

Peran penambahan enzim pada pakan buatan terhadap pertumbuhan larva ikan lele afrika *Clarias gariepinus* Burchell, 1822

[Supplemental enzyme in artificial diets for north african catfish larvae *Clarias gariepinus* Burchell, 1822]

Ucu Cahyadi¹, Dedi Jusadi², Ichsan Ahmad Fauzi², Ade Sunarma³

¹Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Departemen Budidaya Perairan, FPIK-IPB

³Balai Besar Perikanan Budidaya Air Tawar Sukabumi

Jl. Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor 16680

cahyadiucu@gmail.com, siflounder@gmail.com, ichsan.a.fauzi@gmail.com, juraganindoor@yahoo.co.id

Diterima: 29 Agustus 2020; Disetujui: 26 Juni 2020

Abstrak

Penambahan enzim pada pakan buatan dengan dosis berbeda untuk ikan lele Afrika *Clarias gariepinus* (bobot awal $0,0048 \pm 0,0001$ g dan panjang total $0,7633 \pm 0,0392$ cm) telah dilakukan selama 12 hari. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efektivitas penambahan enzim pada pakan untuk pertumbuhan larva ikan lele. Cacing sutra (kontrol) dan multienzim ditambahkan pada pakan dengan dosis $0,00 \text{ g kg}^{-1}$ (ME0), $1,00 \text{ g kg}^{-1}$ (ME1) dan $2,00 \text{ g kg}^{-1}$ (ME2) pakan. Masing-masing dari empat perlakuan disusun secara acak dengan empat ulangan. Larva ditebar dalam 150 L dengan kepadatan 1350 ekor per akuarium. Data dianalisis menggunakan SPSS 20, dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil menunjukkan bahwas intasan dan faktor kondisi tidak berbeda nyata antarperlakuan. Nilai panjang dan bobot akhir, jumlah konsumsi pakan, panjang vili dan aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada kontrol ($P < 0,05$) dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lain. Efisiensi pakan kontrol berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Distribusi ukuran panen, pada kelompok kecil (1-2 cm) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, pada kelompok sedang (2-3 cm) dan kelompok besar (3-5 cm) kontrol menunjukkan perbedaan yang nyata, namun antara ME0, ME1 dan ME2 tidak berbeda nyata. Pada perlakuan pakan buatan yang ditambahkan enzim, ME2 dapat meningkatkan bobot dan panjang total 6,25% dan 13,4% dibandingkan ME0. Diduga bahwa penambahan enzim dapat meningkatkan struktur usus dan kinerja pertumbuhan pada larva lele Afrika. Penambahan enzim dengan dosis sampai 2 g kg^{-1} pakan dapat meningkatkan panjang villi usus, namun belum mampu meningkatkan pertumbuhan ikan sebagaimana penggunaan cacing.

Kata penting: *Clarias gariepinus*, larva, cacing sutra, enzim

Abstract

Supplemental enzyme in artificial diets with difference doses for African catfish *Clarias gariepinus* (initial weight of 0.0048 ± 0.0001 g and total length 0.7633 ± 0.0392 cm) were examined for 12 days feeding trial. The aim of this study was to analyze the effectiveness supplemental enzymes in diets for growth performance of catfish larvae. *Tubifex* sp. (control) and a multi enzyme was included at the level of 0.00 (ME0), 1.00 (ME1) and 2.00 g kg^{-1} (ME2 diet as a test diets. Each of the four experimental diets was randomly assigned to four plicate groups. Larva was allocated into 150 L aquaria at a density of 1350 larvae per aquarium. Data was analyzed using SPSS 20, followed by Duncan's test. The result showed that the survival rate and condition factors were no statistical difference between experimental diets and control group. The highest final length, final weight, total food consumption, villi length and enzymes activity were recorded in the Control ($P < 0.05$) and significantly different with other treatments. Feed efficiency's control significantly different with other. Harvest size distribution, in the small size group (1-2 cm) did not show significantly different, in the medium size group (2-3 cm) and large size group (3-5 cm) the *Tubifex* sp. treatment were significantly different from the other treatments ($P < 0.05$) whereas between ME0, ME1 and ME2 treatments were not significantly different. Among the supplemental enzyme in test diets, ME2 can improve weight and total length 6.25% and 13.4%, respectively than ME0 treatment. The results suggested that enzyme supplementation can improve intestinal structure and growth performance of catfish larvae. The supplemental enzyme in diets with doses up to 2 g kg^{-1} can increase intestinal villi's length but have not been able to increase fish growth performance as use worm.

Keywords: *Clarias gariepinus*, larvae, *Tubifex* sp., enzyme.

Pendahuluan

Salah satu faktor kunci keberhasilan dari budidaya ikan lele afrika, *C. gariepinus* adalah

benih berkualitas baik. Dalam proses produksi benih lele afrika, cacing sutra (*Tubifex* sp.) diperlukan sebagai pakan awal sampai tahap

pemeliharaan larva selesai. Dengan demikian ketersediaan cacing sutra menjadi faktor pembatas untuk produksi benih ikan lele. Cacing sutra tidak tersedia sepanjang tahun, terutama pada musim hujan ketika ketersediaan di alam menjadi berkurang (Nurhayati *et al.* 2014). Kekurangan cacing sutra akan meningkatkan harga per literanya, terutama pada daerah-daerah yang ketersediaan cacing sutranya terbatas atau tidak dapat memproduksi cacing sutra sendiri.

Salah satu usaha untuk menyelesaikan masalah ketersediaan cacing sutra ini adalah dengan memberikan pakan buatan sedini mungkin. Usaha untuk mengganti dari pakan alami ke pakan buatan sudah dilakukan oleh Verret & van Tongeren (1989) dengan menggunakan pakan komersial untuk ikan trout (*Onchorhynchus mykiss*) yang diberikan pada ikan larva ikan lele dan hasilnya menunjukkan bahwa pemberian pakan buatan pada umur 5 hari setelah menetas dapat memberikan sintasan larva ikan lele di atas 90%, tetapi, larva yang diberikan pakan buatan pada umur 5 hari memiliki pertumbuhan yang lebih rendah dibandingkan dengan larva yang diberi pakan *Artemia*. Perbedaan pertumbuhan ini berhubungan dengan sistem pencernaan larva yang belum berkembang secara sempurna (Verret *et al.* 1992), oleh sebab itu larva tidak dapat memanfaatkan pakan buatan secara maksimal. Ketidakefektifan perkembangan sistem pencernaan larva tersebut mencakup struktur morfologi maupun kemampuan sekresi enzim. *Artemia* merupakan zooplankton yang mengandung enzim-enzim pencernaan (Lauf dan Hofer 1984), sehingga ketersediaan enzim diduga sangat dominan terhadap rendahnya pertumbuhan larva yang diberi pakan buatan.

Untuk memperbaiki tingkat pertumbuhan yang rendah pada larva yang diberi pakan buatan, penambahan enzim pada pakan dapat menjadi pertimbangan untuk dijadikan sebagai salah satu solusi. Penambahan multienzim pada pakan memecah protein menjadi asam amino dan peptida; lemak menjadi asam lemak, gliserida dan kolesterol; karbohidrat dapat berubah menjadi glukosa yang disimpan dalam bentuk glikogen. Dengan memecah nutrisi-nutrisi tersebut, akan meningkatkan ketersediaan protein lemak dan karbohidrat dalam pakan. Lebih lanjut, beberapa hasil penelitian juga menduga bahwa penambahan multienzim dapat meningkatkan pemanfaatan pakan buatan oleh ikan. Penambahan enzim pada pakan buatan dapat meningkatkan pertumbuhan dengan meningkatkan pencernaan nutrisi pada ikan rainbow trout (*O. mykiss*) (Drew *et al.* 2005, Farhangi & Carter 2007), meningkatkan enzim-enzim pencernaan pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) (Lin *et al.* 2007), meningkatkan perkembangan struktur usus pada ayam broiler (*Gallus domesticus*) (Mathlouthi *et al.* 2002) dan kesehatan usus pada ikan grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) (Zhou *et al.* 2013).

Penelitian lain tentang penambahan kompleks enzim / multi enzim (yang di dalamnya berisi beberapa enzim) dilaporkan oleh Ze *et al.* (2016) bahwa dengan penambahan protease 150 atau 175 mg kg⁻¹ pada pakan dapat meningkatkan retensi protein dan retensi lemak sehingga dapat meningkatkan pemanfaatan pakan dan pertumbuhan ikan komet (*Carrasius auratus*). Hal yang sama, dilakukan pula oleh Lin *et al.* (2013) yang meneliti pengaruh dari penambahan enzim (protease, β -glucanase dan xylanase) pada dosis 1,0 dan 1,5 g kg⁻¹ untuk

Tabel 1. Rancangan percobaan penambahan enzim pada pakan buatan untuk larva ikan lele *C. gariepinus*

Perlakuan	Hari ke- pemeliharaan													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Cacing (K)	Cacing sutra													
ME0	Artemia	Artemia	Pakan buatan tanpa ditambahkan enzim											
ME1			Pakan buatan + enzim dengan dosis 1 g kg ⁻¹											
ME2			Pakan buatan + enzim dengan dosis 2 g kg ⁻¹											

Keterangan :

ME0 : Pakan buatan tanpa ditambahkan enzim, ME1 : Pakan buatan ditambah enzim dengan dosis 1 g kg⁻¹. ME2: Pakan buatan + enzim dengan dosis 2 g kg⁻¹.

kinerja pertumbuhan benih nila hibrida (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) yang diberi pakan dengan pakan berbahan dasar tumbuhan, hasilnya menunjukkan bahwa laju pertumbuhan spesifik, nisbah efisiensi pakan, retensi protein, aktivitas protease dan amilase pada usus dan hepatopankreas meningkat secara signifikan dengan meningkatkan kadar enzim pada pakan. Hal ini diduga bahwa penambahan enzim dari luar dapat meningkatkan pengeluaran enzim dari dalam oleh ikan. Selain itu, Yildirim & Turan (2010), Ghomi *et al.* (2012), dan Zamini *et al.* (2014) menemukan pengaruh positif berbagai macam multi enzim komersial (phytase, xylanase, β -glucanase, β -amylase, cellulase dan pectinase) pada performa pertumbuhan dan efisiensi pakan lele Afrika, ikan beluga (*Huso huso*) dan ikan salmon Caspian (*Salmo trutta*).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efektivitas penambahan enzim pada pakan untuk pertumbuhan larva ikan lele.

Bahan dan metode

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap, terdiri atas empat perlakuan dengan empat ulangan. Perlakuan yang diberikan disajikan pada Tabel 1.

Persiapan pakan

Pakan buatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pakan komersial untuk ikan sidat (PT. Suri Tani Pemuka, JAFPA, Banyuwangi, Indonesia). Pakan uji diberikan pada ikan dalam bentuk pasta. Pakan tersebut mengandung protein 45%, karbohidrat 23%, lemak 3%, serat kasar 2%, abu 16% dan air 11%. Pakan tersebut ditambah enzim dengan nama dagang Superzyme (PT. Bright International, Bogor, Indonesia) dengan kandungan *xylanase*, *glucanase*, *invertase*, *protease*, *cellulase*, *amylase*, *mannanase* dan *pectinase*. Dosis enzim yang digunakan pada perlakuan adalah 0, 1, dan 2 g kg⁻¹. Penambahan enzim pada pakan dilakukan dengan cara sebagai berikut: untuk 1 kg pakan, disiapkan enzim sesuai dengan dosis perlakuan. Enzim ditambah 800 ml air dan 1 butir telur ayam, lalu diaduk dengan menggunakan *blender* sampai homogen. Telur juga ditambahkan pada pakan tanpa enzim namun tidak diberikan pada perlakuan kontrol (cacing). Campuran tersebut disemprotkan ke pakan dengan menggunakan *sprayer* dan diaduk sampai homogen. Pakan disimpan di dalam freezer suhu -25°C sampai diberikan pada ikan. Untuk memastikan kualitas pakan selama penyimpanan maka dilakukan pengukuran enzim pada pakan perlakuan.

Pemeliharaan larva lele

Larva ikan lele berumur 3 hari dengan panjang total rata-rata $0,7633 \pm 0,0392$ cm dan bobot rata-rata $0,0048 \pm 0,0001$ g, diperoleh dari hasil pemijahan buatan dari induk yang dipelihara di Balai Besar Perikanan Budidaya Ikan Air Tawar Sukabumi, Indonesia. Empat hari setelah menetas, larva dihitung dan dimasukkan ke dalam 150 L air yang terdapat pada akuarium berukuran 80 cm x 60 cm x 40 cm. Jumlah larva yang ditebar adalah 1350 ekor per akuarium.

Hari pertama dan kedua pemeliharaan, larva diberi pakan artemia pada pukul 08.00, 12.00, 16.00, 20.00, 24.00 dan 04.00 WIB. Artemia diberikan setelah dipanen dari wadah penetasan, disaring dengan menggunakan jaring plankton 150 μ m, ditakar dengan menggunakan sendok kecil dan diberikan pada masing-masing akuarium. Pada umur 6 hari sampai dengan umur 14 hari, larva diberi pakan sesuai dengan perlakuan. Cacing sutera dan pakan buatan diberikan sebanyak 4 kali sehari, pada pukul 07.00, 12.00, 17.00 dan 22.00 WIB. Jumlah pakan yang diberikan sesuai dengan kebutuhan ikan. Pemberian pakan perlakuan, kecuali cacing, mengikuti metode yang sudah dilakukan oleh Chepkirui-Boit *et al.* (2011) bahwa pakan diberikan pada ikan sekenyangnya dan untuk meminimalkan sisanya, terlebih dahulu pakan dihitung dan dimasukkan ke dalam wadah untuk masing-masing akuarium.

Untuk menjaga kualitas air agar tetap baik, maka setiap hari dilakukan penyifonan kotoran serta penggantian air sebanyak 10 %. Selain itu dilakukan penggantian air sebanyak 70 % setiap 3 hari. Pengukuran suhu dan pH air dilakukan setiap hari selama pemeliharaan, sedangkan pengukuran oksigen terlarut dan amoniak

dilakukan pada awal dan tengah pemeliharaan. Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer, pH menggunakan pH meter dan oksigen terlarut menggunakan DO meter.

Pengambilan dan preparasi sampel

Sebelum dilakukan penebaran, ikan uji ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,01 g untuk penimbangan bobot awal sebanyak 30 ekor dan dilakukan pengukuran panjang total menggunakan penggaris dengan ketelitian 0,1 cm untuk mengetahui rata-rata panjang total awal. Selain itu dilakukan pula pengambilan sampel larva sebanyak 10 g untuk uji aktivitas enzim sebelum diberikan perlakuan. Sebelum dilakukan pengukuran uji aktivitas enzim, sampel ikan disimpan di dalam freezer -80°C.

Akhir pemeliharaan, dilakukan pengambilan sampel untuk aktivitas enzim empat jam setelah larva diberi pakan uji. Ikan diambil dengan menggunakan *scopenet*, masing-masing perlakuan diambil 2 gram. Jumlah ikan yang diambil dihitung, kemudian sampel dimasukkan ke dalam botol sampel dan disimpan di dalam freezer dengan suhu -80°C. Sebelum melakukan uji aktivitas enzim, terlebih dahulu dilakukan preparasi sampel. Sampel larva ikan yang sudah digerus ditambahkan larutan Tris (20 nM Tris HCl, 1mM EDTA, 10 mM CaCl₂, pH 7,5) dengan perbandingan 10%. Lalu dimasukkan ke dalam tabung effendorf dan disentrifuge selama 10 menit 12.000 rpm pada suhu 4°C. Kemudian diambil supernatannya dan dilakukan analisis aktivitas enzim amilase, protease, tripsin dan kimotripsin.

Untuk parameter pengukuran panjang vili, lima ekor benih lele hidup diambil secara acak dari masing-masing ulangan pada hari ke 14,

dibilas dengan *aquadest* kemudian disimpan di dalam larutan Davidson selama 24 jam. Pembuatan preparat histologi terdiri dari beberapa tahapan yaitu dehidrasi, impregnasi, pence-
takan, pemotongan, peletakan pada gelas objek dan pewarnaan dengan menggunakan *hema-
toxylin* dan *eosin*. Preparat histologi digunakan untuk pengukuran panjang vili yang dilakukan dengan bantuan mikroskop.

Parameter uji

Parameter uji biologi dan kimia yang diukur adalah sintasan, bobot akhir dan panjang akhir dan distribusi ukuran panen. Penimbangan bobot dan pengukuran panjang ikan pada awal dan akhir pemeliharaan dilakukan untuk mengetahui laju pertumbuhan ikan. Sintasan dapat diketahui dengan membagi jumlah ikan pada akhir pemeliharaan dengan jumlah ikan pada awal pemeliharaan dikalikan 100%. Pemanenan ikan dilakukan pada hari ke-15. Ikan dipilah berdasarkan ukurannya, yakni kategori S (1-2 cm), M (2-3 cm), dan L (3-5 cm) dengan menggunakan alat *grading* berupa ember plastik yang dilubangi sesuai dengan ukuran ikan. Pada masing-masing ukuran, ikan dihitung jumlahnya untuk menentukan distribusi ukuran panen. Seluruh ikan pada masing-masing ukuran ditimbang menggunakan timbangan digital dengan ketelitian 0,01 g. Total bobot ikan pada setiap ukuran dijumlahkan untuk mengetahui bobot biomassa ikan. Bobot individu ikan di setiap ukuran dapat diketahui dengan membagi bobot total di setiap ukuran dengan jumlah ikan yang ada. Tiga puluh ekor ikan di setiap ukuran diambil, lalu dihitung panjang totalnya menggunakan jangka sorong ketelitian 0,1 cm. Faktor kondisi dihitung menggunakan rumus:

$$k = [W / L^3] \times 100,$$

Keterangan:

W = bobot basah ikan dalam gram

L = panjang dalam sentimeter (Ali *et al.* 2007).

Aktivitas enzim amilase diukur dengan mengikuti metode Worthington (1993). Jumlah sampel yang digunakan minimal sebanyak 2 g. Pengukuran aktivitas amilase dilakukan dengan cara : larutan pati 1% (dalam 20 mM sodium fosfat pH 6,9) yang terkandung dalam 6,0 mM NaCl digunakan sebagai substrat. Kemudian larutan pati tersebut dipipet sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 0,5 ml sampel/contoh dan diinkubasi selama 3 menit pada suhu 95°C. Setelah itu ditambahkan 0,5 ml larutan dinitrosalicylic (DNS) untuk memberhentikan reaksi yang sedang berjalan, kemudian diinkubasikan kembali pada suhu 95°C selama 5 menit. Selanjutnya absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Aktivitas enzim amilase diukur dengan menggunakan rumus di bawah ini :

$$E = \frac{M}{C \times 3 \text{ menit}}$$

Keterangan

E = Aktivitas tripsin (unit/mg protein)

M = μ mol maltosa yang dihasilkan

C = mg enzim dalam campuran

Sebelum melakukan uji aktivitas enzim protease, terlebih dahulu disiapkan tabung reaksi untuk blanko, standar, dan contoh (banyaknya tabung bergantung kepada jumlah contoh). Aktivitas enzim protease dilakukan dengan membuat campuran yang terdiri atas 1 ml buffer fosfat 0,05 M (pH 7), 1 ml larutan substrat casein 20 mg mL⁻¹ (pH 7). Contoh sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi contoh saja. Larutan standar Tirosin 5 mmol/L sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam

tabung reaksi untuk standar, dan aquadest sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk blanko. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian 2 ml larutan asam *trichloroacetic* (TCA) 0,1 M ditambahkan ke dalam semua tabung. Larutan CaCl₂ mmol/L sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam tabung blanko dan standar, sedangkan ke dalam tabung sampel/contoh ditambahkan 0,2 mL aquadest, lalu didiamkan pada suhu 37°C selama 10 menit. Campuran tersebut disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3500 rpm. Pada filtrat yang dihasilkan, dari masing – masing tabung diambil 1,5 mL, ditambahkan 5 ml Na₂CO₃ 0,4 M dan 1 ml Folin Ciaulcau ke dalam setiap tabung, kemudian didiamkan selama 20 menit pada suhu 37°C. Setelah itu dilakukan pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 578 nm (Bergmeyer *et al.* 1983). Aktivitas protease diukur dengan menggunakan formula berikut ini :

$$AP = \frac{AC-AB}{AS-AB} \times FK \times \frac{1}{WI}$$

Keterangan

AP = Aktivitas protease (unit/mg protein)

AC = Absorbansi sampel

AS = Absorbansi standar

AB = Absorbansi blanko

FK = Faktor koreksi

WI = Waktu inkubasi

Pengukuran aktivitas enzim tripsin dilakukan dengan menggunakan metode dari Erlanger *et al.* (1961). Terlebih dahulu membuat larutan BAPNA (*N-α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide*), yaitu menimbang BAPNA 43,5 mg + 1 mL Dimethyl Sulfoxide (DMSO), kemudian dilarutkan dengan Tris HCl 0,05M yang mengandung CaCl₂.2H₂O 0,02M sampai volume 100 mL. BAPNA digunakan sebagai substrat. Lang-

kah selanjutnya adalah mengambil 25 µL contoh ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah larutan BAPNA sebanyak 1,25 mL. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan larutan asam asetat 30% sebanyak 0,5 mL, lalu diinkubasi lagi selama 10 menit pada suhu 37°C. Setelah itu absorbansi contoh diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm. Oleh karena satu unit tripsin per ml (U) telah ditetapkan sebagai satu µmol BAPNA terhidrolisis per ml dari sampel enzim per menit pada 410 nm. *P-nitro-anilide* memiliki koefisien molar 8800 cm²/mg. Aktivitas tripsin (unit per mg protein) dihitung mengikuti rumus :

$$AT = \frac{AT \times 1000 \times C}{8800 \times C}$$

Keterangan

AT = Aktivitas tripsin (unit/mg protein)

A = Abs₄₁₀/min

C = ml reaksi campuran

P = mg protein dalam reaksi campuran

Pengukuran aktivitas kemotripsin mengacu pada metode Erlanger *et al.* (1961), dengan membuat larutan SAPNA 0,1 mM (*Succinyl-(Ala)2-Prophe-p-nitroanilide*) (C₃₀H₃₆N₆O₉, BM = 624.7) terlebih dahulu.

SAPNA ditimbang sebanyak 6.247 mg, lalu dilarutkan dengan Tris HCl 50 mM yang mengandung CaCl₂.2H₂O 20 mM, sampai volume 100 mL dengan pH 8,5. Kemudian larutan SAPNA yang sudah tercampur tersebut diambil dengan menggunakan pipet sebanyak 0,59 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan dengan 10 µL contoh, diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Setelah itu diukur absorbansi contoh pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm. Pengukuran dilakukan selama 5 menit, dicatat setiap

menit data absorbansi contohnya. Aktivitas kimotripsin dihitung mengikuti rumus :

$$AK = \frac{A \times 1000 \times V}{8800 \times P}$$

Keterangan

AK = Aktivitas tripsin (unit/mg protein)

A = Abs410/min

V = ml volume reaksi campuran

P = mg protein uji

Pada pengukuran panjang vili, lima ekor larva lele hidup diambil secara acak dari masing-masing ulangan pada hari ke 14, kemudian sampel disimpan di dalam larutan Davidson selama 24 jam. Setelah itu sampel ikan dibungkus dengan kain kasa dan dimasukkan ke dalam wadah berbentuk kotak seperti kaset kemudian dimasukkan ke dalam tabung besi pada *Automatic Tissue Processor* selama 24 jam. Pada proses ini sampel didehidrasi, dihilangkan kadar airnya dengan menggunakan alkohol bertingkat. Langkah selanjutnya, sampel ditanam dalam paraffin untuk dipotong dengan *Automatic Rotary Microtome* merk LEICA 2265, jaringan yang terpotong disimpan di dalam *waterbath* suhu 55°C, lalu disimpan di dalam objek glass, kemudian diikuti dengan pewarnaan menggunakan Hematoxylin dan Eosin (H dan E) mengikuti metode dalam Fishcer *et al.* (2008). Selanjutnya jaringan diamati di bawah mikroskop dan dilakukan pengukuran panjang villi.

Nisbah efisiensi protein dapat dihitung dengan memasukkan data bobot ikan pada formulasi berikut:

$$EP = \frac{M}{P}$$

Keterangan

EP = Nisbah efisiensi protein

M = Total biomassa ikan (g)

P = Jumlah protein yang dikonsumsi

Analisis protein dan air dilakukan pada cacing sutra dan pakan buatan di semua perlakuan. Analisis kimia tersebut dilakukan dengan mengikuti metode AOAC (1990). Kadar protein pakan dapat digunakan untuk menghitung nilai nisbah efisiensi protein.

Analisis data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan *Microsoft Excel* 2016 dan *SPPS* 20. ANOVA dilakukan untuk mengetahui pengaruh pakan perlakuan terhadap pertumbuhan dan morfologi usus. Tingkat beda nyata antar nilai tengah diuji dengan menggunakan Duncan dengan tingkat kepercayaan $P < 0,05$. Sebelum data dianalisis, semua data diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Semua data dituliskan dengan nilai tengah dan simpangan baku.

Hasil

Data kinerja pertumbuhan larva ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis enzim berbeda selama 14 hari disajikan pada Tabel 1. Pada akhir penelitian ini, data pertumbuhan panjang akhir dan bobot akhir ikan yang diperoleh, secara signifikan ($P < 0,05$) nilai tertinggi yaitu pada pakan perlakuan cacing dibandingkan perlakuan lainnya, sedangkan pada perlakuan pakan ME0, ME1, dan ME2 tidak berbeda nyata. Pertumbuhan lele pada perlakuan cacing berkorelasi dengan distribusi ukuran. Ikan lele pada perlakuan cacing hanya memiliki dua ukuran, yakni ukuran sedang (70,47 %) dan besar (29,53 %), sedangkan pada perlakuan pakan buatan, ikan terdistribusi di ukuran kecil, sedang dan besar, dengan mayoritas ukuran sedang (98,25 – 99,52 %). Ikan pada perlakuan cacing, mengkonsumsi

Tabel 2. Kinerja pertumbuhan larva ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis enzim berbeda pada hari ke-18 setelah menetas

Parameter (satuan)	Pakan			
	Cacing	ME0	ME1	ME2
Panjang akhir (cm)	2,21 ± 0,05 ^b	1,52 ± 0,33 ^a	1,52 ± 0,05 ^a	1,7 ± 0,08 ^a
Bobot akhir (mg)	103,59 ± 6,27 ^b	37,52 ± 1,80 ^a	37,95 ± 4,77 ^a	49,06 ± 8,43 ^a
Distribusi ukuran panen (%)				
Kecil (1-2 cm)	0,00 ± 0,00 ^a	0,49 ± 0,27 ^a	0,46 ± 0,24 ^a	1,39 ± 1,19 ^a
Sedang (2-3 cm)	70,47 ± 6,76 ^a	99,44 ± 0,26 ^b	99,52 ± 0,51 ^b	98,25 ± 1,15 ^b
Besar (3-5 cm)	29,53 ± 6,76 ^b	0,06 ± 0,02 ^a	0,02 ± 0,02 ^a	1,18 ± 0,80 ^a
Sintasan (%)	93,06 ± 1,87 ^a	90,02 ± 0,52 ^a	91,02 ± 1,54 ^a	92,48 ± 1,81 ^a
Jumlah konsumsi pakan (g)	1508,76 ± 6,67 ^b	114,86 ± 4,30 ^a	114,67 ± 0,94 ^a	114,56 ± 1,18 ^a
Efisiensi pakan (%)	0,66 ± 0,03 ^a	2,84 ± 0,07 ^b	2,89 ± 0,40 ^b	3,84 ± 1,40 ^b
Nisbah efisiensi protein	2,06 ± 0,08 ^b	2,03 ± 0,005 ^b	1,50 ± 0,17 ^a	1,83 ± 0,26 ^{ab}
Faktor kondisi (k)	0,95 ± 0,049 ^a	1,08 ± 0,078 ^a	1,06 ± 0,065 ^a	0,99 ± 0,131 ^a

Keterangan:

Huruf tika atas yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan rata-rata dan nilai setelah tanda ± merupakan simpangan baku. Pakan tanpa enzim (ME0), pakan dengan multienzim 1 g kg⁻¹ (ME1), pakan dengan multienzim 2 g kg⁻¹ (ME2)

Tabel 3. Aktivitas enzim larva ikan lele yang diberi pakan perlakuan pada hari ke-18 setelah menetas

Parameter	Larva 4 hari	Aktivitas enzim pada hari ke-18			
		Cacing	ME0	ME1	ME2
Amilase (IU mg ⁻¹ protein)	2,5113 ± 0,0190	3,3735 ± 0,0235 ^a	3,1635 ± 0,0215 ^b	3,1695 ± 0,0085 ^b	3,0210 ± 0,000 ^c
Protease (IU mg ⁻¹ protein)	0,0100 ± 0,0001	0,0083 ± 0,0110 ^a	0,0050 ± 0,0002 ^b	0,0051 ± 0,0040 ^b	0,0050 ± 0,0110 ^b
Tripsin (IU mg ⁻¹ protein)	0,0274 ± 0,0091	0,0125 ± 0,0125 ^a	0,0072 ± 0,0056 ^a	0,0101 ± 0,0077 ^a	0,0044 ± 0,0012 ^a
Kemotripsin (IU mg ⁻¹ protein)	0,0032 ± 0,0006	0,0115 ± 0,0060 ^a	0,0050 ± 0,0003 ^a	0,0051 ± 0,0060 ^a	0,0036 ± 0,0030 ^a

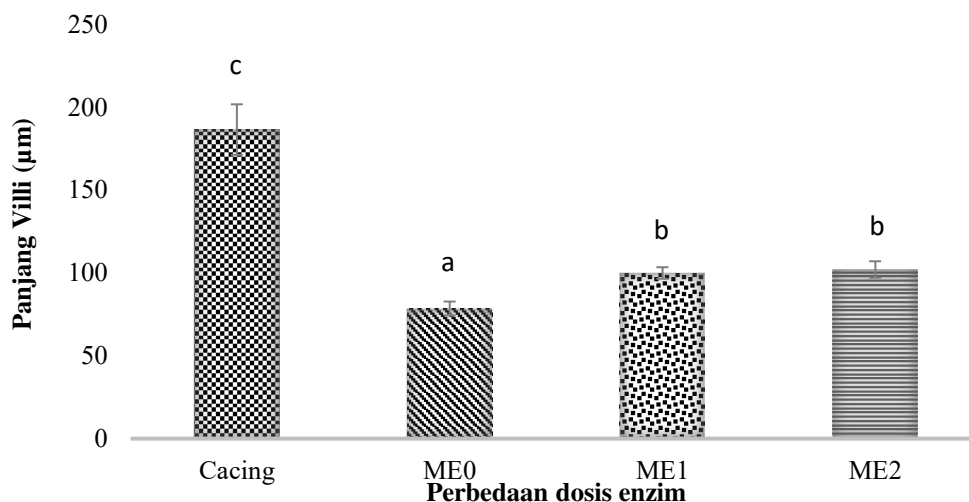
Keterangan :

Huruf tika atas yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan rata-rata dan nilai setelah tanda ± merupakan simpangan baku. Pakan tanpa enzim (ME0), pakan dengan multienzim 1 g kg⁻¹ (ME1), pakan dengan multienzim 2 g kg⁻¹ (ME2)

pakan lebih dari 13 kali lebih banyak daripada perlakuan pakan buatan. Di sisi lain, pemberian pakan buatan memberikan nilai efisiensi pakan yang lebih baik daripada perlakuan cacing. Efisiensi pakan di setiap perlakuan pakan buatan nilainya tidak berbeda nyata. Parameter sintasan, faktor kondisi dan nisbah efisiensi protein

dari masing-masing perlakuan tidak menunjukkan hasil yang berbeda nyata.

Pengaruh pakan perlakuan pada aktivitas enzim pencernaan (amilase, protease, tripsin dan kemotripsin) pada hari ke-4 dan ke-18 setelah menetas disajikan pada Tabel 2.



Keterangan:

Huruf yang berbeda pada baris di atas bar menunjukkan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata ($P < 0,05$). Pakan tanpa enzim (ME0), pakan dengan multienzim 1 g kg^{-1} (ME1), pakan dengan multienzim 2 g kg^{-1} (ME2)

Gambar 1 Panjang vili usus larva ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis enzim berbeda selama 14 hari

Aktivitas enzim amilase pada benih ikan lele meningkat setelah diberi pakan dengan penambahan dosis enzim yang berbeda selama masa pemeliharaan 14 hari. Aktivitas enzim amilase dengan nilai tertinggi yaitu pada benih yang diberi cacing, berbeda secara signifikan ($P < 0,05$) dengan perlakuan ME0 dan ME1, perlakuan ME2 berbeda nyata dengan ketiga perlakuan yang sudah disebutkan sebelumnya.

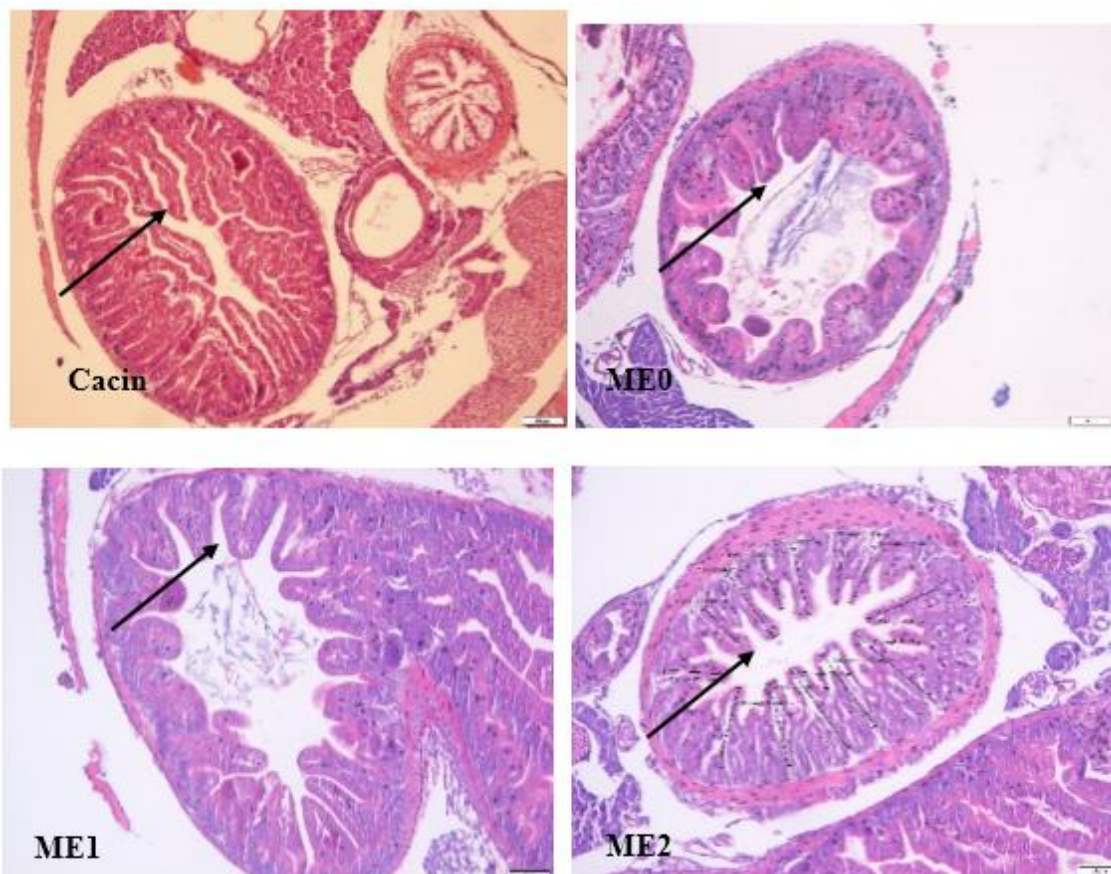
Aktivitas enzim protease pada benih ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis enzim berbeda menurun pada hari ke-18 ($P < 0,05$). Diantara perlakuan pakan uji, nilai aktivitas enzim protease tertinggi diperoleh pada benih dengan pakan cacing, berbeda secara signifikan ($P < 0,05$) dengan perlakuan yang lainnya, sedangkan nilai aktivitas enzim protease untuk perlakuan ME0, ME1 dan ME2 tidak berbeda nyata.

Aktivitas enzim tripsin pada benih ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis

enzim berbeda, rata-rata menurun ($P < 0,05$) pada hari ke-18, sedangkan aktivitas enzim kimotripsin rata-rata meningkat pada pengukuran hari ke 18. Setelah dilakukan analisis data, hasil menunjukkan tidak berbeda nyata ($P < 0,05$) antar masing-masing perlakuan.

Hasil pengukuran panjang vili usus benih ikan lele yang diberi pakan dengan penambahan dosis enzim berbeda disajikan pada Gambar 1. Perbedaan penambahan dosis pada pakan memberikan pengaruh yang berbeda pula pada panjang villi usus ikan lele. Nilai tertinggi ada pada perlakuan benih ikan lele yang diberi pakan cacing, sedangkan nilai yang terendah ada pada perlakuan ME0. Hasil menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan.

Hasil pengamatan gambaran histologi usus secara keseluruhan pada masing-masing perlakuan disajikan pada Gambar 2. Gambaran histologi usus secara visual menunjukkan adanya perbedaan panjang vili dari larva yang



Keterangan: Tanda panah menunjukkan gambar vili usus. Pakan tanpa enzim (ME0), pakan dengan multienzim 1 g kg⁻¹ (ME1), pakan dengan multienzim 2 g kg⁻¹ (ME2).

Gambar 2 Gambaran melintang histologi usus larva ikan lele yang diberi pakan perlakuan pada pengukuran hari ke-18 setelah menetas

diberi pakan cacing, pakan dengan penambahan enzim dan pakan tanpa enzim yang diukur pada hari ke-18 setelah menetas.

Kualitas air selama masa pemeliharaan berada dalam kisaran layak untuk larva ikan lele. Oksigen terlarut : 4,13 mgL⁻¹, suhu berkisar antara 23,93-23,98°C (pagi), 24,58-24,81°C (siang), 24,84-25,06°C (sore); pH berkisar antara 7,68-7,74 (pagi), 7,76-7,76 (siang), 7,49-7,64 (sore); dan NH₃ : 0,12 mgL⁻¹ dan NO₂ : 0,006 mgL⁻¹.

Pembahasan

Pakan awal untuk larva ikan lele dapat berupa pakan hidup ataupun pakan buatan

(Verret & van Tongeren 1989, Uys & Hecht 1987, Adewumi 2015). Pada penelitian ini, pakan awal untuk semua perlakuan, menggunakan artemia selama 2 hari, hal ini merujuk pada Verret & van Tongeren (1989) yang melaporkan bahwa dengan pemberian artemia sebagai pakan awal pada hari pertama dan kedua dapat meningkatkan sintasan hingga di atas 90%. Pada penelitian ini nilai sintasan berkisar antara 90,02±0,52-93,06±1,87%. Hal ini diduga adanya keterlibatan eksogenus enzim yang berasal dari artemia yang dapat merangsang keluarnya endogenous enzim. Enzim dapat memberikan pengaruh yang positif pada mikrobiota yang terdapat di usus melalui peningkatan

daya cerna dan menambah daya serap nutrisi (Ayodeji *et al.* 2016). Pemberian jenis pakan (alami dan buatan) pun dapat berpengaruh terhadap sintasan, seperti penelitian yang dilakukan oleh Chepkirui-Boit *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa larva ikan lele yang diberi pakan 100% naupli artemia menghasilkan sintasan 95,3%, sedangkan larva yang diberi pakan 100% pakan buatan memperoleh sintasan 65,9%.

Ikan lele yang diberi pakan berupa cacing memiliki bobot dan panjang akhir lebih besar dibandingkan dengan ikan lele yang diberi pakan buatan. Jumlah enzim yang ditambahkan di dalam penelitian ini, dari 0 ke 2 g kg⁻¹ pakan, tidak menyebabkan perbedaan pertumbuhan ikan. Tingginya pertumbuhan ikan pada perlakuan cacing didukung dengan data distribusi ukuran ikan saat panen. Ikan pada perlakuan cacing, 29,53% memiliki kriteria ukuran besar, sisanya 70,47% berukuran sedang. Sementara itu, ikan pada perlakuan-perlakuan pakan buatan hanya didominasi oleh ukuran sedang (98,25-99,52%).

Ikan pada perlakuan cacing mampu mengonsumsi pakan sebanyak 1508,76 g, sedangkan ikan pada perlakuan pakan buatan hanya mengonsumsi pakan 114,56-114,86 g. Hal ini berdampak pada jumlah protein yang dikonsumsi, pada perlakuan cacing jumlah protein yang dikonsumsi sebanyak 33,54 g, sedangkan pada perlakuan pakan buatan berkisar antara 4,01-7,08 g. Perbedaan jumlah konsumsi protein mengakibatkan jumlah ketersediaan nutrisi untuk pertumbuhan pun akan berbeda. Rendahnya jumlah konsumsi pakan pada perlakuan pakan buatan diduga kuat menjadi faktor penyebab rendahnya pertumbuhan ikan di perlakuan ini. Walau mengha-

sikan pertumbuhan yang lebih tinggi, efisiensi pakan pada perlakuan cacing lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan pakan buatan. Hal ini mengindikasikan bahwa pencernaan bahan pada pakan buatan lebih tinggi, ditambah dengan penambahan enzim pada pakan buatan yang dapat memecah molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana sehingga nutrisi yang ada dalam pakan buatan lebih mudah dimanfaatkan oleh ikan untuk proses pertumbuhan. Nisbah efisiensi protein merupakan angka yang menyatakan jumlah bobot ikan yang dihasilkan dibagi dengan jumlah protein yang dikonsumsi. Rendahnya nilai nisbah efisiensi pakan pada perlakuan pakan yang ditambahkan enzim menunjukkan bahwa pemanfaatan jumlah protein yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan pakan tanpa enzim dan perlakuan cacing.

Perolehan panjang dan bobot akhir yang tinggi pada perlakuan cacing (22,1±0,5 mm dan 103,59±6,27 mg) diduga karena aktivitas enzim yang tinggi pada saluran pencernaan, dalam hal ini aktivitas enzim amilase (3,3735±0,0235 IU mg⁻¹ protein) yang berguna untuk memecah karbohidrat menjadi glukosa dan aktivitas enzim protease (0,0083±0,0110 IU mg⁻¹ protein) yang memecah protein menjadi asam amino sehingga nutrisi pada pakan dapat diserap dan diedarkan ke sel – sel yang membutuhkan. Aktivitas enzim yang rendah dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan organ. Pertumbuhan organ tubuh yang lambat menyebabkan pertumbuhan larva kurang dan dapat menyebabkan kematian (Jusadi *et al.* 2015). Pada perlakuan ME2, dapat meningkatkan panjang akhir dan bobot akhir sebanyak 6,25% dan 13,4% jika dibandingkan dengan perlakuan ME0. Sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yildirim

& Turan (2010) yang menyatakan bahwa ikan *C. gariepinus* yang diberi pakan dengan penambahan multienzim dengan kandungan fungal *xylanase*, *β -glucanase*, *pentosonase*, *β -amilase*, *fungal β -glucanase*, *hemicellulase*, *pectinase*, *cellulase*, *cellubiase* dosis $0,75 \text{ g kg}^{-1}$ memperoleh kinerja pertumbuhan dan efisiensi pakan yang optimum dibandingkan kontrol.

Faktor kondisi merupakan hasil pengukuran berdasarkan hubungan antara bobot dan panjang ikan, yang menggambarkan kondisi masing-masing individu. Nilai ideal yang biasa digunakan adalah mendekati 1 (Nash *et al.* 2006). Nilai faktor kondisi yang diperoleh berkisar antara $0,95 \pm 0,049$ - $1,08 \pm 0,078$, hal ini menunjukkan proporsi tubuh ikan dalam penelitian ini adalah normal.

Aktivitas enzim tripsin pada larva *C. gariepinus* terdeteksi pada larva umur 4 hari setelah menetas ($0,0274 \pm 0,0091 \text{ IU mg}^{-1}$ protein), meningkat seiring dengan perkembangan larva. Sesuai dengan yang dinyatakan oleh Nazir *et al.* (2018), keadaan ini diduga bahwa keberadaan enzim protease dalam tubuh larva sudah siap mencerna protein sebelum fungsi perut betul-betul berkembang yang ditandai dengan terbentuknya lambung secara utuh ketika terjadi perubahan dari tahap larva menjadi benih. Lebih lanjut Nazir *et al.* (2018) menyatakan bahwa aktivitas awal enzim tripsin selama masa perkembangan awal larva terdeteksi pada saat larva masih memiliki kuning telur, kemudian akan mengalami penurunan.

Pada pengukuran hari ke-18 setelah menetas, nilai aktivitas enzim tripsin menurun pada setiap perlakuan. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Nazir *et al.* (2018) bahwa setelah hari ke-18 enzim tripsin mengalami penurunan, merupakan indikasi dari proses

acidifikasi pada usus atau bisa dikatakan sebagai masa perkembangan dari perut. Hasil penelitian yang lain menunjukkan bahwa aktivitas enzim mengalami peningkatan saat fase awal bertepatan dengan diberikannya naupli *Artemia*, tetapi aktivitas enzim tripsin ini terlihat menurun lagi pada hari ke-16 setelah menetas yang dapat dihubungkan dengan penyempurnaan bentuk dari pankreas esokrin (Tong *et al.* 2012). Penurunan aktivitas tripsin bertepatan dengan tahap perkembangan lambung (Gisbert *et al.* 2009).

Kimotripsin adalah enzim pencernaan yang berada di jaringan pankreas yang dikeluarkan menuju usus dua belas jari (Geiger 1985). Pada penelitian ini, hasil uji aktivitas enzim kimotripsin pada larva berumur 4 hari setelah menetas (habis kuning telur) adalah $0,0032 \pm 0,0006 \text{ IU mg}^{-1}$ protein dan rata-rata meningkat pada pengukuran hari ke-18 setelah menetas. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Chakrabarti *et al.* (1995) bahwa aktivitas kimotripsin yang rendah terjadi ketika telur menetas, meningkat dengan sangat lambat pada 2-3 minggu pertama, kemudian meningkat tajam pada 3 hari berikutnya akhirnya meningkat pada tingkatan yang konstan. Hal ini membuktikan bahwa umur ikan berpengaruh terhadap konsentrasi dan aktifitas kimotripsin.

Lebih jauh Elert *et al.* (2004) menyatakan bahwa konsentrasi kimotripsin 10^5 kali lebih tinggi dalam usus dari pada di jaringan selain usus namun aktivitas dan konsentrasi sangat tergantung pada spesies ikan dan lingkungan dimana ikan hidup. Spesies ikan memberikan pengaruh yang nyata pada konsentrasi dan aktivitas kimotripsin. Berdasarkan kebiasaan makan mereka, ikan dibagi menjadi karnivora, omnivora dan herbivora. Kebiasaan makan ikan

akan mempengaruhi pada nisbah bobot usus dan bobot tubuh serta aktivitas enzim proteolitiknya (Chakrabarti *et al.* 1995; Hidalgo *et al.* 1999). Hofer dan Schiemer (1981) melaporkan bahwa aktivitas proteolitik berhubungan dengan kebiasaan makan, meskipun karnivora memiliki usus yang lebih kecil daripada herbivora, tetapi memiliki aktivitas yang lebih tinggi. Chakrabarti *et al.* (1995) dan Hidalgo *et al.* (1999) menemukan hasil yang sama.

Usus merupakan tempat utama proses pencernaan dan penyerapan nutrisi. Di dalam usus terdapat vili yang merupakan salah satu struktur lapisan mukosa usus yang berfungsi memperluas area penyerapan zat nutrisi sehingga meningkatkan efisiensi penyerapan (Sari *et al.* 2016). Pada pengukuran panjang vili diperoleh hasil bahwa pada larva yang diberi pakan cacing memperoleh nilai tertinggi, kemudian berturut-turut diikuti oleh perlakuan ME2 yang tidak berbeda nyata dengan ME1 dan perlakuan ME0 yang berbeda nyata dengan semua perlakuan lainnya. Adanya perbedaan pertumbuhan dan perbedaan jumlah ukuran hasil panen pada penelitian ini diduga karena kecukupan nutrisi pada pakan dan terjadinya peningkatan kapasitas pencernaan dan penyerapan nutrisi oleh ikan. Hal ini ditunjukkan dengan data panjang vili yang berbeda nyata antara perlakuan cacing, pakan buatan dengan enzim dan pakan buatan tanpa enzim. Panjang vili mampu meningkatkan tingkat penyerapan yang terjadi pada saluran pencernaan sehingga lebih banyak nutrisi yang tersedia sebagai material dasar proses metabolisme tubuh (Vinasiam 2014). Hal ini didukung oleh pernyataan Mathlouthi *et al.* (2002) bahwa manfaat dari penambahan enzim pada pakan dapat memperbaiki kapasitas daya serap dengan meningkatkan ukuran vili usus dan

ini akan menekan dekonjugasi asam empedu lebih awal. Hal ini diduga adanya pengurangan oleh bakteri yang menghidrolisis asam empedu (Smits & Annison, 1996). Qiyu *et al.* (2011) menyatakan bahwa peningkatan panjang vili, jumlah lipatan usus dan luas permukaan vili dapat menyebabkan penyerapan dan pemanfaatan nutrisi menjadi lebih baik karena luas area permukaan penyerapan nutrisi yang lebih banyak sehingga meningkatkan nutrisi yang diserap untuk dimetabolisme dan pernyataan Mathlouthi *et al.* (2002) menyebutkan bahwa penambahan enzim pada pakan gandum dapat meningkatkan ukuran dan tinggi villi, sehingga jika dibandingkan antara pakan yang ditambahkan enzim dengan pakan tanpa enzim ada perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada struktur panjang vili usus.

Simpulan

Penambahan enzim dengan dosis sampai 2 g kg⁻¹ pakan dapat meningkatkan panjang villi usus, namun belum mampu meningkatkan pertumbuhan ikan sebagaimana penggunaan cacing.

Perlu dilakukan evaluasi lanjutan terkait peningkatan jumlah pemberian pakan harian, melalui peningkatan frekuensi pemberian pakan agar jumlah konsumsi pakan buatan setara dengan cacing.

Daftar pustaka

- Adewumi AA. 2014. Growth performance and survival of *Clarias gariepinus* hatchlings fed different starter diets. *Advances in Agricultural, Sciences and Engineering Research*, 4(6): 1659-1664.
- Ali A, Al-Ogaly SM, Asghar NA, Goddard JS, Ahmed SI. 2007. Effect of feeding different protein to energy (P/E) ratios on the growth performance and body composition of

- Oreochromis niloticus* fingerlings. *Journal of Applied Ichthyology* 24 (1):1-37.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. *Official Methods of Analysis*. AOAC : 1928.
- Ayodeji AA, Yomla R, Torres AJ, Rodiles A, Merrifield DL, Davies SJ. 2016. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* growth, intestinal morphology and microbiome. *Aquaculture*, 462: 61-70.
- Bergmeyer HU, Grossl M, Walter HE. 1983. Reagent for enzymatic analysis. In : Bergmeyer HU (Editor). *Method of Enzymatic Analysis*, 3rd Edition, Volume II. Verlag Chemie, Weinheim. pp. 274-275.
- Chakrabarti I, Gani MA, Chaki KK, Sur R, Misra KK. 1995. Digestive enzyme in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 112A (1) : 167-177.
- Chepkirui V, Ngugi CC, Bowman J, Oyoo-Okoth E, Rasowo J, Mugo-Bundi J, Cherop L. 2011. Growth performance, survival, feed utilization and nutrient utilization of African catfish *Clarias gariepinus* larvae co-fed *artemia* and a micro-diet containing freshwater atyid shrimp *Caridina nilotica* during weaning. *Aquaculture Nutrition*, 17 (2):82-89.
- Drew MD, Racz VJ, Gauthier R, Thiessen DL. 2005. Effect of adding protease to coextruded flax : pea or canola : pea product on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Animal Feed Science and Technology*, 119 (1-2):117-128.
- Elert EV, Agrawal MK, Gebauer C, Jaensch H, Ulrike B. 2004. Protease activity in gut of daphnia magna : evidence for trypsin and chymotrypsin enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 137(3): 287 – 296.
- Erlanger BF, Kokowski N, Cohen W. 1961. The preparation and properties of two chromogenic substances of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95(2): 271-278
- Farhangi M, Carter CG. 2007. Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 38(12): 1274 – 1282.
- Fishcer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. Cold Spring Harb Protoc 5.
- Geiger R. 1985. *Chymotrypsin*. In *methods of enzymatic analysis*, 3rd, Bergmeyer HU. Ed. VCH pub : Deerfield. 5 : 99-118.
- Ghomi MR, Shahriari R, Langroudi HF, Nikoo M, von Elert E. 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. *Aquaculture International*, 20(2): 49-254.
- Gisbert E, Gimenez G, Fernandez I, Kotzamanis Y, Estevez A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture*, 287(3-4): 381-387.
- Hidalgo MC, Urea E, Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170(3-4): 267 - 283
- Hofer R, Schiemer F. 1981. Proteolytic activity in digestive tract of several species of fish with different feeding habits. *Oecologia*, 48(3): 42-345.
- Jusadi D, Anggraini RS, Suprayudi MA. 2015. Kombinasi cacing *Tubifex* dan pakan buatan pada larva ikan patin *Pangasianodon hypophthalmus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 14(1): 30-37.
- Lauff M, Hofer R. 1984. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. *Aquaculture*, 37(4): 335-346.
- Lin S, Mai K, Tan B. 2007. Effect of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*. *Aquaculture Research*, 38(15):1645-1653.
- Lin SY, Selle PH, Court SG, Cowieson AJ. 2013. Protease supplementation of sorghum-based broiler diets enhances amino acid digestibility coefficients in four

- small intestinal sites and accelerates their rates of digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 183(3-4): 175-183.
- Mathlouthi N, Lalles JP, Lepercq P, Juste C, Labrier M. 2002. Xylanase and beta-glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in testinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. *Journal of Animal Science*, 80(11): 2773 – 2779.
- Nash RDM, Valencia AH, Geffen AJ. 2006. The origin of Fulton's condition factor – setting the record straight. *Fisheries History*, 31(5): 236-238.
- Nazir MI, Srivastava PP, Bhat IA, Muralidhar AP, Varghese T, Gireesh-Babu P, Jain KK. 2018. Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of indian walking catfish, *Clarias magur*. *Aquaculture*, 491: 266-272.
- Nurhayati, Bambang NPU, Setiawati M. 2014. Perkembangan enzim pencernaan dan pertumbuhan larva ikan lele dumbo, *Clarias gariepinus* Burchell 1822, yang diberi kombinasi cacing sutra dan pakan buatan. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*, 14(3) : 167-178
- Qiyu X, Qing Z, Hong X, Chang'an W, Dajiang S. 2011. Dietary glutamine supplementation improves growth performance and intestinal digestion/absorption ability in young hybrid sturgeon (*Acipenser schrenckii* female x *Huso dauricus* male). *Journal of Applied Ichthyology*, 27(2):721-726
- Sari MN, Wahyuni S, Hammy, Jalaluddin M, Sugito, Masyitha D. 2016. Efek penambahan ampas kedelai yang difermentasi dengan *Aspergillus niger* dalam ransum terhadap histomorfometri vili usus halus ayam kampung, *Gallus domesticus*. *Jurnal Medika Veterinaria*, 10(2):115-119.
- Smits CHM, G. Annison. 1996. Non-starch plant polysaccharides in broiler nutrition : towards a physiologically valid approach to their determination. *World's Poultry Science Journal*, 52(2): 203-221.
- Tong XH, Xu SH, Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Ma DY. 2012. Digestive enzymes activities of turbot, *Scophthalmus maximus* L during early development stages under culture condition. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3): 715 – 724.
- Uys W, Hecht T. 1987. Assay on the digestive enzymes of sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* (Pisces: Clariidae). *Aquaculture*, 63 (1-4): 301 – 313.
- Verret JAJ, Torreele E, Spazier E, van der Sluiszen A, Rombout JHWM, Booms R, Segner H. 1992. The development of a functional digestive system in the african catfish *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(4): 286-298.
- Verret J, van Tongeren M. 1989. Weaning time in *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture*, 83(1-2): 81-88.
- Vinasyiam A. 2014. Aktivitas enzim pencernaan dan kinerja pertumbuhan ikan nila *Oreochromis niloticus* yang diberi pakan mengandung hormon pertumbuhan rekombinan ikan. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Worthington V. 1993. *Worthington Enzyme Manual*. Enzymes and Related Biochemicals Worthington Chemical, New Jersey, USA. 399 p.
- Yildirim YB, Turan F. 2010. Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 9 (2): 327-331.
- Zamini A, Kanani H, Esmaceli A, Ramezani S, Zoriezahra S. 2014. Effects of two dietary exogenous multi-enzyme supplementation, natuzyne and beta-mannanase (Hemicell), on growth and blood parameters of Caspian salmon, *Salmon trutta caspius*. *Comparative Clinical Pathology*. 23 (1): 187-192.
- Ze S, Qin Lin X, Chowdhury MAK, Nan Chen J, Jun Leng X. 2016. Effects of protease supplementatin in low fish meal pelleted and extruded diets on growth, nutrient retention and digestibility of gibel carp, *Carrasius auratus gibelio*. *Aquaculture*, 460: 37-44.
- Zhou Y, Yuan X, Liang X, Fang L, Li J, Guo X, Baik X, He S. 2013. Enhancement of growth and intestinal flora in grass carp: the effect of exogenous cellulose. *Aquaculture*, 416-417: 1-7