

## PENGARUH VITAMIN C DALAM PAKAN TERHADAP SINTASAN, PERTUMBUHAN DAN STRES LARVA BANDENG (*Chanos chanos*)

Ketut Suwirya<sup>\*)</sup>, Agus Prijono<sup>\*)</sup> dan Tony Setiadharna<sup>\*)</sup>

### ABSTRAK

Vitamin C adalah salah satu nutrisi yang penting pada pakan ikan. Banyak jenis ikan sangat sensitif terhadap kekurangan vitamin C. Kebutuhan kuantitatif akan vitamin C untuk mendapatkan pertumbuhan ikan yang optimum sangat bervariasi tergantung jenis dan ukuran ikan. Percobaan ini dilaksanakan untuk menentukan kebutuhan vitamin C larva ikan bandeng. Pakan dibuat dengan kandungan vitamin C yang berbeda yaitu 0, 500, 1.000, dan 1.500 mg/kg pakan, diberikan pada larva yang berumur 10 hari selama 15 hari dalam lingkungan air laut. Larva yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 0 mg/kg menunjukkan sintasan paling rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya, tetapi pertumbuhan yang lebih baik dicapai dengan kandungan vitamin C 1.000 mg/kg pakan atau lebih. Kandungan vitamin C di dalam tubuh meningkat dengan peningkatan kandungan vitamin C dalam pakan. Di samping itu larva yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 1.000 dan 1.500 mg/kg pakan lebih tahan terhadap stres dibandingkan dengan yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C sebesar 0 dan 500 mg/kg pakan.

**ABSTRACT:** *Effect of vitamin C in the diets on survival, growth rate and stress of milkfish (*Chanos chanos*) larvae. By: Ketut Suwirya, Agus Prijono, and Tony Setiadharna.*

*Vitamin C is an important nutrient in fish feed. Most fishes are extremely sensitive to vitamin C deficiency. Quantitative requirement of vitamin C for optimum fish growth varies among species and size of fish. This experiment is conducted to determine vitamin C requirement of milkfish larvae. Diets supplemented with different levels of vitamin C at 0; 500; 1,000; and 1,500 mg/kg diets were fed to the ten-day old milkfish larvae for 15 days in sea waters. Larvae given feed without vitamin C showed the lowest survival rate compare to vitamin C added feed. Better growth result was obtained with vitamin C level of 1000 mg/kg or greater. The vitamin C content in the body increased with the increasing of dietary level of vitamin C. Larvae fed with level of vitamin C at 1,000 and 1,500 mg/kg diets were also more resistant to stress than those fed with 0 and 500 mg/kg vitamin C containing diets.*

**KEYWORDS:** *vitamin C, milkfish larvae, survival rate, stress.*

### PENDAHULUAN

Sampai saat ini produksi benih ikan bandeng masih sangat tergantung pada pakan alami seperti rotifer. Nilai nutrisi pakan alami ini bervariasi dan sangat bergantung pada musim. Pada musim hujan pertumbuhan *Chlorella* sebagai pakan rotifer sangat sulit, sehingga kualitas rotifer juga menurun. Hal ini menyebabkan produksi dan kualitas benih ikan bandeng menjadi tidak stabil. Oleh karena itu perlu dikembangkan pakan buatan larva bandeng sebagai substitusi pakan alami.

Telah banyak diketahui bahwa vitamin C merupakan salah satu nutrisi yang esensial pada ikan (Lovell, 1973). Kitamura *et al.* (1965) menunjukkan bahwa ikan membutuhkan vitamin C. Untuk memenuhi kebutuhan ini, maka vitamin C harus

tersedia dalam pakan. Ikeda & Sato (1965) menyatakan bahwa ikan tidak mempunyai kemampuan untuk mensintesis vitamin C.

Tanda-tanda kekurangan vitamin C pada ikan telah banyak dilaporkan. Tanda-tanda tersebut antara lain lordosis atau sokoliosis dengan tingkat sintasan yang rendah pada ikan *brook trout* (Poston, 1967), *coho salmon* dan *rainbow trout* (Halver *et al.*, 1969) dan lele (Lovell, 1973); kerusakan filamen insang pada *coho salmon* dan *rainbow trout* (Halver *et al.*, 1969), serta pertumbuhan yang rendah pada ikan *red sea bream* (Yano, 1975).

Kebutuhan vitamin C pada ikan untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimum sangat bervariasi tergantung pada spesies dan umur atau ukuran ikan. Halver *et al.* (1969) menunjukkan bahwa yuwana ikan trout membutuhkan 100 mg/

<sup>\*)</sup> Peneliti pada Loka Penelitian Perikanan Pantai Gondol

kg pakan, sedangkan yuwana ikan salmon hanya membutuhkan 50 mg/kg pakan. Kebutuhan vitamin C sejenis ikan lele (2.3 g) untuk pertumbuhan yang optimum adalah 50 mg/kg pakan (Andrews & Murai, 1975), akan tetapi Robinson (1984) menyarankan penambahan vitamin C sebanyak 375 mg/kg pakan untuk mengantisipasi hilangnya vitamin tersebut selama proses pembuatan dan penyimpanan.

Informasi kebutuhan vitamin C dalam pakan larva bandeng masih sangat terbatas. Oleh karena itu percobaan ini dilaksanakan untuk mengetahui pengaruh vitamin C terhadap sintasan, pertumbuhan, dan daya tahan benih bandeng, sekaligus untuk mendapatkan dosis optimum vitamin C dalam pakan.

**BAHAN DAN METODE**

Percobaan ini menggunakan bak silinder ukuran 1 m<sup>3</sup> sebanyak 12 buah dan diisi air laut sebanyak 70%. Setiap bak diisi larva yang baru menetas (D-0) sebanyak 10.000 ekor. Larva dipelihara sampai berumur 10 hari (D-10) dan diberi pakan rotifer dan *Chlorella* dengan kepadatan yang disesuaikan dengan umur larva yaitu masing-masing 10-40 individu dan 1 juta sel per mL.

Pada umur 11 hari (D-11) larva mulai diberi pakan buatan dengan kandungan vitamin C yang berbeda sebagai perlakuan yaitu 0, 500, 1.000, dan 1.500 mg per kg pakan. Adapun komposisi pakan percobaan seperti pada Tabel 1. Jenis vitamin C yang digunakan adalah jenis L-ascorbyl-2-phosphate Mg (AAP). Jenis vitamin ini mempunyai stabilitas dan aktivitas yang tinggi (Lovell & Neggar, 1990; Gadiant & Fenster, 1994; Miyasaki, 1995).

Kadar vitamin C (L-asam askorbik) dalam pakan dan tubuh larva dianalisis dengan menggunakan HPLC. Kolom yang digunakan adalah Nukliosil 100-5C18, 7.6x300 mm, GL Science. Detektor UV diatur pada 257 nm. Fase mobile adalah larutan 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> yang mengandung 0,5% (W/V) asam metafosforik, dengan pH dibuat 3,8 menggunakan 4N NaOH. Laju aliran adalah 0,8 mL/menit. Persiapan contoh, pakan (0,3 g dalam keadaan kering) dan larva (0,5 g dalam keadaan basah) disuspensikan dalam 5 mL larutan fase mobil dan ditambah 0,1% DTT (dithiothreitol) lalu diaduk sampai homogen. Dalam persiapan pakan sebelum diaduk ditambahkan enzim phosphatase untuk memisahkan ikatan garam fosfat dengan L-asam askorbik (vitamin C) sehingga vitamin C dalam

Tabel 1. Komposisi pakan percobaan (%).  
Table 1. Composition of test diets (%).

Bahan (Ingredients)	0 ( A )	500 ( B )	1000 ( C )	1500 ( D )
Tepung udang ( <i>Shrimp meal</i> )	11.00	11.00	11.00	11.00
Tepung cumi ( <i>Squid meal</i> )	6.00	6.00	6.00	6.00
Tepung ikan ( <i>Fish meal</i> )	38.00	38.00	38.00	38.00
Kuning telur ( <i>Eggs yolk</i> )	6.00	6.00	6.00	6.00
Tepung beras ( <i>Rice meal</i> )	16.30	16.30	16.00	16.00
Vitamin mix-1	2.00	2.00	2.00	2.00
Mineral mix-2	3.00	3.00	3.00	3.00
Minyak cumi ( <i>Squid oil</i> )	6.00	6.00	6.00	6.00
Lesitin ( <i>Leshitine</i> )	3.00	3.00	3.00	3.00
BHT	10.00	0.10	0.10	0.10
Sellulose ( <i>Cellulose</i> )	0.60	0.55	0.50	0.45
Vitamin C	0.00	0.05	0.10	0.15
Zein	8.00	8.00	8.00	8.00

- 1) Vitamin mix. (mg/kg diet): Thiamine-HCl 5, riboflavine 5, pyridoxine-HCl 4, cyanocobalamine 0.02, nikotine 20, D-calcium phantotenate 20, choline chloride 300, D-biotine 0.4, inositol 200, folic acid 1.5, menadion 2, b-carotone 0.3, vitamin E 10, calciferol 10, r-aminobenzoic acid 25, cellulosa 1395.08.
- 2) Mineral mix (mg/100 g diet): Fe-citrate 95.7, MgSO<sub>4</sub> 215.77, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 774.6, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 281.4, Ca-lactate 100.5.



pakan dapat dibandingkan dengan vitamin C standar (L-asam askorbik murni). Setelah itu disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Supernatannya dilewatkan sep-pak cartridge 0,8 (Waters, Millipore Corp., USA), kemudian disaring dengan saringan membran 0,45 mikro meter. Contoh sudah siap disuntikkan pada HPLC. Total vitamin C (L-ascorbic acid) pada pakan dan tubuh larva ditentukan dengan menggunakan kurva standar.

Percobaan ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga ulangan. Adapun peubah yang diamati meliputi perkembangan bobot setiap lima hari setelah diberi pakan percobaan, sintasan dan pertumbuhan larva pada akhir percobaan. Di samping itu, pada saat berakhirnya percobaan dilakukan uji tambahan terhadap larva untuk melihat kemampuannya menerima stres dari setiap perlakuan. Caranya, larva dikumpulkan sesuai dengan perlakuan, diambil 10 ekor secara acak dan ditempatkan dalam saringan teh yang dialas dengan kertas tisu, agar airnya tersedot. Larva dibiarkan selama enam menit, setelah itu larva dikembalikan ke dalam bak volume 30 L yang berisi air laut. Kemudian diamati sintasan larva setelah mendapat stres. Setiap perlakuan diulang sampai empat kali. Peubah-peubah ini diuji dengan analisis ragam untuk melihat pengaruh dari setiap perlakuan.

## HASIL DAN BAHASAN

Pakan yang ditambah vitamin C dari jenis L-ascorbyl-2-phosphate Mg (AAP) sebesar 0, 500, 1.000, dan 1.500 mg/kg pakan mengandung protein, lemak, serat, abu, dan kesetaraan vitamin C pakan dengan vitamin C murni (standar) seperti pada Tabel 2. Pakan percobaan mengandung protein kasar 39,52-40,12%, lemak 14,96-15,40% dan abu 8,82-9,01%. Penambahan AAP dalam pakan sebanyak 0 (A), 500 (B), 1000 (C), dan 1500 mg/kg pakan (D) berturut-turut setara dengan 0, 190, 370, dan 540 mg/kg pakan vitamin C murni (standar).

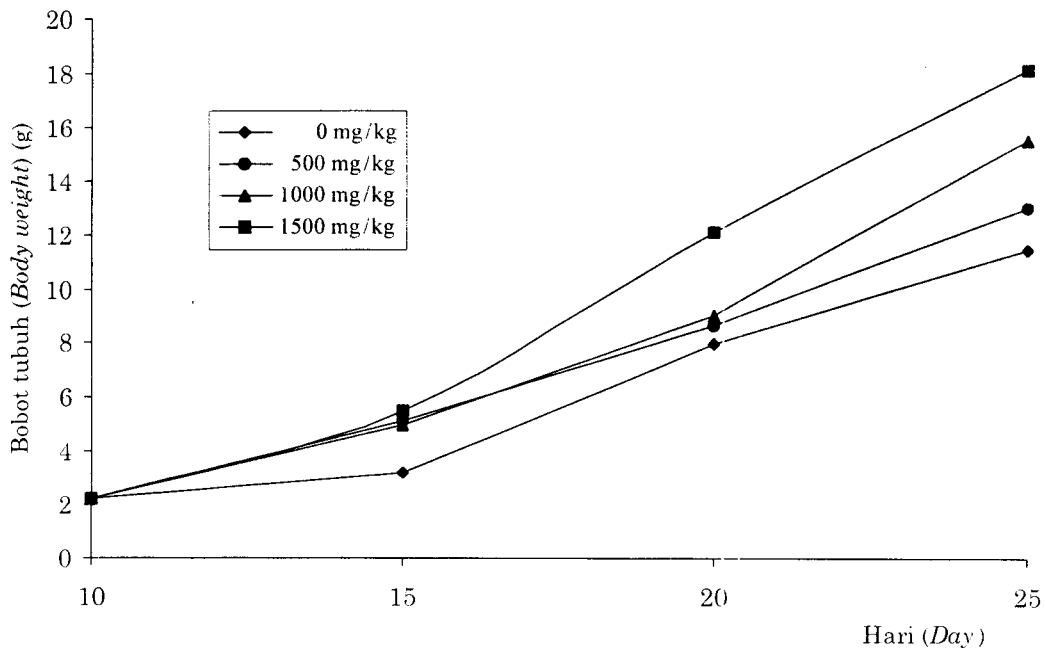
Perkembangan bobot larva bandeng yang diberi pakan percobaan untuk semua perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1 terlihat bahwa makin tinggi kandungan vitamin C dalam pakan, perkembangan bobotnya cenderung lebih cepat. Di samping itu waktu responnya juga lebih pendek. Pada kandungan vitamin C 500-1.500 mg/kg pakan waktu responnya hanya lima hari setelah pemberian pakan, sedangkan dengan vitamin C sebesar 0 mg/kg pakan waktu respon baru terlihat 10 hari setelah pemberian pakan.

Sintasan dan pertumbuhan spesifik selama percobaan disajikan pada Tabel 3. Dari analisis ragam terlihat bahwa sintasan larva bandeng yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 500, 1.000, dan 1.500 mg/kg pakan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ), namun berbeda nyata ( $P<0,05$ ) dengan pakan yang tidak diberi vitamin C. Dengan demikian vitamin C dalam bentuk AAP 500 mg/kg pakan sudah cukup dalam meningkatkan sintasan larva.

Berdasarkan analisis ragam dari tingkat pertumbuhan spesifik (Tabel 3), terlihat bahwa pada larva yang diberi pakan dengan kandungan 0, 500, dan 1.000 mg/kg tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ), namun pakan dengan kandungan 0 dan 500 mg/kg berbeda nyata dengan pakan yang mengandung vitamin C 1.500 mg/kg pakan. Pertumbuhan spesifik larva bandeng yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 1.000 dan 1.500 mg/kg tidak berbeda nyata ( $P<0,05$ ). Hasil ini dapat memberikan gambaran bahwa pakan larva bandeng yang baik sebaiknya mengandung vitamin C 500-1.500 mg/kg pakan. Vitamin C sangat mudah larut dalam air, sedangkan pakan yang diberikan pada larva berukuran sangat kecil (200-400 mikron), sehingga kadar vitamin C dalam pakan yang berada dalam media air akan menurun sangat cepat. Berbeda dengan pakan ikan yang lebih besar seperti yuwana atau ikan sejari, di mana ukuran pakan lebih besar dan makannya lebih cepat, maka peluang ber-

Tabel 2. Hasil analisis pakan.  
Table 2. The result of feed analysis.

Pakan <i>Diets</i>	Protein kasar <i>Crude protein</i> (%)	Lemak <i>Lipid</i> (%)	Abu <i>Ash</i> (%)	Serat <i>Fibre</i> (%)	Vitamin C <i>L-Ascorbic acid</i> (mg/Kg)
A (0)	40.01	15.21	8.93	6.21	0.00
B (500)	39.52	15.40	9.01	5.96	190.00
C (1,000)	40.12	14.96	8.82	5.88	370.00
D (1,500)	40.00	15.11	9.21	5.82	540.00



Gambar 1. Perkembangan bobot larva bandeng yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C (AAP) yang berbeda.

Figure 1. Development of milkfish larvae body weight during feeding with different vitamin C contents.

Tabel 3. Sintasan dan tingkat pertumbuhan spesifik larva bandeng yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 0, 500, 1000, dan 1500 mg/kg pakan.

Table 3. Survival and specific growth rate of milkfish larvae fed with vitamin C content of 0, 500, 1000, and 1500 mg/kg feed.

Kandungan vit. C pakan <i>Dietary vit. C</i> (mg/kg)	Sintasan <i>Survival rate</i> (%)	Tingkat pertumbuhan spesifik <i>Specific growth rate</i>
0 ( A )	32.65 ± 3.23 <sup>a</sup>	0.1257 <sup>ab</sup>
500 ( B )	39.14 ± 1.82 <sup>b</sup>	0.1352 <sup>b</sup>
1,000 ( C )	38.36 ± 3.18 <sup>b</sup>	0.1496 <sup>bc</sup>
1,500 ( D )	38.71 ± 2.29 <sup>b</sup>	0.1617 <sup>c</sup>

Angka dalam kolom diikuti dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ).  
Values in columns followed by the same superscript are not significantly different ( $P>0,05$ ).

kurangnya vitamin C pada pakan yang dimakan lebih sedikit dibandingkan dengan pakan untuk larva. Oleh karena itu pakan larva sebaiknya mengandung vitamin yang lebih tinggi sehingga kebutuhannya terpenuhi. Menurut Kosutarak *et al.* (1995), dosis tinggi vitamin C (500 mg/100 g pakan; kira-kira 100 kali lebih tinggi dari kebutuhannya) yang ditambahkan pada pakan tidak bersifat racun terhadap ikan *red sea bream* berukuran 3,36 g.

Hasil penelitian Boonyaratpalin *et al.* (1990) menunjukkan bahwa ikan kakap ukuran sejari (0,83-0,87 g) yang dipelihara dalam kondisi air laut membutuhkan vitamin C dalam pakan sebanyak 700-2.500 mg/kg pakan. Pada ikan *Atlantic salmon* yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C dari jenis ascorbyl-2-phosphate yang setara dengan 0, 20, 60, dan 100 mg asam askorbat (AA)/kg pakan selama lima bulan tidak menunjukkan perbedaan



dalam pertumbuhan, namun indeks hepatosomatik menurun dengan meningkatnya kadar vitamin C dalam pakan (Waagbø & Sandnes, 1996).

Vitamin C berperan penting dalam biosintesis karnitin dalam jaringan tubuh. Karnitin ini memegang peran dalam transpor asam lemak ke dalam mitochondria. Asam lemak dioksidasi untuk menghasilkan energi. Kekurangan vitamin C dalam jaringan akan menyebabkan berkurangnya produksi energi dan melemahnya tubuh (Horning *et al.*, 1984). Vitamin C dapat meningkatkan absorpsi zat besi dari usus. Zat besi diketahui dapat berperan dalam peredaran oksigen dalam tubuh. Di samping itu, vitamin C dapat berperan dalam pembentukan kolagen (Kosutarak *et al.*, 1995). Terhambatnya pembentukan kolagen akan menyebabkan jaringan pelekut akan melemah. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan tulang yang tidak sempurna (Horning *et al.*, 1984). Menurut Miyasaki *et al.* (1995) bahwa vitamin C juga dapat mencegah terjadinya metabolisme lemak yang abnormal, seperti berkurangnya kadar asam lemak rantai panjang dan terganggunya penggunaan lemak tubuh selama tidak makan.

Meningkatnya kandungan vitamin C dalam pakan akan cenderung meningkatkan kandungan vitamin C dalam tubuh dan daya tahan larva terhadap stres meningkat (Tabel 4). Dari Tabel 4 terlihat bahwa daya tahan benih yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 0 dan 500 mg/kg pakan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Namun larva yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C 1.000 dan 1.500 mg/kg pakan daya tahannya lebih tinggi dari yang diberi pakan dengan kandungan vitamin C lebih rendah. Hal ini juga dapat ditunjukkan pada ikan lele yang mempunyai bobot rata-rata

3 g diberikan pakan dengan kandungan vitamin C > 60 mg/kg pakan daya tahan tubuhnya akan meningkat (Li & Lovell, 1985). Di samping itu, studi pada ikan *rainbow trout* dan *Atlantic salmon* didapat bahwa penurunan kadar vitamin C dalam pakan dapat menekan sistem daya tahan tubuh (Verlhac & Gabaudan, 1994). Pada ikan air tawar *Nemacheilus simatus*, daya tahan tubuh terhadap racun juga meningkat dengan meningkatnya kadar vitamin C dalam darah *atlantic salmon* (Magare & Kulkarni, 1996).

Salah satu indikator bahwa ikan/hewan terkena stres adalah meningkatnya kadar hormon kortison dalam darah (Thaxton & Pardue, 1984). Waagbo & Sandnes (1996) melakukan percobaan pada ikan *Atlantic salmon* dengan memberi pakan berkadar vitamin C yang setara dengan 0, 20, 60, dan 100 mg/kg pakan selama lima bulan. Setelah itu ikan tersebut dipindahkan ke dalam air laut (34 ppt) selama 24 jam, diperoleh indikasi bahwa kadar kortison dalam darah menurun secara proporsional sesuai dengan peningkatan kadar vitamin C dalam pakan. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C berperan dalam mengurangi stres. Thomson *et al.* (1993) mendapatkan bahwa ikan *Atlantic salmon* yang diimunisasi dengan *Aeromonas salmonicida* menunjukkan produksi antibodinya menurun akibat stres, dan antibodi yang spesifik lebih tinggi pada ikan yang diberi pakan dengan kadar vitamin C rendah dibandingkan ikan yang diberi kadar vitamin C tinggi.

## KESIMPULAN

Pakan yang mengandung vitamin C dalam bentuk AAP 500 mg/kg pakan yang setara dengan 190 mg vitamin C murni/kg pakan sudah cukup

Tabel 4. Kandungan vitamin C dalam tubuh larva pada akhir percobaan dan sintasan larva ikan bandeng yang ditempatkan di udara selama enam menit.

Table 4. Vitamin C content of larvae at the end of experiment and survival rate of milkfish fry after being exposed to the air for six minutes.

Kandungan vitamin C pakan <i>Dietary vitamin C</i> (mg/kg)	Sintasan <i>Survival rate</i> (%)	Kandungan vitamin C dalam tubuh (mg/100 g bobot basah) <i>Vitamin C content in the body</i> (mg/100 g wet weight)
0 (A)	10.0 ± 8.17 <sup>a</sup>	0.0096
500 (B)	15.0 ± 5.77 <sup>a</sup>	0.0125
1,000 (C)	35.0 ± 3.18 <sup>b</sup>	0.0151
1,500 (D)	45.0 ± 12.91 <sup>b</sup>	0.0192

Angka dalam kolom diikuti dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ).  
Values in columns followed by the same superscript are not significantly different ( $P>0,05$ ).

untuk meningkatkan sintasan larva bandeng. Akan tetapi untuk pertumbuhan larva lebih cepat dan daya tahan tubuh terhadap stres yang baik diperoleh dengan pakan yang mengandung vitamin C dari jenis AAP sebesar 1.000-1.500 mg/kg atau yang setara dengan 370 -540 mg vitamin C/kg pakan .

## DAFTAR PUSTAKA

- Andrews, J.W. and Murai, T. 1975. Studies on the vitamin C requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) . *J. Nutr.* 105:557-561
- Boonyaratpalin, M., Unprasert, N. and Buranapannidgit, J. 1990. Optimal supplementary vitamin C level in seabass fingerling diets. In Takeda, T. and T. Watanabe (Eds). *Proceeding Third Int. Symp. on feeding and Nutr. in Fish.* Toba Aug. 28-Sept. 1, 1989. Japan. pp. 149-157
- Gadiant, M. and Fenster, R. 1994. Stability of ascorbic acid and other vitamins in extruded fish feeds. *Aquaculture*. 124 (1-4): 207 -211.
- Halver, J.E., Ashley, L.M. and Smith, R.M. 1969. Ascorbic acid requirement of coho salmon and rainbow trout. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 98: 762-771.
- Horning, D., Glatthair, B. and Moser, U. 1984. General aspect of ascorbic acid function and metabolism. In Tawaker, F.J. and J. Monsgaard (Eds). *Proceeding of Ascorbic Acid in Domestic Animals Workshop*. Skjoldenesholm, Sept., 1983. The Royal Danish Aquacultural Society, Copenhagen. pp. 2 -24
- Ikeda, S. and Sato, M. 1965. Biochemical studies on L-ascorbic acid in aquatic animal IV: Metabolism of L-ascorbic acid -1-C14 in carp. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 31: 814-817.
- Kitamura, S., Ohara, S., Suwa, T. and Nakagawa, K. 1965. Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri* I: on ascorbic acid. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 31: 828-834.
- Kosutarak, P., Kanazawa, A., Teshima, S. and Koshio, S. 1995. Interaction of L-ascorbyl-2-phosphate Mg and oxidized fish oil on red sea bream juveniles. *Fish. Sci.*, 61(4) : 696-702.
- Li, Y. and Lovell, R.T. 1985. Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *J. Nutr.* 115(1): 123-131.
- Lovell, R.T. 1973. Essentiality of vitamin C in feeds for intensively fed caged channel catfish. *J. Nutr.* 103:134-138.
- Lovell, R.T. and Neggar, G.O.E. 1990. Vitamin C activity for L-ascorbic acid, L-ascorbyl-2-sulfate, and L-ascorbyl-2-phosphate-Mg for channel catfish. In Takeda, M. and T. Watanabe (Eds). *Proceeding Third Int. Symp. on feeding Nutr. in Fish.* Toba aug. 28 - Sept. 1, 1989. Japan. pp 159 - 165
- Magare, S.R. and Kulkarni, A.B. 1996. Effect of toad poison on ascorbic acid level in the fish, *Nemachelus sinuatus*. *Environ. Ecol.* 14 (2): 488-494.
- Miyasaki, T. 1995. Metabolism and physiological activity of ascorbyl-2-phosphate in fish. *J. Shimonoseki Univ. Fish.* 43(2): 45-107.
- Miyasaki, T., Sato, M., Yoshinaka, R. and Sakaguchi, M. 1995. Effect of vitamin C on lipid and carnitine metabolism in rainbow trout. *Fish. Sci.*, 61(3): 501-505.
- Poston, H.A. 1967. Effect of L-ascorbic acid on immature brook trout. New York State, Cons. Dept., *Fish. Res. Bull.*, 30:30: 46-51.
- Robinson, E.H. 1984. Vitamin requirement, Nutrition and feeding of channel catfish. (Revised) Robinson, E.M. and Lovell, R.T. (Eds). *South Cooperative Series Bulletin* No 296: 21-25.
- Thaxton, J.P. and Pardue, S.I. 1984. Ascorbic acid and physiological stress. In Tagwaker F.J. and J. Monstgard (Eds). *Proceeding of Ascorbic Acid in Domestic Animals Workshop*. Skjoldenesholm, September 1983. The Royal Danish Aqua. Soc., Copenhagen. pp. 25 - 31
- Thomson, I., White, A., Fletcher, T.C., Honlelian, D.F. and Secombes, C.J. 1993. The effect of stress on immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets containing different amount of vitamin C. *Aquaculture*. 114(2): 1-18.
- Waagbo, R. and Sandnes, K. 1996. Effects of dietary vitamin C on growth and parr-smolt transformation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquacult. Nutr.* 2(2): 65-69.
- Yano, Y. 1975 Nutritional studies of red seabream. In Price, K.S., W.N. Shaw and K.S. Danberd (Eds). *Proceeding of the First Inter. Conf. on aquaculture Nutrition*. Univ. of Delaware. pp 34-39