

AKTIVITAS PROTEASE DAN AMILASE DIGESTI BENIH IKAN GURAME, *Osphronemus gouramy* Lac.

Untung Susilo, Edy Yuwono, dan Farida Nur Rachmawati

Laboratorium Fisiologi Hewan Fakultas Biologi

Universitas Jenderal Soedirman

Jl. dr. Soeparno No. 63, Purwokerto 53122

E-mail: susilo.utg@gmail.com

ABSTRAK

Telah dilakukan suatu penelitian untuk mengetahui aktivitas protease dan amilase digesti benih ikan gurame, *Osphronemus gouramy* Lac., dari fase pasca larva hingga berukuran panjang badan satu inci. Penelitian dilaksanakan dengan metode survai. Sebanyak 200 ekor ikan gurame yang terdiri atas ikan fase pasca larva hingga berukuran panjang badan satu inci telah digunakan pada penelitian ini. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan aktivitas protease dan amilase digesti di antara perbedaan fase pertumbuhan ikan dan *buffer* inkubasi ($P < 0,05$). Aktivitas protease ikan gurame fase pasca larva dan ukuran sebesar biji oyong lebih rendah daripada ikan dengan ukuran lebih besar. Kondisi sebaliknya dijumpai pada aktivitas amilase yang menunjukkan adanya aktivitas yang lebih tinggi pada ikan, fase pasca larva, dan ukuran sebesar biji oyong dibandingkan pada ikan dengan ukuran yang lebih besar. Aktivitas protease dengan *buffer* Tris-HCl (pH 6-7) juga lebih tinggi daripada yang diukur dengan *buffer* Glisin-HCl (pH 2-3) dan *buffer* sodium fosfat dibasik (pH 8-9). Disimpulkan bahwa aktivitas protease mengalami peningkatan dengan bertambahnya ukuran ikan, namun aktivitas amilase mengalami penurunan dengan bertambahnya ukuran ikan dari pasca larva hingga ukuran panjang badan satu inci. Aktivitas protease tertinggi juga dijumpai pada *buffer* dengan suasana pH netral.

KATA KUNCI: *Osphronemus gouramy*, protease, amilase, pH inkubasi, pasca larva

PENDAHULUAN

Ikan gurame merupakan salah satu ikan air tawar yang telah dipelihara secara intensif di banyak wilayah di Indonesia. Di wilayah Banyumas dan sekitarnya ikan gurame ini ternasuk ikan primadona, karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan jenis ikan budidaya air tawar yang lain. Namun demikian kendala yang masih sering dijumpai oleh pembudidaya ikan gurame adalah tingginya mortalitas benih dan lambatnya pertumbuhan ikan gurame. Oleh karena itu, diperlukan suatu upaya pengkajian yang mengarah pada pemecahan permasalahan budidaya ikan gurame. Salah satu aspek penting yang perlu dikaji berkaitan dengan permasalahan ini adalah mencari pemecahan berkaitan dengan pemanfaatan nutrisi yang dikonsumsi.

Kemampuan memanfaatkan nutrisi yang terdapat dalam pakan yang dikonsumsi ikan sangat tergantung pada kesiapan sistem digesti, baik struktural maupun fisiologinya. Pakan yang dikonsumsi ikan umumnya mengandung tiga komponen nutrisi yaitu protein, lemak, dan karbohidrat. Untuk dapat memanfaatkan nutrisi tersebut, maka ikan harus memiliki perangkat enzim yang mampu mendigestinya. Enzim digesti yang berperan tersebut secara umum disebut protease, lipase, dan karbohidrat atau amilase. Enzim digesti dapat diukur dari aktivitasnya, sebagai indikator adanya kemampuan sistem digesti untuk mencerna pakan.

Pada ikan yang sedang mengalami pertumbuhan biasanya selaras dengan perkembangan kemampuan digesti terhadap pakan yang dikonsumsi. Untuk mencapai efisiensi pemberian pakan maka perlu diperhatikan kesepadanan antara kemampuan digesti dengan pakan yang diberikan. Oleh karena itu, pengkajian aktivitas enzim digesti seiring dengan pertumbuhan ikan herbivora dan omnivora, terutama stadia pasca larva hingga yuwana, telah banyak dilakukan di antaranya pada ikan bandeng, *Chanos chanos* (Ciu & Benitez, 1981; Benitez & Tiro, 1982), *Catla catla* (Rathore *et al.*, 2005), *Fish Malaysian Mahseer*, *Tor tambroides* –Bleeker (Jalal *et al.*, 2005), *hybrid carp* (Chakrabarti

et al., 2006), tilapia, *Oreochromis mosambicus* L. (Klahan *et al.*, 2009), seabream, *Diplodus puntazzo* (Savona *et al.*, 2011), dan ikan herbivora laut *Hyporhamphus regularis ardelio* (Day *et al.*, 2011). Namun demikian, aktivitas enzim digesti, terutama protease dan amilase, pada ikan gurame yang berada pada fase pertumbuhan awal yaitu mulai pasca larva hingga ikan berukuran satu inci belum banyak dikaji, sehingga dirasa perlu untuk diteliti.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas protease dan amilase digesti benih ikan gurame mulai dari pasca larva hingga berukuran satu inci. Aktivitas protease diamati pada tiga susana buffer berbeda yaitu pH 2-3, pH 6-7, dan pH 8-9 yang analog dengan aktivitas pepsin dan tripsin atau kemotripsin.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dengan metode survai. Materi yang digunakan adalah benih ikan gurame pada fase pertumbuhan yaitu dari fase lepas kuning telur hingga ukuran panjang satu inci atau yaitu pada ukuran bobot 0,02-4,43 g/ekor yang dikelompokkan menjadi 5 (lima) kelompok ukuran. Ikan uji diambil dari kelompok petani ikan di wilayah Kecamatan Sumbang Kabupaten Banyumas. Ikan uji yang diperoleh selanjutnya diseleksi untuk diambil saluran digestinya. Saluran digesti yang diperoleh lalu diukur aktivitas enzimnya pada pH asam (2-3), pH netral (6-7), dan pH basa (8-9) untuk aktivitas protease, namun untuk aktivitas amilase hanya diukur pada pH netral.

Untuk keperluan pengukuran aktivitas enzim digesti, saluran digesti ikan yang telah diisolasi, terlebih dahulu dihancurkan menggunakan homogeniser listrik dalam 0,05 M Tris HCl (pH 6-7) dingin dengan rasio 1:2. Homogenat yang diperoleh kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifuse bersuhu 4°C pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, dan supernatan yang diperoleh siap digunakan untuk uji aktivitas enzim (Natalia *et al.*, 2004). Kadar protein supernatan ditentukan dengan metode Lowry (Furne *et al.*, 2005), menggunakan kasein sebagai standar.

Aktivitas protease diukur menggunakan metode hidrolisis kasein (metode Walter, 1984 dalam Hidalgo *et al.*, 1999). Uji dilakukan menggunakan buffer 0,1 M Glisin-HCl (pH 2-3); 0,1 M tris-HCl (pH 6-7); dan 0,05 M Na₂HPO₄ (pH 8-9) pada 25°C. Reaksi enzim dimulai dengan mencampurkan 1% (w/v) kasein dalam air (0,5 mL), buffer (0,50 mL), dan sampel enzim (0,25 mL) dan diinkubasi selama 60 menit pada 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 0,75 mL dari 8% (w/v) asam trichloroasetat (TCA). Setelah diendapkan dalam refrigerator 60 menit, campuran reaksi disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Absorbansi dicatat pada panjang gelombang 280 nm. Tirosine digunakan sebagai standar dan satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk mengkatalisis pembentukan 1 µg tirosine/menit. Untuk kontrol, TCA ditambahkan ke ekstrak sebelum ditambah substrat. Aktivitas protease yang terukur sebagai jumlah tirosin yang dihasilkan per menit ditentukan menggunakan kurva kalibrasi tirosin.

Aktivitas amilase ditentukan dengan metode hidrolisis pati (Robyt & Whelan, 1968 dalam Hidalgo *et al.*, 1999). Substrat pati disiapkan sebagai 1% (w/v) larutan pati (dalam 10 mM *phosphate buffer* berisi 6,0 mM NaCl). Pada substrat amilum sebanyak 0,75 mL ditambahkan 0,25 mL ekstrak enzim. Campuran reaksi diinkubasi selama 30 menit pada 37°C dan 27°C. Setelah inkubasi tambahkan larutan 2% (w/v) 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) segera homogenkan. Campuran reaksi kemudian dimasukkan ke dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin tambahkan akuades sebanyak 1,5 mL. Absorbansi dicatat pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah maltosa yang dilepas dari uji ini ditentukan dari kurva standar. Aktivitas amilase dikalkulasi dari rasio antara jumlah maltosa yang dilepaskan (µ mol) dengan bobot enzim (mg) dalam reaksi campuran kali lama inkubasi (Hidalgo *et al.*, 1999).

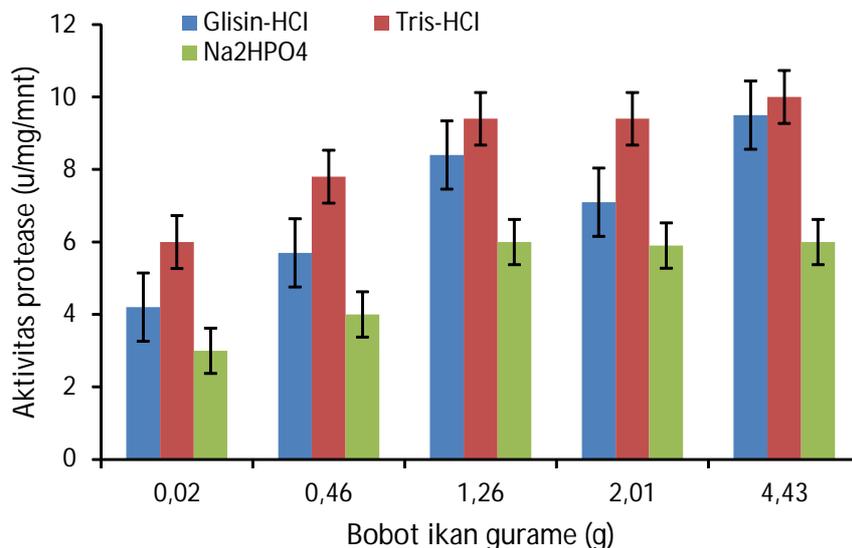
Data aktivitas enzim protease dianalisis dengan menggunakan *univariate analysis of variance* sedangkan aktivitas amilase dianalisis dengan uji F.

HASIL DAN BAHASAN

Aktivitas Protease Digesti

Pengukuran aktivitas protease secara kuantitatif dilakukan pada berbagai *buffer* dengan pH berbeda, terutama yang dilakukan pada penelitian ini adalah *buffer* Glisin-HCl 0,2 M dengan pH 2-3, *buffer* Tris-HCl 0,1 M dengan pH 6-7, dan *buffer* Na₂HPO₄ 0,05 M dengan pH 8-9. Pengukuran aktivitas enzim tidak dilakukan secara spesifik, namun menggunakan *buffer* dengan pH berbeda yang didasarkan pada perbedaan enzim yang aktif pada pH berbeda. Asumsi ini didasarkan pada hubungan kuantitatif antara pH dengan aktivitas enzim, dan dianalogikan bahwa umumnya pepsin aktif pada suasana asam dan tripsin serta kemotripsin aktif pada suasana netral hingga sedikit basa (Furne *et al.*, 2005).

Hasil pengamatan terhadap aktivitas protease digesti pada suasana pH berbeda tertera pada Gambar 1. Pada Gambar 1 terlihat bahwa aktivitas protease dalam suasana asam atau analog dengan aktivitas pepsin terukur rendah pada ikan pasca larva atau lepas kuning telur atau *yolk* yaitu ketika ikan memiliki bobot badan rata-rata 0,02 g/ekor; namun aktivitas protease ini mengalami peningkatan dengan meningkatnya ukuran badannya, dan aktivitas tertinggi dijumpai pada ikan yang memiliki bobot badan rata-rata 1,26 g/ekor dan 4,43 g/ekor. Fenomena perubahan yang sama juga dijumpai pada aktivitas protease yang diukur pada suasana *buffer* Tris-HCl pH 6-7. Aktivitas protease yang analog dengan tripsin juga rendah pada stadia pasca larva dengan bobot badan rata-rata 0,02 g/ekor dan aktivitas protease tinggi pada benih ikan dengan bobot badan 1,26 g/ekor dan 4,43 g/ekor (Gambar 1).



Gambar 1. Aktivitas protease benih ikan gurame pada ukuran dan *buffer* berbeda

Aktivitas protease dengan *buffer* Na₂HPO₄ (pH 8-9) atau analog dengan aktivitas tripsin-kemotripsin, tampaknya lebih rendah dibanding aktivitas protease pada suasana *buffer* Glisin-HCl (pH 2-3) dan Tris-HCl (pH 6-7) pada semua ukuran ikan. Jadi bila diperhatikan perubahan aktivitas protease seiring perubahan ukuran atau umur ikan terlihat bahwa aktivitas protease pada suasana asam dan netral lebih tinggi daripada protease pada suasana alkalis atau dengan kata lain, aktivitas protease pada suasana asam dan netral lebih menonjol pada awal perkembangan atau fase benih ikan gurame. Adanya aktivitas protease digesti pada awal pertumbuhan benih ikan gurame, terutama fase pasca larva, juga dijumpai pada ikan dengan spesies berbeda. Pada ikan *Seriola lalandi*, aktivitas protease meningkat setelah menetas hingga usia tiga hari (DAH, *days after hatching*), namun menurun setelah larva berumur 18 DAH (Chen *et al.*, 2006), pola penurunan aktivitas enzim digesti juga dijumpai pada *Pelteobagrus fulvidraco* ketika umur larva mendekati 28 DAH (Wang *et al.*, 2006). Hasil penelitian ini juga tidak berbeda dengan yang dijumpai pada pasca larva *red drum* (*Sciaenops ocellatus*), yang ditemukan adanya aktivitas protease asam sebagai enzim utama yang berperan dalam digesti ketika usia larva semakin tua dan diduga bahwa peningkatan aktivitas protease asam berhubungan dengan semakin berfungsinya lambung (Lazo *et al.*, 2007).

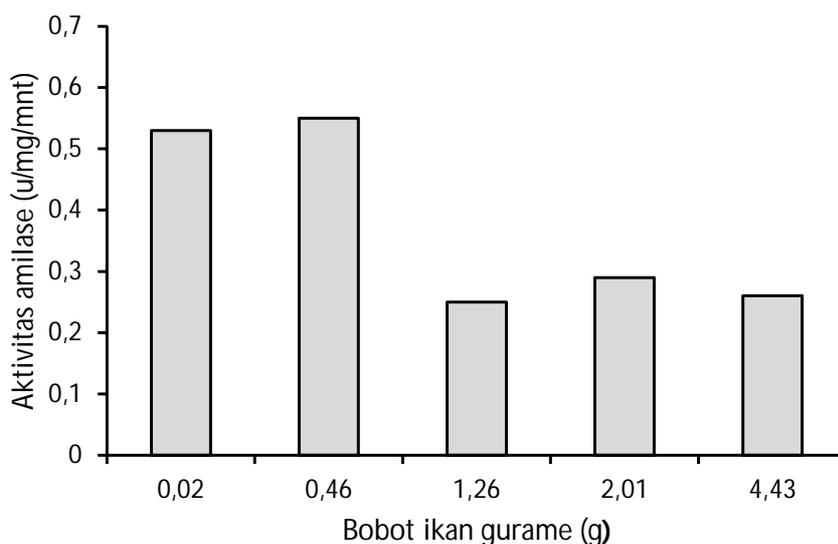
Aktivitas tripsin yang meningkat juga dijumpai pada ikan *Catla catla* (Family: Cyprinidae) selama awal perkembangannya, terutama ketika larva berusia 16 hari hingga 34 hari setelah menetas (Rathore *et al.*, 2005). Pada ikan *malabar grouper* (*Epinephelus malabaricus*) juga dijumpai adanya perubahan aktivitas tripsin pada benih umur 40 hari hingga 52 hari, namun aktivitas pepsin-like meningkat secara signifikan pada ikan berumur 47 hari hingga 51 hari (Fuji *et al.*, 2007). Hasil penelitian tersebut selaras dengan penelitian ini ketika benih ikan gurame berumur 15 hari hingga 60 hari yang analog dengan ukuran benih 0,02 g/ekor hingga 1,26 g/ekor yang menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan aktivitas protease asam dan sedikit basa atau aktivitas *pepsin-like* dan *trypsin-like*.

Pada ikan gurame dengan bobot badan rata-rata 2,01 g/ekor hingga 4,43 g/ekor aktivitas protease, baik untuk suasana pH asam maupun netral dan sedikit basa, tidak mengalami perubahan yang signifikan, namun demikian pada ikan ukuran ini tidak dijumpai adanya penurunan aktivitas protease atau dengan kata lain aktivitas protease masih tetap tinggi (Gambar 1). Tingginya aktivitas protease pada benih ikan gurame ukuran demikian dimungkinkan berada pada fase pertumbuhan cepat. Pada fase pertumbuhan cepat, yang umumnya ikan pada ukuran kecil, kebutuhan protein lebih tinggi daripada ikan dengan ukuran lebih besar (Craig & Helfrich, 2002). Untuk dapat memanfaatkan pakan dengan diet protein tinggi, maka diduga ikan harus memiliki aktivitas protease yang tinggi pula, suatu upaya meningkatkan efisiensi pemanfaatan pakan. Aktivitas protease yang lebih tinggi pada ikan lebih kecil juga dijumpai pada ikan nila tilapia, *Oreochromis niloticus* L. (Klahan *et al.*, 2009).

Aktivitas Amilase Digesti

Pengukuran aktivitas amilase digesti ikan dimaksudkan untuk melihat ada tidaknya enzim yang memiliki kemampuan mendigesti karbohidrat, terutama amilum. Aktivitas amilase diukur pada suasana netral (*buffer* Na₂HPO₄ pH 6-7), sebab studi terdahulu pada ikan brek (*Puntius orphoides* C.V.) pengukuran amilase pada pH asam menunjukkan aktivitas yang sangat rendah (Susilo *et al.*, 2010). Pada ikan gurame pasca larva ternyata dijumpai adanya aktivitas amilase digesti dan aktivitas amilase terukur lebih tinggi pada ikan pasca larva dengan bobot badan rata-rata 0,02 g dan pada benih dengan bobot badan rata-rata 0,46 g/ekor; sedangkan ikan dengan bobot badan rata-rata 1,26 g/ekor hingga 4,43 g/ekor memiliki aktivitas amilase lebih rendah (Gambar 2).

Hasil penelitian ini selaras dengan hasil penelitian sebelumnya pada ikan herbivora laut, yang memperlihatkan tingginya aktivitas amilase pada ikan berukuran kecil dibandingkan dengan ikan berukuran besar (Day *et al.*, 2011), namun berbeda dengan yang dijumpai pada ikan tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) ikan berukuran besar lebih tinggi aktivitas amilasena dibanding ikan berukuran kecil



Gambar 2. Aktivitas amilase benih ikan gurame pada berbagai bobot badan

(Klahan *et al.*, 2009). Jadi tampaknya ikan gurame fase pasca larva hingga ukuran satu sentimeter (bobot badan rata-rata 0,46 g/ekor) telah memiliki kemampuan untuk mendigesti karbohidrat. Fenomena yang sama juga dijumpai pada fase awal pertumbuhan benih ikan *red drum*, *Sciaenops ocellatus* (Lazo *et al.*, 2007), *Seriola lalandi* (Chen *et al.*, 2006), dan *Catla catla* (Rathore *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Aktivitas protease mengalami peningkatan dengan bertambahnya ukuran ikan, namun aktivitas amilase mengalami penurunan dengan bertambahnya ukuran ikan dari pasca larva hingga ukuran panjang badan satu inci. Aktivitas protease tertinggi juga dijumpai pada *buffer* dengan suasana pH netral.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Unsoed, Purwokerto yang telah memberikan pendanaan melalui hibah kompetisi Riset Institusional (RISIN) untuk terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Benitez, L.V. & Tiro, L.B. 1982. Studies on the digestive proteases of the milkfish *Chanos chanos*. *Marine Biology*, 71: 309-315.
- Chakrabarti, R., Rathore, R.M., Mittal, P., & Kumar, S. 2006. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp and bighead carp hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture*, 253(1-4): 694-702.
- Chen, B.N., Qin, J.G., Kumar, M.S., Hutchinson, W.G., & Clarke, S.M. 2006. Ontogenic development of digestive enzymes in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture*, 260(1-4): 264-271.
- Chiu, Y.N. & Benitez, L.V. 1981. Studies on the carbohydrases in the digestive tract of the milkfish *Chanos chanos*. *Marine Biology*, 61: 247-254.
- Craig, S. & Helfrich, L.A. 2002. Understanding Fish Nutrition, Feeds, and Feeding. Virginia Cooperative Extension Publication, p. 420-256.
- Day, R.D., German, D.P., & Tibbetts, I.R. 2011. Why can't young fish eat plants ? Neither digestive enzymes nor gut development preclude herbivory in the young of stomachless marine herbivorous fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 158: 23-29.
- Fuji, A., Kurokawa, Y., Kawai, S., Yoseda, K., Kai, A., & Tanaka, M. 2007. Diurnal variation of tryptic activity in larval stage and development of proteolytic enzyme activities of malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*) after hatching. *Aquaculture*, 270(1-4): 68-76.
- Furne, Hildago, M.C., Lo´pez, A., Garc1´a-Gallego, M., Morales, A.E., Domezain, A., Domezaine´, J., & Sanz, A. 2005. Digestive Enzyme Activities in Adriatic Sturgeon *Acipenser naccarii* and Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. A Comparative Study. *Aquaculture*, 250: 391–398.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., & Sanz, A. 1999. Comparative Study of Digestive Enzymes in Fish with Different Nutritional Habits. Proteolytic and Amylase Activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- Jalal, K.C.A., Ambak, M.A., Abol, M.A.B., Hassan, T.H., & Alam, M.Z. 2005. Effect of feed additives on the development of proteolytic enzymes of the tropical sport fish malaysian mahseer (*Tor tambroides*-Bleeker) fry. *American J. of Biochemistry and Biotechnology*, 1(3): 132-134.
- Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., & Engkagul, A. 2009. Characterization and Activity of Digestive Enzymes in Different Sizes of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43: 143-153.
- Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., & Arnold, C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 265(1-4): 194-2005.
- Natalia, Y., Hashim, R., Ali, A., & Chong, A. 2004. Characterization of Digestive Enzymes in a Carnivorous Ornamental Fish, the Asia Bony Tongoe, *Scleropages formosus* (Osteoglossidae). *Aquaculture*, 233: 305-320.

- Rathore, R.M., Kumar, S., & Chakrabarti, R. 2005. Digestive enzymes patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comp. Biochem. and Physio. Part B*, 142(1): 98-106.
- Savona, B., Tramati, C., & Mazzola, A. 2011. Digestive enzymes in larva and juveniles of farmed sharpsnout seabream (*Diplodus puntazzo*) (Cetti, 1777). *The Open Marine Biology Journal*, 5: 47-57.
- Susilo, U., Rachmawati, F.N., & Setyaningrum, N. 2010. Aktivitas enzim digesti belut sawah, *Monopterus albus* Zuiew, dan ikan brek, *Puntius orphoides* C.V., serta responsnya terhadap stres nutrisi. Laporan penelitian (tidak dipublikasi). Fakultas Biologi, Unsoed. Purwokerto.
- Wang, C., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Yang, Y., & Liu, J. 2006. Effects of age and dietary protein level on digestive activity and gene expression of *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. *Aquaculture*, 254(1-4): 554-562.