

**PERIODE BUKAAN MULUT DAN LAJU SERAPAN KUNING TELUR
KAITANNYA DENGAN AKTIVITAS ENZIM PENCERNAAN PADA STADIA
AWAL KERAPU BEBEK HASIL PEMBENIHAN INDUK TURUNAN KE 2**

***PERIODS OF MOUTH OPENING AND YOLK ABSORPTION RELATED TO THE
ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES IN THE EARLY STADIA FROM THE
SECOND GENERATION OF HUMPBACK GROUPER BROODSTOCK***

Wawan Andriyanto dan Muhammad Marzuqi

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut, BalitbangKP-KKP, Gondol

E-mail: wa2n.rimgdl@gmail.com

ABSTRACT

The experiment was carried out to determine the exposure time of the first mouth opening on humpback grouper larval from F2 broodstock on hatchery until 10 DAH (days after hatching) because this phase is a critical phase of larval adaptation from food endogenous (from yolk sac) to the ability of absorbing nutrients from external (exogenous). The eggs used were collected from natural spawning of second generation of humpback grouper reared in the tank size of 150 litre. The mouth opening was observed at 90 and 45 degrees under computerize integrated microscope and processed by a specific software. The rate of yolk absorption was observed in larvae from the beginning to the end of breeding, while the activities of digestive enzymes (trypsin and chymotrypsin) were analyzed by enzyme assay techniques. The results showed that the period of mouth opening of larvae of humpback grouper occurred at 3 DAH with mouth openings of 45° as large as 0.103 mm and of 90° as large as 0.156 mm. In the early stadia, the diameter of yolk was 0.1875 mm, while the oil globule was 0.0537 mm. At 4 days after hatching, the yolk and oil globule had been absorbed, while the enzymes trypsin and chymotrypsin were detected in the early stadia. The results also showed that the larvae was started to use foods from outside after the age of 4 DAH. Up to the age of 10 days, the mouth opening increased and the activity of trypsin and chymotrypsin were still detected.

Keywords: progeny larvae of humpback grouper F2, mouth opening, yolk sac, enzyme

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu bukaan mulut pertama stadia larva kerapu bebek hasil pembenihan F2 sampai dengan umur 10 HSM (hari setelah menetas) karena pada fase ini merupakan fase kritis adaptasi larva dari input makanan endogen (dari yolk sac) sampai dengan kemampuan menyerap makanan dari luar (eksogen). Telur yang digunakan berasal dari pemijahan alami induk ikan kerapu generasi ke 2 (F2) yang dipelihara pada bak ukuran 150 liter. Bukaan mulut diamati di bawah mikroskop yg terintegrasi dengan komputer, data yang didapatkan diolah dengan software dan diukur bukaan mulut 90° dan 45°. Laju serapan kuning telur diamati dari larva mulai menetas sampai dengan habis. Sedangkan aktivitas enzim pencernaan (trypsin dan chymotrypsin) dianalisa dengan teknik enzim assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bukaan mulut larva kerapu bebek hasil pembenihan F2 terjadi pada umur 3 HSM dengan bukaan 45° sebesar 0.103 mm dan 90° sebesar 0.156 mm. Awal stadia diameter kuning telur adalah 0.1875 mm dan gelembung minyak 0.0537 mm. Pada umur 4 HSM kuning telur dan gelembung minyak telah terserap habis, sedangkan enzim trypsin dan chymotrypsin telah pula terdeteksi pada awal stadia (1 HSM). Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa larva mulai dapat memanfaatkan makanan dari luar setelah umur 4 HSM. Sampai dengan umur 10 HSM, bukaan mulut semakin lebar dan aktivitas trypsin dan chymotrypsin masih terdeteksi.

Kata kunci: larva kerapu bebek, pembenihan F2, bukaan mulut, kuning telur, enzim

I. PENDAHULUAN

Benih kerapu bebek turunan F0 dan F1 selama ini telah berkembang dalam budidaya di tingkat pembudidaya laut. Penelitian tentang faktor biologi, nutrisi, lingkungan, penyakit dan pakan telah banyak dilakukan untuk benih F0 dan F1. Namun untuk turunan F3 nya dari induk F2 masih belum banyak diamati. Studi perkembangan pencernaan larva kerapu bebek sebelumnya telah diketahui bahwa pencernaan larva kerapu bebek mulai fungsional sekitar umur 25 HSM (Munafi *et al.*, 2011). Stadia larva merupakan salah satu faktor kritis dalam perbenihan kerapu bebek, sehingga sampai saat inipun banyak kendala dalam peningkatan survival rate dan pertumbuhannya. Fase kritis adalah sebagian besar pada usia 1 hari setelah menetas sampai 40 hari. Angka kematian tinggi pada tahap ini sebagian besar disebabkan oleh faktor makanan dan penyakit. Larva kerapu sangat sensitif bahkan untuk gangguan mekanis yang minimal khususnya selama metamorfosis. Pada tahap penetasan, larva kerapu kecil dan rapuh dengan cadangan makanan dari yolk sac (Ordonio-Aguilar *et al.*, 1995). Kombinasi faktor ini dianggap menjadi penyebab mendasar dari kematian yang tinggi dan pertumbuhan yang lambat selama pemeliharaan larva (Kohno *et al.*, 1997). Struktur morfologi pada saluran pencernaan larva ikan lebih kompleks karena disertai oleh adanya aktivitas enzim (Timeyko dan Novikov, 1987). Spesies ikan yang berbeda memiliki pencernaan yang berbeda serta kemampuan mencerna yang berbeda karena perbedaan dalam struktur saluran pencernaan mereka dan dalam cara mereka makan (Eusebio *et al.*, 2004).

Aktivitas enzim pencernaan telah digunakan untuk mengevaluasi

kemampuan larva ikan pencernaan selama pertumbuhan (Segner *et al.*, 1993, 1994; Zambonino-Infante dan Cahu, 1994), dan aktivitas enzim pencernaan dapat menunjukkan kebutuhan nutrisi yang berbeda (Buddington, 1985). Pada tahap awal kehidupan, enzim pankreas seperti tripsin, amilase dan lipase, sangat penting untuk pencernaan ikan larva, karena pada tahap ini saluran pencernaan masih belum fungsional dalam beberapa spesies ikan (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Enzim proteolitik yang digunakan sebagai indikator kondisi gizi, dan terutama tripsin telah terbukti menjadi indikator penyerapan makanan yang tepat (Pedersen dan Hjelmeland, 1988; Ueberschär, 1995). Kematian yang tinggi yang terjadi pada stadia awal larva berhubungan dengan faktor makanan setelah habis persediaan makanan dari yolk sac (Kohno *et al.*, 1997). Larva *E. coioides* menunjukkan aktivitas enzim pencernaan rendah selama 10 hari setelah menetas (Eusebio *et al.*, 2004; McBride, 2004). Tripsin, sebuah endoproteinase telah dipilih sebagai enzim indikator, karena terhubung langsung ke metabolisme protein dan terdapat pada stadia awal larva ikan. Studi enzimatik, merupakan langkah awal untuk identifikasi serta sumber informasi yang penting untuk menentukan waktu ketika sistem pencernaan larva secara fungsional siap untuk mencerna dan mengasimilasi pakan buatan (Segner *et al.*, 1993; Sarasquete *et al.*, 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui waktu awal mulut terbuka larva ikan kerapu bebek hasil pembenihan induk F2 dan aktivitas enzim pencernaan yang berupa tripsin dan chymotripsin.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di lokasi hatchery di Gondol Bali selama 40 hari dan analisa dilakukan di laboratorium biologi dan kimia.

2.2. Bahan dan Alat

2.1.1. Telur dan Wadah Inkubasi

Telur berasal dari pemijahan induk generasi turunan ke 2 (F2) dengan menggunakan kolektor telur ukuran 400 (μm). Telur kemudian dipindahkan ke bak fiber ukuran 100 liter untuk diinkubasi. Telur yang tidak terbuahi dibuang dengan cara disipon. Telur yang dibuahi ditebar ke dalam bak ukuran 1000 liter dan diberi aerasi.

2.1.2. Larva dan Wadah Pemeliharaan

Proses penebaran dan pemeliharaan larva (pemberian pakan alami sampai pakan buatan dan manajemen pergantian air) mengikuti SOP (Standar Operasional Prosedur) perbenihan kerapu yang telah ada di BBPPBL Gondol. Hal yang tidak dilakukan adalah pengkayaan pakan alami/buatan agar larva yang hidup dikondisikan normal. Larva dipelihara dari menetas sampai dengan 40 hari setelah menetas (HSM), karena diasumsikan pada umur 40 HSM larva telah mencapai stadia juvenil.

2.1.3. Pengumpulan Data

Untuk mendapatkan data pengukuran panjang digunakan panjang total dari larva ikan menggunakan metode pengambilan gambar dengan mikroskop khusus dengan perbesaran menyesuaikan kondisi larva. Sebelum diamati dalam mikroskop, larva diberikan obat bius MS-222. Setelah didapatkan data berupa foto mikroskop dari larva, kemudian data diolah menggunakan software MOTIC image plus 2.0 untuk mendapatkan data

panjang dari panjang rahang atas dan bawah. Pengukuran bukaan mulut larva ikan menggunakan formula seperti dalam Shirota 1970 yaitu : $MH(90^\circ) = UJ \times \sqrt{2}$ dan $MH(45^\circ) = UJ \times 2 \sin(45/2)$; dimana: UJ: Upper Jaw (rahang atas) and MH: Mouth Height (tinggi mulut). Sedangkan penghitungan volume dan penyusutan kuning telur dilakukan berdasarkan metode Hemming dan Buddington (1988): $V = 0.1667 \pi LH^2$ dan penyusutan kuning telur dengan rumus:

$\{(V_n - V_o)/V_o\} \times 100\%$, dimana: V; volume, L; sumbu terpanjang panjang kuning telur, H; sumbu pendek terlebar kuning telur, V_o ; volume kuning telur awal, V_n ; volume kuning telur hari ke n.

Untuk pengamatan enzim, sediaan sampel diawetkan menggunakan nitrogen cair selama 30 detik dan kemudian disimpan dalam penyejuk dengan suhu -80°C . Larva kemudian dihomogenisasi dalam Tris-HCL dingin menggunakan "hand held glass homogenizer". Homogenat kemudian di sentrifugasi pada 4°C di 10 000 rpm selama 15 menit. Endapan dan supernatant dipisahkan, kemudian supernatant disimpan pada suhu -20°C sebelum dianalisis. Aktivitas tripsin dan cimotripsin diukur dengan menggunakan N- α -benzoyl-DL-Arginine-p-nitroanilide (BAPNA) dan Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanalidine (SAPNA) sebagai substrat masing masing enzim. Perubahan absorbansi dilihat dalam mode kinetik selama 3 menit pada 410 nm (Erlanger *et al.*, 1961). Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan:

Activity units =

$[(\text{Abs}_{410\text{nm}/\text{min}}) \times 1000 \times \text{Volume of reaction mixture}] / 8800 \times \text{mg}$

- 8800: koefisien molar dari para-nitroanilide
- mg: berat jaringan dalam larutan enzim

Aktivitas enzim dinyatakan dalam (mU/mg protein).

2.3. Analisa Data

Data yang diperoleh ditabulasi dan dianalisis secara deskriptif untuk masing masing variabel.

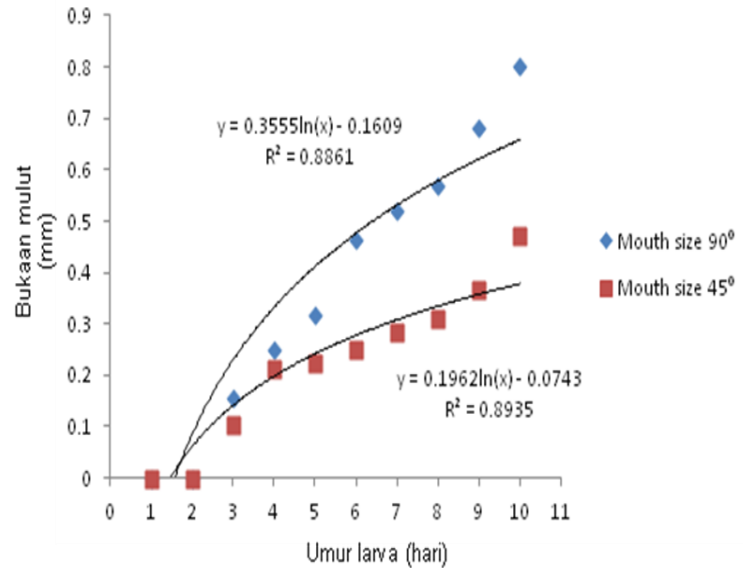
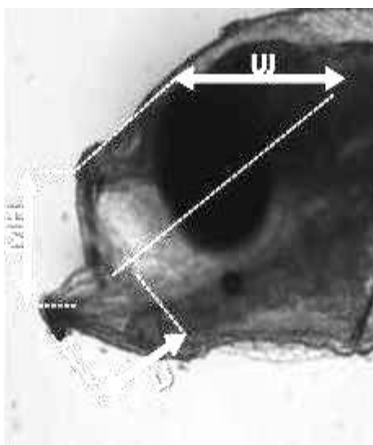
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Bukaan Mulut Larva Kerapu Bebek Hasil Pembenuhan F2

Stadia awal perkembangan larva kerapu bebek hasil pembenuhan F2 dapat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 20x dengan menggunakan obat bius dosis rendah. Larva habis menetas tampak transparan dan belum memiliki pigmen dan mulut masih terlihat tertutup serta organ pencernaan yang belum tampak seperti pada stadia benih. Pada umur 3 hari setelah menetas, mulut mulai terbuka dengan panjang 2.5 ± 0.4 mm – 2.6 ± 0.4 mm. Pada umur ini, ukuran bukaan mulut sekitar 0.103 mm pada

bukaan 45° dan 0.156 mm pada bukaan 90° (Gambar 1). Selain itu dari pengamatan mikroskopis juga dapat dilihat saluran pencernaan mulai terbentuk dan berkembang pada umur 4 hari setelah menetas.

Ukuran bukaan mulut semakin lebar pada umur 6 hari dan berkembang sangat cepat sampai dengan larva mencapai umur 10 hari. Ukuran bukaan mulut pada umur 10 hari setelah menetas adalah 0.471 mm pada bukaan 45° dan 0.801 mm pada bukaan 90° . Secara umum, perkembangan bukaan mulut larva sampai dengan umur 10 hari dapat dilihat pada grafik 1. Pola pertumbuhan bukaan mulut larva pada bukaan 45° dan 90° mengikuti persamaan logaritmik dengan persamaan masing masing $y = 0.1962\ln(x) - 0.0743$ dengan $R^2 = 0.8935$. dan $y = 0.3555\ln(x) - 0.1609$ dengan $R^2 = 0.8861$.



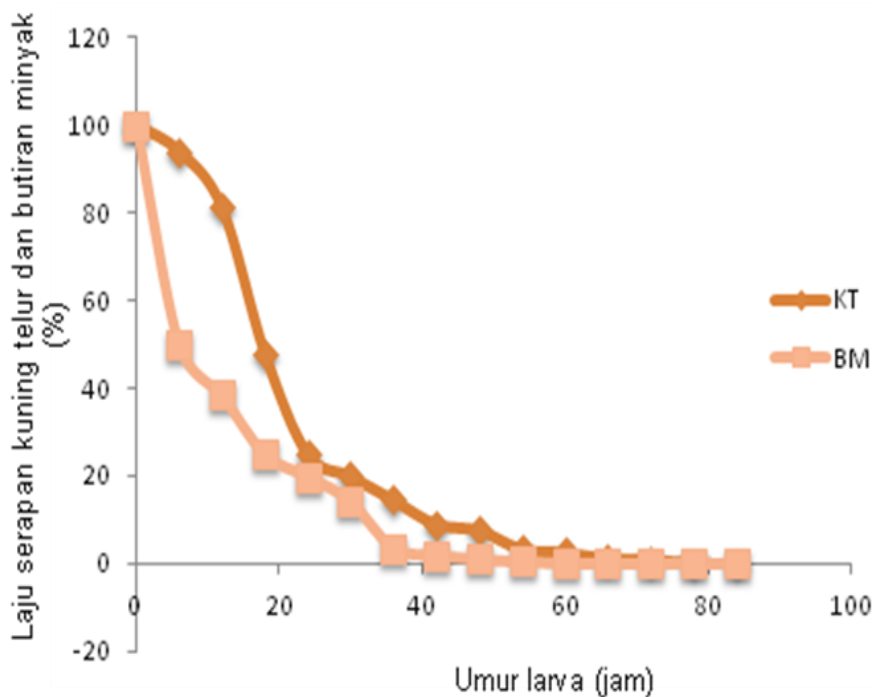
Gambar 1. Grafik perkembangan bukaan mulut stadia larva ikan kerapu bebek hasil pembenuhan F2 (kanan) dan pengukuran bukaan mulut larva (kiri) Ket: UJ: upper jaw, LJ: lower jaw dan MH: mouth high.

3.2. Laju Penyerapan Kuning Telur dan Butiran Minyak Kerapu Bebek Hasil Pembenihan F2

Sehari setelah menetas kuning telur dan butiran minyak terlihat dominan pada larva kerapu bebek hasil pembenihan F2. Proporsi butiran minyak dan kuning telur yang berukuran besar pada stadia ini juga membantu larva dalam mengapung dan berenang mengikuti arus. Ukuran butiran kuning telur pada 1 hari setelah menetas sekitar 0.188 mm sedangkan ukuran butiran minyak sekitar 0.054 mm. Secara mikroskopis kuning telur dan butiran minyak terlihat habis terserap pada umur 4 hari setelah menetas. Prosentase ekspresi laju serapan kuning telur dan butiran minyak (Gambar 2).

Laju penyerapan kuning telur dan butiran minyak mengikuti persamaan

eksponensial dengan persamaan masing masing $y = 0.3804e^{-0.081x}$ dengan $R^2 = 0.9352$ dan $y = 0.4054e^{-0.179x}$ dengan $R^2 = 0.9025$ seperti tersaji pada Gambar 3. Volume kuning telur dan butiran minyak mengalami laju penyerapan yang cepat pada sekitar 30 jam setelah menetas masing masing hingga 20% dan 14% dan menurun drastis 60 jam setelah menetas atau kira kira umur larva mencapai 3 hari. Kuning telur dan butiran minyak habis terserap ketika larva memasuki umur 4 hari atau sekitar 84 jam. Pada usia ini tampak organ pencernaan berupa hati dan pancreas yang memenuhi kolom abdomen yang sebelumnya penuh terisi dengan kuning telur dan butiran minyak. Pada saat bersamaan sirip sirip perut dan dada mulai tampak dan pigmentasi pada bagian abdomen juga terlihat secara mikroskopis.

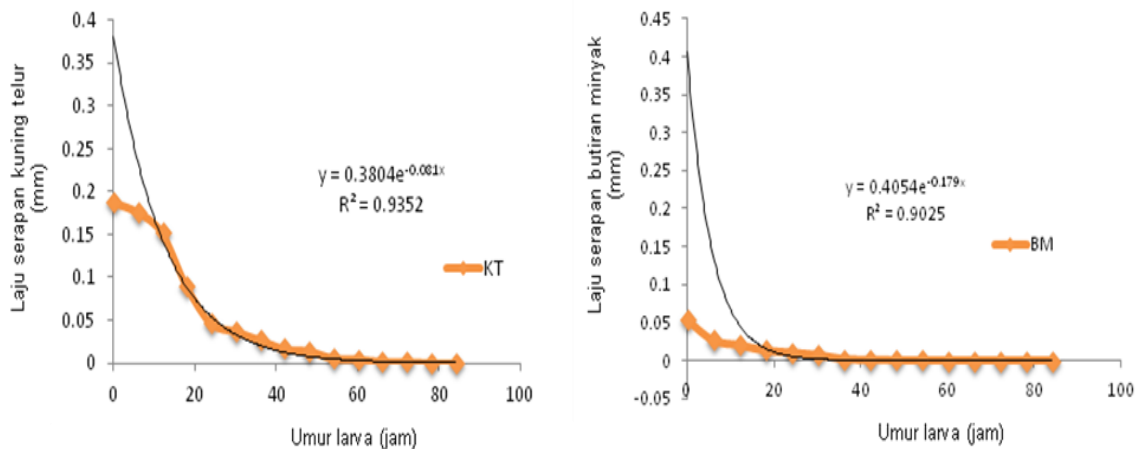


Gambar 2. Persentase laju penyerapan kuning telur dan gelembung minyak pada larva kerapu bebek hasil pembenihan F2.

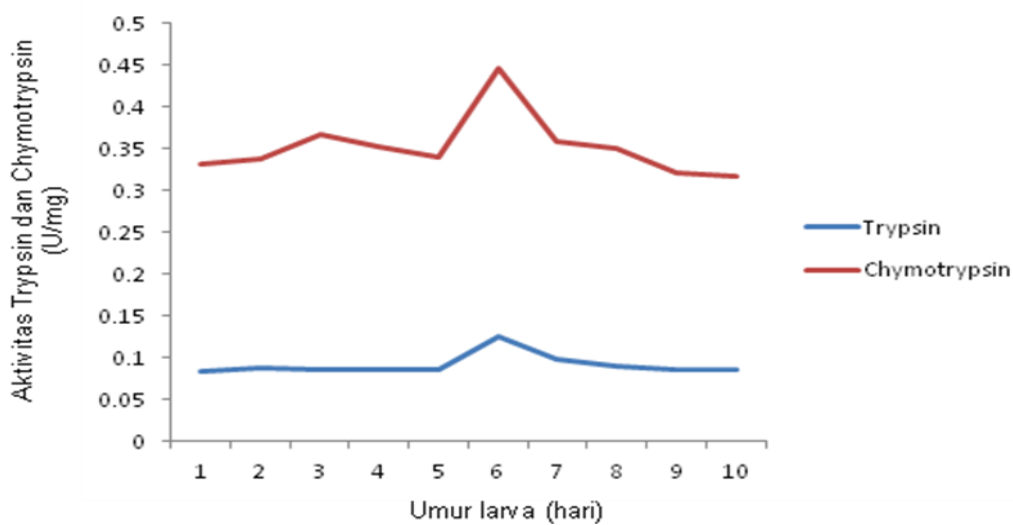
3.3. Aktivitas Enzim Pencernaan pada Stadia Larva Kerapu Bebek Hasil Pembenuhan Induk F2

Pada stadia larva dari penetasan sampai dengan sepuluh hari, aktivitas enzim pencernaan baik trypsin dan chymotripsin telah terdeteksi. Aktivitas enzim trypsin dan chymotripsin pada larva kerapu bebek hasil pembenuhan F2 seperti tampak pada Gambar 4. Aktivitas trypsin telah terdeteksi pada 1 hari setelah menetas sebelum kuning telur dan butiran

minyak terserap habis dengan jumlah 0,0835 U/mg protein sedangkan aktivitas chymotripsin telah pula terdeteksi dengan jumlah aktivitas yang lebih tinggi yaitu 0,3326 U/mg. Kedua aktivitas enzim tersebut cenderung stabil dan sedikit mengalami fluktuasi pada sekitar umur 6 hari setelah menetas dengan jumlah masing masing trypsin dan chymotripsin adalah 0.1253 U/mg dan 0.4455 U/mg kemudian stabil lagi sampai dengan umur 10 hari.



Gambar 3. Hubungan antara umur dan laju penyerapan kuning telur dan butiran minyak stadia larva kerapu bebek hasil pembenuhan F2.



Gambar 4. Kombinasi aktivitas enzim trypsin dan chymotripsin stadia larva kerapu bebek hasil pembenuhan induk F2.

3.4. Pembahasan

Banyak penelitian yang menganalisa hubungan antara bukaan mulut dan aktivitas enzim pencernaan. Pada *Sparid fish (S. aurata)* enzim tripsin dan chymotripsin terdeteksi pada umur 3 hari setelah menetas saat mulut juga mulai terbuka (Moyano *et al.*, 1996), sedangkan pada ikan lain yaitu Senegal sole (*S. senegalensis*) (Martinez *et al.*, 1999) pada 2 hari setelah menetas, kemudian pada Red drum (*S. ocellatus*) (Lazo *et al.*, 2000) pada 3 hari setelah menetas, dan pada *D. labrax* terdeteksi saat umur 5 hari setelah menetas (Zambonino dan Cahu, 1994). Sedangkan Fujii (2007) mengatakan bahwa aktivitas tripsin dalam jumlah yang rendah juga terdeteksi pada umur 1 hari setelah menetas sebelum terjadinya proses eksogenous dan aktivitasnya mulai meningkat setelah umur 2 hari saat mulut mulai terbuka.

Pada penelitian sebelumnya tentang penyerapan kuning telur dan butiran minyak hampir sebagian besar larva kerapu pada umur 3 hari cadangan kuning telur dan butiran minyaknya habis. Seperti dalam Tridjoko *et al.*, 1996 pada kerapu bebek (*Cromileptes altivelis*) turunan pertama dan Anindiasuti *et al.*, 1999 pada kerapu macan (*E. fuscoguttatus*). Laju penyerapan kuning telur dan butiran minyak yang sangat cepat tersebut erat kaitannya dengan pertumbuhan morfologi maupun pencernaan makanannya. Pada umur 3 sampai 4 hari mulut sudah terbuka dengan bukaan mulut yang cukup untuk memanfaatkan makanan dari luar. Selain itu perkembangan saluran pencernaan pada umur stadia 3-4 hari juga berkembang pesat mulai dari mulut, kerongkongan, perut, usus dan anus. Selain itu organ hati dan pancreas mulai terbentuk sehingga proses enzimatik dan penyimpanan energy sudah dimulai pada tahap ini.

Secara umum aktivitas enzim tripsin dalam penelitian ini lebih rendah dari aktivitas chymotripsin, dan kedua aktivitas enzim tersebut telah terdeteksi saat fase endogenous. Tripsin dan cimotripsin memainkan peranan penting dalam proses penyerapan makanan pada stadia larva. Pada penelitian sebelumnya pada ikan sea bass (*D. labrax*) tripsin dan cimotripsin juga terdeteksi sebelum terjadinya proses pemanfaatan makanan dari luar (Zambonino dan Cahu, 1994). Kedua enzim tersebut juga terdeteksi pada proses embriogenesis ikan Atlantic cod sebelum menetas. Hal ini dimungkinkan untuk menjaga agar dapat meningkatkan nilai kelulushidupan larva saat awal pemanfaatan makanan dari luar sehingga menstimulasi aktivitas kedua enzim tersebut. (Sveinsdóttir, 2006). Seperti yang dikemukakan oleh Chen (2006), fluktuasi aktivitas enzim menjelaskan adanya diferensiasi pada fase larva, masa perubahan morfologi dalam organ pencernaan dan organ yang terkait. Sebelum lambung dan kelenjar lambung terdiferensiasi, secara umum larva yang bersifat planktonik mencerna makanan dengan menggunakan organ pancreas dan enzim usus (Kurokawa dan Suzuki, 1996, 1998; Anand *et al.*, 2002), dan dengan penyerapan secara intrasel pada bagian depan usus (Tanaka, 1972; Watanabe, 1981, 1982).

IV. KESIMPULAN

Dari pengamatan pada fase awal stadia tersebut dapat disimpulkan bahwa bukaan mulut larva kerapu bebek hasil pembenihan F2 mulai berkembang pada umur 3 hari – 4 hari dan dari bukaan maksimal nya dapat menangkap makanan alami berupa rotifer dengan ukuran yang kecil. Selain itu laju serapan kuning telur dan butiran minyak habis terserap pada umur 4 hari namun aktivitas enzim typsins dan chymotripsin sebagai indikator telah

terjadi proses pemanfaatan makanan telah terdeteksi dan aktivitasnya tidak menurun. Hal ini sejalan dengan terjadinya proses metamorfosis perubahan organ organ pencernaan untuk dapat berfungsi nya saluran pencernaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, S., T. Kurokawa, and T. Suzuki., 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Part A. 13:629-635.
- Anindiasuti, N. Rausin, Mustamin, and E. Sutrisno. 1999. Paket usaha budidaya kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus*. Departemen Pertanian, Dirjen. Perikanan, Balai Budidaya Laut Lampung. 35Hlm.
- Buddington, R.K. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. *J. of Fish Biology*, 26:715-723.
- Chen, B.N., J.G. Qin, M.S. Kumar, W. Hutchinson, S. Clarke. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 256:489-501.
- Erlanger, B.F., N. Kokowski, W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 95:271-278.
- Eusebio, P.S., J.D. Toledo, R.E.P. Mamauag, M.J.G. Bernas. 2004. Digestive enzyme activity in developing grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. In: M.A. Rimmer, S. McBride, K.C. Williams (eds.), *Advances in grouper aquaculture: Australian Center for International Agriculture Research, Canberra*, 35-40pp.
- Fujii, A., Y. Kurokawa, S. Kawai, K. Yoseda, S. Dan, A. Kai, and M. Tanaka. 2007. Diurnal variation of tryptic activity in larval stage and development of proteolytic enzyme activities of malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) after hatching. *Aquaculture*, 270:68-76.
- Heming, T.A., and R.K. Buddington, 1988. Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In: Randall, D.J. and W.S. Hoar (Eds.). *Fish physiology*. Academic Press. New York.
- Kohno, H., R.S. Ordonio-Aguilar, A. Ohno, and Y. Taki. 1997. Why is grouper larval rearing difficult? an approach from the development of the feeding apparatus in early stage larvae of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Ichthyological Research*, 44:267-274.
- Kurokawa, T. and T. Suzuki. 1996. Formation of the diffuse pancreas and the development of digestive enzyme synthesis in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 141:267-276.
- Lazo, J.P., M.T. Dinis, G.J. Holt, C. Faulk, and C.R. Arnold. 2000. Co-feeding microparticulate diets with algae: toward eliminating the need of zooplankton at first feeding in larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 188:339-351.
- McBride, S., 2004. The activity of digestive enzymes in larval grouper and live food. In: M.A. Rimmer, S. McBride, K.C. Williams, (eds.), *Advances in grouper aquaculture: Australian*

- Center for International Agriculture Research, Canberra, 41–46pp.
- Martinez-Lagos, R. and V. Gracia-Lopez. 2009. Morphological development and growth patterns of the leopard grouper *Mycteroperca rosacea* during larval development. *Aquaculture Research*, 41:120-128.
- Moyano, F.J., M. Diaz, F.J. Alarcon, and M.C. Sarasquete. 1996. Characterization of digestive enzyme activity during larval development of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15:121–130.
- Munafi, A.B., W. Andriyanto, S. Ismi, A.Y. Nirmala, I. Mastuti, A. Muzaki, and A.W.M. Effendy. 2011. The ontogeny of the digestive tract and associated organs of Humpback Grouper (*Cromileptes altivelis*) larvae. *Asian Fisheries Science*, 24:379-386.
- Ordonio-Aguilar, R. 1995. Survival mechanisms of tropical marine fish larvae during changeover from endogenous to exogenous feeding. PhD Thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan. 322p.
- Pedersen, B.H. and K. Hjelmeland. 1988. Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus*) following digestion of copepods, *Marine Biology*, 97:467–476.
- Sarasquete, A., Polo, and M. Yufera, 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata* L., *Aquaculture*, 130:79–92.
- Segner, H., R. Roesch, J. Verreth, U. Witt. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. *J. World Aquaculture Society*, 24:121–134.
- Segner, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas, W. Hanke. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*, 119:471–486.
- Shirota, A. 1970. Studies on the mouth size of fish larvae. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 36:353-368 (in Japanese).
- Sveinsdóttir, H., H. Thorarensen, A. Gudmundsdóttir. 2006. Involvement of trypsin and chymotrypsin activities in Atlantic cod (*Gadus morhua*) embryogenesis. *Aquaculture*, 260:307–314.
- Tanaka, M. 1972. Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae-IV epithelial change in the posterior-gut and protein ingestion. *Japanesse J. of Ichthyology*, 19:172-180 (in Japanese with English summary).
- Timeyko, V.N. and G.G. Novikov. 1987. Proteolytic activity in the digestive tract of Atlantic salmon, *Salmo salar*, during larval development. *J. of Ichthyology*, 27:27–33.
- Tridjoko, B. Slamet, D. Makatutu dan K. Sugama. 1996. Pengamatan pemijahan dan perkembangan telur ikan kerapu bebek, *Cromileptes altivelis*, pada bak secara terkontrol. *J. Penelitian Perikanan Indonesia*, 2(2):55-62.
- Ueberschär, B. 1995. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Marine Science Symposium*, 201:119–129.
- Watanabe, Y. 1981. Ingestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells in larvae or

- juveniles of some teleosts. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 47:1299-1307.
- Watanabe, Y. 1982. Intracellular digestion of horseradish peroxidase by the intestinal cells of teleost larvae and juvenile. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 48:37-42.
- Zambonino-Infante J.L., and C. Cahu. 1994. Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12:399-408.
- Zambonino- Infante, J.L., and C.L. Cahu. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comprehensive Biochemistry and Physiology*, 130C:477-487.