

## Alkaline proteinase in muscle of commercial fishes

### Alkalin proteinase pada otot beberapa ikan laut komersil

Henneke Pangkey\*, Joice R.S.T.L Rimper, and Kurniati Kemer

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi, Jl. Kampus Unsrat Bahu, Manado 95115,  
Sulawesi Utara, Indonesia

\*E-mail: debbiehenneke@gmail.com

**Abstract:** Sea products are valuable resources of natural substances such as lipids, polysaccharides, enzymes, vitamins, and proteins. Fish proteases have been characterized and some purified. Many of these enzymes display potentially interesting new biochemical properties for biotechnological applications. In this research, we have found activity of some proteases (alkaline proteinase, cathepsin S and cathepsin D) in muscle tissues of marine tropical commercial fish species in North Sulawesi (i.e. *Epinephelus fuscoguttatus*, *Caranx ferdau*, *Lutjanus malabricus*, and *Katsuwonus pelamis*). All of these fish are economical species with low prices that are highly consumed by local people©

**Keywords:** enzyme; protease; fish; North Sulawesi.

**Abstrak:** Produk yang berasal dari laut merupakan sumberdaya yang kaya akan bahan-bahan alamiah seperti lipida, polisakarida, enzim, vitamin dan protein. Beberapa enzim protease pada ikan telah diidentifikasi dan dimurnikan. Banyak dari enzim ini menunjukkan potensi yang penting sebagai bahan biokimia yang baru. Pada penelitian ini, kami menemukan beberapa jenis protease (alkalin proteinase, katepsin S dan katepsin D) yang aktif pada otot dari beberapa jenis ikan laut tropis yang komersil di Sulawesi Utara (*Epinephelus fuscoguttatus*, *Caranx ferdau*, *Lutjanus malabricus*, and *Katsuwonus pelamis*). Ikan-ikan ini sangat bernilai ekonomis dan sangat digemari oleh masyarakat lokal©

**Kata-kata kunci:** enzim; protease; ikan; Sulawesi Utara.

### PENDAHULUAN

Enzim protease sangat berperan penting untuk fungsi-fungsi fisiologi serta proses terjadinya penyakit pada organisme hidup. Protease dapat diklasifikasikan menurut enzim *acidic protease*, *neutral* dan *alkaline protease*, yaitu enzim-enzim yang aktif pada pH asam, netral, dan pH basa. Enzim *acidic protease* berperan dalam melembutkan daging pada waktu pengolahan, juga berfungsi dalam proses fermentasi serta sebagai salah satu komposisi pembersih yang bersifat asam (Rao *et al.*, 2007).

Enzim *neutral* dan *alkaline protease* sangat baik digunakan dalam detergen serta industri penyamakan kulit, karena bersifat ramah lingkungan (Rao *et al.*, 1998). Penggunaan enzim *alkaline protease* dalam industri makanan juga sangat penting (Kalisz, 1988; Outtrup and Boyce, 1990), demikian pula pada penggunaan sinar X-ray untuk *recovery silver* (Fujiwara *et al.*, 1991) dan beberapa proses bioremediasi. Protease ini juga

digunakan untuk industri farmasi pada penyembuhan luka bakar dan luka pada umumnya. Keterlibatan peran enzim protease dalam siklus patologi dalam organism hidup menyebabkan perkembangan yang pesat dalam penggunaan bahan obat-obatan untuk penyembuhan terutama pada penyakit-penyakit yang bersifat fatal seperti kanker dan AIDS (Rao *et al.*, 1998). Penggunaan secara oral dari beberapa produk enzim protease untuk pasien luka bakar menunjukkan keadaan di mana proses kesembuhan menjadi sangat cepat (Bogner and Snyder, 1962; Shaw, 1969; Tsomides and Goldberg, 1969).

Studi mengenai enzim alkalin protease pada ikan subtropis telah dilakukan oleh beberapa ahli seperti Makinodan *et. al.* (1982). Pada kesempatan ini, kami melakukan riset tentang alkalin proteinase pada beberapa ikan tropis seperti ikan kerapu macan (*Cephalopolis miniata*), ikan bobara (*Caranx ferdau*), ikan kakap (*Lutjanus malabricus*), dan ikan cakalang (*Katsuwonus pelagis*).

## MATERIAL DAN METODE

### Bahan penelitian

Ikan kerapu macan, bobara, kakap dan cakalang diambil dari nelayan setelah penangkapan dan disimpan dalam wadah yang berisi es (diusahakan sesegar mungkin). Kelompok ikan ini dibawa ke laboratorium untuk diambil dagingnya, masing-masing dengan berat 200 gram.

### Larutan enzim

Masing-masing daging ikan (100 gram) dilarutkan dalam 33 mM fosfat buffer, pH 7,0; kemudian diblender pada kecepatan tertinggi selama 1 menit. Larutan ini didiamkan selama 3 jam pada suhu 4 °C dan disentrifus pada kecepatan 13.000 g selama 30 menit. Supernatan didialisis selama semalam untuk digunakan sebagai larutan enzim.

### Pengukuran protein

Protein diukur dengan menggunakan metode menurut Lowry *et al.* (1951) dengan menggunakan standard Bovine serum albumin.

### Enzim assay

*Aktifitas enzim alkalin proteinase* (Yanagihara, 1991); aktivitas enzim ini diukur dengan cara membuat larutan (volume 1 ml) yang terdiri dari 600 µl larutan 50 mM buffer borat (pH 8,0), 200 µl larutan 10 µM substrat Boc-Val-Leu-Lys-MCA, 200 µl larutan enzim. Larutan ini diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60 °C; reaksi dihentikan dengan menggunakan 1,5 ml larutan stopper (methyl alcohol : n-butyl alcohol : DW = 35:30:35); aktifitas enzim diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 380 nm.

*Aktifitas enzim katepsin S* (Barrett and Kirschke, 1981); aktifitas enzim ini diukur dengan

cara membuat larutan (volume 1 ml) yang terdiri dari 600 µl larutan 100 mM buffer sodium fosfat (pH 7,0), 2 mM sistein dan 2 mM EDTA, 200 µl larutan 5 µM substrat Z-Phe-Arg-MCA, 200 µl larutan enzim. Larutan ini diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C; reaksi dihentikan dengan menggunakan 1,0 ml larutan stopper 0,1 M ClCH<sub>2</sub>COONa-3 mM CH<sub>3</sub>COONa-0,07 M CH<sub>3</sub>COOH. Aktifitas enzim diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 380 nm.

*Aktifitas enzim katepsin D* (Perlmann and Lorand, 1970); aktifitas enzim ini diukur dengan cara membuat larutan (volume 1 ml) yang terdiri dari 600 µl larutan 400 mM buffer sitrat, pH 2,8, 200 µl substrat 2.5% (w/v) larutan Hemoglobin, 200 µl larutan enzim. Larutan ini diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C; reaksi dihentikan dengan menggunakan 1,0 ml larutan stopper 5% (v/v) *Trichloroacetic Acid Solution* (TCA).

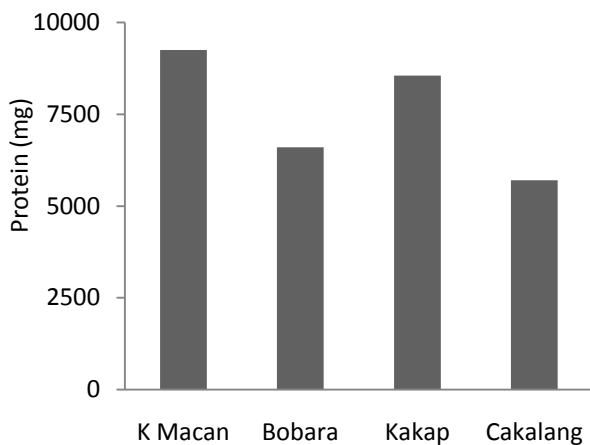
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Besaran protein dan aktifitas protease pada ikan kerapu macan, ikan bobara, ikan kakap dan ikan cakalang dapat dilihat pada Tabel 1, Gambar 1, dan Gambar 2. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim alkalin proteinase, katepsin S dan katepsin D terdapat pada semua otot ikan yang menjadi hewan uji. Hasil menunjukkan, enzim alkalin proteinase terdapat tinggi pada ikan bobara dan ikan kakap, disusul oleh ikan kerapu macan; nilai enzim alkalin proteinase yang paling kecil adalah terdapat pada ikan cakalang.

Katepsin S, yang adalah enzim protease yang aktif pada kondisi netral (pH netral), dijumpai memiliki nilai tinggi pada ikan bobara dan ikan kakap, yang disusul oleh ikan kerapu macan. Ikan cakalang memiliki nilai enzim katepsin S yang

Tabel 1. Aktifitas beberapa enzim protease pada keempat jenis ikan laut

No	Spesis ikan	Protein (mg)	Alkalin proteinase (U/mg protein)	Katepsin S (U/mg protein)	Katepsin D (U/mg protein)
1	Ikan kerapu macan	9250 (8000-10500)	44,7 (40,1-49,3)	21,05 (19,6-22,5)	27,8 (25,4-30,2)
2	Ikan bobara	6600 (5400-7800)	68,7 (60,9-76,5)	33,15 (30,1-36,2)	23,3 (21,2-25,4)
3	Ikan kakap	8550 (7500-9600)	59,2 (55,2-63,2)	27,9 (25,3-30,5)	36,6 (32,3-40,9)
4	Ikan cakalang	5700 (4900-6500)	21,5 (18,6-23,5)	6,65 (6,1- 7,2)	7,5 (6,8-7,9)

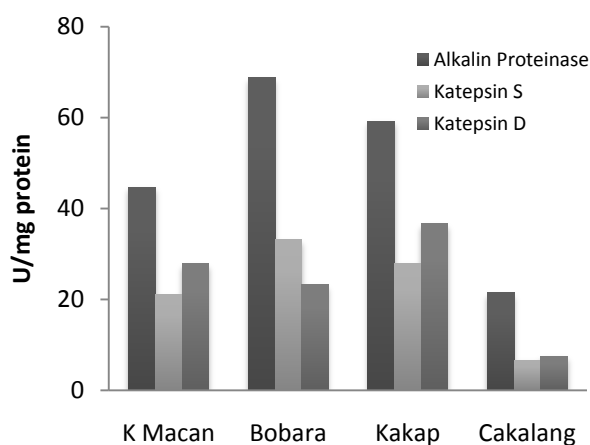


Gambar 1. Perbandingan jumlah protein pada keempat jenis ikan

paling rendah.

Enzim proteinase yang aktif pada pH rendah (kondisi asam) adalah katepsin D, ditemukan memiliki nilai tertinggi pada ikan kakap; sementara ikan kerapu macan dan ikan bobara memiliki nilai yang hampir sama. Ikan cakalang memiliki nilai katepsin D yang paling rendah.

Beberapa spesies ikan yang menunjukkan aktifitas enzim alkalin proteinase pada ototnya adalah seperti pada ikan bandeng (*Chanos chanos*) (Nurhayati et al., 2011), ikan carp (*Catla catla*) (Bhaskar and Mahendrakar, 2007), ikan Atlantic Croaker (*Micropogon undulatus*) (Su et al., 2006) dan ikan mullet (*Mugil sp.*) (Deng, 1981). Dewasa ini, enzim alkalin proteinase dapat diekstraksi pula dari mikroorganisme seperti pada *Bacillus sp.* (Reungsang et al., 2006; Asokan and Jayanthi, 2010). Demikian juga aktifitas katepsin D pada otot



Gambar 2. Diagram perbandingan enzim protease untuk keempat jenis ikan laut

ikan dapat pula ditemui pada ikan pacific sardine (Slutskaia, 1987), ikan mas *Cyprinus carpio* (Makinodan, 2006), ikan cod (McLay, 2006), ikan winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Reddi et al., 2006), ikan gold fish *Carassius auratus* (Dinu et al., 2002), ikan herring *Clupea harengus* (Nielsen and Nielsen, 2001). Katepsin S ditemui memiliki aktifitas pada hepatopankreas ikan mas (Pangkey et al., 2000). Distribusi enzim proteinase bervariasi dan sangat tergantung pada spesies dan organ (Nasri et al., 2011).

Katepsin B, L, dan D ditemukan tersebar dalam otot merah dan putih dari beberapa ikan laut serta ikan perairan tawar (Aoki et al., 2000). Katepsin B dan L dalam otot merah ikan laut lebih tinggi aktifitasnya dibandingkan pada otot putih. Katepsin D dijumpai 1,4 lebih tinggi pada daging dibandingkan pada otot ikan (Cheretab et al., 2006).

Suhu sangat berpengaruh terhadap aktifitas enzim. Pada penelitian ini, ikan diperoleh saat dalam keadaan hidup kemudian dimatikan dan diambil dagingnya dan seluruh proses dilakukan pada kondisi dengan menggunakan es (4°C) sehingga dipastikan kualitas daging ikan yang diperoleh benar-benar segar. Kualitas dan rasa ikan dengan proses penyimpanan yang tepat (-20°C) dapat dipertahankan selama beberapa bulan (Nielsen and Jessen, 2007) dan selama beberapa hari jika disimpan pada 0 °C (Cappeln et al., 1999). Hal ini disebabkan karena selama penyimpanan, kerusakan protein dan lemak dapat dicegah. Ikan tersusun atas protein ( $\pm 20\%$ ), lemak (0,2-25 %) dan air ( $\pm 80\%$ ).

Keberadaan enzim di atas, akan menunjukkan perbedaan laju autolisis pada ikan-ikan ini di mana pH sangat berperan penting. Pada ikan *postmortem* autolisis akan berlangsung pada pH 6,0-6,5. Hal ini terjadi setelah sel-sel otot ikan rusak karena proses pencairan; menyebabkan terlepasnya enzim yang dapat mendegradasi glikogen menjadi asam laktat sehingga menyebabkan terjadinya perubahan pH dalam otot ikan. Fenomena ini menjadi pemicu enzim-enzim proteinase (baik yang aktif pada pH basa, netral maupun asam) menjadi aktif untuk mendegradasi protein dan menyebabkan perubahan tekstur ikan (Singh et al., 2011).

Ukuran ikan juga menentukan degradasi protein. Ikan-ikan berukuran kecil memiliki nilai laju *turn over* protein yang lebih tinggi di mana enzim katepsin D akan menunjukkan aktifitas yang lebih tinggi. Pada hasil penelitian ini, ikan kakap memiliki resiko yang paling cepat terdegradasi,

karena saat penelitian dilakukan, ikan kakap diambil dengan ukuran yang paling kecil (300 gr), disusul oleh ikan kerapu macan (350 gr), ikan bobara (500 gr), dan ikan cakalang (1000 gr).

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ketiga jenis enzim protease (alkalin proteinase, katepsin S, dan katepsin D) yang fungsinya penting sekali dalam mendegradasi protein terdapat dalam otot keempat jenis ikan laut yang dijadikan objek penelitian.

**Ucapan terima kasih:** penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Universitas Sam Ratulangi (UNSRAT), Pimpinan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK), dan Pimpinan Program Studi Ilmu Kelautan, FPIK-UNSRAT, yang telah memberi dana penelitian (IMHERE) hingga penelitian ini dapat terlaksana.

## REFERENSI

- AOKI, T., YAMASHITA, T. and UENO, R. (2000) Distribution of cathepsins in red and white muscles among fish species. *Fisheries Science*, 66, pp. 776-782.
- ASOKAN, S. and JAYANTHI (2010) Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. *Journal of Cell and Tissue Research*, 10 (1), pp. 2119-2123.
- BARRET, A.J. and KIRSCHKE, H. (1981) Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. *Methods Enzymology*, 80, pp. 535-561.
- BHASKAR, N. and MAHENDRAKAR, S. (2007) Chemical and microbiological changes in acid ensiled visceral waste of indian major carp *Catla catla* (Hamilton) with emphasis on proteases. *Indian J. Fish.*, 54 (2), pp. 217-225.
- BOGNER, R.L. and SNYDER, C.C. (1962) High dosage oral chymotrypsin as an adjunct in plastic surgery. *J. Int. College Surg.*, 37, pp. 289-295.
- CAPPELN, G., NIELSEN, J. and JESSEN, F. (1999) Synthesis and degradation of adenosine triphosphate in cod (*Gadus morhua*) at subzero temperatures. *J. Sci. Food Agric.*, 79 (8), pp. 1099-1104.
- CHERETAB, R., DELBARRE-LADRAT, C., DE LAMBALLERIE-ANTON, M. and VERREZ-BAGNIS, V. (2006) Calpain and cathepsin activities in *postmortem* fish and meat muscles. *Food Chemistry*, 101 (4), pp. 1474-1479.
- DENG, J.C. (1981) Effect of temperatures on fish alkaline protease, protein interaction and texture quality. *J. Food Sci.*, 46 (1), pp. 62-65.
- DINU, D., DUMITRU I.F. and NECHIFOR, M.T. (2002) Isolation and Characterization of Two Cathepsins from Muscle of *Carassius auratus gibelio*. *Roum. Biotechnol. Lett.*, 7 (3), pp. 753-758.
- FUJIWARA, N., YAMAMOTO, K. and MASUI A. (1991) Utilization of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray film. *J. Ferment. Bioeng.*, 72, pp. 306-308
- KALISZ, H.M. (1988) Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 36, pp. 1-65.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.
- MCLAY, R. (2006) Activities of cathepsins A and D in cod muscle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31(10), pp. 1050-1054.
- MAKINODAN, Y., AKASAKA, T., TOYOHARA H. and IKEDA, S. (2006) Purification and Properties of Carp Muscle Cathepsin D. *J. Food Sci.*, 47, pp. 647-652.
- MAKINODAN, Y., KYAW, N.N. and IKEDA, S. (1982) Studies on fish muscle protease. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73, pp. 785-789.
- NASRI, R., YOUNES, I., LASSOUED, I., GHORBEL, S., GHORBEL-BELLAAJ, O. and NASRI, M. (2011) Digestive Alkaline Proteases from *Zosterisessor ophiocephalus*, *Raja clavata*, and *Scorpaena scrofa*: Characteristics and Application in Chitin Extraction. *Journal of Amino Acids*, 9.
- NIELSEN, L.B. and NIELSEN, H.H. (2001) Purification and characterization of cathepsin D from herring muscle (*Clupea harengus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128 (2), pp. 351-363.
- NIELSEN, J. and JESSEN, F. (2007) Quality of frozen fish. In: Nollet, L.M.L. (Ed.) *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality*. Blackwell Publishing, pp. 577-586.
- NURHAYATI, T., SALAMAH, E., FENTIANA, N. and NUGRAHA, R. (2011) *Role of*

- Protease Enzyme from Milkfish (Chanos chanos) Offal on Fish Quality Deterioration*. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian.
- OUTTRUP, H. and BOYCE, C.O.L. (1990) Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty C.T, Kelly K. (eds.) *Microbial enzymes and biotechnology*. London: Elsevier, pp. 227-254.
- PANGKEY, H. (2000) Purification and Characterization of Cathepsin S from Hepatopancreas of Carp *Cyprinus carpio*. *Fisheries Science*, 66(6), pp. 1130-1137.
- PERLMANN, G.E. and LORAND, L. (1970). *Methods in Enzymology*, XIX, pp. 316-336.
- RAO, M.B, APARNA, M., TANKSALE, G.S., MOHINI, D.V. and VASANTI. (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, (62), pp. 597-635.
- RAO, K., PRAMEELA, D.Y. and LAKSHMI N.M. (2007) A new acidic protease from *Bacillus badius*. *J. Aqua. Biol.*, 22(1), pp. 1-6.
- REDDI, P. K., CONSTANTINIDES, S. M. and DYMSZA, H. A. (2006) Catheptic activity of fish muscle. *Journal of Food Science*, 37, pp. 643-648.
- REUNGSANG, A., YOSSANA, S. and YASUDA, M. (2006) Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 23(4), pp. 47-50.
- SHAW, P.C. (1969) The use of a trypsin-chymotrypsin formulation in fractures of the hand. *Br. J. Clin. Pract.*, 23, pp. 25-26.
- SINGH P., DANISH M. and SAXENA A. (2011) *Spoilage Of Fish-Process And Its Prevention*. Available from: <http://aquafind.com/articles/spolage.php>. [Accessed 11/11/11].
- SLUTSKAIA, T.N., IGOLKINA, L.A. and SOKOLOVA, E.V. (1987) Isolation of cathepsin D from fish muscle tissue. *Prikl Biokhim. Mikrobiol.*, 23 (4), pp. 447-450.
- SU, H., LIN, T.S. and LANIER, T.C. (2006) Contribution of Retained Organ Tissues to the Alkaline Protease Content of Mechanically Separated Atlantic Croaker (*Micropogon undulatus*). *Journal of Food Science*, 46(6), pp. 1650-1653.
- TSOMIDES, J. and GOLDBERG, R.I. (1969) Controlled evaluation of oral chymotrypsin-trypsin treatment of injuries to the head and face. *Clin.Med.*, 76, pp. 40-45.
- YANAGIHARA, S., NAKAOKA, H. and HARA, K. (1991) Purification and characterization of serine proteinase from white croaker skeletal muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57(10), pp. 133-142.

Diterima: 22 November 2012  
Disetujui: 1 Desember 2012