

PENGARUH LOGAM $FeCl_3$ TERHADAP AKTIVITAS ENZIM PROTEASE IKAN KERAPU MACAN

Muhamad Yamin¹⁾, Neltje N. Palinggi²⁾, dan Rachmansyah³⁾

¹⁾ Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros

ABSTRAK

Tepung darah (*blood meal*) yang mengandung protein 84,3%; berpotensi menjadi bahan pengganti tepung ikan yang semakin jarang dan mahal. Sayangnya tingkat kecernaan tepung darah sangat rendah yaitu 55,2%. Diduga hal ini disebabkan oleh tingginya konsentrasi Fe yang mencapai 0,2%--0,3%. Untuk melihat pengaruh Fe maka dilakukan pengujian *in vitro* terhadap aktivitas enzim pada usus ikan kerapu macan. Enzim protease usus diperoleh dari ikan kerapu macan yang dipelihara pada KJA Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau (BRPBAP) di Teluk Awerange Kabupaten Barru, Sulawesi Selatan. Aktivitas protease diukur secara kuantitatif dengan modifikasi metode Bergmeyer *et al.* (1983) dan untuk mengukur pengaruh logam Fe dilakukan penambahan $FeCl_3$. Hasil analisis menunjukkan bahwa pada konsentrasi $FeCl_3$ 20--50 mM enzim kehilangan aktivitasnya sampai 76,54% dan 83,08%. Namun pada konsentrasi $FeCl_3$ rendah (1 mM) aktivitas enzim protease meningkat 2%. Ini menunjukkan bahwa rendahnya tingkat kecernaan tepung darah disebabkan tingginya kadar besi (Fe) yang mencapai 0,2%--0,3%.

KATA KUNCI: Fe, protease, aktivitas enzim, *Epinephelus fuscoguttatus*

PENDAHULUAN

Kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) merupakan ikan budidaya yang saat ini sangat diminati oleh pembudidaya karena dapat memberikan keuntungan yang cukup tinggi. Salah satu teknologi yang dikembangkan untuk budidaya ikan kerapu ini adalah pada keramba jaring apung (KJA). Dalam kegiatan budidaya ikan kerapu macan di KJA, salah satu faktor yang sangat menentukan keberhasilan adalah manajemen pakan, yang kontribusinya mencapai 60% dari total biaya produksi pada kegiatan budidaya intensif (Usman & Palinggi, 2005). Sementara komponen terbesar penyusun pakan ikan kerapu macan adalah tepung ikan yang mencapai 57%--62% (Kabangnga

et al., 2004; Laining *et al.*, 2003a). Keberadaan tepung ikan sangat esensial pada pakan karena berperan sebagai sumber protein. Sayangnya harga tepung ikan cenderung mengalami peningkatan dari tahun ke tahun di antaranya disebabkan permintaannya yang terus meningkat dan semakin berkurangnya sumberdaya ikan di alam.

Untuk mendapatkan keuntungan yang lebih besar, maka pencarian sumber protein alternatif pengganti tepung ikan terus dilakukan. Salah satu bahan yang berpotensi sebagai sumber protein dan saat ini banyak diteliti adalah tepung darah karena kandungan proteinnya yang cukup tinggi. Menurut Laining *et al.* (2003a), kandungan protein tepung darah kering mencapai 84,3%. Di samping itu, tepung darah juga tergolong sebagai salah satu bahan makanan yang kaya akan besi (Tacon, 1987). Tingginya konsentrasi Fe ini disebabkan peranannya yang esensial di darah, di mana Fe pada hemoglobin berperan sebagai pengikat oksigen (Calvert, 2003).

Namun keberadaan Fe yang terlalu tinggi pada bahan pakan mungkin dapat mengganggu proses pencernaan dan penyerapan makanan karena berpotensi menurunkan aktivitas enzim di usus khususnya enzim protease. Enzim protease adalah enzim yang bekerja dalam mendegradasi protein sebagai substratnya untuk menghasilkan peptida atau asam amino sebagai produknya (Lehninger, 1982). Pengujian aktivitas enzim protease secara *in vitro* diperlukan untuk mendapatkan gambaran lebih jelas tentang pengaruh Fe terhadap aktivitas enzim protease dari usus ikan kerapu macan. Tulisan ini akan memberikan informasi tentang pengaruh berbagai konsentrasi Fe (dalam bentuk $FeCl_3$) pada enzim protease dari usus ikan kerapu macan.

Enzim Protease dan Peranannya dalam Pencernaan Ikan

Ikan menghasilkan sejumlah enzim baik di usus maupun lambung untuk mencerna zat-zat makanan dari pakan yang dimakan (Fujaya, 2004). Salah satu di antara enzim tersebut adalah enzim protease. Enzim ini bekerja mendegradasi protein dalam pakan menjadi asam-asam amino dan peptida yang akan diserap oleh sel-sel enterosit pada dinding sebelah dalam usus. Selanjutnya

asam amino dan peptida ini dikirim ke darah untuk digunakan bagi pertumbuhan dan perkembangan ikan.

Ada dua jenis protease yang berperan penting dalam sistem pencernaan ikan yaitu protease pepsin dan protease tripsin. Protease pepsin disekresikan oleh mukosa lambung dan bekerja optimum pada pH asam yaitu berkisar antara pH 2--4. Sedangkan protease tripsin dihasilkan di pankreas dan bekerja optimum pada kisaran pH basa yaitu antara 7--11 (Fujaya, 2004). Berdasarkan struktur sisi aktif, protease pepsin dikelompokkan dalam protease asam dan protease tripsin dikelompokkan dalam protease serin yaitu protease yang mengandung asam amino serin pada sisi aktif enzimnya (Suhartono, 1992). Enzim protease tripsin dihambat sehingga tidak dapat balik oleh PMSF (*phenil methyl sulfonil floride*) yaitu penghambat spesifik (*specific inhibitor*) bagi protease serin.

Kemampuan enzim (aktivitas enzim) dalam mendegradasi protein sangat menentukan kemampuan ikan dalam mencerna asam amino dalam pakan. Semakin tinggi aktivitas enzim protease maka semakin cepat pula protein dalam pakan dapat dicerna dan dimanfaatkan oleh tubuh. Sebaliknya semakin lambat aktivitas enzim protease, maka semakin lama pula protein dicerna dan dimanfaatkan oleh tubuh ikan. Yamin *et al.* (2007) melaporkan bahwa ikan kerapu yang pertumbuhannya lebih cepat memiliki aktivitas enzim yang lebih tinggi dibanding yang pertumbuhannya lebih lambat.

PERMASALAHAN

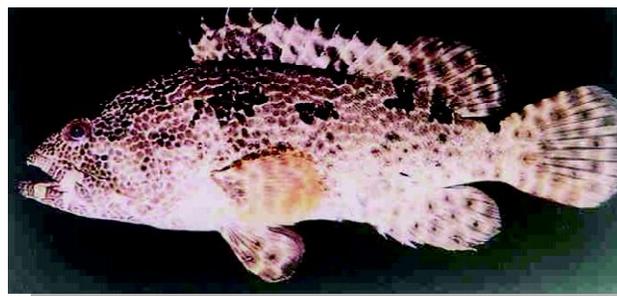
Walaupun kandungan protein tepung darah cukup tinggi, namun pemberiannya dalam pakan ikan harus dibatasi. Hal ini disebabkan karena nilai pencernaan tepung darah yang rendah. Laining *et al.* (2003b) melaporkan bahwa penggunaan tepung darah sebagai bahan substitusi tepung ikan menunjukkan nilai koefisien pencernaan (*digestibility coefficient*) protein kasar rendah (55,2%) dibanding beberapa sumber protein lain seperti kepala udang (78%), ikan sarden (91,3%), ikan rucah (82,4%), kedelai (67,2%), dan minyak kelapa (80,5%). Rendahnya tingkat pencernaan protein dari tepung darah nampaknya berhubungan dengan tingginya kadar Fe pada tepung darah yang dapat mengganggu kerja enzim protease dalam sistem pencernaan ikan. Dilaporkan bahwa tepung darah memiliki kandungan besi berkisar 0,2%--0,3% (Tacon, 1987) atau 2,273 mg/g (Joachim & Pascual, 2000). Sementara Grace *et al.* (1999) melaporkan bahwa khusus untuk tepung darah kuda, kandungan Fe-nya sebesar 2,561 mg/g.

PEMILIHAN IKAN UJI DAN PENGAMBILAN ENZIM PROTEASE

Pemilihan ikan yang akan diuji aktivitas enzim proteasenya adalah langkah awal yang perlu diperhatikan agar enzim protease yang dihasilkan cukup baik. Beberapa hal yang perlu diperhatikan adalah ikan uji yang digunakan adalah memiliki pertumbuhan yang normal, tidak cacat, dan tidak sakit serta memiliki ukuran yang cukup besar.

Mula-mula ikan diberi pakan *moist pellet* dengan kadar protein 45% pada pukul 18.00. Selanjutnya pengambilan enzim dilakukan pada pukul 06.00 atau 12 jam setelah pemberian pakan. Pemberian pakan berkadar protein tinggi pada sore hari dimaksudkan agar ikan dapat menghasilkan cukup banyak enzim protease pada malam hari dan dapat diambil pada pagi hari.

Pengambilan enzim protease dilakukan dengan cara sebagai berikut: Segera setelah ikan dimatikan, ikan dibedah (Gambar 1 dan 2) dan isi usus (cairan dan padatan) dimasukkan dalam tabung *eppendorf* 1,5 mL lalu disimpan pada kotak (*coolbox*) yang telah berisi es lalu dibawa ke laboratorium. Selanjutnya untuk memisahkan antara enzim kasar dengan padatan, tabung *eppendorf* disentrifuse dengan kecepatan 6.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan kedalam tabung lainnya dan disimpan dalam refrigerator sampai waktu analisis.



Gambar 1. Ikan kerapu macan dari KJA



Gambar 2. Ikan kerapu macan yang telah dibedah

ANALISIS AKTIVITAS PROTEASE

Aktivitas protease diukur secara kuantitatif dengan metode Bergmeyer (Bergmeyer *et al.*, 1983) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 50 μ L larutan enzim ditambahkan kedalam tabung *ependorf* yang berisi 250 μ L casein hammarsten 2% (berat/volume) dan 250 μ L *bufer universal* 20 mM pH 8,0. Untuk blanko dan standar, enzim diganti masing-masing dengan akuades dan tirosin 5 mM.

Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan cara penambahan 500 μ L TCA 0,1 M. Pada blanko dan standar ditambahkan 50 μ L larutan enzim, sedangkan pada sampel ditambahkan 50 μ L akuades. Kemudian larutan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit.

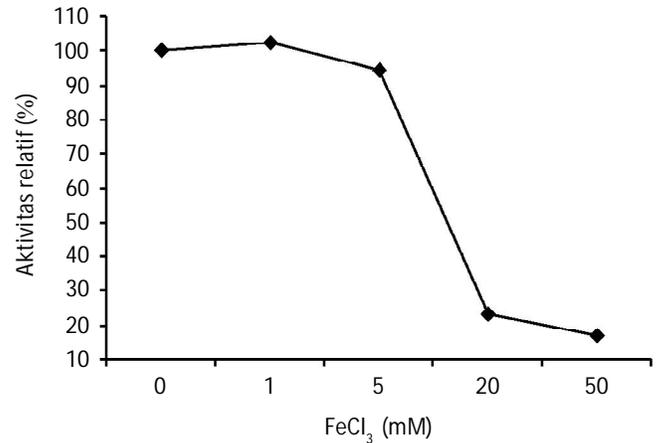
Sebanyak 375 μ L supernatan ditambahkan kedalam tabung berisi 1,25 mL Na_2CO_3 0,4 M dan 250 μ L pereaksi folin ciocalteau 2:1, lalu diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 20 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 578 nm. Satu unit aktivitas protease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan satu μ mol produk tirosin per menit pada kondisi pengukuran. Aktivitas enzim dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$Y = \frac{\text{Abs Sampel} - \text{Abs Blanko}}{\text{Abs Standar} - \text{Abs Blanko}} \times \frac{\text{Faktor Pengenceran}}{\text{Waktu}}$$

$FeCl_3$

Pengaruh $FeCl_3$ terhadap aktivitas enzim protease dilakukan dengan cara menambahkan $FeCl_3$ pada larutan enzim sampai konsentrasi akhir 1, 5, 20, dan 50 mM, kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu ruang. Selanjutnya diuji sisa aktivitas residunya secara kuantitatif (dengan metode Bergmeyer).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa logam $FeCl_3$ pada konsentrasi rendah memberikan pengaruh baik bagi aktivitas enzim namun pada konsentrasi tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim protease dari usus ikan kerapu macan (Gambar 3). $FeCl_3$ dengan konsentrasi 1 mM cenderung meningkatkan aktivitas enzim sampai dengan 2%. $FeCl_3$ pada konsentrasi 5 mM, dapat menurunkan aktivitas enzim sampai 5,4%. Sementara pada konsentrasi 20 mM dan 50 mM menyebabkan enzim kehilangan aktivitasnya masing-masing sebesar 76,54% dan 83,08%.



Gambar 3. Pengaruh $FeCl_3$ pada aktivitas enzim protease usus ikan kerapu macan

Dengan memperhatikan hasil tersebut di atas (Gambar 3) nampaknya bahwa kadar ion Fe yang cukup tinggi di tepung darah memberikan pengaruh buruk bagi sistem pencernaan ikan kerapu macan khususnya menurunkan kecernaan protein. Selain itu, proses pencernaan protein dari sumber lainnya (tepung ikan dan ikan rucah) bila dibuat bersama tepung darah juga terganggu akibat terganggunya aktivitas enzim protease tersebut.

Beberapa faktor menentukan kerja enzim dalam proses pemecahan (degradasi) substrat di antaranya struktur enzim, struktur substrat, dan kondisi lingkungan di mana reaksi itu terjadi. Reaksi pemecahan substrat diawali dari terbentuknya kompleks enzim-substrat dan diikuti proses pemecahan substrat (Lehninger, 1982). Kedua reaksi ini dapat berjalan dengan baik apabila kondisi lingkungan di sekitarnya mendukung, di antaranya ion-ion logam. Pengaruh ion logam ini antara lain dapat mempengaruhi sisi aktif enzim dan kestabilan molekul protein (Suhartono, 1989). Pada konsentrasi tinggi, ion logam dapat mengganggu kestabilan molekul enzim maupun ikatan antara enzim dengan substratnya (Suhartono, 1989).

Adanya penghambatan aktivitas enzim protease oleh ion logam juga telah dilaporkan dalam beberapa hasil penelitian lain. Yamin (2004) melaporkan bahwa enzim protease serin dari *Bacillus subtilis* rekombinan R1 dihambat akitivitasnya oleh penambahan $FeCl_3$ 1 mM sampai lebih dari 25%.

KESIMPULAN DAN SARAN

Ion Fe (besi) dapat mempengaruhi aktivitas enzim protease dari usus ikan kerapu macan. Semakin tinggi kadar besi ($FeCl_3$), maka semakin besar pula penurunan aktivitas enzim protease kecuali pada kadar 1 mM atau kurang. Pada konsentrasi 20 mM atau lebih, maka

persentase kehilangan aktivitas proteolitik dari enzim protease usus ikan kerapu sangat besar yaitu lebih dari 75%.

Berdasarkan hasil tersebut, maka disarankan: a) untuk melakukan pengujian secara *in vivo* (*bioassay*) tentang pengaruh Fe pada konsentrasi yang berbeda terhadap pencernaan pakan; b) untuk pemanfaatan tepung darah pada pakan ikan kerapu macan perlu dilakukan pengurangan kadar Fe-nya terlebih dahulu; dan c) untuk melakukan penelitian bahan baku pakan alternatif bagi ikan kerapu macan perlu dilakukan analisis kadar logam khususnya besi (Fe).

DAFTAR PUSTAKA

- Bergmeyer, H.U., M. Grabl, and H.E. Walter. 1983. Enzymes. *Di dalam* Bergmeyer, H.U. dan Grapl, M. (Eds.): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. 11. Verlag Chemie, Weinheim. 539 pp.
- Calvert, J.B. 2003. Iron. The metal of Mars gives us magnetism and life. <http://www.du.edu/~jcalvert/phys/iron.htm>. (visited April 2006).
- Fujaya, Y. 2004. Fisiologi Ikan. Dasar Pengembangan dan Teknik Perikanan. Rineka Cipta. Jakarta. 179 pp.
- Grace, N.D., S.G. Perce, E.C. Firth, and P.F. Fennessy. 1999. Content and distribution of macro-and micro-elements in the body of pasture-fed young horses. *Aust vet J.* 77(3): 172—176.
- Joachim, W.H. and F.P. Pascual. 2000. Hand book on ingredients for aquaculture feeds. Kluwer Academic, Netherlands. 573 pp.
- Kabangnga, N., Burhanuddin, Usman, S. Lante, dan Kamaruddin. 2004. Kebutuhan optimum protein dan energi pakan pembesaran ikan kerapu macan di tambak. Laporan Hasil Penelitian. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros. 10 pp.
- Laining, A., N. Kabangnga, dan Usman. 2003a. Pengaruh protein pakan yang berbeda terhadap koefisien pencernaan nutrisi serta performansi biologis kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dalam keramba jaring apung. *J. Pen. Perik. Indonesia.* 9(2): 29—34.
- Laining, A., Rachmansyah, T. Ahmad, and K. Williams. 2003b. Apparent digestibility of selected feed ingredients for humpback grouper, *Cromileptes altivelis*. *Aquaculture.* 218: 529—538.
- Lehninger, A.L. 1982. Principles of Biochemistry. Worth Publisher Inc. Alih bahasa, Maggy T. Suhartono. 369 pp.
- Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 322 pp.
- Suhartono, M.T. 1992. Protease. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. 154 pp.
- Tacon, A.G.J. 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp—a training manual. 1. The essential nutrients. Food And Agriculture Organization of The United Nations. Brasilia, Brazil. <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB470E/AB470E00.htm> (visited 08 May 2006).
- Usman dan N.N. Palinggi. 2005. Manajemen pemberian pakan. Makalah dipresentasikan pada kegiatan “sertifikasi bidang keahlian untuk staf pengajar bidang pertanian jurusan perikanan”, tanggal 20—24 Juni 2005 di BRPBAP, Maros-Sulawesi Selatan. Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros. 14 pp.
- Yamin, M. 2004. *Pemurnian dan karakterisasi enzim protease serin dari Bacillus subtilis rekominan R1*. Tesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 70 pp.
- Yamin, M., N.N. Palinggi, Usman, dan Rachmansyah. 2007. Aktivitas enzim protease usus pada ikan kerapu macan *Epinephelus fuscoguttatus* pada ukuran berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Kelautan III, Pembangunan kelautan berbasis iptek dalam rangka peningkatan kesejahteraan masyarakat pesisir*. Universitas Hang Tuah, Surabaya. p. 40—44.