

Aktivitas Protease, Amilase dan Lipase Digesti Ikan Medaka (*Oryzias Javanicus*) yang Tertangkap di Segara Anakan Cilacap

Hana Hana¹, Untung Susilo¹ dan Sri Sukmaningrum¹

¹Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman

Email: han4wari2015@gmail.com.

Abstract

Medaka fish (*Oryzias javanicus*) originating from Segara Anakan, Cilacap Regency has the potential as a bio-indicator of brackish water. The study of the physiological character of this species has not been done before, so that there needs to be basic information for domestication. The purpose of this study was to determine changes in protease, amylase and lipase digestive activity of medaka fish from Segara Anakan at different body sizes and salinity. The study was conducted by survey method. A sample of 567 medaka fish taken from three locations with different salinities (10 ± 1 , 15 ± 1 and 20 ± 1 ppt) at the time of sampling, were used in this study. Medaka fish is grouped into three different sizes, namely (1) 0.063 ± 0.01 g (small), (2) 0.153 ± 0.03 g (medium), and (3) 0.287 ± 0.03 g (large). Measurements of enzyme activity were carried out by spectrophotometric methods. The results showed that body size and salinity were significantly different ($P < 0.05$) on protease, amylase and lipase digestive activity of medaka fish. Large medaka fish shows higher digestive enzyme activity compared to the small body size in each salinity. However, amylase and lipase show same activity between different body sizes at 15 ± 1 ppt. The higher the salinity, the lower the activity of protease, amylase and lipase. However, the salinity of 10 ± 1 - 20 ± 1 ppt shows the same amylase activity (small and medium size) and lipase (small size). Conclusion from the results of this study is the protease, amylase and lipase digestive activity of medaka fish that originating from Segara Anakan, Cilacap has been increased with increasing body size and decreasing environmental salinity. The results of this study are expected to contribute to the enrichment of fish biology, especially medaka fish.

Keywords: Body Size; Digestive enzyme; *Oryzias javanicus*; Salinity; Segara Anakan.

Abstrak

Ikan medaka (*Oryzias javanicus*) yang berasal dari Segara Anakan Cilacap memiliki potensi sebagai bioindikator perairan payau. Kajian karakter fisiologi *O. javanicus* belum banyak dilakukan sehingga perlu ada informasi dasar untuk domestikasi. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perubahan aktivitas protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka pada bobot tubuh dan salinitas berbeda yang ditangkap dari Segara Anakan, Kabupaten Cilacap. Penelitian dilakukan dengan metode survey. Sampel ikan medaka sebanyak 567 ekor diambil dari tiga lokasi dengan salinitas yang berbeda (10 ± 1 , 15 ± 1 dan 20 ± 1 ppt) pada saat pengambilan sampel, telah digunakan dalam penelitian ini. Ikan medaka dikelompokkan menjadi 3 ukuran bobot tubuh yang berbeda, yaitu (1) $0,063 \pm 0,01$ g (kecil), (2) $0,153 \pm 0,03$ g (sedang), serta (3) $0,287 \pm 0,03$ g (besar). Pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bobot tubuh dan salinitas yang berbeda berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap aktivitas protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka. Ikan medaka berukuran besar menghasilkan aktivitas enzim digesti lebih tinggi dibandingkan dengan ukuran tubuh kecil pada masing-masing salinitas. Namun pada salinitas 15 ± 1 ppt, amilase dan lipase menunjukkan aktivitas yang sama di antara ukuran tubuh berbeda. Semakin tinggi salinitas maka aktivitas protease, amilase dan lipase menjadi semakin rendah. Namun, pada salinitas 10 ± 1 - 20 ± 1 ppt menunjukkan aktivitas amilase (ukuran kecil dan sedang) dan lipase (ukuran kecil) yang sama. Simpulan dari hasil penelitian ini adalah aktivitas protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka yang berasal dari Segara Anakan, Cilacap mengalami peningkatan seiring dengan semakin meningkatnya bobot tubuh dan menurunnya salinitas lingkungan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada pengayaan biologi ikan, khususnya ikan medaka.

Kata kunci : Enzim Digesti; *Oryzias javanicus*; Salinitas; Segara Anakan; Ukuran tubuh..

Pendahuluan

Ikan medaka (*Oryzias javanicus*) adalah salah satu spesies dari famili Adrianichthyidae yang memiliki habitat di perairan payau (Yusof *et al.* 2012) dan salah satu wilayah distribusinya di Indonesia adalah di Segara Anakan, Kabupaten Cilacap, Provinsi Jawa Tengah. Ikan medaka termasuk dalam kategori ikan eurihalin sehingga memiliki mekanisme adaptasi osmotik yang unik (Sakamoto *et al.* 2001; Inoue & Takei 2002; Chang *et al.* 2016). Keunikan dari ikan tersebut menjadikan medaka berpotensi sebagai bioindikator kualitas perairan serta organisme

model untuk berbagai riset biologi (Daryoush & Ismail 2014; Yang *et al.* 2013; Woo *et al.* 2014; Yusof *et al.* 2014; Li *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016; Dong *et al.* 2016). Namun, saat ini riset mengenai ikan tersebut yang berasal dari perairan Segara Anakan belum banyak dieksplorasi sehingga perlu adanya informasi dasar studi biologi ikan medaka. Sebagai upaya mendapatkan informasi dasar tersebut, telah dilakukan tahap awal predomestikasi ikan medaka dari habitat aslinya terhadap kondisi laboratorium (Hana dan Sari 2013).

Predomestikasi ikan medaka telah dilakukan dengan mengkaji pengaruh salinitas

terhadap respirasi, metabolisme dan osmoregulasi ikan medaka di Segara Anakan. Hasil riset menunjukkan bahwa laju respirasi, laju konsumsi oksigen dan kadar cairan otot mengalami perubahan ketika diaklimasi pada salinitas berbeda (Hana dan Sari 2013). Beberapa studi melaporkan bahwa salinitas lingkungan selain berpengaruh terhadap osmoregulasi juga berpengaruh terhadap kapasitas digesti Teleostei (Moutou *et al.* 2004; Barman *et al.* 2005; Tsuzuki *et al.* 2007). Dengan demikian, saluran digesti teleostei memiliki dua fungsi, selain sebagai organ untuk memproses makanan juga sebagai organ osmoregulatory (Vargas-Chacoff *et al.* 2015). Kapasitas digesti ikan medaka tercermin dari aktivitas enzim digestinya.

Analisis aktivitas enzim digesti adalah salah satu metode yang dapat digunakan sebagai indikator kondisi nutrisi serta proses digesti ikan pada fase pertumbuhan dan kondisi lingkungan yang berbeda (Moutou *et al.* 2004; Barman *et al.* 2005). Oleh karena itu, ukuran tubuh (panjang dan bobot) yang merupakan representasi dari umur dan proporsi tubuh ikan dapat mempengaruhi aktivitas enzim digesti (Susilo *et al.* 2015; Pujante *et al.* 2016). Aktivitas protease dan amilase digesti ikan pada berbagai ukuran tubuh dan fase perkembangan telah banyak diteliti pada beberapa spesies seperti pada ikan Bream Sharpshout laut (Savona *et al.* 2011), *Osteochilus hasselti* (Al-Gadri *et al.* 2014), dan *Osphronemus gouramy* (Susilo *et al.* 2015). Pada beberapa spesies ikan, salinitas dapat menginduksi perubahan aktivitas enzimnya (Tsuzuki *et al.* 2007; Barman *et al.* 2012; Vargas-Chacoff *et al.* 2015; Hamed *et al.* 2016; Liu *et al.* 2017). Namun belum diketahui apakah terjadi perubahan aktivitas enzim digesti ikan medaka dengan ukuran tubuh berbeda yang diperoleh dari Segara Anakan Cilacap pada salinitas berbeda. Maka, untuk mengetahui hal tersebut dapat dikaji dari aspek aktivitas enzim digesti protease, amilase dan lipase.

Penelitian terdahulu mengenai aktivitas enzim digesti protease, amilase dan lipase telah dilakukan pada beberapa spesies ikan, antara lain pada *Osphronemus gouramy* Lac. (Susilo *et al.* 2015), *Anguilla bicolor* McClelland (Taufik *et al.* 2017) *Labeo rohita* (Umalatha *et al.* 2016), *Scophthalmus maximus* (Gu *et al.* 2017), *Gasterosteus aculeatus* (Hani *et al.* 2018) dan *Rasbora lateristriata* (Susilo *et al.* 2018). Beberapa spesies ikan tersebut memperlihatkan perbedaan aktivitas enzim digesti berdasarkan ukuran tubuh, komposisi pakan, jenis pakan, salinitas, serta segmen saluran pencernaan yang berbeda.

Informasi mengenai pentingnya studi yang terkait respon aktivitas enzim digesti ikan dengan ukuran tubuh atau salinitas berbeda telah banyak dilaporkan. Namun, selama ini belum terdapat informasi mengenai kajian tersebut pada *O. javanicus* yang diperoleh dari Segara Anakan Cilacap. Oleh karena itu, penting untuk melakukan

penelitian tahap predomestikasi mengenai aktivitas protease, amilase dan lipase saluran digesti ikan medaka dengan ukuran tubuh berbeda pada berbagai kondisi salinitas di Segara Anakan. Informasi aktivitas enzim digesti ini menjadi sangat diperlukan untuk memahami fisiologi digesti ikan medaka. Selain itu, sangat berguna untuk mengetahui kebutuhan nutrisi ikan medaka yang akan mampu beradaptasi terhadap salinitas berbeda setelah didomestikasi pada kondisi laboratorium. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perubahan aktivitas protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka pada bobot tubuh dan salinitas berbeda yang ditangkap dari Segara Anakan, Kabupaten Cilacap.

Metode penelitian

Lokasi pengambilan sampel ikan medaka berasal dari Segara Anakan, Kabupaten Cilacap. Pengukuran aktivitas enzim digesti dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan dan Laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. Penelitian dilaksanakan selama enam bulan dari bulan Maret 2018 hingga Agustus 2018. Penelitian dilaksanakan secara survey dengan metode *purposive random sampling*. Sampel ikan medaka diambil dari tiga lokasi di Segara Anakan Cilacap yang berbeda kondisi salinitasnya ketika pengambilan sampel dilakukan dan diulang sebanyak 3 kali, yaitu pada salinitas 10 ± 1 , 15 ± 1 , dan 20 ± 1 ppt. Sejumlah 567 ekor ikan medaka berasal dari salinitas yang berbeda dibagi menjadi tiga ukuran bobot tubuh yang berbeda, yaitu: Grup 1 dengan bobot tubuh $0,063 \pm 0,01$ g (kecil), grup 2 dengan bobot tubuh $0,153 \pm 0,03$ g (sedang), dan grup 3 dengan bobot tubuh $0,287 \pm 0,03$ g (besar). Sampel ikan medaka tersebut ditangkap dengan menggunakan jaring ikan. Sampel ikan diambil dalam kondisi hidup kemudian diangkut dengan menggunakan kantung yang telah diberi oksigen menuju ke laboratorium. Sebelum dilakukan preparasi sampel untuk pengukuran aktivitas enzim digesti, ikan uji diaklimasi dahulu pada kondisi laboratorium selama 1 x 24 jam. Sampel ikan kemudian dikelompokkan menjadi tiga ukuran bobot tubuh seperti tertera pada tabel 1.

Sampel ikan uji yang digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim digesti ditimbang bobot tubuhnya dan diukur panjangnya. Selanjutnya, bagian abdomen ikan uji dibedah dan dilakukan isolasi saluran digesti ikan. Saluran digesti kemudian ditimbang dan diukur panjangnya. Saluran digesti yang telah diisolasi dan dipartisi tersebut kemudian dibersihkan di atas lempengan es. Organ usus ditampung ke dalam botol sampel berlabel, lalu dihancurkan dengan menggunakan homogenizer listrik dalam 50 mM Tris-HCl buffer dingin dengan rasio 1:6 (w/v). Homogenat yang diperoleh kemudian ditampung ke dalam eppendorf 1,5 ml dan disentrifugasi

menggunakan sentrifuge bersuhu 4 °C pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, dan supernatan yang diperoleh siap digunakan untuk uji aktivitas enzim (Rungruangsak-Torrissen 2007). Kadar protein supernatan ditentukan

dengan metode Lowry *et al.* (1951), menggunakan albumin sebagai standar. Kadar protein supernatan digunakan untuk menghitung aktivitas enzim.

Tabel 1. Bobot dan Panjang Tubuh Ikan Medaka dari Segara Anakan pada Salinitas Berbeda

Salinitas (ppt)	Grup Ukuran Tubuh					
	1		2		3	
	Bobot (g)	Panjang (cm)	Bobot (g)	Panjang (cm)	Bobot (g)	Panjang (cm)
10±1	0,06	1,8	0,13	2,4	0,32	3,2
15±1	0,06	1,9	0,18	2,4	0,27	2,9
20±1	0,07	1,9	0,15	2,4	0,29	3,0

Sampel ikan uji yang digunakan untuk pengukuran aktivitas enzim digesti ditimbang bobot tubuhnya dan diukur panjangnya. Selanjutnya, bagian abdomen ikan uji dibedah dan dilakukan isolasi saluran digesti ikan. Saluran digesti kemudian ditimbang dan diukur panjangnya. Saluran digesti yang telah diisolasi dan dipartisi tersebut kemudian dibersihkan diatas lempengan es. Organ usus ditampung ke dalam botol sampel berlabel, lalu dihancurkan dengan menggunakan homogenizer listrik dalam 50 mM Tris-HCl buffer dingin dengan rasio 1:6 (w/v). Homogenat yang diperoleh kemudian ditampung ke dalam eppendorf 1,5 ml dan disentrifugasi menggunakan sentrifuge bersuhu 4 ° C pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, dan supernatan yang diperoleh siap digunakan untuk uji aktivitas enzim (Rungruangsak-Torrissen 2007). Kadar protein supernatan ditentukan dengan metode Lowry *et al.* (1951), menggunakan albumin sebagai standar. Kadar protein supernatan digunakan untuk menghitung aktivitas enzim.

Aktivitas protease diukur menggunakan metode hidrolisis kasein (Furne *et al.* 2005). Pengukuran dilakukan menggunakan buffer Tris-HCl dengan pH 8. Reaksi enzim dimulai dengan mencampurkan substrat kasein 1 % (w/v) pada buffer (350 µl) dan ekstrak enzim (50 µl) yang telah diaktivasi selama 10 menit. Campuran larutan tersebut diinkubasi selama 60 menit pada temperatur 37°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 750 µl asam trichloroacetat (TCA) 8 % (w/v). Kontrol diukur dengan menambahkan TCA ke ekstrak enzim sebelum ditambah dengan substrat. Standar diukur dengan metode yang sama, kecuali substrat diganti dengan tirosin. Seluruh campuran reaksi diendapkan dalam refrigerator dengan temperature 4°C selama 60 menit, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 280 nm menggunakan spektrofotometer. Aktivitas enzim protease

dihitung menggunakan kurva standar tirosin dan satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk mengkatalisis pembentukan 1 µg tirosin/menit/mg protein atau U/mg protein.

Aktivitas amilase diukur menggunakan metode dari Savona *et al.* (2011). Pengukuran dilakukan menggunakan buffer fosfat 0,1 M dengan pH 6,9. Substrat menggunakan amilum 1 % (w/v). Reaksi enzim dimulai dengan mencampurkan substrat amilum 1% sebanyak 350 µg kedalam campuran larutan buffer 350 µg dan ekstrak enzim 50 µg yang telah diaktivasi selama 10 menit. Campuran reaksi diinkubasi selama 15 menit pada temperatur 37°C. Larutan 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1 % (w/v) ditambahkan sebanyak 750 µg ke dalam campuran reaksi dan diinkubasi kembali dalam air mendidih (100°C) selama 5 menit, setelah itu didinginkan selama 20-60 menit. Pengukuran blanko juga dilakukan dengan prosedur yang sama, dengan ekstrak enzim ditambahkan segera setelah pemberian 1% DNS. Kurva standar maltosa dibuat dengan konsentrasi maltosa antara 0,21–3,36 µmol/mL. Absorbansi maltosa sebagai produk hidrolisis amilum oleh aktivitas amilase, diukur menggunakan spektrofotometer pada λ 540 nm. Aktivitas amilase dihitung sebagai jumlah enzim yang diperlukan untuk mengkatalis pelepasan maltosa (µmol)/menit/mg protein atau U/m protein.

Aktivitas lipase diukur menggunakan metode spektrofotometri (Markweg *et al.* 1995). Pengukuran dilakukan menggunakan buffer Tris-HCl dengan pH 8. Substrat menggunakan larutan p-nitrophenylpalmitat 0,01 M ke dalam isopropanol. Aktivasi enzim dimulai dengan mencampurkan buffer (1750 µl) dan ekstrak enzim (100 µl) dan diinkubasi selama 10 menit pada 37 °C. Selanjutnya reaksi enzim dimulai dengan mencampurkan substrat pNNP 100 mM sebanyak 300 µl ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan diinkubasi 30 menit pada temperature 37°C. Reagen Na₂CO₃ 0,1 M ditambahkan pada sampel

untuk menghentikan reaksi. Kontrol diukur dengan menambahkan Na₂CO₃ 0,1 M dan ekstrak enzim setelah larutan diinkubasi. Standar p-nitrofenol diukur dengan metode yang sama. Seluruh campuran reaksi selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 2500 µl lalu divorteks. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 410 nm menggunakan spektrofotometer. Aktivitas enzim lipase dihitung menggunakan kurva standar p-nitrofenol dan satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah 1 µg p-nitrofenol yang dilepaskan per menit per mg protein supernatan (Klahan *et al.* 2009).

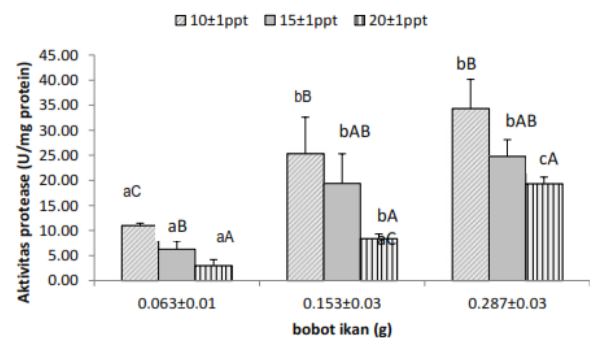
Data hasil pengukuran aktivitas enzim digesti protease, amilase, dan lipase dianalisis dengan *one way* ANOVA. Apabila terdapat perbedaan dilakukan analisis lanjut menggunakan uji *Tukey*. Analisis statistik menggunakan program SPSS 16.0 versi *Windows software*.

Hasil dan Pembahasan

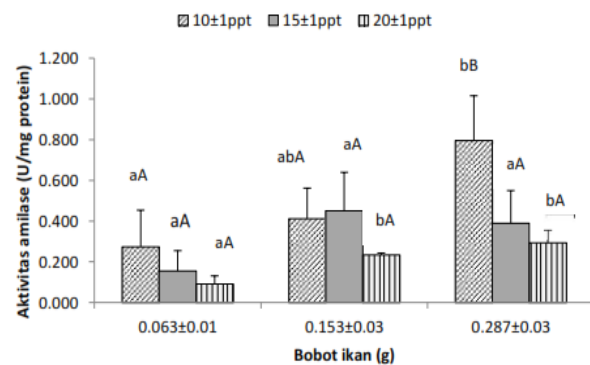
Hasil pengukuran aktivitas protease digesti ikan medaka antar bobot tubuh berbeda yang diperoleh dari Segara Anakan pada salinitas 10±1, 15±1 dan 20±1 ppt tersaji pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran tubuh yang berbeda berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap aktivitas protease digesti ikan medaka yang diperoleh dari Segara Anakan dengan salinitas berbeda. Aktivitas protease digesti ikan medaka pada grup 3 dengan bobot tubuh paling besar (0,287±0,03 g) dan grup 2 dengan bobot tubuh sedang (0,153±0,03 g) lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan dengan grup 1 dengan bobot tubuh paling kecil (0,063±0,01g) pada salinitas 10±1ppt dan 15±1 ppt. Namun aktivitas protease digesti ikan medaka dengan bobot tubuh 0,287±0,03 g dari salinitas 20±1 ppt secara signifikan lebih tinggi dibandingkan ukuran tubuh lainnya dan ikan berukuran sedang memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan ukuran kecil. Salinitas berbeda juga menunjukkan hasil yang berbeda nyata (P<0,05) terhadap aktivitas protease digesti ikan medaka pada masing-masing grup ukuran tubuh. Aktivitas protease ikan medaka berukuran tubuh kecil pada salinitas 10 ppt lebih tinggi dibandingkan salinitas lainnya dan pada salinitas 15±1 ppt juga lebih tinggi aktivitasnya dibandingkan 20±1 ppt. Sementara pada ikan medaka berukuran tubuh sedang dan besar, salinitas 10±1 ppt aktivitas proteasenya lebih tinggi dibandingkan salinitas 20± ppt, namun pada salinitas 15±1 ppt aktivitas proteasenya sama tingginya dibandingkan salinitas 10±1 dan 20±1 ppt.

Rataan aktivitas amilase digesti ikan medaka antar ukuran tubuh berbeda yang diperoleh dari Segara Anakan pada salinitas 10±1, 15±1 dan 20±1 ppt tersaji pada Gambar 2.

Berdasarkan analisis statistik menunjukkan bahwa aktivitas amilase digesti ikan medaka memiliki perbedaan yang signifikan (P<0,05) antar ukuran tubuh yang berbeda pada salinitas 10±1 dan 20±1 ppt. Namun, aktivitas amilasena pada salinitas 15±1 ppt menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan (P>0,05) antar ukuran tubuh yang berbeda. Aktivitas amilase digesti ikan medaka dengan bobot tubuh 0,287±0,03 g lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan ikan dengan bobot tubuh 0,063±0,01 g pada salinitas 10±1 ppt, namun pada ukuran tubuh 0,153±0,03 g menghasilkan aktivitas amilase yang tidak berbeda nyata (P>0,05) dengan bobot tubuh lainnya. Sementara aktivitas amilase digesti ikan medaka dengan bobot tubuh 0,287±0,03 g dan 0,153±0,03 g lebih tinggi (P<0,05) dibandingkan ikan dengan bobot tubuh 0,063±0,01 g pada salinitas 20±1 ppt. Salinitas berbeda ternyata menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata (P>0,05) terhadap aktivitas amilase digesti ikan medaka pada masing-masing grup ukuran tubuh, kecuali pada grup ukuran 3 dengan bobot 0,287 g (P<0,05). Aktivitas amilase ikan medaka berukuran tubuh besar, yaitu 0,287±0,03 g pada salinitas 10±1 ppt lebih tinggi dibandingkan salinitas lainnya.

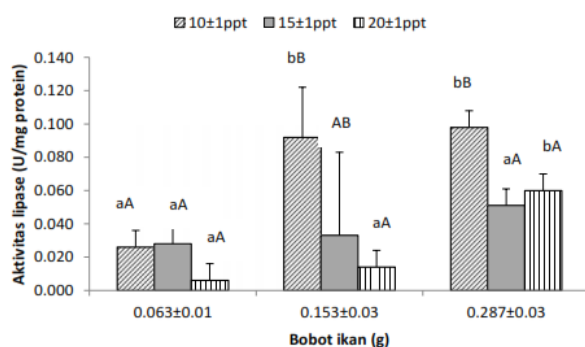


Gambar 1. Aktivitas protease ikan medaka pada bobot tubuh dan salinitas berbeda. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0.05)



Gambar 2. Aktivitas amilase ikan medaka pada bobot tubuh dan salinitas berbeda. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0.05).

Rataan aktivitas lipase digesti ikan medaka antar bobot tubuh berbeda yang diperoleh dari Segara Anakan pada salinitas 10 ± 1 , 15 ± 1 dan 20 ± 1 ppt tersaji pada Gambar 3. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa aktivitas lipase digesti ikan medaka memiliki perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) antar ukuran tubuh yang berbeda pada salinitas 10 ± 1 ppt dan 20 ± 1 ppt. Namun, aktivitas lipase digesti medaka pada salinitas 15 ± 1 ppt menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($P > 0,05$) antar ukuran tubuh yang berbeda. Aktivitas lipase digesti ikan medaka dengan bobot $0,287\pm 0,03$ g dan $0,153\pm 0,03$ g secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan medaka dengan bobot tubuh $0,063\pm 0,01$ g pada salinitas 10 ± 1 ppt. Sementara aktivitas lipase digesti ikan medaka dengan bobot $0,287$ g pada salinitas 20 ± 1 ppt lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan medaka pada ukuran tubuh lainnya. Salinitas berbeda juga menunjukkan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap aktivitas lipase digesti ikan medaka pada masing-masing grup ukuran tubuh., kecuali pada ikan kecil (grup 1; $P > 0,05$). Aktivitas lipase ikan medaka berukuran tubuh sedang (grup 2) pada salinitas 10 ± 1 ppt lebih tinggi dibandingkan salinitas 20 ± 1 ppt, namun pada salinitas 15 ± 1 ppt menghasilkan aktivitas lipase yang sama ($P > 0,05$) dengan salinitas 10 ± 1 dan 20 ± 1 ppt. Sementara pada ikan medaka berukuran besar (grup 3) aktivitas lipasenya pada salinitas 10 ± 1 ppt yang lebih tinggi dibandingkan salinitas 15 ± 1 dan 20 ± 1 ppt, namun antara salinitas 15 ± 1 dengan 20 ± 1 ppt aktivitasnya sama.



Gambar 3. Aktivitas lipase ikan medaka pada bobot tubuh dan salinitas berbeda. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Pada penelitian ini, proses digesti dapat dilihat dari aktivitas enzim digesti protease, amilase dan lipase ikan medaka yang dipengaruhi oleh perbedaan ukuran tubuh pada berbagai salinitas habitat. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kapasitas pencernaan protein, karbohidrat dan lemak yang tercermin sebagai aktivitas protease, amilase dan lipase di antara ikan dengan ukuran yang berbeda. Secara umum ikan medaka berukuran besar dan sedang

memiliki kemampuan mencerna protein, karbohidrat dan lemak yang lebih tinggi dibandingkan ikan berukuran kecil pada berbagai salinitas, kecuali ikan medaka pada salinitas 15 ± 1 ppt menunjukkan kapasitas digesti karbohidrat dan lemak yang sama di antara ikan dengan ukuran berbeda. Sementara ikan medaka berukuran besar yang hidup pada salinitas 10 ± 1 ppt dan 20 ± 1 ppt memiliki kemampuan mendigesti protein dan lemak yang lebih optimal dibandingkan ikan berukuran sedang dan kecil.

Korelasi positif antara peningkatan aktivitas enzim digesti dengan ukuran tubuh pada ikan medaka dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa organ pencernaan, khususnya pankreas memiliki peran dalam mensekresi enzim digesti (Larassagita *et al.* 2018), yang bekerja lebih optimal pada waktu ikan dewasa. Ketika pankreas mensekresikan enzim digesti dalam jumlah sedikit menyebabkan aktivitas enzim di saluran pencernaan akan rendah, sebaliknya apabila sekresinya banyak maka aktivitasnya akan meningkat (Chakrabarti *et al.* 2006). Hal ini mengindikasikan bahwa sekresi enzim digesti pada ikan medaka pada ukuran tubuh besar lebih tinggi daripada ikan medaka berukuran sedang dan kecil. Namun, jumlah sekresi enzim digesti dapat berubah ketika terjadi perubahan kebiasaan makan ikan. Perubahan ini berkaitan dengan jenis pakan (substrat) yang dikonsumsi (Taufik *et al.* 2017).

Keberadaan atau ketiadaan suatu enzim digesti yang dipengaruhi oleh kebiasaan dan cara makan pada ikan akan berkorelasi dengan morfologi segmen-segmen saluran pencernaannya yang fungsional (Odedeyi & Fagbenro 2010). Proses pencernaan yang optimal membantu menunjang pertumbuhan, yang merupakan representasi dari penambahan panjang dan bobot tubuh (Airin & Lumenta 2015). Hal ini sesuai dengan beberapa hasil penelitian aktivitas enzim digesti pada beberapa spesies ikan. Aktivitas protease dan amilase meningkat seiring dengan peningkatan panjang dan bobot pada ikan *Labeo rohita* (Umalatha *et al.* 2016), *Chelon labrosus* (Pujante *et al.* 2016) serta lipase pada *Mormyrus rume* (Odeyeyi & Fagbenro 2010). Sementara pada ikan gurami menunjukkan aktivitas α -amilase yang meningkat seiring pertambahan bobot tubuhnya (Susilo *et al.* 2015).

Menurut Pujante *et al.* (2016), fase pertumbuhan mempengaruhi tipe dan total aktivitas enzim digesti pada ikan. Hal tersebut menunjukkan bahwa total aktivitas protease, amilase dan lipase ikan medaka menjadi semakin tinggi ketika umurnya semakin bertambah. Beberapa hasil penelitian lainnya memperlihatkan fenomena yang sama, yaitu pada *Mormyrus rume* aktivitas enzim digesti ikan dewasa lebih tinggi daripada juvenil (Odedeyi & Fagbenro 2010) dan ikan *Chelon labrosus* ukuran besar lebih tinggi dibandingkan ukuran sedang dan kecil (Pujante *et*

al. 2016). Namun sebaliknya pada *Rasbora lateristriata* (Susilo et al. 2018), *Anguilla bicolor* McClelland (Taufik et al. 2017; Larassagita et al. 2018), serta menunjukkan aktivitas enzim lebih rendah pada ikan berukuran besar, bahkan tidak terdapat perbedaan aktivitas enzim di antara ukuran tubuh yang berbeda pada *Osteochillus hasselti* (Al-Gadri et al. 2014) dan *Gasterosteus aculeatus* (Hani et al. 2018).

Aktivitas enzim ikan medaka pada penelitian ini selain dipengaruhi oleh ukuran tubuh yang berbeda juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan, seperti salinitas (Moutou et al. 2004; Tsuzuki et al. 2007; Barman et al. 2005; 2012; Vargas-Chacoff et al. 2015; Hamed et al. 2016; Liu et al. 2017). Hal ini karena ikan tersebut hidup pada habitat air payau di Segara Anakan Cilacap yang mengalami fluktuasi salinitas harian dan musiman. Salinitas merupakan salah satu faktor lingkungan yang memiliki efek multidimensi pada fisiologi ikan (Barman et al. 2005). Menurut Pujante et al. (2016), bahwa salinitas lingkungan dapat berpengaruh secara langsung atau tidak langsung. Efek secara langsung berhubungan dengan modifikasi fungsionalnya berdasarkan perubahan pada pH, sama halnya dengan kekuatan ion yang meninggalkan lumen usus. Efek secara tidak langsung berhubungan dengan peningkatan metabolisme, dibutuhkan untuk menjaga homeostasis yang dilihat dari parameter kebutuhan pakan dan produksi enzim yang lebih besar untuk proses digesti. Variasi salinitas di lumen gastrik dapat merubah aktivitas enzim digesti yang akan mempengaruhi kemampuan digesti pakan dan performa pertumbuhan dengan meningkatkan kebutuhan energinya.

Pada penelitian ini, salinitas berbeda menyebabkan perubahan terhadap aktivitas enzim protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka. Hasil penelitian yang sama juga diperoleh pada penelitian lain, yaitu enzim protease, amilase dan lipase pada *Chanos chanos* (Barman et al. 2012), *Anguilla* (Ming-Zhong et al. 2015), *Eleginops maclovinus* (Vargas-Chacoff et al. 2015), dan *Alosa sapidissima* (Liu et al. 2017). Sementara pada ikan karnivora *sturgeon*, *Acipenser naccarii*, mampu mendigesti lipid dan protein dan karbohidrat (Furne et al. 2005).

Berdasarkan hasil penelitian pada salinitas 10 ppt, aktivitas protease, amilase dan lipase ikan medaka pada ukuran besar lebih tinggi dibandingkan ukuran lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa salinitas lingkungan 10±1 ppt merupakan salinitas lingkungan optimal bagi ikan berukuran besar. Pada salinitas tersebut, ikan dapat mengurangi belanja energi metabolik yang dibutuhkan untuk regulasi osmotik, peningkatan pertumbuhan dan daya guna pakan (Pujante et al. 2016). Adanya aktivitas enzim yang tinggi berkaitan erat dengan peran pankreas dalam mensekresi enzim untuk proses pencernaan dimana proses pencernaan berkorelasi dengan

produksi enzim. Jika pankreas memproduksi enzim dalam jumlah banyak dengan diiringi keberadaan pakan (substrat) melimpah maka proses pencernaan dapat berjalan dengan optimal (Nurhayati et al. 2014). Jika proses pencernaan optimal akan dapat menunjang pertumbuhan.

Hasil penelitian yang sama seperti penelitian ini ditunjukkan pada ikan *Mugil cephalus* yang menghasilkan aktivitas enzim proteolitik dan amilase optimum pada salinitas 10±1 ppt (Barman et al. 2005). Sementara aktivitas total proteinase alkalin pada *Sparus aurata* lebih tinggi pada salinitas 7-15 ppt (Moutou et al. 2004). Hasil yang tidak jauh berbeda diperlihatkan pada ikan sidat fase elver, *Anguilla bicolor pacifica* dengan aktivitas protease tertinggi di lambung dan liver, masing-masing dihasilkan pada salinitas 10 dan 18 ppt. Sedangkan pada ikan *Rutilus kutum* dengan transfer bertahap ke salinitas 10% memiliki pengaruh positif terhadap aktivitas enzim pencernaan dan laju transit makanannya (Gheisvandi et al. 2015). Fenomena yang sedikit berbeda dihasilkan oleh aktivitas amilase dan lipasnya. Pada salinitas 10-20 ppt menunjukkan aktivitas amilase digesti yang sama pada ikan medaka yang memiliki ukuran tubuh kecil dan sedang. Hasil yang serupa juga terlihat pada aktivitas lipase ikan medaka berukuran tubuh kecil. Fenomena tersebut ternyata juga ditunjukkan oleh *Anguilla bicolor pacifica* stadia elver, yaitu perbedaan salinitas tidak mempengaruhi aktivitas amilase (Ming-Zhong et al. 2015).

Semakin tinggi salinitas, aktivitas protease, amilase dan lipase digesti pada ikan medaka secara umum menjadi semakin rendah. Hal tersebut menunjukkan bahwa perubahan salinitas akan mempengaruhi rongga lumen intestinal dalam proses aktivasi enzim (Gheisvandi et al. 2015). Maka semakin tinggi salinitas, aktivasi enzim di rongga lumen usus ikan medaka akan semakin turun. Fenomena yang sama juga dihasilkan pada aktivitas protease *Sparus aurata* (Moutou et al. 2004), proteolitik dan amilase pada *Mugil cephalus* (Barman et al. 2005) serta aktivitas amilase dan lipase pada *Anguilla marmorata* (Ming-Zhong et al. 2015). Menurut Pujante et al. (2016), pengaruh diet garam terhadap kemampuan digesti nutrient dan energi pada ikan belum banyak diketahui. Investigasi detail dibutuhkan untuk mengeksplorasi berbagai penyebab penurunan kemampuan digesti yang berhubungan dengan peningkatan level NaCl pada ikan yang diadaptasikan pada air tawar dan air laut

Berdasarkan penelitian ini membuktikan bahwa aktivitas protease digesti ikan medaka lebih tinggi dibandingkan aktivitas amilasnya dan aktivitas amilase lebih tinggi dibandingkan aktivitas lipasnya. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kebutuhan protein pakan ikan medaka lebih tinggi dibandingkan kebutuhan karbohidrat dan lemak pakannya. Berdasarkan hal tersebut maka dalam upaya domestikasi sebaiknya ikan medaka

diberikan pakan dengan komposisi protein yang persentasenya lebih tinggi dibandingkan dengan karbohidrat dan lemak. Namun, penentuan kadar protein, karbohidrat dan lemak pakan yang optimal masih memerlukan kajian lebih lanjut. Sedangkan untuk pemeliharannya sebaiknya menggunakan media dengan salinitas 10 ± 1 ppt. Namun, berdasarkan hasil yang diperoleh dari habitat aslinya tersebut, dibutuhkan kajian lebih lanjut tentang pengaruh salinitas media pemeliharaan yang optimal pada skala laboratorium terhadap aktivitas enzim digesti dan kondisi fisiologi lainnya.

Simpulan

Aktivitas protease, amilase dan lipase digesti ikan medaka yang berasal dari Segara Anakan, Kabupaten Cilacap mengalami peningkatan seiring dengan peningkatan bobot tubuh dan menurunnya salinitas lingkungan.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Jenderal Soedirman yang telah mendanai Riset Peningkatan Kompetensi dari Dana BLU Universitas Jenderal Soedirman tahun anggaran 2018.

Daftar Referensi

- Airin, D. Y., dan Lumenta, C., 2015. Pakan diameter berbeda bagi pertumbuhan benih sidat (*Anguilla* sp). *e-Journal BUDIDAYA PERAIRAN*, 3(3), pp. 30-41
- Al-Gadri S.F, Susilo, U., and Priyanto, S. 2014. Aktivitas protease dan amilase pada hepatopankreas dan intestine ikan nilem (*Osteochilus Hasselti* C.V.). *Scripta Biologica*, 1(1), pp.43–48.
- Barman, UK., Jana, S. N., Garg, S. K., Bhatnagar, A. & Arasu, A.R.T. 2005. Effect of inland water salinity on growth, feed conversion efficiency and intestinal enzyme activity in growing grey mullet, *Mugil cephalus* (Linn.): Field and laboratory studies. *Aquaculture International*, 13, pp.241–256.
- Barman, UK., Garg, S.K. & Bhatnagar, A. 2012. Effect of different salinity and ration levels on growth performance and nutritive physiology of milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal) – Field and laboratory studies. *Fisheries and Aquaculture Journal*, Vol. 2012 (FAJ-53), pp.1-11.
- Chakrabarti, R., Rathore, R.M., Mittal, P. & Kumar, S. 2006. Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture*, 253, pp.694–702.
- Chang, C-H. Yang, W-K, Lin, C-H., Kang, C-K., Tang, C-H. & Lee, T-H. 2016. FXVD11 mediated modulation of Na^+/K^+ -ATPase activity in gills of the brackish medaka (*Oryzias dancena*) when transferred to hypoosmotic or hyperosmotic environments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 194, pp.19–26.
- Chen, T.H., Chou, S-M., Tang, C-H., Chen, C-Y., Meng, P-J., Ko, F-C. & Cheng, J-O. 2016. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, sexual behavior, and gene expression in the brackish medaka *Oryzias melastigma*. *Chemosphere*, 150, pp.566–575.
- Daryoush, K. & Ismail, A. 2014. Metallothionein-like protein levels in Java medaka fish (*Oryzias javanicus*) exposed to different concentrations of cadmium. *Walailak J. Sci. and Tech.*, 11(10), pp.883-893.
- Dong, X., Li, Y., Zhang, L., Zuo, Z., Wang, C. & Chen, M. 2016. Influence of difenoconazole on lipid metabolism in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Ecotoxicology*, 25 (5), pp.982-990.
- Furne, M.C. Hidalgo, A. Lo'pez, M. Garc'ia-Gallego, A.E. Morales, A. Domezain, J. Domezaine', A. Sanz. 2005. Digestive enzyme activities in adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study, *Aquaculture*, 250, pp.391–398.
- Gheisvandi, N., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R., & Hoseinifar, S. H. 2015. The Effects of gradual or abrupt changes in salinity on digestive enzymes activity of Caspian kutum, *Rutilus kutum* (Kamensky, 1901) larvae. *J. Appl. Ichthyol*, 31, pp.1107–1112.
- Gu, M., Bai, N. & Kortner, T.M. 2017. Taurocholate supplementation attenuates the changes in growth performance, feed utilization, lipid digestion, liver abnormality and sterol metabolism in turbot (*Scophthalmus maximus*) fed high level of plant protein. *Aquaculture*, 468, pp.597–604.
- Hamed, S. S., Jiddawi, N.S. & Bwathondi, P.O.J. 2016. Effect of salinity levels on growth, feed utilization, body composition and digestive enzymes activities of juvenile silver pompano *Trachinotus blochii*. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(6), pp.279-283.
- Hana dan Sari, I.G.A.A.R.P. 2013. Kajian aspek fisiologi ikan medaka (*Oryzias javanicus*) yang tertangkap di perairan segara anakan. *Prosiding Seminar Nasional "Pengembangan Sumber Daya Pedesaan dan Kearifan Lokal*

- Berkelanjutan III*" LPPM Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Hani Y.M.I., Marchand, A., Turies. C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J-M., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O. 2018. Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. PLoS ONE, 13(4), e0194932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>.
- Inoue, K. & Takei, Y. 2002. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. *Zoological Science*, 19(7), pp.727-734.
- Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R. & Engkagul, A. 2009. Characterization and activity of digestive enzymes in different sizes of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*, 43, pp.143 – 153.
- Larassagita, A. F., Hana, Susilo, U. 2018. aktivitas tripsin-like dan kimotripsin-like pada ikan sidat tropik *Anguilla bicolor* McClelland. *Scripta Biologica*, 5(1), pp.55-60.
- Li, A.J., Leung, P. T.Y., Bao, V.W.W., Lui, G.C.S. & Leung, K.M.Y. 2015. Temperature-dependent physiological and biochemical responses of the marine medaka *Oryzias melastigma* with consideration of both low and high thermal extremes. [Journal of Thermal Biology](https://doi.org/10.1007/s12267-015-9308-1), 54, pp.98–105.
- Liu, Z-F, Gao, X-Q., Yu, J-X., Qian, X-M., Xue, G-P., Zhang, Q-Y., Liu, B-L. & Hong, L. 2017. Effects of different salinities on growth performance, survival, digestive enzyme activity, immune response, and muscle fatty acid composition in juvenile American shad (*Alosa sapidissima*). *Fish Physiol Biochem*, 43(3), pp.761-773.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 1, pp.265-275.
- Markweg, H., Lang, M.S. & Wagner, F. 1995. Dodecanoic acid inhibition of lipase from *Acinetobacter* sp. OPA 55. *Enz. Microb. Tech*, 17, pp.512–516.
- Ming-Zhong, L., Rui-Zhang, G., Heng, J. 2015. Effects of the salinity on the growth performance and digestive enzyme activities of *Anguilla marmorata* elver and *A. bicolor pacifica* elver. [Acta Hydrobiologica Sinica](https://doi.org/10.1007/s12267-015-9308-1), 39(4), pp.653-660.
- Moutou, K.A., [Panagiota Panagiotaki](https://doi.org/10.1007/s12267-015-9308-1), P. & [Mamuris](https://doi.org/10.1007/s12267-015-9308-1), Z. 2004. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: A preliminary study. *Aquaculture Research*, 35, pp.912-914.
- Nurhayati, Utomo, N.B.P. & 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 Iktiologi Indonesia*, 14(3), pp.167-178.
- Odedeyi, D. O. & Fagbenro, O. A. 2010. Feeding habits and digestive enzyme in the gut of *Mormyrus rume* (Valenciennes 1846) (Osteichthyes Mormyridae). *Tropical Zoology*, 23, pp.75-89.
- Pujante, I.M., Diaz-Lopez, M., Mancera, J.M. & Moyano, F.J. 2016. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827). *Aquaculture Research*, pp.1-10. doi: 10.1111/are.13038.
- Rungruangsak-Torrison, K., Moss, R., Andresen, L.H., Berg, A. & Waagbo, R. 2006. Different expression of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*. 32: 7-23.
- Sakamoto, T., Kozaka, T., Takahashi, A., Kawachi, H., & Ando, M. 2001. Medaka *Oryzias latipes* as a model for hypoosmoregulation of euryhaline fishes. *Aquaculture*, 193, pp.347–354.
- Savona, B., Tramati, C., & Mazzola, A. 2011. Digestive enzymes in larvae and juveniles of farmed Sharpnose Seabream (*Diplodus puntazzo*) (Cetti, 1777). *The Open Marine Biology Journal*, 5(1), pp.47–57. [http://dx.doi.org/10.2174/1874450801105010047](https://doi.org/10.2174/1874450801105010047).
- Susilo, U., Yuwono, E., Rachmawati, F.N., Priyanto, S. & Hana. 2015. Karakteristik enzim digesti protease dan amilase Ikan Gurami (*O. gouramy* Lac.) pada fase pertumbuhan. *Biosfera*, 3(2), pp.134-142. [http://dx.doi.org/10.20884/1.mib.2015.32.2.3050](https://doi.org/10.20884/1.mib.2015.32.2.3050).
- Susilo, U., Sukardi, P., Affandi, R. 2018. The age dependent activities of digestive enzymes in Rasbora, *Rasbora lateristriata* Blkr., (Pisces: Cyprinidae). *Molekul*, 13(1), pp.80 – 91.
- Taufik, M., Hana, Susilo, U. 2017. Aktivitas protease dan amilase pada ikan sidat, *Anguilla bicolor* McClelland. *Scripta Biologica*, 4(3), pp.183–188 <https://doi.org/10.20884/1.SB.2017.4.3.418>.
- Tsuzuki, M.Y., Sugai, J.K., Maciel, J.S., Francisco, C.J., & Cerqueira, V.R. 2007. Survival, growth and digestive enzyme activity of juveniles of the

- fat snook (*Centropomus parallelus*) reared at different salinities. *Aquaculture*, 271, pp.319–325.
- Umalatha, Sridhar, N, Kushwaha, JP, Gangadhar, B. 2016. Digestive enzyme activities in different size groups and segments of the digestive tract in *Labeo rohita* (Day, 1878). *J. Aquac. Mar. Biol.*, 4(5), 00098. DOI: 10.15406/jamb.2016.04.00098.
- Vargas-Chacoff, L., Saavedra, E., Oyarzun, R., Martinez-Montano, E., Pontigo, J. P., Yanez, A., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J. M., Ortiz, E. & Bertran, C. 2015. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities. *Fish Physiol. Biochem.*, 41(6), pp.1369-1381.
- Woo, S., Denis, V. & Yum, S. 2014. Transcriptional changes caused by bisphenol a in *Oryzias javanicus*, a fish species highly adaptable to environmental salinity. *Mar. Drugs*, 12, pp.983-998.
- Yang, W-K., Kang, C-K., Chang, C-H., Hsu, A-D., Lee, T-H. & Hwang, P-P. 2013. Expression profiles of branchial FXYD proteins in the brackish Medaka *Oryzias dancena*: A potential saltwater fish model for studies of osmoregulation. *PLoS ONE*, 8(1), e55470.
- Yusof S., Ismail, A., Koito, T., Kinoshita, M. & Inoue, K. 2012. Occurrence of two closely related ricefishes, Javanese medaka (*Oryzias javanicus*) and Indian medaka (*O. dancena*) at sites with different salinity in Peninsular Malaysia. *Environ. Biol. Fish*, 93, pp.43–49.
- Yusof, S., Ismail, A. & Alias, M. S. 2014. Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of Java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin*, [85](#) (2), pp.494–498.