

## KEMAMPUAN IKAN TAWAR MENCERNA MIKROPLASTIK SECARA *IN VITRO*

### THE ABILITY OF FISH TO DIGEST MICROPLASTICS IN VITRO

Dudi Muhammad Wildan\*, Lia Sutiani, Ridwan Affandi

Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor,  
Jalan Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

\*Korespondensi: dudiwildan@apps.ipb.ac.id

#### ABSTRACT

Microplastics that pollute waters can accumulate and clog in the digestive tract of fish. It is still not well known whether microplastics can be digested by fish or not. Therefore, this research is important. The purpose of this study was to analyze the ability of digestive fluids in fish to digest microplastics *in vitro*. This research was conducted from January to April 2021 at the Laboratory of Aquatic Animal Physiology and Environmental Productivity (ProLing), Faculty of Fisheries and Marine Science, IPB University, Bogor. This research consisted of two stages, namely preliminary research (prelim test) and core research (core test). The parameters observed consisted of the digestive fluid performance (temperature, pH, turbidity) and microplastic conditions (size, color, and shape). The measurement results for each parameter of the digestive fluid performance of catfish (carnivore) and tilapia (omnivore) showed that there was no significant change in value for each treatment. Observation of the condition of microplastics after testing also showed no change in microplastics. This proved that *in vitro* fish digestive fluids were unable to digest microplastics.

Keywords: digestive ability, fish, *in vitro*, microplastic

#### ABSTRAK

Mikroplastik yang mencemari perairan dapat terakumulasi dan menyumbat saluran pencernaan ikan. Mikroplastik ini belum diketahui secara pasti mampu dicerna ikan atau tidak sehingga diperlukan penelitian terkait hal tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kemampuan cairan digestif pada ikan dalam mencerna mikroplastik secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga April 2021 di Laboratorium Fisiologi Hewan Air dan Produktivitas Lingkungan (ProLing), FPIK-IPB. Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan (uji *prelim*) dan penelitian inti (uji inti). Parameter yang diamati terdiri dari keragaan cairan digestif (suhu, pH, turbiditas, dan kondisi mikroplastik (ukuran, warna, dan bentuk). Hasil pengukuran pada setiap parameter keragaan cairan digestif (enzim) ikan lele (karnivor) dan ikan nila (omnivor) menunjukkan bahwa terjadi perubahan nilai yang tidak signifikan pada masing-masing perlakuan. Pengamatan kondisi mikroplastik setelah dilakukan pengujian juga menunjukkan tidak ada perubahan pada mikroplastik. Hal ini membuktikan bahwa secara *in vitro* cairan digestif ikan tidak mampu mencerna mikroplastik.

Kata kunci: ikan, *in vitro*, kemampuan mencerna, mikroplastik

## PENDAHULUAN

Sampah plastik di perairan pada tahun 2013 mencapai 299 milyar ton (Galgani 2015). Peningkatan jumlah sampah di perairan disebabkan penggunaan plastik sebagai kemasan produk, disebabkan sifatnya yang tahan air, fleksibel, dan harganya murah (Storck *et al.* 2015). Sampah plastik yang berada perairan dalam waktu yang lama akan mengalami perubahan ukuran yang lebih kecil. Plastik yang mengalami perubahan hingga <5 mm disebut dengan mikroplastik (Hidalgo-Ruz *et al.* 2012).

Mikroplastik telah menyebar ke permukaan perairan, sedimen, sedimen di mangrove, dan sepanjang pesisir (Talbot *et al.* 2022). Mikroplastik berpotensi dapat termakan oleh ikan disebabkan partikel plastik yang berukuran mikro dapat terakumulasi dan menyumbat saluran pencernaan ikan (Browne *et al.* 2013). Mikroplastik dalam saluran pencernaan pada 36,5% dari 504 ikan demersal dan ikan pelagis (Lusher *et al.* 2013). Keberadaan mikroplastik pada saluran pencernaan juga dapat menimbulkan rasa kenyang palsu sehingga ikan dapat kehilangan nafsu makan (Ryan *et al.* 2009). Selain itu, mikroplastik ini belum diketahui secara pasti mampu tercerna dalam saluran pencernaan ikan atau tidak sehingga diperlukan penelitian terkait hal tersebut.

Penentuan pencernaan mikroplastik pada ikan dapat dilakukan secara *in vitro*. Metode tersebut dianggap lebih praktis dan mudah dibandingkan dengan metode *in vivo*. Metode tersebut dilakukan menggunakan enzim-enzim pencernaan yang ada pada ikan sehingga kondisinya dibuat serupa dengan kondisi sesungguhnya pada saluran pencernaan ikan (Saputra 2014). Metode ini telah dilakukan oleh Wang *et al.* (2021) yang melakukan penelitian terkait pencernaan ikan dan manusia. Oleh sebab itu, perlu melakukan penelitian terkait kemampuan ikan tawar mencerna mikroplastik secara *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kemampuan cairan digestif pada ikan dalam mencerna mikroplastik secara *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Hewan Air (FHA) dan

Laboratorium Produktivitas Lingkungan (ProLing), Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstra cairan digestif di Laboratorium Produktivitas Lingkungan (ProLing) dan uji pendahuluan secara *in vitro* di Laboratorium Fisiologi Hewan Air (FHA).

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini terdiri atas dua tahap, yakni penelitian pendahuluan (uji *prelim*) dan penelitian inti (uji inti). Penelitian pendahuluan meliputi (1) uji keaktifan enzim pencernaan, (2) uji pengaruh larutan dengan pH berbeda terhadap struktur mikroplastik, dan (3) uji pencernaan mikroplastik secara *in vitro* menggunakan cairan digestif ikan karnivora (pH 2, 3, 4) dan ikan herbivora (pH 8, 9, 10). Penelitian inti terdiri dari uji pencernaan mikroplastik menggunakan cairan digestif ikan herbivora (pH ± 8) dan ikan karnivora (pH ± 3).

Penelitian pendahuluan yang dilakukan tidak menggunakan ulangan, sedangkan pada penelitian inti terdiri dari empat perlakuan dengan empat ulangan di setiap perlakuan. Perlakuan penelitian inti tersebut, yakni herbivora perlakuan kontrol (HK), ikan herbivora dengan pH basa [H (pH 8)], karnivora perlakuan kontrol (KK), dan ikan karnivora dengan pH asam [K (pH 3)]. Setiap kelompok ikan tersebut masing-masing diambil cairan digestifnya dan diberi perlakuan pH, kecuali perlakuan kontrol. Perlakuan kontrol yang digunakan bertujuan sebagai data pembanding dengan perlakuan yang diberikan. Perlakuan kontrol tersebut terdiri dari perlakuan kontrol herbivora dan karnivora yang terbuat dari masing-masing enzim ikan herbivora dan karnivora.

### Pengumpulan data

- 1) Penelitian pendahuluan: uji keaktifan enzim pada cairan digestif

Uji keaktifan enzim pada cairan digestif dilakukan untuk memastikan bahwa cairan digestif yang digunakan enzimnya aktif bekerja. Proses pengujian keaktifan ekstrak enzim tersebut dilakukan dengan menggunakan potongan daging ikan lele yang berbentuk dadu. Bobot setiap daging ikan tersebut sebesar 0,16 gram. Uji coba ini terdiri dari dua perlakuan, yaitu larutan cairan digestif ikan karnivora dengan pH ± 3

[K (pH 3)] dan larutan akuades tanpa perlakuan pH. Masing-masing perlakuan diberi empat ulangan. Pengujian dimulai dengan memasukkan potongan daging ke setiap perlakuan yang telah diisi masing-masing larutan sebanyak 10 ml. Potongan daging yang dimasukkan sebelumnya telah ditimbang dengan massa yang sama sebesar 0,16 gram.

Cara untuk mengetahui keaktifan ekstrak cairan enzim tersebut adalah dengan mengukur nilai turbiditas cairan dari awal (saat dimasukkan potongan daging) dan akhir (setelah diinkubasi selama  $\pm 6$  jam). Waktu inkubasi tersebut lamanya disesuaikan dengan lama pencernaan dalam ikan, yakni sekitar 6-8 jam. Selama inkubasi, larutan dihomogenisasi selama tiga menit untuk menyerupai gerakan peristaltik dalam saluran pencernaan. Setelah diinkubasi selama  $\pm 6$  jam kemudian diukur turbiditas cairan menggunakan turbidimeter merek hach 2100q dan dibandingkan hasilnya, serta diamati ada atau tidaknya perubahan pada potongan daging ikan di setiap perlakuan.

- 2) Penelitian pendahuluan: uji coba pengaruh pH larutan terhadap struktur mikroplastik

Uji coba dilakukan dengan hanya menggunakan cairan pH dan mikroplastik (menggunakan plastik kresek berukuran 1x1 mm). Cairan pH yang digunakan terdiri dari pH asam (2, 3, 4) dan pH basa (8, 9, 10). Nilai pH tersebut dipilih karena masuk dalam rentang nilai pH pada pencernaan ikan. Cairan pH dibuat dari larutan HCl atau NaOH, dan akuades. Setiap tabung reaksi tersebut diisi dengan akuades sebanyak 10 ml. Selanjutnya, sampel diberikan perlakuan dengan penambahan larutan HCl atau NaOH. Mikroplastik sebanyak lima buah kemudian dimasukkan ke dalam setiap sampel lalu diukur parameter keragaan cairan digestif awal (pH dan turbiditas). Setelah itu, sampel diinkubasi dan dihomogenkan selama  $\pm 12$  jam. Setelah masa inkubasi, parameter kondisi mikroplastik diukur dan diamati kembali di bawah mikroskop.

Hasil analisis *t-test* ( $p > 0,05$ ) menunjukkan bahwa nilai pH pada sampel tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis *t-test* terhadap turbiditas larutan mengalami perubahan

nilai yang cukup signifikan ( $p < 0,05$ ). Meski demikian, hasil pengamatan tidak menunjukkan adanya perubahan pada kondisi mikroplastik baik dari segi ukuran, warna, ataupun bentuk. Hasil uji ini kemudian menjadi acuan untuk dilakukan penelitian pendahuluan menggunakan cairan digestif ikan.

- 3) Penelitian pendahuluan: pencernaan mikroplastik secara invitro menggunakan cairan digestif ikan karnivora (pH 2, 3, 4) dan ikan herbivora (pH 8, 9, 10)

Penelitian pendahuluan ini terdiri dari dua perlakuan, yakni larutan digestif ikan karnivora dengan perlakuan pH asam (2, 3, 4) dan ikan herbivora dengan perlakuan pH basa (8, 9, 10). Larutan digestif ikan karnivora dibuat dari cairan digestif (10 ml) yang ditambahkan HCl sehingga diperoleh pH 2, 3, 4. Larutan ikan herbivora dibuat dari cairan digestif (10 ml) yang ditambahkan NaOH sampai diperoleh nilai pH 8, 9, dan 10.

Mikroplastik dimasukkan sebanyak lima buah di setiap sampel kemudian diukur parameter keragaan cairan digestif awal sebelum diinkubasi. Sampel diinkubasi dan dihomogenkan selama  $\pm 12$  jam. Setelah masa inkubasi, dilakukan pengukuran akhir pada masing-masing parameter dan diamati kondisi mikroplastiknya.

Hasil penelitian pendahuluan tersebut memperlihatkan terjadi perubahan nilai parameter sesudah diinkubasi, namun tidak signifikan berdasarkan hasil analisis *t-test* ( $p > 0,05$ ). Apabila dicermati dari pengamatan mikroplastik juga terlihat bahwa tidak terjadi perubahan fisik secara visual baik ukuran, warna, ataupun bentuknya. Hasil penelitian tersebut digunakan dalam penentuan pH yang paling sesuai untuk uji inti pada cairan digestif ikan herbivora dan karnivora. Semua uji coba tersebut menunjukkan tidak terjadi hidrolisis pada mikroplastik sehingga acuan pH yang digunakan pada penelitian inti disesuaikan dengan data literatur.

Sesuai dengan acuan literatur dan penelitian pendahuluan, nilai pH yang digunakan pada cairan digestif ikan herbivora berkisar  $\pm 8$ . Penentuan nilai pH tersebut sesuai dengan riset Amaral *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa pH 8 merupakan pH optimal yang diekstraksi dari usus ikan herbivora. Pada sampel

ikan karnivora menggunakan pH ± 3, yang sesuai dengan Solovyev *et al.* (2015) bahwa enzim pencernaan ikan karnivora optimum bekerja pada kisaran pH 2-3.

- 4) Penelitian inti: pencernaan mikroplastik secara *in vitro* menggunakan cairan digestif ikan herbivora (pH ± 8) dan ikan karnivora (pH ± 3)

Bahan yang dipakai pada penelitian inti menggunakan material yang sama dengan penelitian pendahuluan. Perbedaannya hanya pada nilai pH yang ditentukan. Prosedur yang dilakukan juga sama, yakni dimulai dari penyiapan sampel, pengukuran parameter di awal-akhir, dan pengamatan pada kondisi mikroplastik.

- 5) Analisis kondisi mikroplastik dan keragaan cairan digestif

Pengukuran pada parameter keragaan cairan digestif terdiri dari suhu, pH, dan turbiditas, sedangkan pengamatan kondisi mikroplastik dianalisis menggunakan aplikasi DinoLite 2.0. Kondisi fisik mikroplastik tersebut dapat dilihat dari perubahan bentuk, ukuran, dan warna mikroplastik. Analisis pada setiap parameter tersebut ditinjau perubahannya dari awal dan akhir setelah diuji secara *in vitro*.

**Parameter yang diamati**

Parameter yang diuji pada penelitian ini adalah kondisi mikroplastik dan keragaan cairan digestif. Kondisi fisik mikroplastik

tersebut diamati dari perubahan bentuk, ukuran, dan warna mikroplastik dari sebelum dan sesudah dicerna secara *in vitro*. Adapun pada cairan digestif dilihat dari perubahan suhu, pH, dan turbiditas pada sampel.

**Analisis data**

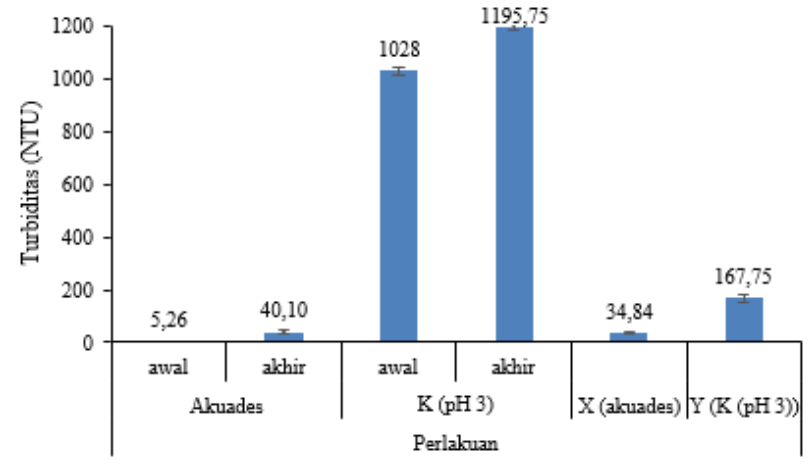
Data setiap parameter yang diuji kemudian dianalisis menggunakan analisis statistik deskriptif dan analisis sidik ragam. Analisis dilakukan menggunakan *software* Microsoft Excel 2013. Analisis sidik ragam yang digunakan, yaitu *paired sample t-test* dengan selang kepercayaan (SK) 95% untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh perlakuan yang diberikan terhadap parameter sampel.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

- 1) Penelitian pendahuluan: keaktifan enzim pencernaan

Penentuan keaktifan ekstrak enzim diukur berdasarkan hasil turbiditas larutan enzim sebelum dan sesudah diinkubasi. Keaktifan ekstrak enzim tersebut juga diamati dari kondisi potongan daging yang dicerna secara *in vitro* melalui proses inkubasi selama enam jam. Berikut adalah nilai turbiditas dari hasil pencernaan potongan daging secara *in vitro* yang disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Nilai turbiditas larutan pada kedua perlakuan

Nilai turbiditas larutan pada kedua perlakuan berdasarkan Grafik 1 menunjukkan bahwa turbiditas sampel K (pH 3) mengalami kenaikan signifikan. Rata-rata turbiditas awal sebesar 1028 NTU naik menjadi 1195,75 NTU. Turbiditas sampel akuades juga mengalami kenaikan, namun nilainya masih di bawah sampel K (pH 3). Rata-rata nilai turbiditas awal pada sampel akuades sebesar 5,26 NTU, kemudian meningkat menjadi 40,10 NTU. Perbedaan nilai turbiditas masing-masing sampel dapat ditinjau dari selisih kedua sampel, yaitu pada grafik X (akuades) dan Y [K (pH 3)]. Nilai turbiditas sampel akuades meningkat sebesar 34,84 NTU, sedangkan kenaikan sampel K (pH 3) mencapai 167,75 NTU.

- 2) Penelitian inti: uji kecernaan mikroplastik menggunakan ikan herbivora (pH  $\pm$  8) dan ikan karnivora (pH  $\pm$  3)

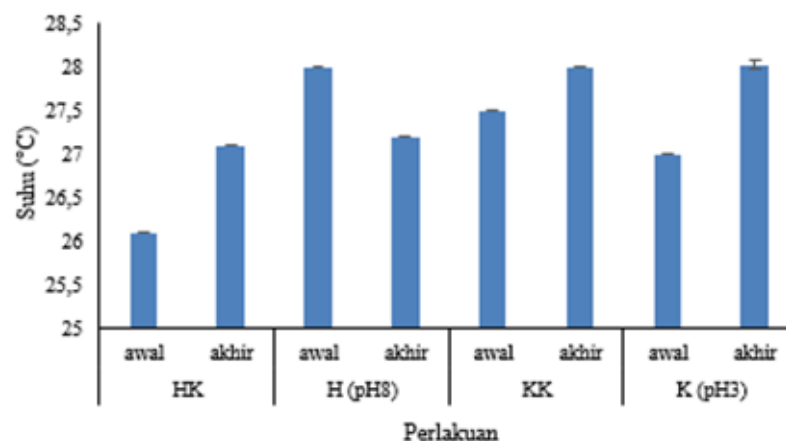
Keragaan cairan digestif ikan diukur untuk mengetahui kinerja enzim pencernaan dalam menghidrolisis mikroplastik. Keragaan cairan digestif tersebut diamati berdasarkan parameter suhu, pH, dan turbiditas pada setiap sampel. Berikut hasil pengukuran parameter suhu, pH, dan turbiditas pada Gambar 2, 3, dan 4.

Nilai suhu pada keempat perlakuan berdasarkan Grafik 2, menunjukkan bahwa rata-rata nilai suhu akhir pada

setiap perlakuan naik, kecuali pada perlakuan H (pH 8). Rata-rata suhu akhir pada sampel cairan digestif ikan herbivora, yaitu sampel HK sebesar 27,1°C dan H (pH 8) mencapai 27,2°C. Rata-rata suhu akhir pada sampel tersebut nilainya tidak berbeda jauh. Kondisi yang sama juga terjadi pada sampel cairan digestif ikan karnivora. Nilai suhu akhir sampel KK diperoleh sebesar 28°C, sedangkan pada suhu sampel K (pH 3) mencapai 28,03°C. Selain suhu, keragaan cairan digestif juga diukur nilai pH-nya yang disajikan pada Gambar 3.

Rata-rata nilai pH pada masing-masing perlakuan berdasarkan Gambar 3, mengalami perubahan setelah diuji selama 12 jam. Rata-rata nilai pH akhir pada sampel HK, H (pH 8), KK, dan K (pH 3) masing-masing adalah 6,83; 7,91; 5,96; dan 3,26. Nilai pH akhir pada sampel H (pH 8) mengalami penurunan, sedangkan pH sampel HK meningkat. pH sampel K (pH 3) mengalami kenaikan dan pH sampel KK menurun. Perubahan nilai pH tersebut menggambarkan kinerja enzim selama masa inkubasi.

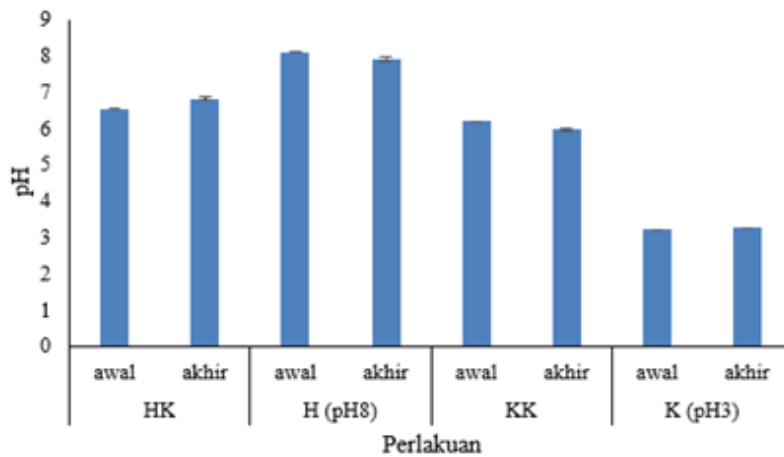
Kinerja enzim juga diamati berdasarkan kekeruhan sampel. Kekeruhan sampel ditinjau dari pengukuran turbiditas awal dan akhir. Rata-rata nilai turbiditas pada setiap perlakuan yang disajikan dalam Gambar 4.



Gambar 2. Nilai suhu pada keempat perlakuan

Keterangan:

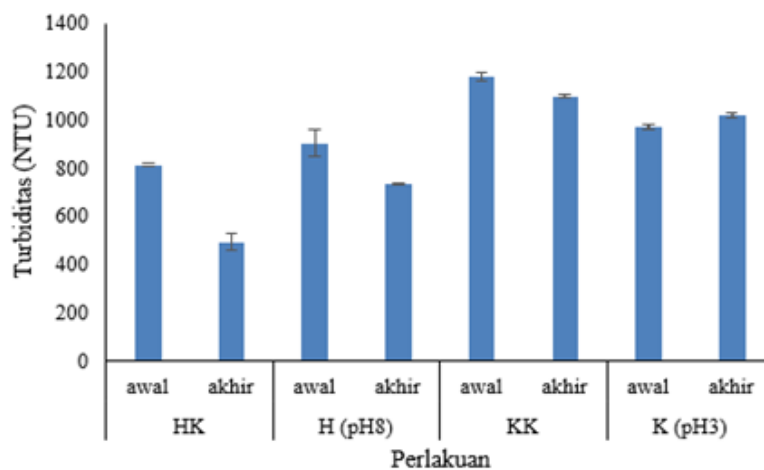
- HK : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan kontrol  
 H (pH 8) : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan pH  $\pm$ 8  
 KK : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan kontrol  
 K (pH 3) : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan pH  $\pm$ 3



Gambar 3. Nilai pH pada keempat perlakuan

Keterangan:

- HK : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan kontrol
- H (pH 8) : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan pH ±8
- KK : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan kontrol
- K (pH 3) : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan pH ±3



Gambar 4. Nilai turbiditas pada keempat perlakuan

Keterangan:

- HK : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan kontrol
- H (pH 8) : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan pH ±8
- KK : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan kontrol
- K (pH 3) : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan pH ±3

Nilai turbiditas pada keempat perlakuan berdasarkan Gambar 4, menunjukkan nilai turbiditas sampel cairan digestif ikan karnivora cenderung lebih tinggi dibandingkan sampel cairan digestif ikan herbivora. Rata-rata turbiditas akhir pada sampel KK mencapai 1097,75 NTU dan sampel K (pH 3) sebesar 1020,75 NTU. Berbeda dengan sampel tersebut, turbiditas pada sampel cairan digestif ikan herbivora nilainya lebih rendah. Nilai turbiditas akhir pada sampel HK dan H (pH 8) diperoleh

masing-masing 439,25 NTU dan 735,50 NTU. Rata-rata nilai turbiditas pada setiap perlakuan tersebut mengalami penurunan, kecuali pada sampel K (pH 3). Turbiditas sampel K (pH 3) tersebut naik sebesar 48,25 NTU.

### 3) Kondisi mikroplastik

Parameter yang diamati pada kondisi mikroplastik terdiri dari ukuran, bentuk, dan warna mikroplastik. Penilaian setiap parameter proporsinya ditentukan berdasarkan perubahannya

sebelum dan sesudah diuji. Berikut adalah nilai proporsi pada masing-masing parameter kondisi mikroplastik yang disajikan pada Tabel 1.

Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya perubahan pada masing-masing parameter kondisi mikroplastik. Mikroplastik tersebut tidak mengalami

kerusakan pada warna, ukuran, maupun bentuknya. Hal tersebut dapat dilihat dari nilai proporsi nol pada setiap parameter di semua ulangan sampel. Kondisi ini menandakan bahwa setiap perlakuan yang diberikan tidak memberikan pengaruh pada kondisi mikroplastik.

Tabel 1. Dokumentasi dan nilai proporsi kondisi mikroplastik

Perlakuan	Ulangan	Dokumentasi	Total Skor
HK	1		0
	2		0
	3		0
	4		0
H (pH ± 8)	1		0
	2		0
	3		0
	4		0
KK	1		0
	2		0
	3		0
	4		0
K (pH ± 3)	1		0
	2		0
	3		0
	4		0

Keterangan:

HK : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan kontrol

H (pH 8) : sampel cairan digestif ikan herbivora dengan perlakuan pH ±8

KK : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan kontrol

K (pH 3) : sampel cairan digestif ikan karnivora dengan perlakuan pH ±3

Proporsi warna : 0 = tetap, 1 = pudar, 2 = transparan/bening

Proporsi ukuran : 0 = tetap, 1 = sedikit berkurang (< 10%), 2 = banyak berkurang (>10%)

Proporsi bentuk : 0 = tetap, 1 = sedikit berubah (< 10%), 2 = banyak berubah (>10%)

## Pembahasan

Enzim adalah biokatalisator yang susunannya terdiri dari bagian protein (Alam *et al.* 2013). Enzim yang bekerja dalam proses pencernaan, yaitu enzim pepsin, amilase, khitinase, dan lipase. Salah satu bagian saluran pencernaan ikan, yakni lambungnya merupakan sumber peptida dan asam amino sehingga menjadi sumber enzim pepsin (Pasaribu *et al.* 2018). Enzim pepsin termasuk enzim protease yang menjadi enzim pencernaan utama di lambung. Ikan karnivora diketahui memiliki aktivitas enzim protease yang lebih tinggi dibandingkan ikan herbivora (Chauduri *et*

*al.* 2012). Kandungan protein yang lebih tinggi pada jenis makanan ikan karnivora menyebabkan enzim protease lebih banyak dibutuhkan untuk mencerna makanan ikan tersebut. Enzim protease berfungsi untuk mengkatalis hidrolisis ikatan peptida pada protein dan menghasilkan asam amino (Ogino *et al.* 2008). Pada ikan herbivora, aktivitas enzim amilase diketahui lebih tinggi karena besarnya kandungan karbohidrat pada pakannya (Furne *et al.* 2005).

Kinerja enzim pencernaan dipengaruhi oleh faktor suhu dan pH. Faktor ini yang mengakibatkan enzim dapat bekerja secara optimal dan efisien. Suhu memiliki peran dalam mempengaruhi aktivitas enzim

karena sistem kerja dari rangkaian asam amino dalam enzim berkaitan erat dengan kondisi suhu. Suhu yang optimum akan membantu reaksi enzimatik mencapai maksimum (Almeida & Marana 2019). Suhu dalam reaksi tersebut juga berfungsi untuk meningkatkan interaksi pada substrat dan enzim. Meski demikian, apabila suhu enzim mencapai nilai optimumnya maka enzim dapat mengalami denaturasi sehingga kehilangan aktivitas katalitiknya. Kondisi ini membuat enzim menjadi tidak aktif bekerja (inaktivasi). Proses tersebut terjadi karena suhu yang terlalu tinggi akan mendorong terputusnya ikatan hidrogen pada enzim sehingga terjadi perubahan struktur asam amino (Alam *et al.* 2013).

Hasil pengukuran suhu enzim pada setiap perlakuan menunjukkan adanya kenaikan suhu setelah diinkubasi selama 12 jam, kecuali pada perlakuan H (pH 8). Kenaikan suhu pada enzim tersebut biasanya menunjukkan adanya aktivitas enzim yang meningkat (Noviyanti *et al.* 2012). Terjadinya penurunan suhu pada perlakuan H (pH 8) tersebut dapat menandakan adanya penurunan aktivitas enzim. Meski demikian, penurunan suhu pada perlakuan H (pH 8) nilainya tidak terlalu signifikan. Hal ini dapat dilihat dari hasil analisis *t-test* ( $p > 0,05$ ) yang menolak  $H_0$  sehingga menunjukkan tidak ada perubahan yang signifikan antara nilai suhu sebelum dan sesudah percobaan.

Adanya perubahan suhu pada masing-masing sampel diduga akibat penyesuaian suhu sampel dengan kondisi suhu lingkungan. Perolehan suhu tersebut juga sesuai suhu dalam penelitian ini, yakni pada suhu kamar. Suhu kamar menurut Husna (2016) sekitar 27-30°C sehingga suhu pada sampel juga berkisar pada rentang tersebut. Selain itu, Zhao *et al.* (2011) mengungkapkan bahwa kinerja enzim pada lambung ikan mengalami penyesuaian suhu sesuai lingkungan habitatnya. Penelitian Pasaribu *et al.* (2018) juga menyatakan bahwa aktivitas enzim pepsin bekerja stabil pada suhu dengan kisaran 20-60°C. Enzim tersebut kemudian akan menurun aktivitasnya pada saat suhunya lebih dari 60°C. Kondisi tersebut membuktikan bahwa selama percobaan berlangsung, proses enzimatik dalam pencernaan *in vitro* masih aktif karena berada pada kisaran suhu tersebut.

Kinerja enzim tersebut ditandai dengan terlepasnya ion-ion hidrogen ( $H^+$ ) dari asam

amino yang terlepas dari protein. Lepasnya ion-ion  $H^+$  yang sifatnya asam tersebut akan mendorong pH pada pencernaan menurun (Almeida & Marana 2019). Kondisi ini terjadi pada sampel dengan perlakuan H (pH 8) dan KK yang mengalami penurunan pH setelah diinkubasi. Pada perlakuan K (pH 3) dan HK mengalami kenaikan pH. Sebenarnya, penambahan larutan HCl pada cairan digestif ikan karnivora dapat membantu kinerja enzim pepsin karena sifatnya yang asam sebagai pengganti HCl yang diproduksi lambung sehingga dapat membantu hidrolisis protein (Allen & Flemstrom 2005). Hal tersebut dikarenakan terkandung 44 asam amino tambahan dalam pepsinogen yang apabila terkena asam (HCl), asam amino tersebut akan diubah menjadi pepsin secara autokatalitik (Allen & Flemstrom 2005). Apabila pepsinogen tersebut berada pada lingkungan alkali yang sifatnya netral dan lemah maka sifatnya akan stabil (Allen & Flemstrom 2005). Maka dari itu, perlakuan kontrol baik cairan digestif ikan herbivora maupun karnivora menunjukkan nilai pH yang sesuai.

Sampel K (pH 3) dengan penambahan asam (HCl) memang mengalami kenaikan nilai pH di akhir inkubasi, sedangkan sampel H (pH 8) mengalami penurunan setelah diberi perlakuan basa (NaOH). Meski demikian, bukan berarti terjadinya perubahan yang berbeda dengan kondisi kontrolnya tersebut menunjukkan enzim tidak bekerja. Perubahan nilai pH pada kedua sampel tersebut tidak signifikan berdasarkan hasil analisis *t-test* ( $p > 0,05$ ) sehingga tidak terlalu berarti nilainya. Kondisi ini juga didukung hasil penelitian Nalinanon *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa enzim pepsin pada ikan karnivora, yakni ikan tuna albakor memiliki rentang stabilitas kerja dalam kondisi pH 2-5. Oleh sebab itu, meski sampel K (pH 3) mengalami kenaikan tetapi masih berada pada stabilitas kerja enzim tersebut, yakni dengan pH sekitar 3,26.

Hal yang sama juga terjadi pada sampel H (pH 8) yang sebenarnya masih dalam kisaran pH basa meski rata-rata nilai pHnya menurun di akhir. Apabila ditinjau dari karakteristik aktivitasnya, enzim yang bekerja pada pencernaan ikan herbivora merupakan enzim protease basa (De Silva dan Anderson 1995). Riset Lobel (1981) menyatakan jika nilai pH pada pencernaan ikan herbivora berkisar 6,1-8,4 sehingga nilai akhir pH sampel H (pH 8) sebesar 7,91 masih dalam rentang pH aktivitas enzim. Di



sisi lain, penurunan pH basa pada sampel H (pH 8) dapat pula dipengaruhi oleh suhu sampel yang mengalami penurunan ataupun diduga adanya stressor dari mikroplastik yang mengganggu kinerja enzim.

Daya cerna cairan digestif terhadap mikroplastik juga ditinjau dari nilai kekeruhan sampel atau turbiditasnya. Setelah ditinjau secara keseluruhan ternyata nilai turbiditas pada cairan digestif ikan karnivora cenderung lebih tinggi dibandingkan pada ikan herbivora. Menurut Chauduri *et al.* (2012), pencernaan ikan karnivora memiliki aktivitas protease lebih tinggi karena digunakan untuk mencerna makanan yang besar kadar proteinnya. Hal inilah yang menyebabkan perolehan ekstrak cairan digestif pada ikan karnivora lebih keruh dibandingkan ikan herbivora. Turbiditas pada setiap sampel tersebut mengalami penurunan pula kecuali pada sampel K (pH 3). Meningkatnya turbiditas pada sampel K (pH 3) menandakan adanya hidrolisis protein oleh enzim yang nilainya lebih besar dibandingkan pada tiga perlakuan lainnya. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Susilo *et al.* (2015) yang menyatakan jika aktivitas protease umumnya tinggi pada suasana asam sehingga turut mendorong proses hidrolisis oleh enzim.

Perubahan nilai turbiditas cairan awal tersebut menggambarkan kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat. Penurunan nilai turbiditas pada akhir pengukuran sampel HK, H (pH 8), dan KK menandakan bahwa hidrolisis enzim bekerja optimal pada pH asam seperti yang terjadi pada sampel K (pH 3). Adanya penambahan larutan HCl pada sampel K (pH 3) juga akan membantu pemecahan peptida dalam sampel (Pasaribu *et al.* 2018). Selain itu, hasil analisis *t-test* menyatakan jika perubahan turbiditas pada setiap sampel nilainya tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) dengan nilai thitung yang lebih besar dibandingkan dua parameter lainnya. Hasil analisis *t-test* tersebut menunjukkan bahwa ketiga parameter keragaan cairan digestif tidak mengalami perubahan signifikan. Data tersebut menandakan bahwa perlakuan yang diberikan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap setiap parameter keragaan cairan digestif.

Pengamatan berikutnya pada kondisi mikroplastik yang dimasukkan dalam sampel. Hasil penelitian kecernaan mikroplastik secara *in vitro* ini membuktikan bahwa mikroplastik tidak mengalami perubahan

yang nyata setelah diinkubasi (Tabel 1). Perlakuan yang diberikan khususnya dalam pH asam tidak mengakibatkan kondisi mikroplastik berubah pada pengamatan secara langsung melalui mikroskop ataupun aplikasi DinoLate 2.0. Hal tersebut diduga akibat daya resistan yang kuat pada mikroplastik jenis LDPE tersebut. Kondisi ini juga didukung dengan penelitian Enders *et al.* (2017) yang membuktikan tidak ditemukannya perubahan atau efek dari plastik LDPE yang diberi garam natrium dari asam hipoklorit (NaOCl) atau cairan pemutih selama 10 jam dalam suhu 80°C. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sangat terbatas kemampuan ikan mencerna mikroplastik melalui proses enzimatik tersebut.

Kemampuan enzim dalam mencerna tersebut juga dapat dibandingkan dengan hasil pencernaan secara *in vitro* pada uji coba keaktifan enzim menggunakan potongan daging ikan. Hasilnya menunjukkan bahwa potongan daging ikan mampu terhidrolisis dan luruh dalam larutan ekstrak enzim dengan pH 3, sedangkan pada mikroplastik tidak mengalami kerusakan sama sekali. Hal ini dikarenakan fungsi enzim pencernaan ikan yang memang fungsinya untuk mencerna bahan makanan yang masuk seperti memecah lemak, protein, dan zat lainnya yang terkandung dalam makanan. Hasil tersebut juga didukung dengan riset Lusher *et al.* (2017) yang menunjukkan bahwa enzim pepsin tidak dapat menyebabkan kerusakan pada polimer, tetapi efektif dalam mencerna bahan biogenik atau material organik.

Mikroplastik yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim pencernaan tersebut dapat berbahaya jika terus terakumulasi dalam waktu lama di saluran pencernaan ikan. Retensi mikroplastik yang tidak terhidrolisis dapat menyumbat saluran pencernaan sehingga memicu timbulnya rasa kenyang palsu. Dampaknya, menurunkan nafsu makan pada ikan hingga kerusakan fisik pada vili atau epitel saluran pencernaan (Barboza *et al.* 2019). Sifat asam pada lambung ikan karnivora dan sifat basa pada usus ikan herbivora secara perlahan juga berdampak pada bahan kimia yang terkandung dalam mikroplastik. Paparan bahan kimia mikroplastik tersebut dapat menimbulkan adanya pengaruh stressor sehingga mempengaruhi aktivitas enzim pencernaan. Stressor tersebut dapat menyebabkan penurunan enzim antioksidan sehingga menimbulkan stress

oksidatif sebagai respon terhadap paparan mikroplastik (Prinz dan Korez 2020). Paparan mikroplastik juga dapat mengganggu homeostasis enzim pencernaan di kelenjar pencernaan sehingga terjadi penurunan filtrasi dalam proses pencernaan (Wang *et al.* 2019). Hal inilah yang dapat mengakibatkan kinerja enzim tidak normal atau terganggu. Mikroplastik yang digunakan dalam penelitian ini masuk dalam kelompok jenis plastik plastik polietilen (PE) dengan tipe *Low-Density Polyethylene* (LDPE) dengan nomor kode 3 (Surono 2013). Jenis plastik tersebut mengandung senyawa kimia seperti *phthalates*, *bisphenoal A*, dan *4-nonyphenol*. Penelitian Mutsuga (2005) menyatakan bahwa selain senyawa tersebut terdapat kandungan bahan kimia lainnya seperti *formaldehyde* dan *acetaldehyde*. Senyawa kimia tersebut dapat dilepaskan atau terurai ketika berada di perairan dan pewarna sintetik serta senyawa karbon yang volatile dari plastik tersebut juga dapat terlepas (Guart *et al.* 2011).

Hasil penelitian Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) menyatakan bahwa kantong plastik hitam memiliki kandungan yang lebih berbahaya dibandingkan warna lainnya. Hal ini disebabkan plastik tersebut terbuat dari plastik bekas yang didaur ulang. Ditambah lagi, mikroplastik LDPE yang digunakan dalam penelitian ini berwarna hitam sehingga memiliki kandungan zat yang lebih berbahaya. Jenis plastik LDPE berwarna hitam tersebut diketahui memiliki kandungan logam berat kromium (Cr) sebesar 67 mg/kg plastik LDPE (Alam *et al.* 2018). Hasil penelitian Afrinaldi dan Rahayu (2019) menunjukkan bahwa secara umum kantong plastik daur ulang mengandung logam berat timbal (Pb) dan raksa (Hg).

Berkaitan dengan hal tersebut, maka bahan kimia pada mikroplastik yang terurai di perairan maupun mikroplastik yang terakumulasi dalam tubuh ikan dapat berdampak buruk bagi ikan. Penelitian Peda *et al.* (2016) menyebutkan bahwa terdapat efek fisiologis seperti perubahan saluran usus dan gangguan fungsi usus akibat paparan mikroplastik pada ikan bass laut Eropa (*Dicentrarchus labrax*) yang diberi pakan pelet (0,1% PVC) selama 90 hari. Pengaruh buruk mikroplastik pada ikan juga ditemukan pada penelitian Rochman *et al.* (2013) terhadap ikan medaka Jepang (*Oryzias latipes*) yang menunjukkan respon stress setelah diberi makan perlakuan plastik LDPE. Hal ini dibuktikan dengan

terganggunya sistem kerja hati dengan gejala penipisan glikogen, vakuolasi lemak, dan nekrosis sel tunggal. Mikroplastik jenis LDPE tersebut mengandung bahan kimia seperti PAHs, PCBs, dan PBDEs. Kandungan logam berat pada jenis plastik tersebut juga dapat menyebabkan kerusakan otak, saraf, dan hati apabila terakumulasi secara terus-menerus pada makhluk hidup seperti ikan (Canopoli *et al.* 2018).

Selain itu, diketahui eksperimen yang dilakukan di laboratorium tidak mampu mengidentifikasi efek mikroplastik pada individu di alam karena paparan (bentuk, ukuran, ataupun konsentrasi mikroplastik) dengan habitat atau kondisi yang berbeda dengan alam liar serta pemicu stress lainnya. Banyak hasil penelitian memproyeksikan bahwa peningkatan kelimpahan mikroplastik memiliki pengaruh terhadap fisiologis organisme, namun masih terbatas hasil risetnya. Kondisi tersebut dikarenakan kurangnya informasi mengenai dampak mikroplastik yang dipersulit dengan minimnya pengetahuan tentang efek fisiologis mikroplastik secara alami (Lusher *et al.* 2017).

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Mikroplastik tidak mengalami perubahan fisik baik dari kondisi warna, ukuran, ataupun bentuknya setelah dicerna secara *in vitro*. Tidak adanya perubahan tersebut menandakan cairan digestif ikan tidak mampu mencerna mikroplastik. Secara *in vitro*, enzim yang terdapat pada cairan digestif ikan herbivora dan karnivora tidak dapat mencerna mikroplastik.

### Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melakukan penelitian yang sama namun menggunakan jenis mikroplastik yang berasal dari alam. Penelitian tersebut berguna sebagai data pembanding sekaligus mendekati kondisi mikroplastik yang sebenarnya ketika dicerna oleh ikan. Pengamatan mikroplastik dianjurkan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) agar dapat terlihat jelas perbedaan kondisi mikroplastik sebelum dan sesudah diberi perlakuan, terutama pada bagian permukaannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrinaldi B, Rahayu T. 2019. Pengukuran Kandungan Logam Berat pada Kantong Plastik Daur Ulang. polimer. [bppt.go.id](http://bppt.go.id). [30 Juli 2019].
- Alam MS, Sarjono PR, Aminin ALN. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Selusase dari Bakteri Selulolitik Termofilik Kompos Pertanian Desa Bayat, Klaten, Jawa Tengah. *J Mat Sains*. 21(2): 48-53.
- Alam O, Billah M, Yajie D. 2018. Characteristics of Plastic Bags and Their Potential Environmental Hazards. *Resour Conserv Recycl*. 132: 121-129.
- Allen A, Flemström G. 2005. Gastrointestinal Mucus Bicarbonate Barrier: Protection against Acid and Pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288(1): C1-C19. DOI: 10.1152/ajpcell.00102.2004.
- Almeida VM, Marana SR. 2019. Optimum Temperature May Be A Misleading Parameter in Enzyme Characterization and Application. *PLOS ONE*. 14(2): e0212977. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212977>.
- Amaral IPG, Carneiro-cu-Cunha MG, Carvalho LB, Bezerra. 2005. Fish Trypsin Immobilized on Ferromagnetic Dacron. *Proc Biochem*. 41(5): 1231-1216.
- Barboza LGA, Lopes C, Oliveira P, Bessa F, Otero V, Henriques B, Raimundo J, Caetano M, Vale C, Guilhermino L. 2019. Microplastic in Wild Fish from North East Atlantic Ocean and Its Potential Neurotoxic Effects, Lipid Oxidative Damage, and Human Health Risks Associated with Ingestion Exposure. *Sci Total Environ*. 717(134625): 1-14.
- Browne MA, Niven SJ, Galloway TS, Rowland SJ, Thomson RC. 2013. Microplastic Moves Pollutants and Additives to Wrom, Reducing Functions Linked to Health and Biodiversity. *Curr Biol*. 23(23): 2388-2392.
- Canopoli L, Fidalgo B, Coulon F, Wagland ST. 2018. Physico-chemical Properties of Excavated Plastic from Landfill Mining and Current Recycling Routes. *Waste Management*. 30: 1-13.
- Chaudhuri A, Mukherjee S, Homechaudhuri S. 2012. Diet Composition and Digestive Enzymes Activity in Carnivorous Fishes Inhabiting Mudflats of Indian Sundarban Estuaries. *Turkish J Fish Aquat Sci*. 12: 265-275.
- De Silva SS, Anderson TA. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. London (UK): Chapman and Hall.
- Enders K, Lenz R, Beer Sabrina, Stedmon CA. 2017. Extraction of Microplastic from Biota: Recommended Acidic Digestion Destroys Common Plastic Polymers. *J Mar Sci*. 74(1): 326-331.
- Furne M, Hidalgo MC, Lopez A, Garcia GM, Morales AE, Domezain A, Domezaine J, Sanz A. 2005. Digestive Enzyme Activities in Adriatic Sturgeon (*Acipenser naccarii*) and Rainbow Trout (*Onchorynchus mykiss*): A Comparative Study. *Aquaculture*. 250: 391-398.
- Galgani F. 2015. The Mediterranean Sea: From Litter to Microplastic. Proceeding of MICRO2015 Seminar on Microplastic Issues 2015; 2015 May 4-6; Piran, Slovenia. [https://defishgear.net/conferences/micro2015/item/download/83\\_075d1c6fe7c6e293e02691bafcf6334](https://defishgear.net/conferences/micro2015/item/download/83_075d1c6fe7c6e293e02691bafcf6334). [10 Januari 2021].
- Guart A, Bono-Blay A, Borrel A, Lacorte S. 2011. Migration of Plasticizers Phthalates, Bisphenol A, and Alkylphenols from Plastic Containers and Evaluation of Risk. *Food Addit Contam*. 28(5): 676-685.
- Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of The Methods Used for Identification and Quantification. *Environ Sci Technol*. 46(6): 3060-3075.
- Husna FE. 2016. Penentuan Kondisi Simpan untuk Mempertahankan Viabilitas dan Vigor Benih Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Lobel PS. 1981. Trophic Biology of Herbivorous Reef Fishes: Alimentary pH and Digestive Capabilities. *J Fish Biol*. 19(4): 365-397.
- Lusher AL, McHugh M, Thompson R. 2013. Occurrence of Microplastics in the Gastrointestinal Tract of Pelagic and Demersal Fish from The English Channel. *Mar Poll Bull*. 67(1-2): 94-99.
- Lusher AL, Welden NA, Sobral P, Cole M. 2017. Sampling, Isolating, and Identifying Microplastics Ingested by Fish and Invertebrates. *R Soc Chem*. 9: 1346-1360.
- Mutsuga M. 2005. Survey of Formaldehyde, Acetaldehyde, and Oligomers in Polyethylene Terephthalate Food

- Packaging Materials. *Food Addit Contam.* 22(8): 783-789.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. 2010. Biochemical Properties of Pepsinogen and Pepsin from Stomach of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.* 121: 49-55.
- Noviyanti T, Ardinarsih P, Winda R. 2012. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Enzim Protease dari Daun Sansaking (*Pycnarrhena cauliflora* Diels). *JKK.* 1(1): 31-34.
- Ogino H, Otsubo T, Ishikawa H. 2008. Screening, Purification, and Characterization of A Leather-Degrading Protease. *Biochemical Engineering Journal.* 38(2): 234-240.
- Pasaribu E, Nurhayati T, Nurilmala M. 2018. Ekstraksi dan Karakterisasi Enzim Pepsin dari Lambung Ikan Tuna (*Thunnus albacares*). *JPHPI.* 21(3): 486-496.
- Peda C, Caccamo L, Fossi MC, Maricchiolo G. 2016. Intestinal Alternations in European Sea Bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) Exposed to Microplastics: Preliminary Result. *Environ Pollut.* 212: 251-256.
- Prinz P, Korez S. 2020. Understanding How Microplastics Affect Marine Biota on Cellular Level is Important for Assessing Ecosystem Function: A Review. doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4\_6. [30 Juli 2021].
- Rochman CM, Hoh E, Kurobe T, Teh SJ. 2013. Ingested Plastic Transfers Hazardous Chemicals to Fish and Induces Hepatic Stress. *Scientific Reports.* 3(3263): 1-7.
- Ryan PG, Moore CJ, van Franeker JA, Moloney CL. 2009. Monitoring The Abundance of Plastic Debris in the Marine Environment. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 364(1526): 1999-2012.
- Saputra D. 2014. Penentuan Daya Cerna Protein *In Vitro* Ikan Bawal (*Colossoma macropomum*) pada Umur Panen Berbeda. *Comtech.* 5(2): 1127-1133.
- Solovyev MM, Kashinskaya EN, Izvekova GI, Glupov VV. 2015. pH Values and Activity of Digestive Enzymes in the Gastrointestinal Tract of Fish in Lake Chany (West Siberia). *Journal of Ichthyology.* 55(2): 251-258.
- Storck FR, Karlsruhe TZW, Kools SAE, Rinck-Pfeiffer SR. 2015. Microplastics in Fresh Water Resources. [https://www.researchgate.net/publication/286441847\\_Microplastics\\_in\\_Fresh\\_Water\\_Resources\\_GWRC](https://www.researchgate.net/publication/286441847_Microplastics_in_Fresh_Water_Resources_GWRC). [30 Juli 2021].
- Surono UB. 2013. Berbagai Metode Konversi Sampah Plastik Menjadi Bahan Bakar Minyak. *Jurnal Teknik.* 3(1): 32-40.
- Susilo U, Yuwono E, Rachmawati FN, Priyanto S, Hana. 2015. Karakteristik Enzim Digesti, Protease, dan Amilase Ikan Gurami (*Osphronemus gourami* Lac.) pada Fase Pertumbuhan. *Biosfera.* 32(2): 134-142.
- Talbot R, Cárdenas-Calle M, Mair JM, López F, Cárdenas G, Pernía B, Hartl MGJ, Uyaguari M. 2022. Macroplastics and Microplastics in Intertidal Sediment of Vinces and Los Tintos Rivers, Guayas Province, Ecuador. *Microplastics.* 1(4): 651-668. DOI: <https://doi.org/10.3390/microplastics1040045>.
- Wang R, Mahtab M, Amir M, Mohammad JT. 2021. In-vitro Digestion Models: A Critical Review for Human and Fish and A Protocol for In-Vitro Digestion in Fish. *Bioengineered.* 12(1): 3040-3064. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1940769>.
- Wang X, Huang W, Wei S, Shang Y, Gu H, Wu F, Lan Z, Hu M, Shi H, Wang Y. 2019. Microplastic Impair Digestive Performance but Show Little Effects on Antioxidant Activity in Mussels Under Low pH Conditions. *Environ Pollut.* 258: 1-26.
- Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS, Dave D. 2011. Extraction, Purification, and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *J Food Process Technol.* 2: 126.