHAN ENZIM CAIRAN RUMEN DOMBA
TERHADAP PENURUNAN SERAT KASAR BUNGKIL KELAPA
SEBAGAI BAHAN BAKU PAKAN IKAN**

The Evaluation of Utilization of Sheep Rumen Liquor Enzyme for Hydrolysis of Crude Fiber Content in Coconut Meal Basic Material Fish Diet)

Zuraida¹, Dedi Jusadi², Nur Bambang Priyo Utomo³

¹Mahasiswa Peneliti, ²Dosen Pembimbing I, ³Dosen Pembimbing II

*Program Magister Mayor Ilmu Akuakultur
SPs-Institut Pertanian Bogor (IPB) Bogor*

ABSTRACT

Experiments to evaluate the hydrolysis of crude fiber in coconut cake meal (CCM) by sheep rumen liquor enzymes for basic material fish diet. In Experiment I, the sheep rumen liquor enzymes were added into the CCM at concentration of either 0, 25, 50, 75, 100, or 125 ml/kg of CCM, and incubated for the period of 0, 12, and 24 hours, respectively. The result showed that sheep rumen liquor enzymes could effectively reduced the fiber content of CCM, while its glucose concentration increased. It was found that the application of sheep rumen liquor enzymes at a dose of 125 ml in 1 kg CCM at a period of 24 hours was the most effective treatment to reduce the crude fiber content in CCM. The crude fiber content in this treatment decreased from 13.76% to 6.98%.

Keywords: coconut cake meal, sheep rumen liquor, and crude fiber

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan pakan impor selama ini semakin meningkat dari tahun ke tahun. Peningkatan impor bahan pakan maka otomatis akan mengakibatkan banyak menguras devisa negara, dan efeknya adalah mahalnya harga pakan. Peningkatan harga pakan menimbulkan masalah yang besar di sektor budidaya, sehingga perlu dicari bahan pakan

alternatif untuk mengurangi ketergantungan terhadap impor. Bahan pakan alternatif yang perlu didorong di antaranya bungkil kelapa. Penggunaan bungkil kelapa sebagai bahan pakan ikan mempunyai permasalahan sendiri yaitu tingginya serat kasar. Salah satu teknologi yang bisa dilakukan untuk menurunkan serat kasar bahan baku pakan yaitu dengan

penambahan cairan rumen domba, dimana di dalam cairan rumen ini berdasarkan penelitian diketahui mengandung enzim pendegradasi serat (Williams dan Withers, 1992). Martin *et al.* (1999) mendapatkan bahwa enzim-enzim pencerna karbohidrat dalam cairan rumen antara lain adalah amilase, xilanase, avicelase, α -D-glukosidase, α -L-arabinofuranosidase, β -D-glukosidase, dan β -D-xylosidase. Penelitian Budiansyah (2010) menyatakan bahwa di dalam enzim cairan rumen mengandung enzim selulase, xilanase, mannanase, amilase, protease, dan fitase mampu menghidrolisis bahan pakan lokal dan penambahan enzim cairan rumen sapi lokal dalam pakan meningkatkan kecernaan ayam broiler.

Lebih lanjut penelitian Fitriiyani (2010); Pamungkas (2011) bahwa di dalam rumen domba terdapat aktifitas enzim-enzim selulase, amilase, protease, lipase, dan fitase. Pemanfaatan ekstrak cairan rumen domba 100 ml/kg daun lamtoro dengan masa inkubasi 24 jam mampu menurunkan serat kasar dari 16,77% ke 7,774% (Fitriiyani, 2010). Pamungkas (2011) menyatakan bahwa penggunaan ekstrak cairan rumen domba 100 ml/kg bahan dengan lama inkubasi 24 jam mampu menurunkan serat kasar dari 17,54% ke 6,69% dan meningkatkan nilai

kecernaan bungkil kelapa sawit sebesar 42,26%. Penelitian Sandi (2010) penambahan enzim cairan rumen dosis 1% (b/v) dengan lama waktu inkubasi 24 jam mampu menurunkan kandungan serat kasar sebesar 17,83% dan meningkatkan gula total terlarut sebesar 29,91% pada singkong.

Penambahan cairan rumen domba ke dalam bungkil kelapa diharapkan dapat menurunkan kandungan serat kasar dan meningkatkan nilai kecernaan bungkil kelapa sehingga bisa digunakan sebagai bahan baku alternatif yang dapat mensubstitusi bahan baku lain terutama impor. Dalam pembuatan pakan diperlukan bahan pakan yang mempunyai nilai kecernaan tinggi sehingga nutrien yang ada dalam pakan dapat dimanfaatkan secara optimal oleh ikan.

METODE PENELITIAN

Penelitian penambahan enzim cairan rumen domba terhadap penurunan serat kasar pada bungkil kelapa dilakukan untuk mengevaluasi penambahan enzim cairan rumen dalam TBK terhadap penurunan kandungan serat kasar pada bungkil kelapa. Tahap awal pada penelitian 1 ini adalah isolasi dan produksi enzim cairan rumen yang akan

dicampurkan dengan bahan baku pakan. Cairan rumen yang diambil adalah cairan rumen dari domba yang selama pemeliharaan diberikan pakan rumput dan cairan rumen domba yang dihasilkan diusahakan selalu dalam kondisi dingin. Cairan rumen yang diambil kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C, supernatan yang terbentuk direaksikan dengan menggunakan amonium sulfat 60% menggunakan *magnetic stirer* selama 1 jam dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Selanjutnya cairan rumen yang telah diinkubasi selama 24 jam disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit kondisi 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan endapannya digunakan sebagai sumber enzim. Enzim kemudian dilarutkan dalam buffer fosfat dengan perbandingan 1:1 (endapan dari 100 ml supernatan cairan rumen dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat pH 7,0 dan disimpan pada suhu 4°C (Budiansyah 2010; Fitriyani, 2010; Pamungkas, 2011).

Enzim yang telah diperoleh dari hasil isolasi dan produksi enzim cairan rumen yang dihasilkan selanjutnya diuji aktifitas enzimnya yang meliputi aktifitas enzim selulase dilakukan menurut metode Ghosse (1987), amilase dan protease (Bergmeyer & Grassi, 1983), serta lipase

(Tiests dan Friedreck *dalam* Barlongan, 1990). Tujuan penelitian tahap 1 ini dilakukan untuk mengetahui efektifitas penambahan enzim cairan rumen domba dalam menurunkan kandungan serat kasar dalam BK.

Rancangan penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor peubah dan 3 ulangan. Faktor peubah tersebut adalah dosis enzim cairan rumen domba dan lama waktu inkubasi. Enzim yang diisolasi dari cairan rumen domba yang telah diuji efektifitasnya kemudian ditambahkan ke dalam bungkil kelapa dengan volume yang berbeda. Adapun taraf perlakuan tersebut yaitu :

- A : Tanpa Penambahan Isolasi cairan rumen domba.
- B : Penambahan Isolasi cairan rumen domba sebesar 25 ml/kg bungkil kelapa
- C : Penambahan Isolasi cairan rumen domba sebesar 50 ml/kg bungkil kelapa
- D : Penambahan Isolasi cairan rumen domba sebesar 100 ml/kg bungkil kelapa
- E : Penambahan Isolasi cairan rumen Domba sebesar 125 ml/kg bungkil kelapa

Masing – masing perlakuan disimpan pada lama waktu inkubasi yang berbeda yaitu 0, 12 dan 24 jam. Parameter

yang diamati adalah kandungan serat kasar BK sebelum dan sesudah inkubasi. Kandungan glukosa bahan setelah di inkubasi 12 dan 24 jam. Untuk mengetahui kandungan nutrisi dalam bahan pakan dilakukan analisa proksimat bahan pakan sebelum dan sesudah inkubasi.

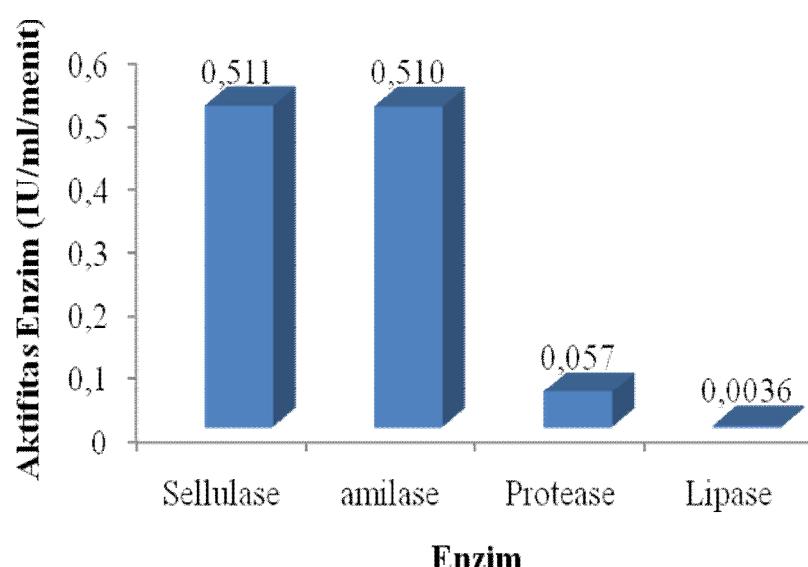
Analisis Data

Pengaruh pakan uji terhadap setiap peubah yang diukur menggunakan analisis ragam (Uji F). Jika terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil pengukuran aktifitas enzim selulase, amilase, protease, dan lipase disajikan pada Gambar 1. Hasil pengukuran aktifitas enzim menunjukkan bahwa aktifitas enzim selulase lebih tinggi diantara aktifitas enzim yang lain. Nilai aktifitas enzim yang terbesar berturut-turut adalah enzim selulase ($0,511 \pm 0,11$), amilase ($0,50 \pm 0,015$), protease ($0,057 \pm 0,013$), dan lipase ($0,0036 \pm 0,002$).



Gambar 1. Aktifitas enzim selulase, amilase, protease, dan lipase pada ekstrak enzim cairan rumen domba.

Hasil analisis proksimat bungkil kelapa yang diberikan perlakuan penambahan volume enzim dan lama waktu inkubasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 3. Perlakuan dosis enzim cairan rumen domba dan lama waktu inkubasi memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan serat kasar bungkil kelapa. Nilai serat kasar bungkil kelapa tanpa penambahan enzim lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya pada lama waktu inkubasi 12 dan 24. Penurunan nilai serat kasar pada semua perlakuan

inkubasi 24 jam menunjukkan penurunan yang nyata bila dibandingkan dengan perlakuan lama waktu inkubasi 12 jam. Perlakuan penambahan enzim 125 ml/kg dengan lama waktu inkubasi 24 jam memperoleh nilai serat kasar sebesar 6,98%. Nilai tersebut lebih rendah bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya pada lama waktu inkubasi 24 jam yaitu 25, 50, 75, dan 100 ml/kg bungkil kelapa dan menghasilkan nilai serat kasar masing-masing 11,43%; 11,25%; 9,16%; dan 9,69%.

Tabel 3. Kandungan lemak, protein dan serat kasar bungkil kelapa yang diberikan perlakuan penambahan volume enzim dan lama waktu inkubasi yang berbeda

Volume		Enzim Cairan Rumen	Lama Waktu Inkubasi (Jam)	Abu	Lemak	Protein	Serat kasar	BETN
	(ml/kg)							
0	0	4,93±0,04	17,66±0,02	18,46±0,05	13,76±0,04 ^c	45,20±0,11		
	12	6,93±0,01	18,33±0,03	18,26±0,01	12,50±0,03 ^{bc}	44,53±0,02		
	24	4,99±0,03	17,25±0,03	17,46±0,01	11,32±0,03 ^{ac}	48,98±0,01		
25	0	5,52±0,43	18,12±0,64	19,10±0,75	12,68±0,40 ^c	44,58±0,46		
	12	5,17±0,02	17,87±0,03	20,98±0,06	13,43±0,07 ^{bc}	42,55±0,02		
	24	6,47±0,10	16,88±0,12	20,00±0,01	11,43±0,04 ^{ab}	45,21±0,16		
50	0	6,22±0,18	16,29±0,34	19,37±0,19	12,22±0,19 ^{ac}	45,89±0,34		
	12	5,73±0,03	14,30±0,03	18,77±0,04	11,61±0,05 ^{ab}	49,60±0,13		
	24	5,9±0,05	14,58±0,09	20,85±0,08	11,25±0,08 ^a	47,42±0,18		
75	0	5,98±0,23	15,32±0,41	20,60±0,46	12,76±0,30 ^{ac}	45,35±1,36		
	12	5,20±0,05	13,66±0,03	20,37±0,05	12,80±0,04 ^{ab}	47,97±0,15		
	24	4,51±0,07	12,92±0,01	21,00±0,04	9,16±0,06 ^a	52,40±0,30		
100	0	5,63±0,43	13,64±0,46	21,30±0,65	13,84±0,35 ^{bc}	45,59±0,57		
	12	5,34±0,02	13,55±0,07	21,04±0,04	13,21±0,04 ^b	46,87±0,07		
	24	5,68±0,24	13,11±0,07	21,57±0,16	9,69±0,16 ^a	49,96±0,10		
125	0	5,54±0,22	14,10±0,15	21,81±0,03	14,34±0,36 ^{ac}	44,21±0,47		
	12	6,025±0,02	13,48±0,05	21,84±0,02	13,76±0,04 ^{ab}	44,89±0,04		
	24	6,09±0,03	12,44±0,15	22,94±0,05	6,98±0,02 ^a	51,57±0,08		

Hasil analisis kandungan glukosa terlarut pada bungkil kelapa yang dihidrolisis dengan enzim cairan rumen domba menunjukkan adanya kenaikan kandungan glukosa terlarut pada bungkil kelapa dengan semakin bertambahnya volume enzim yang ditambahkan dan lama waktu inkubasi (Tabel 4). Kandungan glukosa terlarut tertinggi diperoleh pada perlakuan penambahan enzim cairan rumen domba 125 ml/kg yaitu sebesar 0,464 %.

Tabel 4. Kandungan glukosa terlarut pada bungkil kelapa yang dihidrolisis dengan enzim cairan rumen domba

Volume enzim cairan rumen domba (ml/kg)	Konsentrasi glukosa (%)	
	12 Jam	24 jam
0	0,013	0,014
25	0,053	0,142
50	0,135	0,248
75	0,145	0,275
100	0,212	0,358
125	0,232	0,464

PEMBAHASAN

Tingginya aktifitas enzim selulase pada cairan rumen domba disebabkan jenis pakan yang dikonsumsi oleh domba selama masa pemeliharaan. Domba yang diambil cairan rumennya ini mengkonsumsi rumput, dimana rumput mengandung serat yang cukup tinggi sehingga di dalam rumen domba

dibutuhkan enzim selulase yang lebih banyak untuk mencerna rumput. Hal ini menyebabkan kandungan dan aktifitas selulase yang diperoleh dalam penelitian ini lebih tinggi dibandingan dengan aktifitas enzim amilase, protease dan lipase. (Moharrery dan Das, 2002; Fitriiyani, 2010) menyatakan bahwa aktifitas enzim dalam cairan rumen tergantung dari komposisi atau perlakuan makanan. Penelitian Budiansyah (2010), sapi lokal yang mendapatkan pakan serat menghasilkan aktifitas selulase tinggi. Sedangkan pada sapi impor yang lebih banyak mendapatkan karbohidrat dari pakan konsentrat menghasilkan lebih banyak enzim xilanase, manannase dan amilase. Aktifitas enzim lainnya yang diperoleh dalam penelitian Moharrery dan Das (2002), adalah amilase sebesar 1,16 IU/ml/menit, protease 0,22 IU/ml/menit dan lipase 1,22 IU/ml/menit. Martin *et al.* (1999) mendapatkan bahwa enzim-enzim pencerna karbohidrat dalam cairan rumen antara lain adalah amilase, xilanase, avicelase, α -D-glukosidase, α -L-arabinofuranosidase, β -D-glukosidase dan β -D-xylosidase.

Tingginya aktifitas enzim disebabkan oleh tingginya aktifitas mikroba rumen yang menghasilkan enzim-

enzim penghidrolisis serat kasar. Semakin efektif aktifitas enzim dalam menghidrolisis fraksi serat, semakin banyak senyawa yang lebih mudah dicerna, sehingga kandungan serat kasar turun. Pada penelitian ini diperoleh kandungan serat kasar terendah pada perlakuan penambahan enzim cairan rumen domba 125 ml/kg bahan dengan lama waktu inkubasi 24 jam yaitu sebesar 6,98% dan peningkatan kandungan glukosa terlarut tertinggi pada bungkil kelapa yang dihidrolisis dengan enzim cairan rumen domba 125 ml/kg bahan dengan lam waktu inkubasi 24 jam yaitu sebesar 0,464%. Peningkatan konsentrasi enzim secara umum akan memberikan pengaruh yang lebih besar pada waktu proses hidrolisis dibandingkan dengan peningkatan temperatur (James *et al.* 2005). Lama waktu berlangsungnya proses hidrolisis menyebabkan substrat yang terdegradasi semakin banyak dan produk yang dihasilkan akan semakin meningkat. Indikasi peningkatan derajat hidrolisis dengan meningkatnya waktu inkubasi (Vijaya *et al.* 2002). Tingkat penambahan enzim yang semakin tinggi akan efektif dibandingkan penambahan yang lebih rendah. Hal ini berhubungan dengan kesediaan substrat yang dapat dirombak oleh enzim yang ditambahkan.

Peningkatan volume ekstrak cairan enzim rumen meningkatkan nilai glukosa terlarut, hal ini mengindikasikan bahwa substrat polisakarida pada bungkil kelapa masih cukup untuk dirombak sehingga akan meningkatkan pula nilai polisakarida yang dapat disederhanakan menjadi monosakarida yang dapat dilihat dari semakin meningkatnya nilai glukosa terlarut. Penurunan kandungan serat kasar dan peningkatan glukosa terlarut pada bungkil kelapa yang ditambahkan enzim cairan rumen domba terjadi karena adanya aktifitas enzim selulase yang menghidrolisis selulosa dalam bungkil kelapa menjadi bentuk yang lebih sederhana. Enzim yang mendegradasi selulosa yaitu endoglukanase (endo-1,4- β -glukanase), eksoglukanase/selobiohidrolase (ekso-1,4- β -glukanase) dan selobiase (β -glukosidase) (Hardjo *et al.* 1989; Schlegel and Schmidt, 1994). Endoglukanase memecah selulosa menjadi selulo-oligosakarida/selulodekstrin. Ksoglukanase memecah unit glukosil dari selulo-oligosakarida dengan melepaskan selobiosa, kemudian selobiase menghidrolisis selobiosa dan oligosakarida menjadi glukosa (Hardjo *et al.* 1989).

Penelitian Pantaya (2003), penambahan enzim cairan rumen pada *wheat pollard* dengan dosis 3,44 dan 6,89

IU/kg dapat menurunkan kandungan polisakarida berserat dan meningkatkan oligosakarida sebesar 4% dan 3,9%. Lebih lanjut dikatakan bahwa hidrolisis enzim dengan konsentrasi 6,8 IU/kg terhadap komponen polisakarida *wheat pollard* juga akan meningkatkan kandungan oligosakarida dan monosakarida sebesar 5,5% dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan enzim. Hasil penelitian Pamungkas (2011) yang menggunakan enzim cairan rumen domba dosis 100 ml/kg bahan dengan lama waktu inkubasi 24 jam untuk menghidrolisis bungkil kelapa sawit (BKS) menunjukkan penurunan serat kasar terendah yaitu sebesar 6,69% dan peningkatan kandungan glukosa terlarut sebesar 0,469%. Hasil penelitian Sandi (2010), penambahan enzim cairan rumen dosis 1% (b/v) dengan lama waktu inkubasi 24 jam mampu menurunkan kandungan serat kasar sebesar 17,83% dan meningkatkan gula total terlarut sebesar 29,91% yang terbaik pada singkong. Penelitian Fitriyani (2010) yang menggunakan enzim cairan rumen domba dengan dosis 100 ml/kg bahan dengan lama waktu inkubasi 24 jam, untuk menghidrolisis tepung daun lamtoro menunjukkan penurunan kandungan serat kasar sebesar 53,64% dan peningkatan glukosa terlarut sebesar 2.127,45%.

Penelitian Alemawor et al. (2009) mengatakan bahwa adanya peningkatan kualitas nutrisi yang lebih baik pada penggunaan multienzim pada bahan baku pakan dengan nilai total gula meningkat, serat kasar, NDF, ADF, selulosa dan lignin yang menurun. Penambahan enzim cairan rumen mampu menurunkan serat kasar, penurunan serat kasar disebabkan oleh adanya aktifitas enzim selulase. Penambahan enzim cairan rumen akan merombak komponen bahan yang sulit dicerna menjadi bahan yang mudah dicerna sehingga dapat dimanfaatkan oleh hewan. Penelitian yang dilakukan oleh Malathi dan Devegowda (2002) pada pakan awal untuk broiler mendapatkan bahwa penggunaan multi enzim meningkatkan nilai total gula *sunflower meal, soybean meal, deoiled rice bran*, yang lebih besar dibandingkan penggunaan enzim tunggal kandungan multi enzim ini juga menjadi kelebihan ekstrak enzim rumen domba.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan enzim cairan rumen domba 125 ml/kg bahan dengan lama waktu inkubasi 24 jam dapat menurunkan serat kasar bungkil kelapa paling tinggi yaitu 67,8% dari 13,76% ke 6,98%

DAFTAR PUSTAKA

- Alemawor, Victoria, Dzogbefia, Emmanuel O.K, Oddoye, James H.O. 2009. Enzyme cocktail for enhancing poultry utilization of cocoa pod husk. *Scientific Research and Essays Vol.4 (6)*. Pp.555-559
- Barlongan T.G. 1990. Studies on lipases of milkfish (*Chanos-chanos*). *Aquaculture*, 89:315-325.
- Bergmeyer H.U and Grassi M. 1983. *Methods of enzymatic analysis*. Vol. V: Enzymes 3 : peptidases, proteinases and their inhibitors. VCH Verlagsgesellschaft MBH, Weinheim.
- Budiansyah A. 2010. Aplikasi cairan rumen sapi sebagai sumber enzim, asam amino, mineral dan vitamin pada ransum broiler berbasis pakan lokal. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Fitrailiyani I. 2010. Peningkatan kualitas nutrisi tepung daun lamtoro dengan penambahan ekstrak enzim cairan rumen domba untuk pakan ikan nila *Oreochromis* sp. *Disertasi*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Ghose, 1987. Measurement cellulose activities. *Appl. Chem* 59. (2): 252-268
- Hardjo S.S, Indrasti N.S, Tajuddin B. 1989. *Biokonversi: Pemanfaatan Limbah Industri Pertanian*. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB.
- James, I.T., Philip, B. G. And Sheila, A.B. 2005. Optimization of condition for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma. *Analytical Biochemistry* 341:220-229.
- Malathi V and Devegowda G. 2002. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide digestibility of feed ingredients by enzymes. *Department of poultry Science*, University of Agricultural Sciences, Hebbal, Bangalore-India.
- Martin C, Devillard E and Michlet-Doreau B. 1999. Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activites of protozoa and bacteria in the rumen, *J. Anim. Sci*, 77: 979-987.
- Moharrery A and Das T.K. 2002. Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod. Nutr. Dev*, 41:513-529
- NRC. 1993. *Nutrient requirement of fish*. National academy of Science. Washington DC. 114pp.
- Pantaya, P. 2003. Kualitas Ransum Hasil Pengolahan Steam Pelleting berbasis Wheat-Pollard yang Mendapat Perlakuan Enzim Cairan Rumen pada Performans Broiler. *Tesis* .Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pamungkas WS. 2011. Uji Efektifitas penambahan enzim cairan rumen domba terhadap penurunan serat kasar dan nilai kecernaan bungkil kelapa sebagai pakan benih ikan patin siam *Pangasius hypophthalmus*. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Robinson, E.H., M.H. Li and B.B. Manning. 2001. Feeding catfish based on water temperature or by a

- set schedule. *The Catfish Journal* 15 (9):14–15.
- Sandi S. 2010. Peningkatan kualitas nutrisi silase berbahan baku singkong varietas pahit dengan enzim cairan rumen dan bakteri Leuconostoc mesenteroides sebagai pakan ternak unggas. *Tesis*. Sekolah sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Schlegel, H.G dan K. Schmidt. 1994. Microbiologi Umum. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. Hal. 470.
- Stell R.D.G. and J.H.Torrie. 1993. *Principles and Procedure of Statistic*. McGawHill London.
- Takeuchi, T. 1988. *Laboratory Work Chemical Evaluation of Dietary Nutrition*. p.179–229. In Watanabe T. Fish Nutrition and Mariculture JICA Textbook the General Aquaculture Course. Tokyo: Kanagawa International Fisheries Training Center.
- Vijaya G.V,Gireesh T and Gajanan S.B. 2002. Effect of enzymatic hydrolysis of protein on growth of in milk. *J. of The Science of food and Agriculture*. 82:493-496
- Watanabe, T. 1988. *Fish Nutrition and Mariculture*. Department of Aquatic Bioscience. Tokyo University of Fisheries. JICA. 223 pp.
- Williams, A.G and S.E. Withers. 1992. Changes in the rumen microbial population and its activities during the refaunation period after the reintroduction of ciliate protozoa into the rumen of defaunated sheep. Canadian. *J. microbiology*. 39: 61-69