

EKSTRAKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM PEPSIN DARI LAMBUNG IKAN TUNA (*Thunnus albacares*)

Ewi Pasaribu*, Tati Nurhayati, Mala Nurilmala

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat

Telepon (0251) 8622909-8622906, Faks. (0251) 8622915

*Korespondensi: nurhayati7870@yahoo.com

Diterima: 14 Oktober 2018 / Disetujui: 14 Desember 2018

Cara sitasi: Pasaribu E, Nurhayati T, Nurilmala M. 2018. Ekstraksi dan karakterisasi enzim pepsin dari lambung ikan tuna (*Thunnus albacares*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(3): 486-496.

Abstrak

Lambung ikan merupakan limbah hasil samping perikanan yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber enzim pepsin, misalnya dari lambung ikan tuna. Tujuan penelitian ini adalah melakukan ekstraksi enzim pepsin dari lambung tuna dan karakterisasi enzim pepsin hasil dialisis. Proses ekstraksi pepsin diawali dengan memisahkan cairan dinding lambung ikan dengan penambahan buffer Tris-HCl pH 7,5, lalu dilanjutkan dengan presipitasi fraksi ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) dari 20% hingga 80% secara bertingkat dilanjutkan dengan dialisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar enzim pepsin memiliki aktivitas spesifik 0,251 mg/mL. Ekstrak enzim pepsin hasil presipitasi dengan fraksi 30-40% memiliki aktivitas 4,274 U/mg dan enzim pepsin hasil dialisis memiliki aktivitas 5,137 U/mg. Enzim pepsin lambung tuna hasil dialisis memiliki suhu kerja pada kisaran 20-60°C dan pH kerja pada kisaran pH 2-3,5. Ion logam FeCl_3 dan ZnCl_2 meningkatkan aktivitas enzim pepsin sebesar 2,97 kali dan 1,92 kali.

Kata kunci: Aktivitas enzim, pepsin, presipitasi

*Extraction and Characterization of Pepsin Enzyme from Tuna (*Thunnus albacares*) Gastric*

Abstract

Fish gastric is a by-product of fishery waste that has the potential to be developed as a source of pepsin enzyme, such as tuna gastric. The purpose of this study was to extract pepsin from tuna gastric and characterize the enzyme pepsin after dialysis step. The extraction process of pepsin carried out by separating the gastric wall fluid by adding Tris-HCl buffer pH 7.5, then proceed by ammonium sulphate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) fractional precipitation from 20% to 80% followed by dialysis. The results showed that the crude extract of the pepsin enzyme had a specific activity of 0.251 mg/mL. Pepsin extract from precipitation with 30-40% fraction had 4.274 U / mg activity and after dialysis, pepsin had 5.137 U / mg activity. The pepsin obtained from gastric tuna had a working temperature in the range of 20-60°C and the working pH is in the pH range 2-3.5. The metal ion, namely FeCl_3 and ZnCl_2 increased the activity of the pepsin by 2.97 times and 1.92 times.

Keywords: Enzyme activity, pepsin, precipitation

PENDAHULUAN

Limbah perikanan tuna terdiri dari bagian kepala 17%, kulit 8%, jeroan 5%, tulang 4% dan sirip 2% (Sayana dan Siraajudheen 2017). Limbah industri perikanan secara umum telah banyak diteliti sebagai produk hasil samping, antara lain pemanfaatan tulang dan kulit ikan dalam menghasilkan gelatin

(Nurilmala *et al.* 2006; Wiratmaja 2006; Lombu *et al.* 2015; Nurilmala *et al.* 2017; Naiu *et al.* 2018; Gunawan *et al.* 2017). Pemanfaat hasil samping industri filet ikan patin dan jeroan kakap putih untuk hidrolisat protein (Nurilmala *et al.* 2018; Nurhayati *et al.* 2014), tepung tulang sebagai pembuatan material biokeramik,

hidroksiapatit, dan fortifikasi kalsium pada kerupuk ikan (Riyanto *et al.* 2013; Hanura 2017; Yuliani *et al.* 2018), kulit ikan untuk penyamakan (Alami 2017) dan ekstraksi kolagen (Nalinanon 2010; Hardiyanti 2014).

Jeroan ikan termasuk lambung, usus serta limfa dimanfaatkan dalam pembuatan pupuk (Giyatmi dan Irianto 2017), media bakteri yaitu pepton (Saputra dan Nurhayati 2013) dan *recovery enzim* (Bougatef *et al.* 2008; Wu *et al.* 2009). Lambung ikan tuna merupakan salah satu sumber peptida dan asam amino yang baik, namun belum dimanfaatkan secara maksimal. Ekstraksi dan *recovery enzim* merupakan salah satu tindakan pengolahan limbah industri perikanan menjadi hasil samping yang dimanfaatkan. Lambung ikan merupakan sumber protease salah satunya adalah enzim pepsin. Pepsin disintesis dan disekresikan di dalam membran lambung dalam keadaan tidak aktif yang disebut pepsinogen dengan berat molekul 40 kDa. Pepsinogen mengandung 44 asam amino tambahan dan stabil dilingkungan alkali yang netral dan lemah, namun bila terkena asam hidroklorida (HCl) yang terdapat pada cairan lambung (pH 1,5 – 2,0), 44 amino proteolitik dikeluarkan secara autokatalitik menjadi pepsin. Peran utama pepsin pada proteolisis adalah membelah asam amino aromatik (fenilalanin dan tirosin) dari N-terminal protein (Raufman 2004).

Pepsin banyak diaplikasikan pada industri makanan salah satunya sebagai bahan tambahan untuk membuat kecap ikan, hidrolisat protein (Ohsima dan Giri 2014). Pepsin berperan sebagai biokatalisator yang dapat meningkatkan kecepatan reaksi kimia spesifik, yang apabila tanpa enzim berlangsung lambat (Suptijah 1998). Jongjareonrak *et al.* (2005) menggunakan pepsin sebagai substitusi rennet dalam pembuatan keju. Produksi enzim pepsin saat ini merupakan salah satu tantangan bagi industri karena tingkat biaya produksi yang mahal, selain itu diperlukan kajian untuk mengetahui sumber enzim pepsin selain dari babi dan sapi karena berkaitan dengan kehalalan enzim pepsin. Kajian yang dapat mendukung hal tersebut salah satunya dilakukan penelitian mengenai pemurnian

dan karakterisasi enzim pepsin yang berasal dari ikan. Tujuan penelitian ini adalah ekstraksi enzim pepsin dari lambung tuna dan karakterisasi enzim pepsin hasil dialisis.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah EDTA (Titriplex III) (Merck, Jerman), HCl, Sephadex G-75 (Sigma Aldrich, US), Hemoglobin (Sigma Aldrich, US), TCA (Merck, Jerman), *bovine serum albumin* (AppliChem, Jerman), *coomassie brilliant blue* (CBB) R-250 *staining solution* (Bio-Rad Laboratories, US), kertas saring *Whatman* 1, etanol 96% (Merck, Jerman).

Peralatan yang digunakan untuk preparasi sampel, ekstraksi dan purifikasi enzim pepsin di antaranya sentrifuse (*J2-21 BECKMAN*, Jerman), spektrofotometer (*Spectro UV-VIS 2500*, Jerman), pipet mikro (*Thermo Scientific Vantaa*, Finlandia), pH meter (*Thermo Electron*, Finlandia).

Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 3 tahap, yaitu 1) ekstraksi enzim pepsin dari lambung ikan tuna dan 2) purifikasi enzim pepsin yang meliputi tahap presipitasi dengan ammonium sulfat dan dialisis 3) karakterisasi enzim hasil dialisis.

Ekstraksi enzim pepsin dari lambung ikan tuna

Jeroan ikan terutama lambung ikan tuna diperoleh dari perairan Gorontalo, Sulawesi. Bagian lambung dipisahkan dan dibersihkan dari kotoran dibawah air mengalir. Preparasi isi perut ikan meliputi pemisahan isi perut atau mukosa (lapisan lendir dari perut yang mengandung kelenjar dan lambung yang merupakan sumber pepsinogen) dari organ lain pada jeroan ikan. Isi perut ikan disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan, hal tersebut dilakukan untuk meminimalisir autolisis protease. Ekstraksi enzim menggunakan metode Bougatef *et al.* (2008). Sampel dihomogenisasi dengan rasio 1:2 (w/v) menggunakan buffer 10 Mm Tris-HCl pH 7,5 kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 g.

Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar enzim pepsin. Perhitungan unit aktivitas enzim dihitung dari hasil perkalian jumlah kenaikan enzim tiap 1,0 pada absorbansi dengan panjang gelombang 280 nm per menit pada kondisi pengujian.

Perhitungan unit aktivitas menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[1 \times (\text{absorbansi sampel} - \text{absorbansi blanko}) \times \text{faktor pengenceran}] / \text{waktu inkubasi}$$

Presipitasi enzim pepsin lambung ikan tuna menggunakan ammonium sulfat

Pemurnian setelah tahap ekstrak kasar dengan cara presipitasi. Presipitasi dilakukan untuk mengendapkan protein-protein yang menjadi target pemurnian. Bahan yang digunakan pada tahap ini adalah garam ammonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan MgSO_4 . Ekstrak kasar ditambahkan garam sedikit demi sedikit secara bertingkat menjadi 7 fraksi yaitu 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70% dan 70-80%.

Dialisis enzim pepsin lambung ikan tuna

Dialisis dilakukan dengan tujuan untuk pemekatan, pembuangan garam serta pemurnian bahan-bahan misalnya protein, hormon dan enzim. Sampel yang sudah dimasukkan dalam kantung dialisis selanjutnya dicelupkan dalam buffer Tris-HCl pH 7,5 dengan pengenceran 1000 kali dan distirer selama 6; 12 dan 24 jam.

Prosedur Analisis

Aktifitas enzim pepsin

Aktifitas enzim pepsin ditentukan menggunakan hemoglobin sebagai substrat berdasarkan Bougatef *et al.* (2008) dengan modifikasi. Sampel enzim 50 μL diencerkan dengan tepat dicampur dengan 100 μL larutan terdiri dari 2% asam-denaturasi bovine hemoglobin kemudian ditambahkan 350 μL buffer yang mengandung 100 mM glisin-HCl dengan pH 2. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, reaksi segera dihentikan dengan penambahan

500 μL asam trikloroasetat (TCA) 8,0%. Campuran disentrifugasi (10.000 g) selama 15 menit pada suhu 4°C, setelah itu absorbansi supernatan diukur pada panjang gelombang 280 nm. Aktifitas satu unit pepsin terhadap hemoglobin didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkatalisis peningkatan 1,0 dalam absorbansi pada 280 nm per menit di bawah kondisi pengujian.

Konsentrasi protein

Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford (1976) dengan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar. Pereaksi Bradford dibuat dengan melarutkan 10 mg *coomasie brilliant blue* dalam 5 mL etanol 95%, lalu ditambahkan dengan 10 mL asam fosfat 85% (b/v). Akuades sebanyak 250 mL ditambahkan hingga larutan tercampur sempurna kemudian disaring dengan kertas saring *Whatman* nomor 1 sesaat sebelum digunakan.

Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan mencampurkan 0,1 mL sampel dan 5 mL pereaksi Bradford ke dalam tabung reaksi kemudian diinkubasi selama 5 menit dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Larutan standar didapatkan dengan cara melarutkan BSA (Aplichem) yang dijadikan larutan stok dengan konsentrasi 2 mg/mL, kemudian dari larutan stok standar dibuat rentang standar pada konsentrasi 0,1 – 1,0 mg/mL. Pengukuran absorbansi larutan standar dilakukan sama seperti larutan sampel.

Karakterisasi enzim pepsin hasil dialisis

Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan pH substrat dan pH buffer yang sama dengan variasi pH 2; 2,5; 3; 3,5; 4 dan 5 berdasarkan metode Nalinanon *et al.* (2010). Substrat yang digunakan adalah hemoglobin 2%. Larutan enzim sebanyak 0.1 mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0.7 mL buffer glisin-HCl pH 2 dan 0.2 mL larutan hemoglobin 2% (b/v) pH 2 pada suhu 37°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL TCA 8% (w/v). Campuran kemudian dipisahkan dengan

sentrifugasi suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 g. Supernatan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan melakukan variasi suhu inkubasi pada saat pengujian aktivitas enzim pepsin dengan suhu 20; 30; 40; 50; 60 dan 70°C berdasarkan metode Nalinanon *et al.* (2010). Larutan enzim sebanyak 0,1 mL ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,7 mL buffer glisin-HCl pH 2 dan 0,2 mL larutan hemoglobin 2% (b/v) pH 2 pada suhu tersebut selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL TCA 8% (b/v). Campuran disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 10.000 g. Supernatan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Penghambatan inhibitor

Karakterisasi pengaruh inhibitor dan ion logam dilakukan dengan menambahkan inhibitor yaitu EDTA dan molybdate serta ion logam *monovalent* (NaCl), *bivalent* (ZnCl₂, CaCl₂.2H₂O, MgCl₂, MnCl₂.4H₂O, Cu₂SO₄.5H₂O) dan *trivalent* (FeCl₃) berdasarkan Nalinanon *et al.* (2010). Substrat hemoglobin 2% pH 2 sebanyak 0,2 mL dicampurkan dengan 0,7 mL larutan glisin-HCl pH 2 ditambahkan dengan 0,1 mL larutan logam (NaCl, ZnCl₂, CaCl₂.2H₂O, MgCl₂, MnCl₂.4H₂O, Cu₂SO₄.5H₂O, FeCl₃) dan larutan inhibitor (EDTA, molybdate) dan ditambahkan 0,1 mL larutan enzim kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL TCA 8% (b/v). Campuran disentrifugasi pada suhu 4°C kecepatan 10.000 g kemudian

supernatan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 280 nm, selain itu, dilakukan pula pengukuran absorbansi untuk larutan blanko dengan prosedur yang sama seperti larutan sampel namun enzim digantikan dengan akuades.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ikan tuna sirip kuning merupakan ikan karnivor yang hidup dengan memakan ikan-ikan kecil dengan presentase berkisar 14%, udang 3%, cumi-cumi 0,3% dan 3% lainnya yang tidak teridentifikasi (Jatmiko 2018). Komposisi kimia jeroan ikan dapat dilihat pada *Table 1*. Lambung ikan tuna sirip kuning memiliki kadar protein yang tinggi yaitu 18,96%. Studi yang dilakukan oleh Miazwir (2012) menyatakan bahwa ikan tuna sirip kuning yang ditangkap di perairan Samudra Hindia memiliki kapasitas bobot perut sebesar 7% dari total berat tubuhnya. Lambung ikan tuna yang merupakan sumber protein yang signifikan, begitu pula untuk komponen lainnya antara lain asam lemak rantai panjang, lipoprotein, fosfolipid, vitamin larut air maupun komponen bioaktif lainnya (Shirahigue *et al.* 2016).

Lambung ikan tuna mempunyai dinding sel epitelium yang mengandung kelenjar sel *oxyntic* yang berisi pepsinogen yang merupakan bentuk tidak aktif dari enzim pepsin (Gildberg 1992). Kadar protein yang tinggi dari dinding lambung ikan tuna kemungkinan mempengaruhi kadar pepsinogen yang terdapat didalamnya. Jeroan prnghasil enzim pencernaan, khususnya protease dengan aktivitas yang tinggi pada rentang pH dan suhu tertentu. Berbagai enzim proteolitik pencernaan diisolasi dari organ dalam tubuh ikan. Enzim proteolitik yang

Table 1 Comparison of fish stomach chemical composition

Source	Moisture (% bb)	Ash (% bb)	Lipid (% bb)	Protein (% bb)
<i>Skipjack viscera</i> ¹⁾	75.09	0.87	0.87	16.72
<i>Sturgeon viscera</i> ²⁾	39	5.76	15.68	15.48
<i>Yellowfin tuna stomach</i>	76.02	0.59	0.54	18.96

Note : 1) Nurhayati *et al.* (2013); 2) Ovissipour *et al.* (2008)

paling penting dari limbah jeroan ikan adalah pepsin yang merupakan aspartat protease dan trypsin yaitu serin protease, chymotrypsin dan elastase (Cancre *et al.* 1999; Gildberg 1992; Shahidi dan Kamil 2001).

Ekstrak Kasar Enzim Pepsin Lambung Ikan Tuna

Hasil ekstraksi kasar yang didapat dari hasil sentrifugasi larutan homogen lambung ikan dan buffer Tris-HCl pH 7,5 dengan rasio 1:2 berupa supernatan dengan nilai rendemen 64,5% berwarna kecoklatan. Teknik sentrifugasi digunakan untuk mengendapkan bagian padat dinding lambung sehingga dapat memisahkan supernatan yang merupakan ekstrak kasar enzim dengan endapan. Sentrifugasi dilakukan pada suhu rendah untuk mencegah terjadinya kerusakan enzim. Penggunaan buffer dapat memengaruhi aktivitas enzim yang diperoleh. Jurado *et al.* (2012) menyatakan bahwa pepsinogen pada ekstrak kasar memiliki aktivitas enzim yang tinggi dibanding ekstrak kasar yang terkoagulasi maupun ekstrak kasar terliofilisasi. Konsentrasi protein pada ekstraksi kasar enzim didapat yaitu 0,506 mg/mL, sedangkan aktifitas enzim adalah yaitu 0,127 U/mL. Zhao *et al.* (2011) menyatakan bahwa pH larutan memengaruhi proses ekstraksi pepsinogen. Kisaran pH 7 sampai 7,5 adalah kondisi yang baik untuk menjaga kestabilan enzim dimana pelarut pada proses homogenisasi akan memberi gangguan terhadap sel mukosa sehingga protein terlepas dan larut dalam buffer secara merata.

Presipitat Ammonium Sulfat Enzim Pepsin Lambung Ikan Tuna

Presipitasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *salting out*. Garam netral yang digunakan adalah ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Penambahan garam dilakukan secara bertingkat dengan konsentrasi penambahan 20-80%. Aktifitas spesifik enzim presipitat ammonium sulfat dapat dilihat pada *Figure 1*.

Aktivitas spesifik enzim pada presipitat yang paling tinggi diperoleh pada fraksi 30-40% (*Figure 1*). Zhao *et al.* (2011) menyatakan bahwa fraksi yang rendah seperti 20-30% dapat mengendapkan protein yang tidak diinginkan dengan cara pengendapan.

Klomklao *et al.* (2007) menggunakan fraksi 30-70% untuk memurnikan pepsinogen pada ikan *pectoral rattail* sedangkan Wu *et al.* (2009) dan Bougatef *et al.* (2008) menggunakan fraksi 20-60% untuk mendapatkan tingkat kemurnian yang tinggi pada belut Eropa dan hiu gergaji. Penambahan garam menyebabkan terjadinya peningkatan kekuatan ion dalam larutan serta penarikan terhadap molekul air dan mengakibatkan penurunan efek penolakan dari muatan yang serupa diantara molekul protein yang identik (Chaplin dan Bucke 1990). Hal ini juga menurunkan gaya larut yang berada di sekeliling permukaan molekul protein.

Kadar protein yang tinggi tidak berarti memiliki kandungan enzim pepsin yang tinggi. Peningkatan kadar protein selama presipitasi berlangsung tidak mengakibatkan

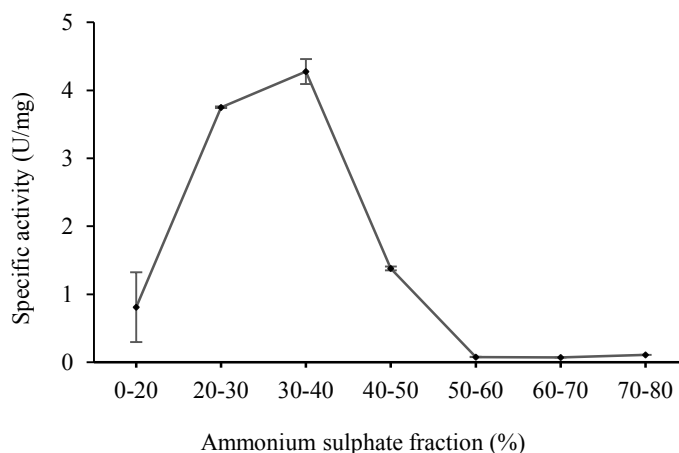


Figure 1 Specific activity on ammonium sulphate precipitate

peningkatan aktifitas enzim spesifik. Protein yang mengendap tersebut tidak hanya mengandung enzim pepsin tetapi enzim protease lainnya atau bahkan protein non enzim yang terukur ketika analisis konsentrasi protein.

Dialisat Enzim Pepsin Lambung Ikan Tuna

Endapan yang diperoleh dari hasil presipitasi dengan garam ammonium sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) kemudian dilakukan dialisis menggunakan membran selofan berukuran 12 kDa. Tujuan penggunaan dialisis adalah untuk pemekatan, pembuangan garam dan memurnikan protein seperti enzim atau hormon. Prinsip dialisis ialah aplikasi preparasi enzim ke dalam kantong dialisis yang terbuat dari membran semi-permeabel yang memungkinkan molekul berukuran kecil untuk bermigrasi (Grogan 2009). Aktifitas spesifik hasil dialisis disajikan pada *Figure 2*.

Figure 2 menunjukkan nilai aktifitas spesifik enzim pepsin pada tahap presipitasi yang diberi perlakuan dialisis selama retang perlakuan 6 jam, 12 jam dan 24 jam. Peningkatan aktifitas terjadi dari dialisis 6 jam yaitu 3,540 U/mg hingga perlakuan dialisis 12 jam yaitu 5,138 U/mg kemudian aktifitas kembali menurun pada dialisis 24 jam menjadi 4,586 U/mg. Penurunan nilai aktifitas spesifik tersebut disebabkan karena protein yang telah dipisahkan berdasarkan ukuran sudah berkurang dalam kantong

selofan, dengan berkurangnya jumlah protein sehingga mempengaruhi nilai aktifitas spesifik enzim.

Karakteristik Enzim Pepsin Lambung Ikan Tuna

Derajat keasaman (pH) optimum

Derajat keasaman (pH) yang optimum dan stabil akan menghasilkan enzim yang stabil dan memiliki efek yang signifikan terhadap aktifitas enzim pepsin yang dihasilkan. El Beltagy *et al.* (2004) menyatakan bahwa pada penelitian terhadap pepsin I dan II yang di ekstrak dari lambung ikan *bolty* memiliki nilai pH optimum yaitu 2,5. Umumnya jika ikan memiliki lebih dari satu jenis pepsin maka nilai pH optimumnya akan sama. Pepsin adalah jenis protease asam yang stabilitasnya dikaitkan dengan denaturasi protein pada pH dengan nilai diatas 6,0 (Squires *et al.* 1986). Klomklao *et al.* (2007) meneliti tentang pengaruh pH pada *pectoral rattail* dan ditemukan bahwa pepsin A dan pepsin B memiliki stabilitas pada kisaran pH 2 sampai 6, aktifitasnya akan menurun drastis ketika pH melebihi 6. Nalinanon (2010) menyatakan bahwa pepsin pada ikan tuna albakor memiliki stabilitas pada kondisi pH 2 sampai 5. Pengaruh pH terhadap aktifitas unit enzim dapat dilihat pada *Figure 3*.

Figure 3 memperlihatkan bahwa pH enzim pepsin memiliki stabilitas pada kisaran pH 2 sampai 3,5 dan menurun drastis mulai dari pH 4 dan seterusnya hingga 5. Profil

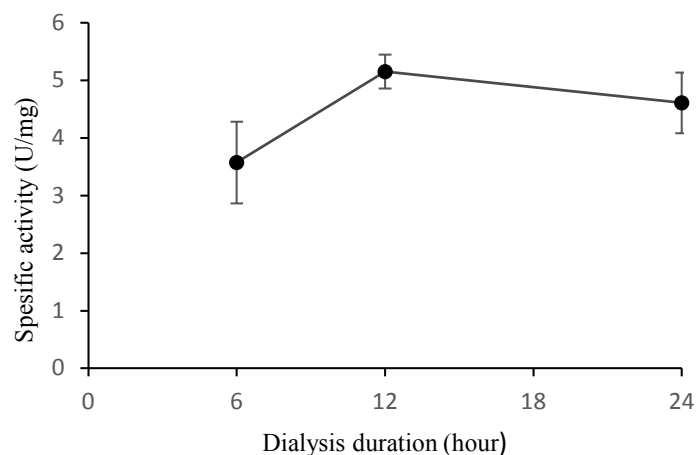


Figure 2 Specific activity of dialysis sample

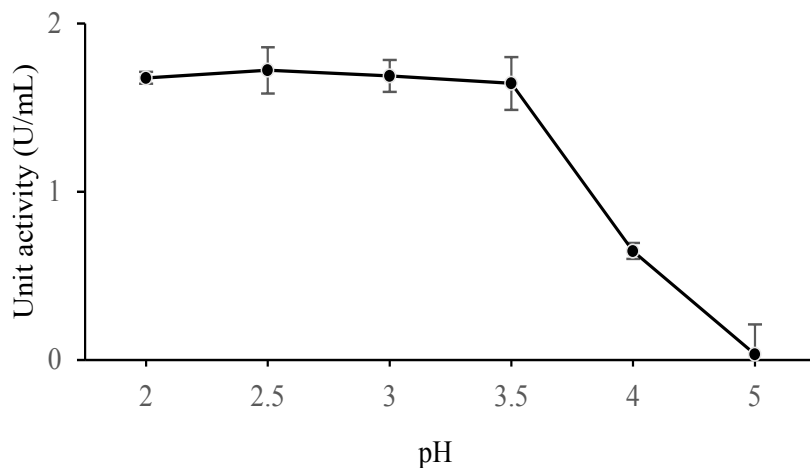


Figure 3 Effect of pH on enzyme unit activity

aktivitas pH enzim menggambarkan pH pada saat pemberi dan penerima proton yang penting pada sisi katalitik enzim berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan. Derajat keasaman tertentu seperti nilai yang ekstrim dapat menyebabkan enzim terdenaturasi yang menyebabkan enzim kehilangan aktivitas biologisnya (Lehninger 1982).

Suhu Optimum

Faktor suhu memberikan pengaruh terhadap laju katalisis reaksi enzimatik. Ketika suhu meningkat sampai tahap batas tertentu dapat meningkatkan aktivitas enzimatik sampai pada kondisi suhu optimum, namun kenaikan suhu yang berlebih mampu memberikan efek menurunnya aktivitas

enzim. Hasil pengujian beberapa tingkatan suhu terhadap aktivitas enzim pepsin dapat dilihat pada *Figure 4*.

Aktivitas unit enzim stabil pada kisaran suhu 20°C hingga 60°C kemudian memiliki penurunan aktivitas diatas suhu 60°C. Penurunan aktivitas unit enzim diduga disebabkan terjadinya denaturasi ketika kenaikan suhu (Nalinanon *et al.* 2010). Habitat ikan yang berbeda-beda dapat memengaruhi karakteristik suhu enzim pepsin seperti ikan karnivora yang hidup di lingkungan subtropis yang memangsa ikan dimana organ pencernaannya harus mampu mencerna protein. Hal tersebut menyebabkan pepsin pada lambung ikan menyesuaikan suhu lingkungan habitatnya (Zhao *et al.* 2011).

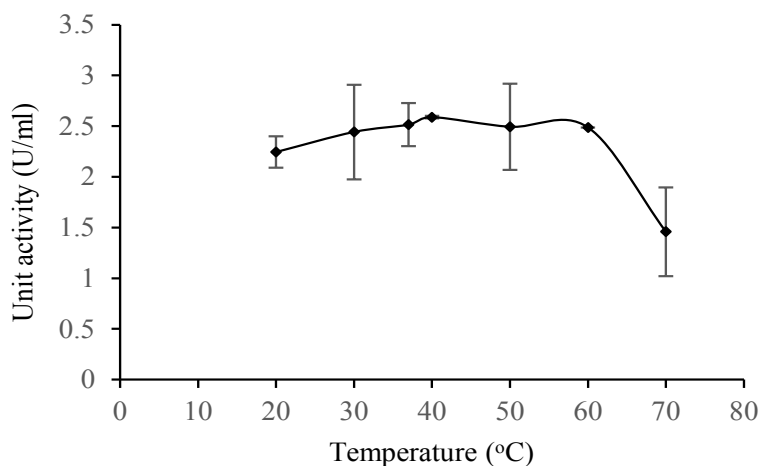


Figure 4 Effect of temperature on enzyme unit activity

Wu *et al.* (2009) melakukan studi pada pepsin dari ikan sidat laut dengan suhu optimum berkisar antara 30°C hingga 50°C. Suhu optimum pada *arctic capelin* yaitu 38°C dan 43°C (Gildberg dan Raa 1983).

Pengaruh ion logam dan inhibitor

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh ion logam melalui dua cara yaitu sebagai aktivator atau sebagai inhibitor, hal tersebut tidak dapat dibedakan reaksinya secara kimiawi, namun dapat dibedakan setelah adanya interaksi yang terjadi ketika enzim dibubuhkan ion logam. Sebagai aktivator, ion dapat berikatan dengan enzim sehingga mempengaruhi kecepatan reaksi enzim, sedangkan sebagai inhibitor interaksi yang terjadi akan menyebabkan penurunan kecepatan reaksi (Suhartono 1989). Ion logam dapat membantu pengikatan antara enzim dengan substrat, selain itu dapat berikatan dengan enzim secara langsung sehingga konformasi aktif enzim menjadi stabil, dan juga dapat berikatan dengan inhibitor enzim sehingga mempengaruhi kerja inhibitor menghambat enzim.. Pengujian pengaruh ion logam terhadap aktivitas enzim menunjukkan adanya pengaruh yang menyebabkan naik dan menurunnya aktivitas enzim Hasil pengujian pengaruh inhibitor terhadap aktivitas enzim pepsin dapat dilihat pada *Figure 5*.

Inhibitor yang banyak digunakan dalam analisa inhibitor enzim yaitu PMSF, E-64, EDTA dan juga pepstatin (Arunchalam dan Haard 1984; Zhao *et al.* 2007; Cao *et al.* 2011). Enzim pepsin merupakan enzim yang tergolong aspartik protease. Uniacke-Lowe dan Fox (2017) menyatakan gugus yang mengandung aspartik protease sangat rentan terhadap pepstatin sebagai inhibitor. Souza *et al.* (2017) menyatakan bahwa ion logam seperti FeCl_2^+ dan ZnSO_4 memiliki aktivitas relatif yang tinggi terhadap aspartik protease dari *Aspergillus foetidus* sama dengan pepsin dari tuna sirip kuning. Beberapa enzim dan inhibitor memerlukan ion-ion tertentu untuk menjaga kestabilan aktivitasnya. Ion-ion tersebut dapat bertindak sebagai inhibitor pada konsentrasi tertentu tetapi juga dapat menjadi aktivator pada konsentrasi yang berbeda. Ion Fe^{3+} dan Zn^{2+} dalam hal ini kemungkinan berperan sebagai aktivator yang dapat menaikkan nilai aktivitas unit enzim. Ion logam dapat membentuk suatu kompleks dengan substrat dan sisi aktif enzim sehingga menggabungkan keduanya dalam membentuk aktif. Ion logam juga berfungsi sebagai senyawa penarik kuat elektron pada tahap tertentu dalam siklus katalitik. Komponen kimia tersebut berfungsi sebagai kofaktor dan pada penelitian ini Fe^{3+} dan Zn^{2+} berperan sebagai kofaktor yang mempercepat kinerja enzim (Lehninger 1982).

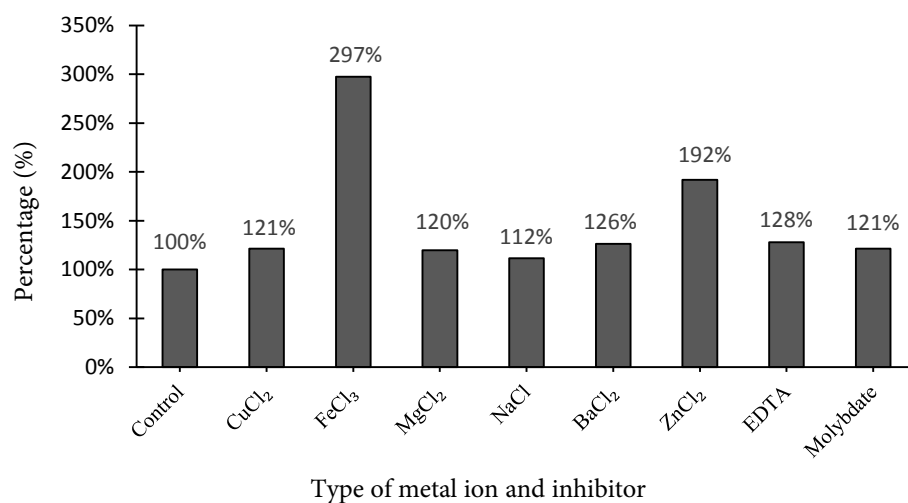


Figure 5 Effect of metal ion and inhibitors on unit enzyme activity

KESIMPULAN

Enzim pepsin dapat diekstraksi dengan buffer TrisCl. Proses presipitasi bertingkat dengan ammonium sulfat dan dialisis dapat meningkatkan aktivitas enzim pepsin. Enzim pepsin lambung tuna hasil dialisis memiliki suhu kerja pada kisaran 20-60°C dan pH kerja pada kisaran pH 2-3,5. Ion logam FeCl₃ dan ZnCl₂ meningkatkan aktivitas enzim pepsin yaitu 2,97 kali dan 1,92 kali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kemenristekdikti melalui Hibah Kompetitif Nasional Skim Penelitian Tim Pascasarjana (PTP) tahun 2018 yang diketuai oleh Prof. Dr. Tati Nurhayati, SPi, MSi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alami R. 2017. Adsorpsi kromium limbah cair penyamakan kulit ikan menggunakan hidroksi apatit tulang ikan tuna. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Arunchalam K, Haard NF. 1984. Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 80(3): 467-473.
- Bougatef A, Balti R, Zaied SB, Souissi N, Nasri M. 2008. Pepsinogen pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*); Purification characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*. 107: 777-784.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 234-254.
- Cancre I, Ravallec R, Van Wormhoudt AV, Stenberg E, Gildberg A and Le GY. 1999. Secretagogues and growth factors in fish and crustacean protein hydrolysates. *Marine Biotechnology*. 1: 489-494.
- Cao MJ, Chen WQ, Du CH, Yoshida A, Lan WG, Liu GM, Su WJ. 2011. Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 158(4): 259-265.
- Chaplin MF, Bucke C. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge (UK): Cambridge University. Pr.
- El-Beltagy AE, El-Adawy TA, Rahma EH, El-Bedawey AA. 2004. Purification characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry* 86:33-39.
- Giyatmi, Irianto HE. 2017. Enzymes in fermented fish. *Advance Food Resources*. 80: 199-216.
- Gildberg A, Raa J. 1983. Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology a Comparative Physiology*. 75: 337-342.
- Gildberg A. 1992. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. *Bioresource Technology*. 39: 271-276.
- Grogan G. 2009. *Practical Biotransformation*. Postgraduates Chemistry Series. Chichester (UK): John Willey & Sons Ltd.
- Gunawan F, Suptijah P, Uju. 2017. Ekstraksi dan karakterisasi gelatin kulit ikan tenggiri (*Scomberomorus commersonii*) dari Provinsi Kepulauan Bangka Belitung. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(3): 568-581
- Hardiyanti STK. 2014. Isolasi kolagen dari kulit ikan patin (*Pangasius sp.*) [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Hanura AB, Trilaksani W, Suptijah P. 2017. Karakterisasi nanohidroksiapatit tulang tuna *Thunnus sp.* sebagai sediaan biomaterial. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 9(2): 619-629.
- Jatmiko PD. 2018. Karakteristik ekstrak kasar pepsin ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*). [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*. 93: 475-484.
- Jurado E, Vicaria JM, Lechuga M, Moya-Ramirez I. 2012. Pepsin extraction process from swine wastes. *Procedia Engineering* 42 : 1346-1350.
- Kamal MM, Ernawati Y, Rahmah Y. 2009.

- Variasi struktur morfoanatomi organ pencernaan dan kaitannya dengan strategi makan serta kebiasaan makanan ikan kekakapan laut dalam (Famili Lutjanidae). *Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*. 16(1): 33-38.
- Klomklao S, Kishimura H, Yabe M, Benjakul S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoidespectoralis*). *Comprehensive Biochemistry Physiology Molecular Biology*. 147:682-689.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jilid 1. M. Thenawijaya, penerjemah. Jakarta (ID): Erlangga. Terjemahan dari : Principle of Biochemistry.
- Lombu FV, Agustin AT dan Pandey EV. 2015. Pemberian konsentrasi asam asetat pada mutu gelatin kulit ikan tuna. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*. 3(2): 25-28.
- Miazwir. 2012. Analisis aspek biologi reproduksi ikan tuna sirip kuning (*Thunnus albacares*) yang tertangkap di Samudra Hindia. [Thesis]. Depok(ID): Universitas Indonesia.
- Naiu AS, Yusuf N. 2018. Nilai sensoris dan viskositas skin cream menggunakan gelatin tulang tuna sebagai pengemulsi dan humektan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 199-207.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. 2010. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry* 121:49-55
- Nalinanon. 2010. Purification, partitioning and uses of fish pepsin for collagen extraction and protein hydrolysate production [Thesis]. Thailand (TH): Prince of Songkla University.
- Nurhayati T. 2000. Pemurnian dan karakterisasi protease *Enteropathogenic Escherichia coli* K1.1 sebagai bahan antigen. [Thesis]. Bogor(ID): Institut Pertanian Bogor.
- Nurhayati T, Salamah E, Cholifah, Nugraha R. 2014. Optimasi proses pembuatan hidrolisat jeroan ikan Kakap putih. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 17(1): 42-52
- Nurilmala M, Wahyuni M, Wiratmaja H. 2006. Perbaikan nilai tambah limbah tulangIkan tuna (*thunnus sp*) menjadi gelatin serta analisis fisika kimia. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 9(2): 22-33
- Nurilmala M, Jacoeb AM, Dzaky RA. 2017. Karakteristik gelatin kulit ikan tuna sirip kuning. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 339-350
- Nurilmala M, Nurhayati T, Roskananda R. 2018. Limbah industri filet ikan patin untuk hidrolisat protein. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 287-294
- Ohsima T, Giri A. 2014. Traditional fish fermentation technology and recent developments. *Enhanced Food Microbiology*. 1:852-869.
- Raufman J. 2004. *Pepsin*. In *Encyclopedia of Gastroenterology*. Amsterdam (NL): Johnson LR. Ed, Academic Press. 3: 147-148.
- Riyanto B, Maddu A, Nurrahman, 2013. Material biokeramik berbasis hidroksiapatit tulang ikan tuna. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 16(2): 119-132
- Saputra D, Nurhayati T. 2013. Produksi dan aplikasi pepton ikan selar untuk media pertumbuhan bakteri. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan*. 16(3) : 215-223.
- Sayana KS, Sirajudheen TK. 2017. By-products from Tuna processing wastes an economic approach to coastal waste management. *Proceedings of the International Seminar on Coastal Biodiversity Assessment*. 411-420.
- Shahidi F, Janak Kamil YVA. 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Science and Technology*. 12: 435-464.
- Shirahigue LD, Silva MO, Camargo AC, Sucasas LFDA, Borghesi R, Cabral ISR, Oetterer M. 2016. The feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25: 265-271.

- Souza PM, Werneck G, Aliakbarian B, Siqueira F, Filho AXF, Perego P, Converti A, Magalhaes PO, Junior AP. 2017. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food Chemistry Toxicology*. 109(2): 1-8.
- Suptijah P. 1998. Ekstraksi protease dari limbah ikan tuna. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. 5(1): 28-32.
- Squires EJ, Haard NF, Feltham LA. 1986. Gastric proteases of the Greenland cod *Gadus ogac*. I. Isolation and kinetic properties. *Biochemistry Cell Biology* 64(3): 205-214.
- Uniacke-Lowe T, Fox PF. 2017. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteases : Structure, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. Chapter 4. *Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology*.
- Wiratmaja H. 2006. Perbaikan nilai tambah limbah tulang ikan tuna (*Thunnus sp.*) menjadi gelatin serta analisis fisika kimia. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Wu T, Sun L, Du C, Cai Q, Zhang Q. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*. 103: 795-801.
- Yuliani, Marwati, Wardana H, Emmawati A, Candra KP. 2018. Karakteristik kerupuk ikan dengan substitusi tepung tulang ikan gabus (*Channa striata*) sebagai fortifikan kalsium. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 258-265.
- Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. 2011. Extraction, Purification and Characterization of fish pepsin : A critical review. *Journal Food Process Technology*. 2:126.
- Zhou Q, Fu XP, Zhang LJ, Su WJ, Cao MJ. 2007. Purification and characterization of sea bream (*Sparus latus* Houuttuyn) pepsinogens and pepsins. *Food Chemistry*. 103: 795-801.