

**RESPON CACING *Tubifex* TERHADAP LIMBAH YANG  
MENGANDUNG MERKURI**

**DISERTASI**



Oleh

**IRAWATI MEI WIDIASTUTI  
NIM. 157080100111009**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**





**DISERTASI**

**RESPON CACING *Tubifex* TERHADAP LIMBAH YANG  
MENGANDUNG MERKURI**

Oleh :

**IRAWATI MEI WIDIASTUTI  
NIM. 157080100111009**

**Menyetujui  
Komisi Pembimbing,**

**Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS.  
Promotor**

**Dr. Ir. Muhammad Musa, MS.  
Ko-Promotor 1**

**Dr. Asus Maizar S.H., SPI., MSi.  
Ko-Promotor 2**

**Mengetahui,  
Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

**Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS  
NIP. 196003221986011001**

**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : Respon Cacing *Tubifex* Terhadap Limbah Yang Mengandung Merkuri

Nama Mahasiswa : Irawati Mei Widiastuti

NIM : 157080100111009

Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan

Program Mlnat : Manajemen Sumberdaya Perairan

Komisi Pembimbing

Promotor : Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS

Ko-Promotor 1 : Dr. Ir. Muhammad Musa, MS

Ko-Promotor 2 : Dr. Agus Maizar S.H., SPi., MSi.

Komisi Penguji

Dosen Penguji 1 : Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA. Ph.D

Dosen Penguji 2 : Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS

Dosen Penguji 3 : Prof. Dr. Ir. Agoes Soegianto, DEA

Tanggal Ujian : 27 Juni 2019



**PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI**

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Juni 2019

Nama : Irawati Mei Widiastuti  
NIM. : 157080100111009

## PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No.20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 dan pasal 70).

Malang, Juni 2019



Nama : Irawati Mei Widiastuti  
NIM. : 157080100111009

SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI

plagiarism-detector  
Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention



19 0081 D

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
PASCASARJANA**

---

**SERTIFIKAT BEBAS PLAGIASI**  
Nomor: 981/UN10.F40/PN/2019  
Sertifikat ini diberikan kepada:

Nama : Irawati Mei Widiastuti  
NIM : 157080100111009  
Program Studi : Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan  
Fakultas : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas : Universitas Brawijaya

Dengan Judul **Disertasi**  
**Respon Cacing Tubifex terhadap Limbah yang Mengandung Merkuri**  
Telah dideteksi tingkat plagiasinya secara online pada tanggal **15 Mei 2019**  
dan dinyatakan **bebas plagiasi** dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ .

Malang, 15 Mei 2019  
Ketua Badan Penerbitan Jurnal

Direktur  
Prof. Dr. Marjono, M.Phil  
NIP. 196211161988031004

Indah Yanti, S.Si., M.Si.  
NIP. 19791129 200501 2 002



Irawati Mei Widiastuti, lahir di Malang pada 9 Mei 1969. Anak kesembilan dari sembilan bersaudara dari pasangan Bapak Karno (Alm) dan Ibu Siti Soelasiatoen (Almh). Pada tahun 1994 menikah dengan Fahrudin, S.Sos (Alm.) dan dikaruniai seorang anak yang bernama Muhammad Yusuf Afandi.

Pada tahun 1975 memasuki pendidikan Sekolah Dasar di SDN Blimbing 2 Malang dan lulus tahun 1981, dilanjutkan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama di SMPN 5 Malang lulus tahun 1984 dan SMAN 1 Malang lulus tahun 1987. Pada tahun yang sama melanjutkan studi jenjang S1 di Program Studi Budidaya Perikanan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya lulus tahun 1992. Pada tahun 2001 meraih gelar Magister Biologi dari Institut Teknologi Bandung (ITB). Penulis diberi kesempatan untuk melanjutkan studi jenjang S3 (Doktor) pada tahun 2015 pada Program Studi Ilmu Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya dengan mengambil minat Manajemen Sumberdaya Perairan (MSP). Sejak tahun 1994 sampai sekarang berkarir sebagai staf pengajar di Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Tadulako Palu Sulawesi Tengah.

Malang, Juni 2019

**UCAPAN TERIMA KASIH**

Segala puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Disertasi ini. Penulis menyadari bahwa proses penyelesaian Disertasi ini tidaklah mudah, perlu waktu yang lama dan pengorbanan yang tidak terhitung. Penulisan Disertasi ini juga tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak, oleh karena itu, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR., MS., selaku Rektor Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS., selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.
3. Dr. Ir. Anik Martinah Hariati, M.Sc., selaku Ketua Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya.
4. Rektor Universitas Tadulako Palu dan Dekan Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Tadulako atas bantuan dan kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk melanjutkan studi jenjang S3.
5. Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS. Sebagai Promotor, Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. dan Dr. Asus Maizar SH., S.Pi., M.Si sebagai Ko-Promotor 1 dan Ko-Promotor 2 yang dengan ikhlas dan sabar memberikan arahan, bimbingan dan motivasi yang besar dari awal penyusunan proposal sampai penyelesaian Disertasi.
6. Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D., Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS., Prof. Dr. Ir. Agoes Soegianto, DEA. dan Dr. Ulfah Utami, M.Si sebagai Tim Penguji Disertasi, atas masukan dan sarannya.
7. Segenap staf pengajar pada Program Doktor Ilmu Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
8. Para pegawai dan staf administrasi pada Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang.



9. Kementerian Riset dan Teknologi dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan bantuan Beasiswa Program Pendidikan Dalam Negeri (BPPDN).

10. Kedua orangtua Bapak Karno (Alm) dan Ibu Siti Soelasitoen (Almh), Suami Fahrudin K. Ngongo, S.Sos (Alm) yang setia menemani dan senantiasa mendoakan dan memberi dukungan sampai akhir hayatnya, dan anak Muhammad Yusuf Afandi, S.Si. yang selalu memberi dukungan dan memotivasi penulis untuk cepat menyelesaikan pendidikan Doktor, serta keluarga besar atas doa, dukungan dan motivasi selama penulis mengikuti pendidikan Doktor.

11. Rekan-rekan mahasiswa Program Doktor Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya atas kebersamaan, dukungan dan motivasi serta bantuannya.

12. Seluruh pihak yang telah berkontribusi dalam penyelesaian studi dan penyusunan disertasi penulis.

Semoga semua pihak yang telah memberikan bantuan, doa dan motivasi selalu diberi limpahan rahmat dan hidayah dari Allah SWT. Aamiin. Semoga Disertasi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Malang, Juni 2019

Penulis

Nama : Irawati Mei Widiastuti

NIM : 157080100111009

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

## A

**AAS** : *Atomic Absorption Spectrofotometer*, metode analisa spektrofotometri dimana dasar pengukurannya adalah pengukuran serapan suatu sinar oleh suatu atom, sinar yang tidak diserap, diteruskan dan diubah menjadi sinyal listrik yang terukur, untuk analisa logam, karena sederhana, sensitif dan selektif.

**Aklimatisasi** : suatu upaya penyesuaian fisiologis atau adaptasi dari suatu organisme terhadap suatu lingkungan baru yang dimasukinya.

**Ambang letal atas** : Konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% dari hewan uji

**Ambang letal bawah** : Konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian sama sekali pada hewan uji.

**Analisis Probit** : Metode analisis yang digunakan untuk menggambarkan hubungan antara peubah prediktor dan peubah respon lebih dari 1 kategori.

## C

**Cacing *Tubifex*** : Cacing *Tubifex* merupakan hewan tingkat rendah yang tidak memiliki tulang belakang (avertebrata) dan bertubuh lunak, hidup di perairan tawar daerah tropis dan subtropis, tubuhnya beruas-ruas dan mempunyai saluran pencernaan, termasuk kelompok Annelida.

## D

**Dosis** : Kadar dari materi (kimiawi, fisik, biologis) yang dapat mempengaruhi suatu organisme secara biologis; makin besar kadarnya, makin besar pula dosisnya.

## E

**EDX (*Energy Dispersive X-Ra*)** : Suatu teknik x-ray yang digunakan untuk mengidentifikasi komposisi unsur bahan, lampiran instrument SEM/TEM. Data yang dihasilkan terdiri dari spektrum yang menunjukkan puncak dari unsur-unsur yang membentuk komposisi sebenarnya dari sampel yang dianalisis, pemetaan unsur dari sampel dan analisis citra sesuai dengan komposisi unsur.

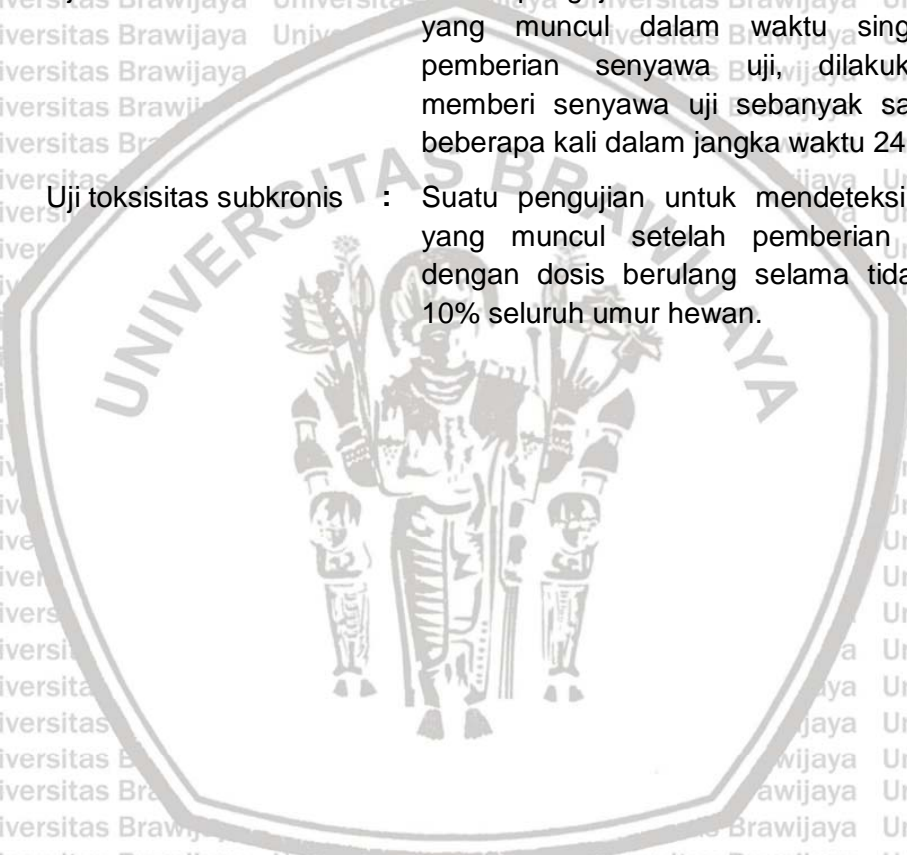
- H**as Brawijaya : *Hemotoxillin Eosin* (HE), Metode pewarnaan jaringan dengan prinsip inti yang bersifat asam akan menarik zat/larutan yang bersifat basa sehingga akan berwarna biru. Sitoplasma bersifat basa akan menarik zat/larutan yang bersifat asam sehingga berwarna merah.
- H**istologi : Ilmu yang mempelajari tentang struktur jaringan secara detail menggunakan mikroskop pada sediaan jaringan yang dipotong tipis.
- K**onsentrasi : Ukuran yang menggambarkan jumlah zat terlarut di dalam larutan.
- L**arutan : Campuran homogen yang terdiri dari dua atau lebih zat.
- LC50** : *Lethal Concentration Median*, konsentrasi senyawa kimia yang menyebabkan kematian hewan uji sebesar 50%.
- M**ortalitas : Ukuran jumlah kematian pada suatu populasi.
- P**erairan : Kumpulan massa air pada suatu wilayah tertentu, baik yang bersifat dinamis (bergerak atau mengalir) seperti laut dan sungai maupun statis (tergenang) seperti danau.
- S**ampel : Bagian dari populasi. Sampel biasanya diambil karena tidak bisa dilakukan penelitian kepada seluruh anggota populasi karena terlalu banyak.
- S**edimen : Suatu proses pengendapan material yang ditranspor oleh media air, angin, es, atau gletser di suatu cekungan.

**SEM** : *Scanning Electronic Microscopy*, mikroskop yang menggunakan hamburan elektron dalam membentuk bayangan, menghasilkan bayangan dengan resolusi yang tinggi, dapat menghasilkan perbesaran yang maksimal tanpa memecahkan gambar.

**Uji toksisitas** : Suatu uji untuk mendeteksi efek toksin suatu zat pada sistem biologi dan untuk memperoleh data dosis-respon yang khas dari sediaan uji.

**Uji toksisitas akut** : Suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian senyawa uji, dilakukan dengan memberi senyawa uji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam.

**Uji toksisitas subkronis** : Suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji dengan dosis berulang selama tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan.



## RINGKASAN

IRAWATI MEI WIDIASTUTI, NIM. 157080100111009 Program Doktor Ilmu Perikanan dan Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Respon Cacing *Tubifex* Terhadap Limbah Yang Mengandung Merkuri. Dibimbing oleh Promotor Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS. dan Ko-Promotor Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. dan Dr. Asus Maizar, S.H., S.Pi., M.Si.

Limbah pengolahan emas di Desa Kejapanan Pasuruan menghasilkan limbah yang mengandung merkuri dan dibuang ke perairan. Merkuri adalah logam berat yang sangat toksik bagi organisme perairan terdegradasi sehingga terakumulasi dalam tubuh cacing. Salah satu organisme di perairan tersebut adalah cacing *Tubifex*, termasuk Annelida (Oligochaeta) famili Naididae yang tahan terhadap polusi dan menjadi organisme akuatik terakhir yang hilang dari ekosistem perairan ketika pencemaran meningkat. Berdasarkan efek paparan merkuri terhadap organisme, diperlukan informasi berkaitan dengan respon cacing *Tubifex* terhadap merkuri pada perairan yang tercemar.

Tujuan umum penelitian adalah menganalisis respon cacing *Tubifex* dalam limbah perairan yang mengandung merkuri. Tujuan khusus penelitian adalah 1) Mengidentifikasi kualitas lingkungan pada aliran pembuangan limbah industri yang mengandung merkuri, 2) Menentukan konsentrasi merkuri yang dapat ditoleransi oleh cacing *Tubifex*.; 3) Menganalisis efek paparan merkuri terhadap kondisi histologi dan respon cacing *Tubifex*. Hasil penelitian diharapkan dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan (teoritis) dan bagi masyarakat (praktis).

Penelitian dilaksanakan di laboratorium, pengambilan sampel dilakukan di Desa Kejapanan Kecamatan Gempol Kabupaten Pasuruan dari bulan Agustus 2018 sampai Mei 2018. Pengujian kualitas air, logam berat, preparasi dan pengamatan preparat dilakukan di Laboratorium di lingkungan Universitas Brawijaya Malang. Penelitian terdiri dari tiga tahap yaitu tahap I. Kajian kualitas lingkungan; Tahap II. Penentuan toleransi konsentrasi merkuri pada *Tubifex*; Tahap III. Analisis dampak paparan merkuri pada *Tubifex*.

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah deskriptif. Metode penetapan konsentrasi merkuri menggunakan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS), pewarnaan Hemotoxilyn Eosin (HE) untuk histologi, dan SEM/EDX untuk mengetahui morfologi dan konsentrasi merkuri, metode ELISA untuk menentukan kadar MT, metode spektrofotometri untuk menentukan kadar ROS, sedangkan penentuan kadar SOD, CAT dan GPx menggunakan kit. Analisis yang digunakan adalah analisis deskriptif untuk mendeskripsikan kualitas lingkungan dan menjelaskan efek paparan merkuri pada *Tubifex*, selain itu digunakan juga analisis probit untuk memperoleh nilai LC<sub>50</sub> 48jam.

Hasil penelitian tahap I menunjukkan bahwa logam merkuri yang terkandung di perairan di lokasi penelitian telah melebihi ambang batas maksimum yang direkomendasikan. Konsentrasi logam yang tertinggi pada saluran air limbah. Logam tersebut terkandung di dalam air, sedimen dan pada cacing *Tubifex*. Konsentrasi logam yang terkandung di dalam sedimen lebih tinggi daripada konsentrasi logam di air dan *Tubifex*. Konsentrasi logam yang terkandung di dalam air, sedimen dan cacing saling berkorelasi positif. Kadar MT yang terdapat pada cacing *Tubifex* berkorelasi positif dengan konsentrasi logam pada cacing. Kadar superoksida dismutasi (SOD) pada konsentrasi logam yang tinggi mengakibatkan aktivitas SOD pada *Tubifex* tinggi.

Tahap II menunjukkan bahwa *Tubifex* mampu mentoleransi merkuri, pada uji toksisitas akut diperoleh LC<sub>50</sub> 48 jam sebesar 83,16 µg/L. Konsentrasi

mercuri berkorelasi positif dengan mortalitas *Tubifex*, artinya apabila konsentrasi mercuri tinggi menyebabkan persentase mortalitas cacing meningkat. Selain itu, konsentrasi mercuri pada media berkorelasi positif dengan konsentrasi mercuri dalam tubuh *Tubifex*, apabila konsentrasi mercuri di tinggi maka konsentrasi mercuri dalam tubuh cacing tinggi pula.

Tahap III menunjukkan bahwa kadar MT pada uji akut dan subkronis terlihat pada perlakuan konsentrasi mercuri yang tinggi mengakibatkan konsentrasi mercuri pada *Tubifex* tinggi pula. Aktivitas ROS, SOD, CAT dan GPx pada uji akut dan subkronis menunjukkan kecenderungan dengan konsentrasi mercuri yang tinggi menyebabkan aktivitas SOD, CAT dan GPx meningkat. Cacing *Tubifex* yang dipapar  $HgCl_2$  menunjukkan gerakan yang sangat aktif, mengeluarkan lendir yang lebih banyak dan setiap individu saling terpisah. Selain itu, cacing yang dipapar mercuri menunjukkan proses fragmentasi yaitu proses terpisahnya tubuh cacing menjadi dua bagian. Paparan mercuri menyebabkan perubahan dan kerusakan setae pada tubuh *Tubifex*. Pada paparan mercuri (subkronis) menunjukkan terjadinya kerusakan setae yaitu setae patah. Kerusakan juga terjadi pada sel-sel epidermis dan sel-sel chloragogen pada bagian usus cacing. Kebaharuan dari penelitian ini adalah berdasarkan parameter penelitian (MT, ROS, SOD, CAT, GPx, Histologi) bahwa cacing *Tubifex* mampu bertahan hidup pada lingkungan perairan yang tercemar mercuri dengan konsentrasi 41,58  $\mu g/L$ .



## SUMMARY

IRAWATI MEI WIDIASTUTI, NIM. 157080100111009 Doctoral Program in Fisheries and Marine Sciences, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Universitas Brawijaya. Respon of *Tubifex* Worms Against Waste Containing Mercury. Supervised by Promoter Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS. and Co-Promoter Dr. Ir. Muhammad Musa, MS. and Dr. Asus Maizar, S.H., S.Pi., M.Sc.

Gold processing waste in Kejapanan Pasuruan Village produces waste containing mercury and is discharged into the farm. Mercury is a heavy metal that is very toxic to degrade so that it accumulates in the body of worms. One culture in the fishery is *Tubifex*. *Tubifex* worms including the Naididae family's Annelida (Oligochaeta) which are resistant to pollution and the last to be aquatic lost from the ecosystem increases increased pollution compilation. Based on the toxic nature of mercury in life, information is needed about *Tubifex*'s adaptability to survive in mercury-polluted environments.

The general objective of the study was to analyze the adaptability of *Tubifex* in wastes containing mercury. Specific objectives of the study are 1) Identifying environmental quality in industrial waste streams containing mercury, 2) Determining mercury concentrations that can be tolerated by *Tubifex* worms; 3) Determine mercury effect to *Tubifex* worms. The results of the study are expected to be useful for science (rational), and beneficial to society and industry (practical).

The research was conducted in the laboratory, sampling was conducted in Kejapanan Village, Gempol District, Pasuruan Regency from August 2018 to May 2018. Air quality testing, heavy metals, preparation and inspection of preparations were carried out in the Laboratory in the University of Brawijaya Malang. The study consisted of three strong namely me. Environmental quality study; Phase II. Determination of mercury balance assessment on *Tubifex*; Stage III. Analysis of the impact of mercury exposure on *Tubifex*.

The method used in this study is descriptive. The method of determining mercury concentration using Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS), Hemotoxilyn Eosin (HE) staining for histology, and SEM / EDX to determine morphology and mercury concentration, ELISA method for measuring MT levels and spectrophotometric methods to measure ROS, CAT, SOD and GPx. The analysis used is descriptive analysis to describe the quality of the environment and explain the effect of mercury on *Tubifex* besides probit analysis is also used to obtain a 48 hour LC<sub>50</sub> value.

The results of phase I research showed that mercury contained in the waters at the study site had exceeded the recommended maximum threshold. The highest metal concentration in sewerage. The metal is contained in water, sediments and in *Tubifex* worms. The concentration of metals contained in sediments is higher than the concentration of metals in water and *Tubifex*. The concentration of metals contained in water, sediments and worms is positively correlated. MT levels found in *Tubifex* worms are positively correlated with metal concentrations in worms. Superoxid dismutation (SOD) activity at high metal concentrations resulted in high SOD activity on *Tubifex*.

Stage II shows that *Tubifex* is able to tolerate mercury, in the acute toxicity test obtained a 48-hour LC<sub>50</sub> of 83.16 µg / L. Mercury concentrations are positively correlated with *Tubifex* mortality, meaning that if high mercury concentrations cause the percentage of worm mortality to increase. In addition, the mercury concentration in the media is positively correlated with the mercury

concentration in Tubifex's body, if the mercury concentration in the media is high, the mercury concentration in the worm's body is also high.

Stage III shows that MT levels and densities in the acute and subchronic tests seen in the treatment of high mercury concentrations resulted in high mercury concentrations in Tubifex. The activities of ROS, SOD, CAT and GPx in the acute and subchronic tests showed a tendency for high mercury concentrations to cause SOD, CAT and GPx activity to increase. *Tubifex* worms exposed to  $HgCl_2$  showed very active movements, released more mucus and each individual separated from each other. In addition, worms exposed to mercury indicate the autotomy process, which is the process of separating the worm's body into two parts. Mercury exposure causes changes and damage to the setae in Tubifex's body. On mercury exposure (subchronic) showed damage to the setae ie broken setae. Damage also occurs in epidermal cells and chloragogen cells in the intestinal part of the worm. The highest mercury exposure (100%) caused Tubifex mortality to be 22% higher compared to exposure to other mercury concentrations. The novelty of this research is based on research parameter (MT, ROS, SOD, CAT, GPx, Histology), Tubifex worm can adapted in the water pollution with 41,58  $\mu g/L$  mercury concentration.





**KATA PENGANTAR**

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan Disertasi yang berjudul "Respon Cacing *Tubifex* Terhadap Limbah yang Mengandung Merkuri". Disertasi ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Doktor pada Program Pascasarjana Ilmu Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan Disertasi ini, tidak mungkin berjalan dengan baik tanpa dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih untuk semua pihak yang telah membantu baik moril maupun materil. Dengan segala kekurangan yang ada, penulis menyadari Disertasi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran yang membangun, agar dapat menyempurnakan tulisan ini.

Malang, Juni 2019

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI .....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI .....	iv
RIWAYAT HIDUP .....	v
UCAPAN TERIMAKASIH .....	vi
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN .....	viii
RINGKASAN .....	xi
SUMMARY .....	xiii
KATA PENGANTAR .....	xv
DAFTAR ISI .....	xvi
DAFTAR GAMBAR .....	xix
DAFTAR TABEL .....	xxii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxiii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	4
1.3 Tujuan penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan umum .....	5
1.3.2 Tujuan khusus .....	5
1.4 Manfaat penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat teoritis .....	5
1.4.2 Manfaat praktis .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Cacing <i>Tubifex</i> .....	6
2.1.1 Deskripsi .....	6
2.1.2 Ekologi .....	9
2.2 Logam merkuri (Hg) .....	11
2.2.1 Efek logam merkuri terhadap organisme .....	12
2.2.2 Kontaminasi logam berat dalam sistem perairan .....	14
2.2.3 Logam merkuri di perairan .....	15
2.3 Toksisitas logam merkuri .....	17
2.4 Metallothionein (MT) .....	21





2.5 Stres oksidatif pada organisme .....	23
2.6 Sistem pertahanan tubuh pada organisme .....	26
2.7 Hasil penelitian terdahulu .....	31
<b>BAB III KERANGKA PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	34
3.2 Kerangka Operasional Penelitian .....	39
3.2.1 Tahap I Kajian kondisi lingkungan perairan .....	39
3.2.2 Tahap II Penentuan toleransi konsentrasi merkuri pada <i>Tubifex</i> .....	39
3.2.3 Tahap III Analisis efek paparan merkuri pada <i>Tubifex</i> .....	40
3.3 Hipotesis .....	47
<b>BAB IV METODE PENELITIAN .....</b>	<b>48</b>
4.1 Tempat dan waktu penelitian .....	48
4.2 Bahan dan Alat .....	48
4.2.1 Bahan .....	48
4.2.2 Alat .....	49
4.3 Penelitian Tahap I (Kajian Kualitas Lingkungan).....	51
4.3.1 Metode .....	51
4.3.2 Prosedur penelitian .....	51
4.4 Penelitian Tahap II (Uji Toksisitas Merkuri) .....	57
4.4.1 Uji toksisitas akut .....	57
4.4.2 Uji toksisitas subkronis .....	61
4.4.3 Respon tingkah laku dan kondisi fisik <i>Tubifex</i> .....	62
4.5 Penelitian Tahap III (Efek Merkuri pada <i>Tubifex</i> ).....	62
4.5.1 Deskripsi morfologi, konsentrasi dan sebaran merkuri dengan Metode SEM-EDX (Scanning Electron microscopes-Energy Dispersive X-Ray) .....	62
4.5.2 Pengukuran kadar metallothionein (MT) .....	64
4.5.3 Pengukuran kadar SOD pada cacing <i>Tubifex</i> .....	67
4.5.4 Pengukuran kadar CAT pada <i>Tubifex</i> .....	69
4.5.5 Pengukuran kadar GPx pada <i>Tubifex</i> .....	70
4.5.6 Histologi <i>Tubifex</i> dengan pewarnaan Haemotoxylin-Eosin (HE) .....	72
4.6 Metode Analisis .....	75
4.6.1 Penelitian tahap I .....	75
4.6.2 Penelitian tahap II .....	75
4.6.3 Penelitian tahap III .....	76
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>77</b>
5.1 Deskripsi lingkungan perairan .....	77
5.1.1 Konsentrasi Merkuri (Hg).....	77
5.1.2 Korelasi merkuri di air, sedimen dan cacing <i>Tubifex</i> .....	81

5.1.3	Fisika Kimia air di perairan yang tercemar merkuri.....	82
5.1.4	Metallothionein (MT) pada <i>Tubifex</i> yang terpapar logam .....	84
5.2	Uji toksisitas merkuri pada cacing <i>Tubifex</i> .....	85
5.2.1	Respon tingkah laku cacing <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> .....	85
5.2.2	Uji toksisitas akut .....	90
5.2.3	Uji toksisitas subkronis merkuri pada cacing <i>Tubifex</i> .....	94
5.3	Metallothionein (MT) pada <i>Tubifex</i> .....	101
5.3.1	Kadar MT pada paparan akut .....	101
5.3.2	Kadar MT pada paparan subkronis .....	102
5.4	Aktivitas antioksidan pada <i>Tubifex</i> .....	106
5.4.1	Kadar SOD, CAT dan GPx pada <i>Tubifex</i> paparan HgCl <sub>2</sub> akut .....	106
5.4.2	Kadar ROS <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	108
5.4.3	Kadar SOD, CAT dan GPx pada <i>Tubifex</i> (subkronis) .....	109
5.4.4	Sistem pertahanan cacing <i>Tubifex</i> terhadap stress lingkungan .....	112
5.5	Deskripsi histologi cacing <i>Tubifex</i> setelah paparan HgCl <sub>2</sub> .....	113
5.6	Morfologi dan ukuran cetae pada <i>Tubifex</i> .....	120
5.7	Konsentrasi dan sebaran merkuri pada cacing <i>Tubifex</i> .....	125
5.8	Elemen-elemen pada cacing <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri (subkronis) .....	128
5.9	Deskripsi efek paparan merkuri pada <i>Tubifex</i> .....	134
5.10	Kebaharuan penelitian .....	139

**BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....** 140

6.1 Kesimpulan ..... 140

6.2 Saran ..... 140

**DAFTAR PUSTAKA .....** 141

**LAMPIRAN .....** 164



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Cacing <i>Tubifex</i> .....	6
2. Segmen anterior pada cacing <i>Tubifex</i> .....	7
3. Bentuk setae cacing <i>Tubifex</i> .....	8
4. Anatomi genital dari famili Naididae .....	9
5. Reaksi pembentukan dimetil merkuri .....	17
6. Mekanisme pembentukan <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) .....	26
7. Logam berat yang masuk ke dalam sel dan keseimbangan antara produksi ROS dan antioksidan....	27
8. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap merkuri .....	30
9. Kerangka Konsep Penelitian.....	38
10. Kerangka operasional penelitian tahap I.....	44
11. Kerangka operasional penelitian tahap II .....	45
12. Kerangka operasional tahap III .....	46
13. Prosedur pengukuran merkuri dengan metode AAS .....	54
14. Penentuan kadar MT menggunakan Fish MT-2 ELISA Kit .....	67
15. Penentuan aktivitas katalase (CAT) .....	70
16. Proses preparasi pewarnaan HE .....	74
17. Konsentrasi Hg dalam air, sedimen dan cacing <i>Tubifex</i> .	79
18. Kadar MT (ng/L) pada cacing <i>Tubifex</i> yang terpapar logam .....	84
19. Respon cacing <i>Tubifex</i> pada saat dipapar merkuri.....	87
20. Bagian tubuh cacing <i>Tubifex</i> yang mengalami fragmentasi setelah tujuh hari paparan HgCl <sub>2</sub> subkronis	88
21. Persentase mortalitas <i>Tubifex</i> (%) pada paparan akut ...	91
22. Konsentrasi Hg pada <i>Tubifex</i> (µg/L) setelah 48 jam paparan akut .....	92
23. LC <sub>50</sub> 24 jam paparan HgCl <sub>2</sub> uji toksisitas definitif akut pada <i>Tubifex</i> .....	93
24. LC <sub>50</sub> 48 jam paparan HgCl <sub>2</sub> uji toksisitas definitif akut pada <i>Tubifex</i> .....	93

25.	Penurunan konsentrasi merkuri harian paparan subkronis .....	95
26.	Persentase mortalitas <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan HgCl <sub>2</sub> subkronis .....	96
27.	Konsentrasi merkuri pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> subkronis .....	97
28.	Kadar MT (ng/L) pada <i>Tubifex</i> setelah 48 jam paparan akut.....	101
29.	Kadar MT pada cacing <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	102
30.	Kadar SOD pada cacing <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (akut) .....	106
31.	Kadar CAT pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (akut) .....	107
32.	Kadar GPx pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (akut) .....	107
33.	Kadar ROS pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	108
34.	Kadar SOD pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	109
35.	Kadar CAT pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	110
36.	Kadar GPx pada <i>Tubifex</i> yang dipapar HgCl <sub>2</sub> (subkronis) .....	110
37.	Histologi dinding tubuh cacing <i>Tubifex</i> .....	115
38.	Histologi usus cacing <i>Tubifex</i> .....	116
39.	Mekanisme kerusakan sel karena tekanan lingkungan .....	117
40.	Lima segmen pertama <i>T. tubifex</i> .....	118
41.	Bagian segmen 5 (sudut kiri bawah) sampai segmen 8 <i>T. tubifex</i> .....	119
42.	Morfologi cacing <i>Tubifex</i> .....	120
43.	Morfologi bagian anterior dan tengah tubuh cacing <i>Tubifex</i> .....	121
44.	Jenis setae pada <i>Tubifex</i> .....	122
45.	Histologis serat otot epitel .....	123
46.	Lebar setae cacing <i>Tubifex</i> .....	123

47.	Panjang setae cacing <i>Tubifex</i> .....	124
48.	Kerusakan setae pada <i>Tubifex</i> .....	124
49.	Sebaran merkuri pada <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri .....	127
50.	Elemen-elemen pada <i>Tubifex</i> tanpa paparan merkuri .....	130
51.	Elemen-elemen pada <i>Tubifex</i> yang dipapar merkuri dosis akut .....	130
52.	Elemen-elemen pada <i>Tubifex</i> yang dipapar merkuri dosis subkronis .....	130
53.	Elemen-elemen pada <i>Tubifex</i> tanpa paparan (pengujian SEM-EDX).....	132
54.	Elemen-elemen pada <i>Tubifex</i> setelah 7 hari dipapar HgCl <sub>2</sub> (pengujian SEM-EDX).....	133



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Jenis dan konsentrasi logam di perairan Desa Kejapanan Pasuruan Jawa Timur .....	2
2.	Sifat fisika dan kimia merkuri dan senyawanya.....	12
3.	Transformasi bentuk merkuri.....	16
4.	Penelitian Terdahulu .....	31
5.	Tahapan operasional penelitian.....	42
6.	Bahan yang digunakan dalam penelitian.....	49
7.	Alat yang digunakan dalam penelitian.....	50
8.	Konsentrasi merkuri (Hg) di air, sedimen dan cacing <i>Tubifex</i> .....	77
9.	Fisika-kimia air pada perairan tempat pembuangan limbah pengolahan emas di Desa Kejapanan Kabupaten Pasuruan .....	82
10.	Respon tingkah laku <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri .....	85
11.	Persentase mortalitas <i>Tubifex</i> pada konsentrasi HgCl <sub>2</sub> uji definitif akut .....	93
12.	Kualitas air pada uji toksisitas akut.....	100
13.	Presentase kerusakan jaringan cacing <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan merkuri subkronis .....	120



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1.	Peta Lokasi Penelitian.....	166
2.	Korelasi antara Hg air dan sedimen.....	167
3.	Korelasi antara Hg air dan Hg <i>Tubifex</i> .....	168
4.	Korelasi antara Hg sedimen dan Hg <i>Tubifex</i> .....	169
5.	LC50 48 jam.....	170
6.	Persentase Mortalitas <i>Tubifex</i> pada paparan merkuri akut.....	172
7.	Konsentrasi Hg di <i>Tubifex</i> pada paparan merkuri akut.....	174
8.	Kadar Metallothionein (MT) pada <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri akut.....	176
9.	Kadar SOD di <i>Tubifex</i> pada paparan akut.....	178
10.	Kadar CAT di <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri akut.....	180
11.	Kadar GPx di <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri akut.....	182
12.	Persentase mortalitas <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan merkuri subkronis.....	184
13.	Konsentrasi Hg di <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri subkronis.....	186
14.	Kadar Metallothionein (MT) di <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri subkronis.....	188
15.	Kadar ROS pada <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan merkuri subkronis.....	190
16.	Kadar SOD di <i>Tubifex</i> setelah paparan merkuri subkronis.....	192
17.	Kadar CAT di <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan merkuri subkronis.....	194
18.	Kadar GPx di <i>Tubifex</i> setelah 7 hari paparan merkuri subkronis.....	196
19.	Persentase kerusakan jaringan tubuh <i>Tubifex</i> setelah dipapar merkuri subkronis.....	198





## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Masalah pencemaran perairan yang disebabkan cemaran logam berat di Indonesia, sebagian besar berasal dari limbah industri, pertanian dan rumah tangga (Murtini *et al.*, 2003). Logam berat tersebut antara lain merkuri (Hg) (Soegianto, 2007), timbal (Pb) (Koedrith dan Seo, 2011), kadmium (Cd) (De Recherche dan Es, 2013), kromium (Cr) (Rodríguez *et al.*, 2016), tembaga (Cu) (Asztalos *et al.*, 2010). Merkuri, timbal dan kadmium merupakan logam yang banyak mencemari perairan di Indonesia (Siregar dan Murtini, 2008) seperti di sungai Porong yang melalui Desa Kejapanan Pasuruan Jawa Timur (Widiastuti *et al.*, 2019).

Desa Kejapanan merupakan salah satu desa di Kecamatan Gempol Kabupaten Pasuruan Jawa Timur yang terletak di dataran rendah dengan luas ±3,2 km<sup>2</sup> dan dilewati aliran sungai Porong. Lahan di wilayah tersebut diperuntukkan sebagai pemukiman, persawahan dan industri. Perairan di wilayah ini berperan sangat penting sebagai sumber air untuk kegiatan rumah tangga dan untuk mengairi sawah. Namun demikian, airnya terindikasi telah tercemar logam berat (Widiastuti *et al.*, 2019).

Beberapa jenis logam yang teridentifikasi mencemari perairan di Desa Kejapanan adalah merkuri, timbal, kadmium, seng dan tembaga (Widiastuti *et al.*, 2019). Konsentrasi logam-logam tersebut telah melebihi ambang batas baku mutu air yang direkomendasikan oleh Peraturan Pemerintah Nomor 82 Tahun 2001 (Tabel 1).

Tabel 1. Jenis dan konsentrasi logam di perairan Desa Kejapangan Pasuruan Jawa Timur

Jenis logam	Air (mg/L)	Sedimen (mg/L)	Kriteria mutu air* (mg/L)
Merkuri (Hg)	0,375	0,851	0,002
Timbal (Pb)	0,631	1,321	0,03
Cadmium (Cd)	0,136	1,538	0,01
Seng (Zn)	1,765	1,815	0,05
Tembaga (Cu)	1,373	1,260	0,02

Keterangan : \* = kriteria mutu air berdasarkan kelas, Lampiran PP nomor 82 tahun 2001; Kelas mutu air pada Tabel 1 adalah kelas III yang diperuntukan pertanian, peternakan dan perikanan

Berdasarkan Tabel 1, konsentrasi merkuri di perairan tersebut bukan yang tertinggi namun memiliki ambang batas maksimum paling rendah (0,002 mg/L) dibandingkan dengan logam yang lain. Merkuri di perairan tersebut terindikasi berasal dari limbah industri pengolahan emas yang menggunakan merkuri dalam proses pencucian emas. Berdasarkan hasil studi pendahuluan (2017), limbah yang dibuang ke perairan masih mengandung merkuri meskipun telah dilakukan pengendapan.

Merkuri merupakan salah satu logam berat yang sangat toksik di perairan (Boening, 2000) dan sangat bioakumulatif (Shi *et al.*, 2010). Toksisitas merkuri paling tinggi dibandingkan logam yang lain karena bisa berubah menjadi senyawa organik metilmerkuri yang sangat toksik ketika masuk ke dalam perairan (Zhang *et al.*, 2017). Bioakumulasi merkuri sangat berpengaruh bagi biota air dan manusia (EPA, 2017). Apabila terakumulasi dalam tubuh organisme menyebabkan terjadinya perubahan morfologi dan kematian organisme (Clarkson dan Magos, 2006), gangguan biokimia dan fisiologis (Barregard *et al.*, 2010).

Berbagai jenis biota termasuk golongan cacing (Annelida) hidup di perairan tersebut, diantaranya cacing *Tubifex*. Cacing *Tubifex* termasuk Annelida

(Oligochaeta) famili Naididae yang tahan terhadap polusi dan menjadi organisme akuatik terakhir yang hilang dari ekosistem perairan ketika pencemaran meningkat (Lucan-Bouché *et al.*, 1999). Cacing *Tubifex* mampu hidup pada kondisi perairan tercemar zat organik berbahaya (Vorob'ev *et al.*, 2010) dan toleransi pada kondisi hipoksia (Zhang *et al.*, 2012), oleh karena itu digunakan sebagai bioindikator pencemaran di perairan (Lafont, 2001; Oztetik *et al.*, 2013; Rodriguez dan Reynoldson, 2011). Selain itu, cacing *Tubifex* berperan penting dalam jaring makanan bentik perairan tawar (Reynoldson *et al.*, 1991; Woodward, 2009; Zhang *et al.*, 2014).

Merkuri merupakan stresor bagi organisme akuatik yang dapat menyebabkan perubahan fisik dan kimia dalam tubuh organisme. Secara fisik ditunjukkan dengan adanya perubahan morfologi organisme, sedangkan secara kimia ditunjukkan oleh adanya reaksi biokimia di dalam tubuh organisme seperti gangguan homeostasis sel, kemampuan bertahan hidup dan *signalling cell*. (Afnas'ev, 2010; Rocha *et al.*, 2010). Ketika merkuri masuk ke dalam tubuh organisme, merkuri akan berikatan dengan thiol (-SH) yang akan membentuk metalothionein merkuri (MT-Hg) yang berfungsi sebagai detoksifikasi logam untuk mencapai homeostasis, perlindungan terhadap radiasi, kerusakan oksidatif dan kontrol seluler (Carpenè *et al.*, 2007; Hall, 2002).

Toksisitas merkuri menghasilkan pembentukan stres oksidatif dan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap stresor dan dapat menyebabkan terjadinya gangguan homeostasis sel, kelangsungan hidup sel dan stimulasi pertumbuhan sel. Kerusakan sel yang dimediasi oleh ROS akan menstimulasi munculnya perlindungan dari antioksidan internal seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Catalase* (CAT) dan *Glutathione peroxidase* (GPx) (Saint-Denis *et al.*, 1998). Metallothionein berfungsi sebagai

detoksifikasi logam untuk mencapai homeostasis, perlindungan terhadap radiasi, kerusakan oksidatif dan kontrol seluler (Carpenè *et al.*, 2007; Hall, 2002).

Hasil studi pendahuluan (2017) menunjukkan bahwa cacing *Tubifex* yang ditemukan di perairan tersebut mengandung merkuri sebesar 0,294 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa cacing *Tubifex* mampu bertahan hidup pada lingkungan perairan yang mengandung merkuri. Berdasarkan toksisitas merkuri terhadap organisme, diperlukan informasi tentang respon cacing *Tubifex* terhadap merkuri di perairan yang tercemar.

## 1.2 Rumusan masalah

Limbah industri pengolahan emas yang dibuang ke perairan mengandung logam merkuri. Merkuri di perairan diabsorpsi dan terakumulasi di dalam tubuh organisme (Siregar *et al.*, 2012) yang menimbulkan efek kelainan perilaku (US EPA, 2010), perubahan morfologi dan kematian organisme (Clarkson dan Magos, 2006) serta gangguan biokimia dan fisiologis karena sifatnya yang tidak terurai dan mengganggu proses metabolisme (Barregard *et al.*, 2010).

Toksisitas merkuri mengalami peningkatan apabila masuk ke dalam perairan karena akan mengalami perubahan menjadi senyawa organik metilmerkuri akibat proses dekomposisi bakteri. Senyawa metilmerkuri sangat toksik (Zhang *et al.*, 2009) karena dapat menembus membran (Wang dan Shi, 2001), terakumulasi dalam sel (Das *et al.*, 2008) dan mengganggu sistem imunitas tubuh organisme (Karaca *et al.*, 2011; Engelmann *et al.*, 2011).

Cacing *Tubifex* merupakan salah satu organisme yang ditemukan hidup di perairan yang tercemar merkuri dan berdasarkan efek yang ditimbulkan oleh merkuri pada organisme, maka diperlukan informasi berkaitan dengan respon *Tubifex* terhadap merkuri dalam perairan tercemar. Berdasarkan uraian tersebut, dapat dirumuskan beberapa masalah yaitu:

- Bagaimana kualitas lingkungan perairan di lokasi pembuangan limbah pencucian emas di Desa Kejapanan Pasuruan.

- Berapa konsentrasi merkuri yang dapat ditoleransi oleh cacing *Tubifex*.

- Bagaimana efek paparan merkuri terhadap cacing *Tubifex*.

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum :

Tujuan umum penelitian adalah menganalisis respon cacing *Tubifex* dalam limbah perairan yang mengandung merkuri.

#### 1.3.2 Tujuan khusus :

- Mengidentifikasi kualitas lingkungan pada aliran pembuangan limbah yang mengandung merkuri di Desa Kejapanan Pasuruan.
- Menentukan konsentrasi merkuri yang dapat ditoleransi oleh cacing *Tubifex*.
- Menganalisis efek paparan merkuri terhadap kondisi histologi dan respon cacing *Tubifex*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi terkait efek dan respon merkuri pada cacing *Tubifex* sebagai dasar untuk mempelajari perubahan bentuk (transformasi) merkuri dalam tubuh *Tubifex*.

#### 1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian diharapkan dapat menyediakan informasi terkait dengan kebijakan pengelolaan limbah yang mengandung merkuri sebelum dibuang ke perairan.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Cacing *Tubifex*

#### 2.1.1 Deskripsi

Nama umum lain dari cacing *Tubifex* adalah *Sludge Worms*, *Detritus Worms*, *Sewage Worms*, dan *Bloodworms* yang termasuk dalam Filum Annelida Famili Naididae (sebelumnya Tubicidae). Cacing *Tubifex* merupakan cacing akuatik yang memiliki bentuk tubuh kecil bulat dan bersegmen kecuali bagian kepala dan ekor, memiliki setae pada setiap bagian atas dan bawah yang digunakan untuk bergerak dan kontraksi otot-otot dinding tubuh yang melingkar dan membujur secara ritmik (Pinder dan Ohtaka, 2014; EOL, 2016), tidak memiliki kaki, memiliki mulut pada bagian kepala, berwarna merah dan bergerak dengan meregangkan dan menarik tubuh.. Warna tubuh cacing *Tubifex* kemerah-merahan (Priyambodo dan Wahyuningsih, 2001), disebabkan adanya erythrocrucin yang larut dalam darah dan dapat meningkatkan kemampuan darah untuk menyerap oksigen (Pennak, 1978; Pinder dan Ohtaka, 2014).

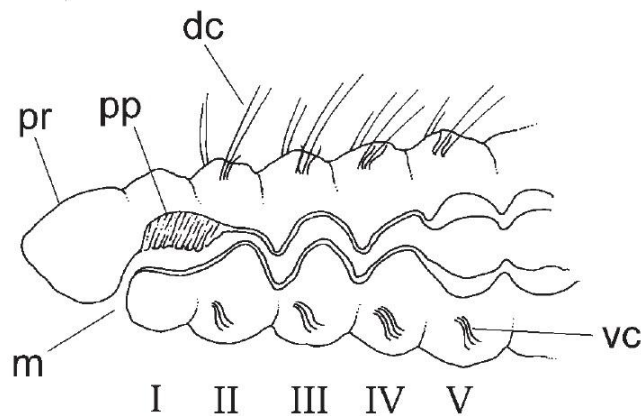


Gambar 1. Cacing *Tubifex* (Dokumentasi, 2017)

Keseluruhan tubuh cacing *Tubifex* terdiri dari kepala, ekor, saluran pencernaan, saraf dan beberapa pembuluh darah yang memanjang dari bagian anterior sampai posterior. Semua segmen pada tubuh cacing hampir identik dan masing-masing memiliki organ sendiri. Setiap segmen dibatasi oleh septa dan banyak terjadi kerutan yang mengelilingi septa antar segmen. Bagian tubuh

paling depan adalah prostomium (bagian depan mulut) yang tidak dihitung sebagai segmen, pada segmen I terdapat peristomium yang menopang bagian mulut tetapi tidak memiliki setae (Pinder dan Ohtaka, 2014), diikuti oleh banyak segmen yang dipisahkan secara internal oleh septa dan pyrgidium di ujung posterior. Prostomium berbentuk kerucut atau segitiga tanpa bintik mata dan ekornya bulat (Kanchana-aksorn dan Petpiroon, 2008). Setiap segmen mengandung sepasang nefridia, rongga selom, ganglia dan empat bundel (dua dorsal dan dua ventral) dari setae (Liu, 2017). Ukuran cacing *Tubifex* dapat mencapai panjang sampai tiga sentimeter dan terdiri dari 34-130 segmen yang ukurannya mengecil ke arah posterior tubuh (Timm, 2006; EOL, 2016).

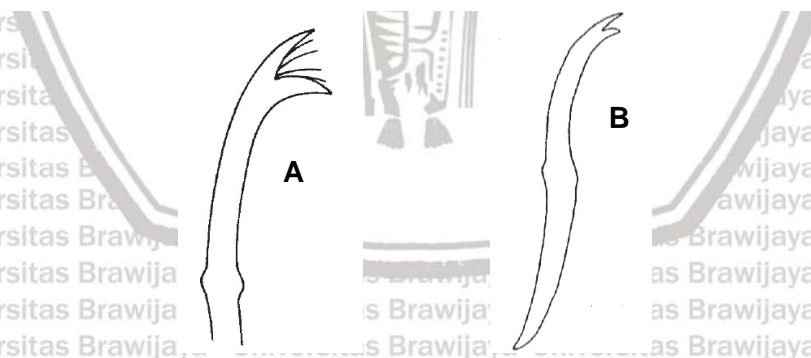
Mulut terletak pada segmen I (peristomium) mengarah ke saluran pencernaan yang dibentuk oleh faring besar, esofagus tubulus yang sempit, usus panjang tertutup oleh sel-sel kloragogen, anus terletak di atas pygidium. Jaringan kloragogen dimulai dari segmen V (Ragi dan Jaya, 2014). Makanan yang masuk ke dalam tubuh cacing diserap dari usus dan diangkut ke pembuluh darah yang terletak di antara otot usus dan selom epitel (Liu, 2017).



Gambar 2. Segmen anterior pada cacing *Tubifex*; dc. Dorsal chaetae; m. mouth; pp. Pharyngeal pad; pr. prostomium; vc. ventral chaetae.  
 Sumber: Pinder dan Ohtaka (2014).



Setae pada cacing *Tubifex* berasal dari sel-sel epidermis dan berstruktur keras. Setae mulai terdapat pada segmen II dan pada segmen berikutnya, tersusun dalam empat bundel yang terpisah pada setiap segmen (dua ventro-lateral dan dua dorso-lateral). Jenis setae yang berbeda bisa terdapat pada satu individu yaitu setae rambut yang terbatas pada bundel dorso-lateral, pectinate (seperti sisir) dan bifid (bercabang). Segmen anterior terdiri dari 3-9 setae per bundel. Jumlah setae per bundel menurun pada segmen berikutnya, sekitar 3-5 setae di segmen menengah dan 1-2 di segmen posterior. Secara eksternal, segmentasi pada cacing muda terdapat setae chitinous, sedangkan yang dewasa terdapat clitellum (Pinder dan Ohtaka, 2014) yang terdapat pada segmen XI dan XII (Ragi and Jaya, 2014). Clitellum adalah penebalan dinding tubuh dari beberapa segmen (biasanya 2-3 segmen) di sekitar gonad dan pori genital (antara segmen IV dan XXIV), agak sulit dilihat karena hanya satu segmen, namun membuat dinding tubuh menjadi sedikit lebih tebal, lebih buram dan seringkali lebih terang atau lebih gelap dari biasanya (Pinder and Ohtaka, 2014).

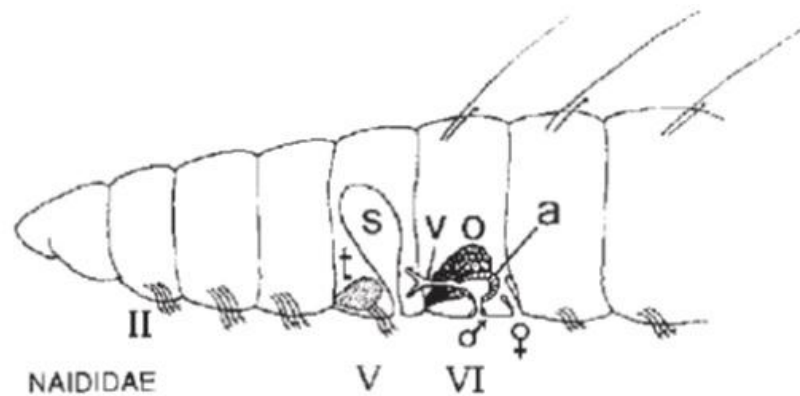


Gambar 3. Bentuk setae cacing *Tubifex*: pectinate chaeta (A) dan bifid chaetae (B).

Sumber: Pinder dan Ohtaka (2014).

Cacing *Tubifex* bersifat hermaphrodit, cacing dewasa memiliki alat kelamin jantan dan betina pada saat yang sama. Ada satu atau dua pasang testis yang diikuti oleh satu atau dua pasang ovarium (setiap individu menghasilkan sperma

dan telur. Selama proses kawin, dua cacing bertukar sperma yang kemudian disimpan dalam spermateka. Cacing melepaskan sperma yang disimpan bersama telurnya sendiri ke dalam selubung lendir yang disekresikan oleh clitellum. Clitellum mengeluarkan lendir kepompong berfungsi untuk melindungi telur yang dibuahi sampai menetas. Pada cacing *Tubifex* tidak terjadi perbedaan antara tahap larva, muda dan belum dewasa, namun pada saat cacing *Tubifex* tumbuh, tubuh bertambah panjang dengan membentuk segmen baru tepat di depan segmen bagian paling belakang. Reproduksi aseksual dengan fragmentasi biasa terjadi pada cacing *Tubifex* (Pinder and Ohtaka, 2014).



Gambar 4. Anatomi genital dari famili Naididae. Dimodifikasi dari Kathman dan Brinkhurst (1998). Singkatan: a. atrium; o. ovary; p. prostat; s. spermatheca; t. testis; v. vas deferens. Angka Romawi mengacu pada nomor segmen.

Sumber: Pinder dan Ohtaka (2014)

### 2.1.2 Ekologi

Cacing *Tubifex* hidup di endapan-endapan sungai, kolam dan danau yang halus, berpasir dan kasar, termasuk sistem saluran pembuangan yang mengandung lumpur dan bahan organik yang membusuk, dapat mentolerir kadar oksigen terlarut yang rendah dan polutan organik tingkat tinggi, memakan mikroorganisme dan bahan organik (Lafont dan Vivier, 2006; Vivien *et al.*, 2014), berperan penting dalam jaring makanan benthik perairan tawar (Woodward, 2009;

Zhang *et al.*, 2014). Respirasi dilakukan melalui dinding tubuh posterior secara difusi. Cacing *Tubifex* membenamkan bagian anterior dalam sedimen dan membiarkan bagian posterior bergerak dalam kolom air untuk meningkatkan pembentukan aliran air untuk menjaga keseimbangan oksigen dan pertukaran gas (Liu, 2017).

Cacing *Tubifex* yang melimpah di suatu perairan mengindikasikan terjadinya ketidakseimbangan dalam sistem aliran dan dapat menutupi area dasar sedimen. Populasi cacing *Tubifex* melimpah pada perairan yang tercemar, bersifat kosmopolitan, toleran terhadap polusi organik dan kekurangan oksigen. Cacing *Tubifex* menjadi organisme yang baik untuk pengujian toksisitas perairan (Reynoldson *et al.*, 1991) karena mampu hidup pada perairan yang tercemar bahan organik, sebagian besar hidup di perairan dangkal sepanjang tepi sungai, resisten terhadap pencemaran dan merupakan organisme terakhir yang hilang dari perairan tercemar (Lucan-Bouché *et al.*, 1999).

Cacing *Tubifex* di perairan memiliki peran yang penting dalam rantai makanan di perairan tawar, mendaur ulang nutrisi, membersihkan alga yang membusuk sampai ke substrat, sebagai sumber makanan untuk ikan muda dan sebagai predator akuatik kecil. Selain itu, cacing *Tubifex* berperan juga pada sistem akuakultur yaitu sebagai pakan dari ikan-ikan yang dibudidaya. Cacing *Tubifex* memiliki fungsi ekologis sebagai *conveyor-belt feeder* yang mencerna partikel di sedimen bagian dalam untuk diubah menjadi pseudofeces (Kasterl *et al.*, 1984). Aktivitas cacing ini dapat mengubah stratifikasi sedimen (Dafoe *et al.*, 2011; Matisoff *et al.*, 1999; Nogaro *et al.*, 2007), meningkatkan kadar air dan porositas sedimen (Fukuhara, 1987), mengubah distribusi ukuran partikel sedimen (Ciutat *et al.*, 2006; Dafoe *et al.*, 2011), mengubah oksigen dan dinamika nutrisi dalam sedimen dan melalui antarmuka sedimen-air (Matisoff *et al.*, 1985; Mermillod-Blondin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010) dan mempengaruhi

proses resuspensi sedimen (Zhang *et al.*, 2014). Cacing *Tubifex* dapat melakukan bioakumulasi kontaminan hidrofobik dan menurunkan konsentrasi kontaminan, namun tergantung pada struktur dan sifat kontaminan (Lotufo and Fleeger, 1996).

## 2.2 Logam merkuri (Hg)

Logam berat adalah komponen alami dari kerak bumi yang dapat masuk ke dalam air dan siklus makanan melalui berbagai proses kimia dan geokimia. Logam berat merupakan unsur-unsur kimia yang memiliki berat jenis lebih besar dari  $5 \text{ g/cm}^3$ ; mempunyai afinitas yang tinggi terhadap sulfur (S) dan biasanya bernomor atom 22 sampai 92 dari periode 4 sampai 7; unsur-unsur tersebut pada sistem periodik terletak di sudut kanan bawah (Duruibe *et al.*, 2007), tidak termasuk alkali, alkali tanah, lantanida dan aktinida (Effendi, 2000).

Merkuri merupakan salah satu logam berat yang disebut dengan hydrargyrum (Singh dan Rustagi, 2010). Sebagian besar merkuri dalam bentuk unsur merkuri ( $\text{Hg}^0$ ) dan jenis yang reaktif sebagai divalen merkuri ( $\text{Hg(II)}$ ). Unsur  $\text{Hg}^0$  merupakan satu-satunya unsur logam yang berada dalam fase cair pada suhu ruang dan dapat juga berwujud gas serta memiliki kelarutan rendah dalam air (Morel *et al.*, 2002). Merkuri memiliki titik lebur  $-38,83^\circ\text{C}$  dan titik didih  $356,73^\circ\text{C}$ . Merkuri merupakan konduktor panas yang buruk dibandingkan dengan logam lain, namun merupakan konduktor listrik yang cukup baik (Singh dan Rustagi, 2010).

Merkuri merupakan *trace element* yang mempunyai sifat cair pada suhu ruang dengan spesifik gravity dan daya hantar listrik yang tinggi. Merkuri dalam tabel periodik terletak pada golongan XII D, periode VI, dengan nomor atom 80 dan berat atom  $200,59 \text{ g/mol}$  (Cotton dan Geoffrey, 1989). Sifat fisika dan kimia merkuri tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat fisika dan kimia merkuri dan senyawanya

Sifat fisik- kimia	Merkuri dan senyawa merkuri				
	Hg <sup>0</sup>	HgCl <sub>2</sub>	HgO	HgS	CH <sub>3</sub> HgOH
Titik lebur (°C)	-38,8	277	500 (dekomposisi)	584 (sublimasi)	137
Kelarutan dalam air (g/L)	49,6x10 <sup>-6</sup> (20°C)	66 (20°C)	0,053 (25°C)	2 x 10 <sup>-24</sup> (25°C)	-
Titik didih (°C)	356,7	303	-	-	-
Tekanan uap (Pa)	0,18	0,009	9,2 x 10 <sup>-12</sup>	-	0,9

Sumber: Yang *et al.* (2012)

### 2.2.1 Efek logam merkuri terhadap organisme

Merkuri termasuk logam berat nonesensial yang beracun bagi organisme pada konsentrasi tertentu (Nandan *et al.*, 2016), memiliki toksisitas paling tinggi dibandingkan logam berat yang lain (Darmono, 1995), konsentrasinya meningkat pada level yang mengkhawatirkan karena meningkatnya kegiatan antropogenik (Dash *et al.*, 2014).

Merkuri telah dikenal sebagai logam yang sangat toksik di lingkungan perairan (Boening, 2000) dan sangat bioakumulatif (Shi *et al.*, 2010). Bioakumulasi merkuri menjadi perhatian terbesar bagi biota air dan manusia (EPA, 2007). Dua pertiga merkuri berasal dari emisi biogeokimia alami, sementara sepertiga dari sumber antropogenik (Patra and Sharma, 2000). Merkuri memiliki toksisitas paling tinggi karena bisa berubah menjadi senyawa organik metilmerkuri yang sangat toksik ketika masuk ke dalam perairan (Zhang *et al.*, 2017). Merkuri yang terakumulasi pada organisme menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan, penurunan keberhasilan reproduksi, kelainan perilaku (United States Environmental Protection Agency, 2010), perubahan morfologi dan kematian organisme (Clarkson dan Magos,



2006). serta gangguan biokimia dan fisiologis karena sifatnya yang nonbiodegradable dan menyebabkan distorsi jalur metabolisme (Barregard *et al.*, 2010).

Merkuri yang terabsorpsi ke dalam tubuh cacing *Tubifex* dalam jangka waktu tertentu akan terakumulasi di dalam tubuh. Bioakumulasi merkuri terjadi pada saat metil merkuri (MeHg) menembus membran secara cepat tetapi keluar secara lambat. Mekanisme *uptake* (melalui MeHg-sistein kompleks) dan redistribusi dalam tubuh menentukan kecepatan proses bioakumulasi (Luoma dan Rainbow, 2008). Akumulasi merkuri di dalam tubuh hewan air disebabkan karena kecepatan pengambilan merkuri (*up take rate*) lebih cepat dibandingkan dengan proses ekskresi. Hal ini disebabkan karena MeHg memiliki paruh waktu sampai beberapa ratus hari di tubuh hewan air, sehingga zat ini menjadi terakumulasi dan konsentrasinya lebih besar dibanding air di sekitarnya (Purnawan *et al.*, 2013).

Jumlah merkuri yang terakumulasi pada tubuh organisme air tergantung pada ukuran, umur dan kondisi ikan. Distribusi dan akumulasi logam tersebut berbeda untuk setiap organisme air. Hal ini tergantung pada spesies, konsentrasi logam dalam air, fase pertumbuhan dan kemampuan untuk pindah tempat (Kosnett, 2019; Soemirat dan Ariesyadi, 2017; Plaa, 2008). Merkuri mempunyai afinitas terhadap lipid dalam tubuh organisme sehingga merkuri cenderung terakumulasi dan terbiomagnifikasi (Ravichandran, 2004).

Senyawa merkuri yang masuk ke dalam tubuh bersama dengan makanan, akan masuk ke dalam saluran pencernaan. Setelah diabsorpsi di usus, senyawa merkuri akan dibawa ke hati oleh vena porta hepatica.

Selanjutnya di dalam hati, senyawa merkuri mengalami metilasi lambat dan akan masuk ke dalam darah teroksidasi menjadi merkuri bivalensi. Bersama peredaran darah, yang masuk ke hati akan mengalami metabolisme,

terdegradasi dan dilepaskan, sehingga dapat menghambat kerja enzim proteolitik dan menyebabkan kerusakan sel (Plaa, 2007; Kosnett, 2007; Klaasen, 2001). Merkuri yang masuk ke dalam hati akan terbagi menjadi dua, sebagian akan terakumulasi pada hati, sedangkan sebagian lainnya akan disalurkan ke empedu. Dalam kantong empedu, akan dirombak menjadi senyawa merkuri anorganik yang kemudian akan dikirim lewat darah ke ginjal, dimana sebagian akan terakumulasi pada ginjal dan sebagian lagi dibuang bersama urin (Connell, 2005).

### 2.2.2 Kontaminasi logam berat dalam sistem perairan

Logam berat dalam perairan dapat bermanfaat atau menimbulkan efek bahaya pada tanaman, hewan dan kehidupan manusia tergantung konsentrasinya (Fösner 1981). Beberapa logam beracun bagi organisme hidup bahkan pada konsentrasi rendah, sedangkan yang lain menjadi racun pada konsentrasi yang relatif tinggi. Apabila tertelan dalam jumlah berlebih, logam berat bergabung dengan biomolekul tubuh seperti protein dan enzim untuk membentuk biotoksik yang stabil (Duruibe *et al.*, 2007).

Logam berat dapat memasuki sistem akuatik dari alam dan antropogenik termasuk limbah industri atau domestik, aplikasi pestisida dan pupuk anorganik. Apabila dibandingkan dengan jenis pencemaran yang lain, pencemar logam berat kurang terlihat tetapi memiliki pengaruh yang besar terhadap ekosistem karena kemampuannya untuk terakumulasi dalam biota. Bentuk yang larut dalam air dianggap lebih berbahaya karena mudah diangkut dan lebih mudah tersedia untuk tanaman dan hewan (Shanmugam *et al.*, 2007).

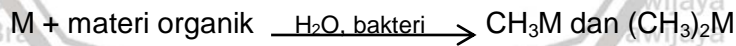
Dalam ekosistem perairan alami, logam dalam konsentrasi yang rendah.

Logam berat tidak bisa terdegradasi, terakumulasi, berasimilasi dalam air, sedimen dan hewan air, dengan demikian logam berat menyebabkan pencemaran dalam badan air (Abdel-Baki *et al.*, 2011). Logam memasuki

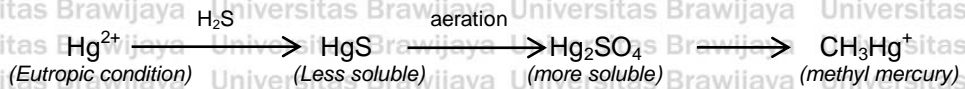
ekosistem akuatik tersimpan dalam organisme akuatik melalui biokonsentrasi, bioakumulasi melalui rantai makanan dan menjadi beracun saat tingkat akumulasinya sangat tinggi. Ketika masuk ke dalam lingkungan akuatik, hanya bagian kecil dari ion logam bebas yang tertinggal di dalam air karena adanya kombinasi dari adsorpsi, hidrolisis dan presipitasi; serta tertinggal dalam sedimen (Gaur *et al.*, 2005)

**2.2.3 Logam merkuri di perairan**

Merkuri (Hg) di alam dalam bentuk organik maupun inorganik. Hampir semua Hg di udara, air, tanah dan sedimen dalam bentuk inorganik sedangkan bioakumulasi Hg dalam organisme akuatik dan biomagnifies yang melewati rantai makanan dalam bentuk organik (Wiener *et al.*, 2003). Menurut Duruibe *et al.* (2007), siklus merkuri di alam dimediasi oleh proses geologi dan biologi. Bentuk utama merkuri di atmosfer adalah uap merkuri (Hg<sup>0</sup>) yang mudah menguap dan dioksidasi menjadi ion merkuri (Hg<sup>2+</sup>) sebagai hasil interaksi antara ozon dengan air. Sebagian besar merkuri yang masuk ke lingkungan perairan dalam bentuk Hg<sup>2+</sup>. Merkuri yang masuk ke perairan dengan bantuan bakteri akan diubah menjadi metil merkuri. Konversi ini dilakukan oleh bakteri di dalam air sehingga terjadi keseimbangan sebagai berikut :



Dalam konversi non biologis teridentifikasi sebagai berikut :



Bentuk organik tersebut sangat toksik dan mempengaruhi kualitas air dengan merusak rembesan air bawah tanah. Pada umumnya merkuri terdiri dari tiga bentuk yaitu elemen merkuri (Hg<sup>0</sup>), ion merkuri (Hg<sup>2+</sup>) dan merkuri organik kompleks. Transformasi bentuk merkuri tertera pada Tabel 3.





Tabel 3. Transformasi bentuk merkuri

Elemen Hg <sup>0</sup>	Merkuri divalent (Hg <sup>+</sup> )	Metilmerkuri (CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> )
Bentuk di alam	95% terdapat di atmosfer dalam bentuk uap	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terikat di udara</li> <li>• 5% merkuri di atmosfer</li> <li>• Ditemukan di tanah dan air sebagai ion kompleks</li> <li>• Dapat membentuk garam merkuri</li> </ul>
Transformasi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cenderung tetap di udara dan sulit disimpan</li> <li>• Dapat mengalami konversi ke bentuk lain dan terdeposisi, ditemukan pada jarak yang jauh dari sumber.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ion terikat dalam lapisan lemak pada tumbuhan dan organisme invertebrata maupun vertebrata</li> <li>• Hasil perombakan Hg oleh bakteri dalam kolom air dan sedimen</li> <li>• Terserap dan terakumulasi pada tumbuhan dan hewan</li> <li>• Memasuki rantai makanan melalui biota perairan</li> <li>• Terjadi penyerapan dan dapat terakumulasi di dalam jaringan tumbuhan dan hewan</li> <li>• Mengalami biomagnifikasi dalam rantai makanan, mencapai biomagnifikasi tertinggi pada organisme di tingkatan tropik tertinggi.</li> </ul>

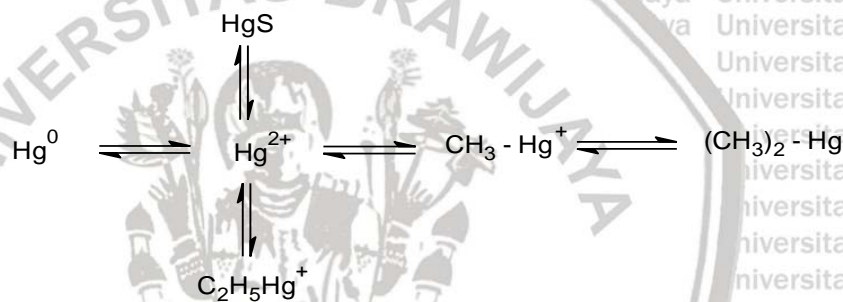
Sumber : dimodifikasi dari US Centres for Disease Control, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, "Toxicological Profile : Mercury" (1999) (Luther and Elisabeth, 2002).

Pembentukan metil merkuri (MeHg) dalam lingkungan perairan tergantung jenis sedimen, kadar merkuri anorganik, pengaruh kondisi lingkungan seperti sulfur, pH, senyawa organik, suhu, Fe dan tipe bakteri (Beldowski dan Pempkowiak, 2007; Bettoso *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2008). Metil merkuri (MeHg) merupakan jenis merkuri (Hg) yang dibentuk oleh bakteri melalui proses metilasi (Grandjean *et al.*, 2010). Proses metilasi dibantu oleh bakteri pereduksi sulfat dalam sedimen anoksik (Luoma dan Rainbow, 2008; Merrit and Amirbahman, 2009). Konsentrasi oksigen yang rendah dalam zona akumulasi partikel



berpotensi meningkatkan aktivitas bakteri. Pada perairan tawar dan estuari, metilasi terjadi dalam sedimen (Monperrus *et al.*, 2007).

Mikroorganisme dapat mengubah merkuri ke dalam tiga bentuk oksidasinya (0, +1 dan +2), bentuk anorganik dan organik merkuri (Vetriani *et al.*, 2005). Metilasi terjadi karena transfer grup metil ( $\text{CH}_3$ ) dari senyawa organik ke ion logam (Rothenberg *et al.*, 2008). Reaksi ini tidak dibantu oleh termodinamika kimia tetapi dipercepat ketika mikroorganisme membuat ikatan karbon-logam yang stabil dalam air dan proses hidrolisis yang memecah ikatan ini sangat lambat. Aktivitas manusia yang membuang merkuri anorganik akan berakibat peningkatan produksi  $\text{MeHg}$  di lingkungan (Luoma and Rainbow, 2008).



Gambar 5. Reaksi pembentukan dimetil merkuri  
Sumber: Fergusson, 1990

### 2.3 Toksisitas logam merkuri

Toksisitas adalah tingkat di mana suatu zat dapat merusak suatu organisme. Toksisitas merujuk pada efek seluruh organisme seperti hewan, bakteri atau tanaman, serta efeknya pada substruktur organisme seperti sel (sitotoksisitas) atau organ. Pada sistem biologis, logam berat mempengaruhi organel seluler dan komponen seperti membran sel, mitokondria, lisosom, retikulum endoplasma, inti dan beberapa enzim yang terlibat dalam metabolisme, detoksifikasi dan perbaikan kerusakan (Wang dan Shi, 2001).

Toksisitas merupakan suatu keadaan yang menandakan adanya efek toksin yang terdapat pada bahan sebagai dosis tunggal atau dosis campuran

(US EPA, 2002). Toksisitas adalah seberapa besar suatu bahan kimia dapat merusak suatu organisme. Toksisitas, ketersediaan dan penyebaran merkuri tidak hanya tergantung pada konsentrasi total, namun tergantung juga pada perubahan bentuknya (Harris *et al.*, 2003).

Uji toksisitas subkronis adalah salah satu uji praklinik untuk mengidentifikasi ciri fisik maupun organ yang diberikan senyawa uji secara berulang dalam waktu tertentu (28 atau 90 hari) (Casarett dan Klaassen, 2008).

Prinsip uji toksisitas subkronis yaitu senyawa uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji. Tujuan uji toksisitas subkronik adalah untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut (OECD 423, 2001). Konsep utama toksikologi adalah bahwa dampak yang ditimbulkan tergantung pada dosis. Uji toksisitas digunakan untuk menentukan *median lethal concentration* (LC<sub>50</sub>) (Frank, 1996). LC<sub>50</sub> adalah konsentrasi mematikan yang dibutuhkan untuk membunuh 50% populasi dalam periode waktu tertentu. (Rahman, 2017).

Toksisitas akut menjelaskan efek dari suatu zat yang dihasilkan baik paparan tunggal atau berbagai paparan dalam waktu singkat (biasanya kurang dari 24 jam). Toksisitas akut dibedakan dari toksisitas kronis, yang menggambarkan efek yang merugikan dari paparan berulang pada konsentrasi yang lebih rendah selama periode waktu yang lebih lama (Rahman, 2017). Tes bioassay telah digunakan untuk menentukan tingkat toksisitas senyawa untuk organisme akuatik. Efek suatu substansi toksik ditentukan oleh faktor lamanya waktu paparan dan besarnya konsentrasi (Katzung, 2007).

Semua invertebrata akuatik termasuk cacing Tubificid mengakumulasi logam dalam jaringan tubuh dan merupakan bagian penting dari rantai makanan detritus yang memakan sedimen sebagai substrat (Matisoff *et al.*, 1999). Cacing Tubificid telah digunakan sebagai organisme uji untuk bioassay sedimen

(Wiederholm dan Dave, 1989) dan untuk menilai toksisitas akut berbagai logam dan senyawa organik (Khangarot, 1991)

Toksistas logam terhadap organisme dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan yaitu suhu, derajat keasaman (pH), Oksigen Terlarut (DO) dan alkalinitas. Suhu adalah faktor fisik lingkungan yang mempengaruhi aktivitas mikroorganisme air terhadap logam berat yang masuk ke dalam perairan (Agarwala *et al.*, 2006). Menurut Wardhana (2004), efek yang ditimbulkan akibat kenaikan suhu yaitu: a. Terjadinya goncangan suhu; b. Meningkatnya kepekaan organisme akuatik terhadap parasit, penyakit dan toksin kimia; c. Menurunnya kadar oksigen perairan, sementara kenaikan suhu akan menaikkan kebutuhan oksigen; d. Meningkatnya derajat eutrofikasi, sebab kenaikan suhu dan penurunan kandungan oksigen akan memungkinkan berkembangnya ganggang hijau, ganggang biru yang tidak diinginkan tumbuh; e. Menurunnya daya tahan hidup ikan-ikan muda yang mempunyai toleransi suhu yang lebih rendah; f. Terganggunya rantai makanan oleh hilangnya satu atau berbagai spesies kunci, terutama plankton, pada tingkat tropik rendah dalam rantai makanan; g. Perubahan komposisi spesies ke arah spesies yang tidak diinginkan.

Limbah yang mengandung merkuri bersifat asam dan apabila dibuang ke perairan akan mempengaruhi pH perairan (Duruibe *et al.*, 2007). Derajat keasaman (pH) permukaan perairan mempengaruhi jumlah merkuri pada organisme (Gilmour dan Henry, 1991) yaitu toksistas merkuri mengalami peningkatan sejalan dengan kenaikan pH akibat menurunnya kompetisi antara ion Cd, Pb maupun Hg dengan ion-ion hidrogen (Agarwala *et al.*, 2006). Batas toleransi organisme akuatik pada pH 5-9. Namun apabila ada polutan yang mengganggu sistem keseimbangan perairan akan menimbulkan gangguan yang serius bagi organisme akuatik (Supriharyono, 2009; Miller, 2007; Leidy, 2000).

Oksigen terlarut (*dissolved oxygen/DO*) merupakan parameter mutu air yang sangat penting, karena nilai oksigen terlarut dapat menunjukkan tingkat pencemaran di perairan atau tingkat pengolahan air limbah. Nilai oksigen terlarut dalam suatu perairan akan menentukan kesesuaian kualitas air sebagai sumber kehidupan (Sunu, 2001). Banyaknya oksigen terlarut menunjukkan kemampuan badan perairan pada kadar oksigen yang minimal (Leidy, 2000).

Oksigen terlarut dalam air berasal dari atmosfer atau proses fotosintesis tumbuhan air. Jumlah oksigen terlarut dalam air tergantung pada suhu, tekanan atmosfer dan kadar mineral dalam air sedangkan jumlah oksigen yang dikonsumsi organisme tergantung dari jenis, stadium dan aktivitas dari organisme tersebut (Agarwala *et al.*, 2006; Miller, 2007).

Alkalinitas dan pH mempengaruhi kapasitas pengikatan merkuri pada spesies, laju produksi metil merkuri dan efisiensi penyerapan metil merkuri oleh organisme akuatik (Cope *et al.*, 1990). Metil merkuri diproduksi, diangkut dan diakumulasikan oleh organisme akuatik secara signifikan lebih efisien pada alkalinitas dan pH rendah atau netral (Winfrey dan Rudd, 1990). Pada perairan yang tercemar, nilai alkalinitas menggambarkan basa dan hidroksil, sedangkan pada perairan yang alami dan normal nilai alkalinitas menggambarkan nilai kebasan dari karbonat dan bikarbonat (Naaz and Anshumali, 2015; Tomson *et al.*, 2006). Nilai alkalinitas lebih besar dari 500 mg/l menunjukkan bahwa perairan memiliki produktivitas rendah, 200-500 mg/L perairan produktif, 50-200 mg/L produktivitas sedang, 10-50 mg/L perairan kurang produktif dan 0-10 mg/L tidak dapat dimanfaatkan (Supriharyono, 2009). Laju metilasi dan keseimbangan metil merkuri dipengaruhi oleh penigkatan salinitas (Compeau dan Bartha, 1985).

Bioakumulasi adalah peningkatan konsentrasi polutan dari lingkungan ke organisme. Zat kimia menumpuk pada jaringan organisme akuatik pada konsentrasi beberapa kali lebih tinggi daripada konsentrasi dalam air, dan terbiomagnifikasi dalam rantai makanan yang menyebabkan gangguan fisiologis pada tingkat tropis yang lebih tinggi (Simons dan Raposo, 2009).

#### 2.4 Metallothionein (MT)

Metallothionein (MT) adalah golongan protein non enzim yang mengandung ikatan logam baik esensial maupun non esensial, terbentuk dari thionein yang berikatan dengan segala macam logam termasuk logam berat (Hall, 2002). Metallothionein (MT) merupakan protein aditif yang berperan dalam proses homeostatis organisme dalam mentolelir logam berat. Senyawa-senyawa kimia yang telah berikatan dengan protein dan membentuk metallothionein tersebut akan dibawa oleh darah (Klaassen, 2008; Kosnett, 2019; Soemirat dan Ariesyadi, 2017)

Metallothionein pertama kali ditemukan oleh Marghoses dan Valle pada tahun 1957, yang melakukan identifikasi unsur yang bertanggungjawab terhadap mekanisme akumulasi kadmium secara alami pada jaringan korteks ginjal kuda. Unsur tersebut diketahui terdiri dari logam kadmium dan protein (thionein) yang berikatan membentuk suatu struktur kompleks metallothionein (Carpenè *et al.*, 2007).

Metallothionein ditemukan pada sel hewan, tumbuhan tinggi, mikroorganisme eukariotik dan prokariotik. Metallothionein (MT) terkandung di dalam vertebrata, krustacea (Roesijadi, 1999) dan invertebrata air (Roesijadi dan Fowler, 1991), seperti moluska (Carpenè *et al.*, 2007; Couillard *et al.*, 1993).

Logam yang masuk ke dalam tubuh organisme berkompetisi untuk berikatan dengan thionein untuk membentuk metallothionein (Hall, 2002).

Merkuri merupakan logam yang terlibat dalam proses enzimatik, terikat dengan protein (*ligan binding*). Ikatan merkuri dengan protein jaringan membentuk senyawa metallothionein-Hg. Pada hewan, logam akan terikat pada residu cys dalam formasi logam-cys (thiolate) dengan cara pertukaran ion logam misalnya ion Zn tergantikan dengan ion Cu, Cd, atau Hg (Sutherland and Stillman, 2011). Menurut (Zangger *et al.*, 2015), metallothionein mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan logam dapat berlangsung dengan mudah karena ikatan metallothionein terhadap logam memiliki stabilitas termodinamik yang tinggi dan stabilitas kinetik yang rendah.

Invertebrata dapat digunakan sebagai biomarker yang didasarkan pada kadar metallothionein dalam organisme tersebut (Amiard *et al.*, 2006). Metallothionein menyebabkan organisme menjadi resisten terhadap paparan logam berat dan menyebabkan toksisitas dari logam berat berkurang karena metallothionein berfungsi sebagai detoksifikasi logam untuk mencapai homeostasis, perlindungan terhadap radiasi, kerusakan oksidatif, kontrol seluler (Carpenè *et al.*, 2007; Hall, 2002), distribusi dan ekskresi berbagai senyawa logam (Soemirat dan Ariesyadi, 2017), berperan dalam proses adaptasi terhadap paparan logam (Amiard *et al.*, 2006).

Metallothionein berperan juga sebagai antioksidan bagi tubuh. Molekul metallothionein memiliki sejumlah besar kelompok thiolic dengan sifat nukleofilik yang membuat metallothionein mampu mengikat logam dan radikal bebas.

Distribusi metallothionein dalam sel memungkinkan metallothionein untuk melindungi semua kelompok sel terhadap tekanan lingkungan (Cairns *et al.*, 2018).

Metallothionein telah banyak digunakan sebagai biomarker spesifik karena ekspresi metallothionein mencerminkan keberadaan logam berat (Carpenè *et al.*, 2007; Dewi *et al.*, 2014). Ekspresi metallothionein umumnya

meningkat dengan adanya paparan logam Zn, Cu, Cd, Hg dan Ag. Toksisitas selular bisa terjadi jika kecepatan masuknya logam ke dalam sel melebihi kecepatan sintesis metallothionein (Viarengo *et al.*, 2002).

## 2.5 Stres oksidatif pada organisme

Radikal bebas paling penting dalam organisme aerobik adalah *Reactive Oxygen Species* (Valko *et al.*, 2006) yang menggambarkan sejumlah molekul reaktif dan radikal bebas yang berasal dari molekul oksigen (Setiawati, 2009). Radikal yang berasal dari oksigen merupakan kelompok radikal terpenting yang dihasilkan dalam tubuh organisme (Tyler dan Spollman, 2009).

*Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah produk normal dari metabolisme seluler, memiliki efek menguntungkan dan merugikan. Efek menguntungkan terjadi ketika konsentrasi rendah hingga sedang, merupakan proses fisiologis respon seluler terhadap zat-zat yang merugikan, seperti pertahanan diri terhadap infeksi dan induksi respon mitogenik (Valko *et al.*, 2006). Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan biologis yang disebut dengan stress oksidatif (Kovacic dan Osuna, 2005).

Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan produksi ROS dan status antioksidan endogenus (Barceló *et al.*, 2006). Halliwell (2006) mendefinisikan stress oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan, dimana jumlah radikal bebas lebih banyak bila dibandingkan dengan antioksidan. Stres oksidatif timbul akibat reaksi metabolik yang menggunakan oksigen dan mengakibatkan gangguan pada keseimbangan antara oksidan dan antioksidan pada sel.

*Reactive Oxygen Species* adalah molekul yang tidak berpasangan, oleh karena itu sangat tidak stabil dan sangat reaktif. ROS hanya bertahan dalam hitungan *milisecond* ( $10^{-9}$ – $10^{-12}$ ) sebelum bereaksi dengan molekul lain untuk



menstabilkan diri (Makker *et al.*, 2009; Turan, 2010). Efek berbahaya dari radikal bebas dapat diimbangi dengan adanya aksi antioksidan enzimatis dan non-enzimatis (Halliwell, 2006). Jumlah ROS yang terbentuk akan mengganggu homeostasis dan stimulasi terhadap pertumbuhan, pertahanan hidup dan signaling sel, tergantung pada jumlah ROS yang diproduksi. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan maka sel mengalami stress oksidatif, apoptosis atau nekrosis. Di sisi lain, jika produksi ROS seimbang dengan kapasitas antioksidan, maka sel mengalami pertumbuhan dan bertahan hidup (Izyumov *et al.*, 2010).

Sumber ROS berasal dari *respiratory burst* macrofag yang teraktifkan. Aktivasi macrofag ini menyebabkan peningkatan penggunaan glukosa melalui lintasan pentose fosfat yang dipakai untuk mereduksi NADP menjadi NADPH dan peningkatan penggunaan oksigen yang dipakai untuk mengoksidasi NADPH untuk menghasilkan superoksida dan halogen radikal sebagai agen yang sitotoksik untuk membunuh mikroorganisme yang telah difagosit (Makker *et al.*, 2009).

### Mekanisme pembentukan ROS

Mekanisme pembentukan ROS (Gambar 6): *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat terbentuk dalam tubuh karena terjadi Stres oksidatif dan mampu merusak lemak peroksida dari membran lipid, membran sel dari fosfolipid dan lipoprotein dengan menyebar pada reaksi berantai (Hazra *et al.*, 2010). *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menyerang semua jenis biomolekul seperti asam nukleat, protein dan asam amino sehingga mengganggu metabolisme tubuh (Kunwar dan Priyadarsini, 2011).

Produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan proses fisiologis, penting untuk kehidupan organisme aerobik (Seis, 1991). Sejumlah faktor

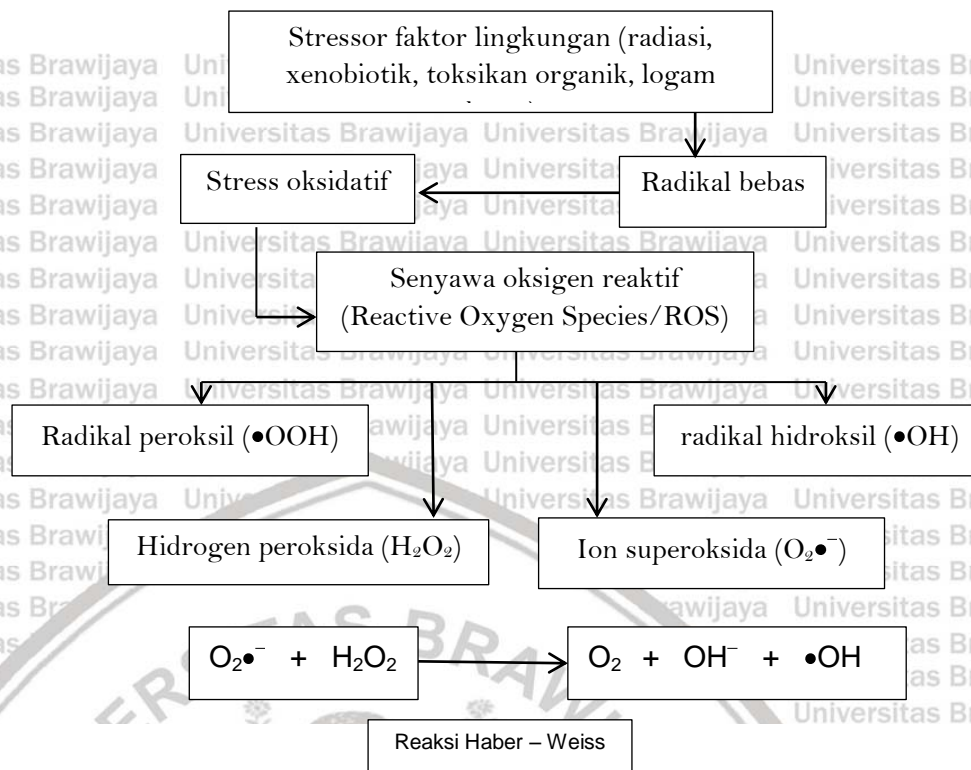
lingkungan (misalnya radiasi UV, radiasi pengion, xenobiotik, asap tembakau) serta aktivasi reseptor sel dapat berkontribusi pada peningkatan produksi ROS pada organisme (Pinkus *et al.*, 1996; Barstch dan Nair, 2000).

*Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan reaksi tubuh Stres oksidatif karena masuknya toksikan termasuk logam ke dalam tubuh organisme. Hal yang terpenting dalam pembentukan ROS adalah terbentuknya senyawa oksigen reaktif. Salah satu senyawa oksigen reaktif yang berperan sebagai oksidan adalah hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan ion superoksida (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>). Ion superoksida tak terlalu reaktif, namun akan sangat berbahaya apabila bersamaan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karena akan membentuk radikal hidroksil (•OH). Radikal hidroksil bersifat sangat reaktif dan paling berbahaya. Namun radikal hidroksil bukan merupakan produk primer proses biologik, tetapi berasal dari H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>.



Superoxide (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) merupakan radikal bebas yang dapat diproduksi oleh reaksi yang dikatalisis oleh berbagai enzim untuk dikonversi menjadi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oleh superoxide dismutase (SOD). Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) akan diubah menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub> oleh catalase (CAT). Oleh karena itu sebagian besar enzim yang memproduksi dan membutuhkan superoxide berada dalam peroxisome bersama dengan enzim SOD, CAT dan HPx (Widayati, 2012).

Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), diproduksi secara spontan atau konversi enzimatik O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diproduksi oleh banyak tipe sel dalam menanggapi berbagai rangsangan ekstraseluler (Kim *et al.*, 2000). Hidrogen peroksida berperan penting dalam pengaturan kematian sel (apoptosis) (Buttke *et al.*, 1994).

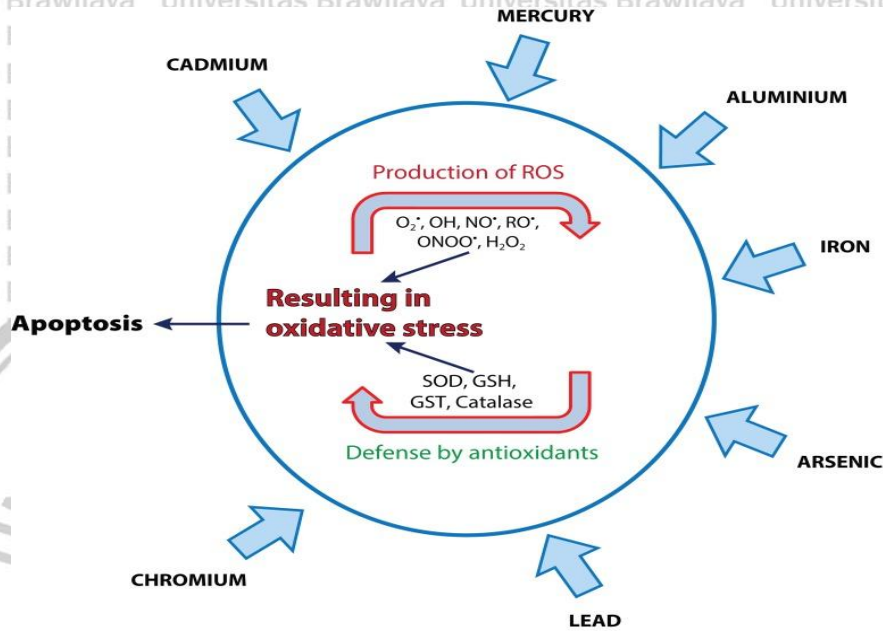


Gambar 6. Mekanisme pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

## 2.6 Sistem pertahanan tubuh pada organisme

Sehubungan dengan potensi toksisitas senyawa radikal bebas, tubuh memiliki mekanisme sistem pertahanan alami berupa enzim antioksidan endogen yang berfungsi menetralkan dan mempercepat degradasi senyawa radikal bebas untuk mencegah kerusakan komponen makromolekul sel. Sistem ini dibagi dalam dua kelompok besar yaitu: sistem pertahanan preventif seperti enzim superoksida dismutase, katalase dan glutation peroksidase (Valko *et al.*, 2007) dan sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal seperti isoflavan, vitamin A, vitamin C, dan vitamin E. Setelah ROS terbentuk, maka terbentuk ion superoksid radikal. Molekul oksigen memiliki konfigurasi elektron yang unik dan merupakan bi-radikal karena memiliki 2 elektron tidak berpasangan pada dua orbit yang berbeda (Kohen, 2002). Penambahan satu elektron pada dioksigen akan membentuk radikal superoksid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Peningkatan anion superoksid terjadi

melalui proses metabolik atau setelah aktivasi oksigen oleh radiasi (ROS primer) dan dapat bereaksi dengan molekul lain untuk membentuk ROS sekunder baik secara langsung maupun melalui proses enzimatik atau katalisis metal (Valko *et al.*, 2005). Mekanisme serangan logam berat pada sel dan keseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan tubuh tertera pada Gambar 7.



Gambar 7. Logam berat yang masuk ke dalam sel dan keseimbangan antara produksi ROS dan antioksidan.

Sumber: Jaishankar *et al.* (2014)

Enzim superoksida dismutase sebagai salah satu enzim antioksidan intrasel bekerja dengan cara membersihkan radikal bebas atau spesies oksigen reaktif (ROS) dengan reaksi enzimatik dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. SOD mengkatalisis reaksi dismutasi radikal bebas anion superoksida ( $^{\bullet}O_2^-$ ) menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen sehingga tidak berbahaya bagi sel (Halliwell, 2006). Valko *et al.* (2007) menyatakan bahwa enzim ini menghambat keberadaan dari  $O_2^{\bullet-}$  dan  $H_2O_2$  yang berasal dari pembentukan radikal hidroksi ( $^{\bullet}OH$ ).

Glutathion peroksidase intraseluler berpotensi mengubah molekul hidrogen peroksida dengan mengoksidasi glutathion bentuk tereduksi (GSH) menjadi bentuk teroksidasi (GSSG). Glutathion bentuk tereduksi mencegah membran lipid dan unsur-unsur sel lainnya dari kerusakan oksidasi, dengan cara merusak molekul hidrogen peroksida dan lipid hidroperoksida. Enzim glutathion peroksidase mendekomposisi  $H_2O_2$  lebih kuat dibandingkan dengan enzim katalase. Enzim perlu substrat untuk bisa bekerja, misalnya glutathion, yang merupakan substrat enzim glutathion peroksidase (Delmas *et al.*, 1996).

Peroksida yang dibentuk oleh reaksi radikal OH dengan asam lemak tak jenuh pada membran dan plasma fosfolipid akan direduksi menjadi asam lemak oleh glutathione peroksidase dan tergantung pada selenium sebagai kofaktor. Glutathione yang teroksidasi akan direduksi oleh *glutathione reductase* yang tergantung pada NADPH (Kefer *et al.*, 2009).

Mekanisme pertahanan terpenting dari organisme berasal dari antioksidan enzimatik. Organisme memiliki tiga enzim antioksidan intrasel atau antioksidan endogen, yaitu *superoxide dismutase* (SOD), *catalase* (CAT) dan *glutathion peroksidase* (GPx). Ketiga enzim tersebut termasuk antioksidan intrasel yang diproduksi dalam tubuh dan berfungsi untuk meredam radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan sel (Widayati, 2012; Halliwell, 2006).

Superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu antioksidan endogen yang berfungsi mengkatalisis reaksi dismutasi radikal bebas anion superoksida ( $O_2^{\bullet-}$ ) menjadi hidrogen peroksida dan molekul oksigen. Dengan adanya SOD, kecepatan dismutasi meningkat lebih dari 1000 kali lipat dibandingkan dismutasi spontan (Miwa *et al.*, 2008).

Katalase (CAT) ditemukan pada hampir seluruh organ tubuh, sedangkan di dalam sel, katalase ditemukan di dalam peroksisom yang berfungsi untuk mengkatalisis  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ . Proses tersebut menjadi penting

karena hidrogen peroksida merupakan senyawa toksik yang dihasilkan dari berbagai reaksi sel sebagai produk samping. Hidrogen peroksida dapat meracuni sel dan menyebabkan sel bermutasi, bahkan mengalami kematian. Kapasitas reduksi katalase meningkat ketika konsentrasi  $H_2O_2$  tinggi, sedangkan pada konsentrasi rendah kapasitasnya menurun (Miwa *et al.*, 2008) karena katalase memerlukan reaksi dua molekul  $H_2O_2$  dalam proses reduksinya, sehingga jarang ditemukan pada konsentrasi rendah (Cemeli *et al.*, 2009).

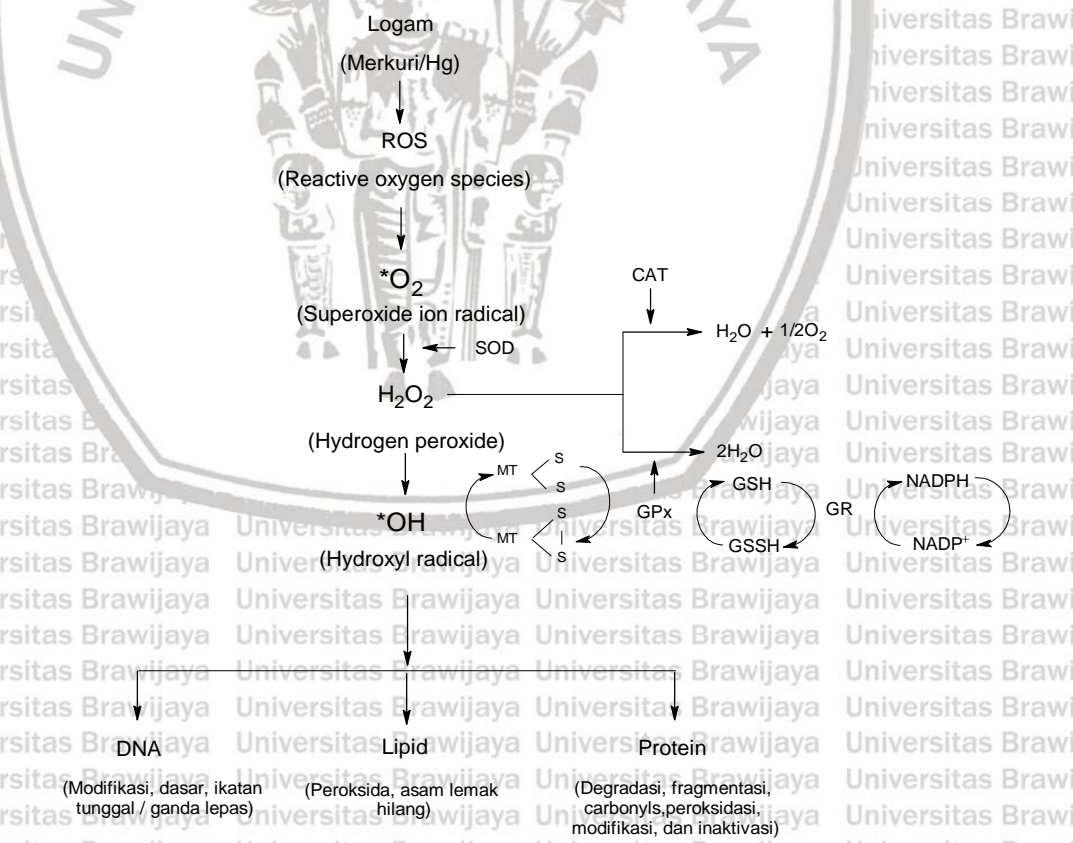
Glutathione peroxidase (GPx) merupakan seleno-enzim yang pertama kali ditemukan pada mamalia (Toppo *et al.*, 2009). Enzim ini memerlukan glutathione sebagai donor substrat untuk mengikat  $H_2O_2$  maupun hidropersida organik (ROOH) untuk menghasilkan glutathione disulphide (GSSG), air dan bentuk hidroksi dari bahan organik tersebut (ROH). Glutathione peroxidase (GPx) merupakan enzim yang bekerja memecah  $H_2O_2$  dan berbagai hidro serta lipid peroksida dengan cara mereduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ . Peristiwa tersebut melibatkan reaksi oksidasi-reduksi dari glutathione tereduksi (GSH). Glutathione peroxidase (GPx) mampu mereduksi 70% peroksida organik dan lebih dari 90%  $H_2O_2$ . Aktivitas GPx ditemukan dalam mitokondria, plasma, dan saluran pencernaan (Winarsi, 2007).

Menurut Kevin *et al.* (2006) dan Valko *et al.* (2007), kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas berimplikasi pada berbagai kondisi patologis, yaitu kerusakan sel, jaringan dan organ seperti hati, ginjal, jantung baik pada manusia maupun hewan. Kerusakan ini dapat berakhir pada kematian sel sehingga terjadi percepatan timbulnya berbagai penyakit degeneratif.

Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menyebabkan kerusakan sel pada konsentrasi yang rendah ( $10 \mu M$ ), karena mudah larut dalam air dan mudah melakukan penetrasi ke dalam membran biologis. Efek negatifnya dapat dibedakan menjadi dua, yaitu efek langsung dari kemampuan oksidasinya dan efek tidak langsung, akibat

bahan lain yang dihasilkan dari  $H_2O_2$ , seperti  $OH\cdot$  dan  $HClO$ . Efek langsung  $H_2O_2$  seperti degradasi protein, pelepasan besi, inaktivasi enzim, lipid, kelompok  $-SH$  dan asam keto (Kohen, 2002).

Jika produksi radikal bebas melebihi dari kemampuan antioksidan intrasel untuk menetralkannya maka kelebihan radikal bebas sangat potensial menyebabkan kerusakan sel. Sering kali kerusakan ini disebut sebagai kerusakan oksidatif, yaitu kerusakan biomolekul penyusun sel yang disebabkan oleh reaksinya dengan radikal bebas. Adanya peningkatan stres oksidatif berdampak negatif pada beberapa komponen penyusun membran sel, yaitu kerusakan pada lipid membran membentuk malonaldehida (MDA), kerusakan protein, karbohidrat, dan DNA (Kevin *et al.*, 2006). Terbentuknya hidroksil radikal ( $OH\cdot$ ) menyebabkan kerusakan DNA, lipid dan protein.



Gambar 8. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap merkuri

## 2.7 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian yang telah dilakukan berkaitan dengan cacing *Tubifex* dan pencemaran merkuri tertera pada Tabel 4 berikut :

Tabel 4. Penelitian Terdahulu

Judul Artikel dan Jurnal	Hasil Penelitian
What is <i>Tubifex tubifex</i> (O.F. Müller) (Oligochaeta, Tubificidae)? Zoologica Scripta. Vol. 12 No. 3 pp 187-201, 1983. (Holmquist, 1983)	<ol style="list-style-type: none"> <li><i>Tubifex fissidens</i> (Kernall, MS) dan <i>Tubifex tubifex</i> memiliki rambut setae berduri, pectinates anterior bagian belakang dan ventral setae pada segmen X dan XI tetapi modifikasi setae pada genital terbatas.</li> <li>Perbedaan kedua spesies tersebut pada organ genital antara lain atrium dan slendere atria dan prostat yang lebih kecil pada <i>Tubifex tubifex</i>.</li> </ol>
Metallothionein induction in aquatic oligochaeta <i>Tubifex tubifex</i> exposed to herbicide isoproturon. <i>Environmental Toxicology Wiley Periodicals, Inc</i> 88-93. (Paris-Palacios et al., 2004)	<ol style="list-style-type: none"> <li>Metallothioneins (MTs) adalah protein berbobot rendah yang terlibat pada detoksifikasi logam.</li> <li>MTs berperan dalam pengaturan pertumbuhan dan pertahanan antioksidan.</li> <li>Tingkat MT dalam cacng yang terpapar meningkat signifikan setelah 7 dan 15 hari paparan herbisida konsentrasi 50 mg/L.</li> <li>Induksi MT bukan sebagai biomarker logam tertentu namun sebagai biomarker nonspesifik pada cacing akuatik.</li> </ol>
Metallothionein functions and structural characteristics. <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i> 21 (2007) S1, 35-39. (Carpenè et al., 2007)	<ol style="list-style-type: none"> <li>Metallothioneins (MTs) adalah protein dengan berat molekul rendah yang dicirikan oleh kandungan sistein yang tinggi dan menimbulkan peningkatan gugus logam-tiolat.</li> <li>Kebanyakan MTs memiliki dua kelompok logam yang mengandung tiga dan empat ion logam bivalen</li> <li>Keluarga gen MT di mamalia terdiri dari empat subfamili yang ditunjuk MT-1 hingga MT-4. MT-3 dinyatakan terutama di otak dan MT-4 dalam membedakan sel epitel skuamosa bertingkat.</li> <li>MTs dianggap sebagai biomarker yang valid dalam studi kedokteran dan lingkungan.</li> </ol>
The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. <i>Int.J.Mol.Sci</i> , 14, 6044-6066. (RuttKay-Nedecky et al., 2013)	<ol style="list-style-type: none"> <li>Perhatiannya pada MTs, sistein-rich dan protein pengikat logam berat yang berperan dalam perlindungan respons stres.</li> <li>MT melindungi sel dari paparan oksidan dan elektrofili yang bereaksi dengan kelompok sulfhidril.</li> <li>MT juga berperan dalam pengaturan tingkat seng dan distribusinya secara intraselular.</li> <li>Hubungan antara seng, MT dan kanker</li> </ol>



Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* Vol. 64 (1) June, 2006: 121-128. (Mosleh et al., 2006)

1. *Tubifex tubifex* terpapar tembaga (Cu) dengan konsentrasi yang berbeda (50, 100 dan 200 µg/L) selama 7 dan 15 hari.
2. MT dalam cacing meningkat secara signifikan ( $p < 0,05$ ) setelah 7 dan 15 hari paparan.
3. Aktivitas katalase (CAT) dalam cacing yang dipapar Cu meningkat secara signifikan dan menunjukkan adanya peningkatan pertahanan antioksidan.
4. Glutathione-S-transferase (GST) menurun setelah 7 hari paparan (44,42%)
5. Tingginya MTs yang diamati selama paparan membuat *Tubifex tubifex* berpotensi sebagai biomarker pencemaran logam berat.

Effects chitosan on axidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligocaheta, Tubificidae). *Chemosphere* 47: 167-175. (Mosleh et al., 2007)

1. Peningkatan metallothioneins merupakan biomarker spesifik untuk paparan logam.
2. MTs berpartisipasi dalam regulasi pertumbuhan dan pertahanan antioksidatif.
3. Aktivitas katalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), dan glutathione reduktase (GR) meningkat sebagai respons terhadap chitosan yang menunjukkan tekanan oksidatif pada cacing.

Toxic effects and bioaccumulation of the herbicide isoproturon in *Tubifex tubifex* (Oligocheate, Tubificidae): A study of significance of autotomy and its utility as a biomarker. *Aquatic Toxicology* 98 (2010) 8–14 (Séverine Paris-Palacios et al., 2010)

1. *Tubifex* adalah satu-satunya hewan yang merespon kontaminasi dengan autotomi.
2. Respon kontaminasi pada cacing merupakan model ekskresi logam.
3. Konsentrasi pada senyawa logam potensial memicu terjadinya autotomi *Tubifex*.
4. Tujuan penelitian: menyelidiki apakah autotomi dapat diinduksi oleh herbisida isoproturon dan terkait dengan cara ekskresi.
5. Akumulasi isoproturon dalam jaringan cacing dan efeknya pada mortalitas, autotomi dan tingkat regenerasi dianalisis setelah 4 dan 7 hari paparan.
6. Isoproturon terakumulasi dengan cara yang sama pada semua bagian tubuh cacing tetapi tingkat metabolit secara signifikan lebih tinggi di bagian posterior.
7. Dengan hilangnya bagian posterior memungkinkan cacing untuk mengekskresikan pestisida.
8. Proses autotomi apabila dikaitkan dengan populasi dan derajat pencemaran maka cacing dapat dijadikan sebagai biomarker.

Ecotoxicity of Uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) Exposed to Contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009) 527-537. (Lagauzère et al., 2009)

1. *Tubifex tubifex* sangat toleran dan kurang sensitif terhadap uranium dibandingkan dengan hewan invertebrata lain.
2. Penggunaan *Tubifex tubifex* direkomendasikan sebagai model biologi.
3. Beberapa titik akhir sublethal diukur untuk menilai toksisitas uranium pada lingkungan yang tercemar.
4. Sampai konsentrasi 599 µg Ug<sup>-1</sup> dry wt, dapat digunakan untuk menilai toksisitas uranium pada lingkungan tercemar.

Caudal regeneration in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) following copper exposure. *Invertebrate Biology* 122( 1): 42-5 1.0 2003 American Microscopical Society, Inc. (Bouché et al., 2003)

1. Segmen baru dapat diregenerasi.
2. Pada *Tubifex tubifex*, regenerasi melibatkan kehadiran mesoblastocytes, peningkatan jumlah neoblast, dan peningkatan perpindahan sel-sel ini.
3.  $Cu^{2+}$  tidak mempengaruhi proses regenerasi, karena tidak terdeteksi perbedaan antara regenerasi pada cacing kontrol dan cacing Cu-autotomized.

An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead.

1. *Tubifex tubifex* sangat tahan terhadap pencemaran namun cara adaptasinya masih kurang dipahami.
2. Hasil observasi lapang menunjukkan bahwa sebagian besar cacing memiliki ekor yang abnormal (hilang atau beregenerasi) pada limpasan air yang terkontaminasi dari kebumah anggur.
3. Penentuan logam di bagian anterior dan posterior *T. tubifex* dari lokasi yang tercemar dan eksperimen cacing yang dipapar menunjukkan bahwa konsentrasi logam lebih tinggi pada bagian posterior.
4. *T. tubifex* melindungi diri terhadap peningkatan konsentrasi logam beracun (Cu dan Pb) dengan autotomi pada bagian posterior dimana logam terakumulasi.
5. Kemampuan cacing untuk regenerasi tidak terganggu meskipun pada media yang tercemar.
6. Hilangnya ekor pada cacing dapat digunakan sebagai biomarker kontaminasi.

*Aquatic Toxicology* 45 (1999) 9–17 (Lucan-Bouché et al., 1999).

Identification of genera of tubificid worms in Bangladesh through morphological study. Mariom, Sharmin Nahar Liza and Md. Fazlul Awal Mollah. *Asian J. Med. Biol. Res.* 2016, 2 (1), 27-32. (Mariom et al., 2016)

1. Tubificids adalah cacing oligochaete akuatik (F-Naididae, O- Haplotaxida, P-Annelida) yang tersebar di seluruh dunia
2. Identifikasi genera cacing Tubikifid atas dasar beberapa fitur eksternal termasuk bentuk anterior (prostomium) dan ujung posterior, jumlah segmen tubuh dan pengaturan setae.
3. Hasil studi menunjukkan adanya tiga genera adalah *Tubifex*, *Limnodrilus* dan *Aulodrilus*
4. Ketiga genera ini memiliki tubuh silindris simetri bilateral yang dibentuk oleh metamer. Jumlah segmen tubuh berkisar antara 34 - 120 di *Tubifex*, 50 - 87 di *Limnodrilus*, dan 35 - 100 di *Aulodrilus*.
5. *Tubifex*, segmen pertama, dengan prostomium, adalah pelengkap bantalan bulat atau segitiga, sedangkan, di *Limnodrilus* dan *Aulodrilus*, prostomium tanpa pelengkap adalah segitiga dan kerucut,
6. Tiga jenis setae yaitu setae rambut, setae pektin dan setae bifid dengan berbagai ukuran ditemukan di *Tubifex*, sedangkan *Limnodrilus* memiliki setae pectinate dan bifid setae dengan ukuran dan bentuk yang kurang lebih sama; dan *Aulodrilus* memiliki hanya setae rambut dan setae bifid dengan ukuran yang berbeda.

### BAB III. KERANGKA PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Perkembangan industri di Indonesia yang berkembang pesat menimbulkan beberapa masalah, antara lain masalah limbah. Limbah merupakan hasil samping dari proses produksi industri yang seringkali dibuang ke perairan. Meskipun perairan adalah ekosistem terbuka, namun tidak seharusnya menjadi tempat pembuangan limbah karena apabila limbah dibuang ke perairan menyebabkan terjadinya pencemaran perairan. Pada umumnya, kegiatan industri menghasilkan limbah yang mengandung bahan sesuai dengan bahan baku dan bahan sampingan yang digunakan dan yang dihasilkan, termasuk kegiatan penambangan dan pengolahan emas.

Penambangan emas merupakan salah satu sumberdaya alam yang sampai sekarang masih banyak dieksplorasi. Kegiatan penambangan emas membawa dampak positif dan negatif (Agus *et al.*, 2005). Teknik penambangan yang banyak digunakan adalah amalgamasi yang menggunakan merkuri sebagai pengikat emas (Ravel *et al.*, 2016). Teknik tersebut menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan (Rhani, 2012) karena melepaskan limbah merkuri yang membahayakan ekosistem dan kesehatan lingkungan (Dash *et al.*, 2014). Pada proses amalgamasi, merkuri terlepas ke lingkungan pada tahap pencucian karena limbah yang mengandung merkuri dibuang langsung ke badan air atau ke atas tanah (Rhani, 2012).

Merkuri termasuk logam berat nonesensial yang beracun bagi organisme apabila melebihi batas konsentrasi yang bisa ditoleransi (Nandan *et al.*, 2016) dan konsentrasinya meningkat seiring dengan meningkatnya kegiatan

antropogenik, termasuk pertambangan (Dash *et al.*, 2014). Merkuri yang masuk ke dalam perairan akan terakumulasi di permukaan air, sedimen dan organisme akuatik karena tidak terurai dan bersifat bioakumulatif (Ahluwalia dan Goyal, 2007).

Beberapa efek merkuri pada organisme yaitu menimbulkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan, kelainan perilaku (United States Environmental Protection Agency, 2010), perubahan morfologi dan kematian organisme (Clarkson dan Magos, 2006) serta gangguan biokimia dan fisiologis karena sifatnya yang nonbiodegradable dan mengganggu proses metabolisme (Barregard *et al.*, 2010). Darmono (2001) membagi efek yang ditimbulkan karena akumulasi merkuri berupa kerusakan fisik (degenerasi dan nekrosis) dan gangguan fisiologi (gangguan enzim dan metabolisme).

Gangguan metabolisme yang disebabkan akumulasi merkuri di dalam tubuh organisme memicu terjadinya stress oksidatif. Gangguan tersebut dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang diproduksi oleh sel sebagai respon awal terhadap tekanan. Stres oksidatif memicu produksi antioksidan internal yang dimiliki oleh organisme yaitu superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione peroksidase (GPx). Antioksidan internal berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh organisme terhadap stres lingkungan. Apabila produksi ROS melebihi kapasitas antioksidan dapat mengakibatkan terjadinya apoptosis atau nekrosis. Namun apabila produksi ROS seimbang dengan antioksidan maka akan mengarahkan pada pertumbuhan dan kemampuan hidup sel (Izyumov *et al.*, 2010).

Merkuri yang terabsorpsi ke dalam tubuh organisme akan berikatan dengan protein membentuk metallothionein yang memiliki kemampuan mengikat

logam tertentu. Setiap metallothionein hanya mengikat satu jenis logam, seperti MT-Cd hanya mengikat Cd, MT-Hg hanya bisa mengikat Hg atau MT-Pb hanya mengikat Pb (Astutik dan Zulaika, 2015). Metallothionein berfungsi untuk membersihkan radikal bebas yang terdapat dalam tubuh organisme dan mendetoksifikasi logam untuk mencapai keseimbangan (Carpenè *et al.*, 2007; Hall, 2002).

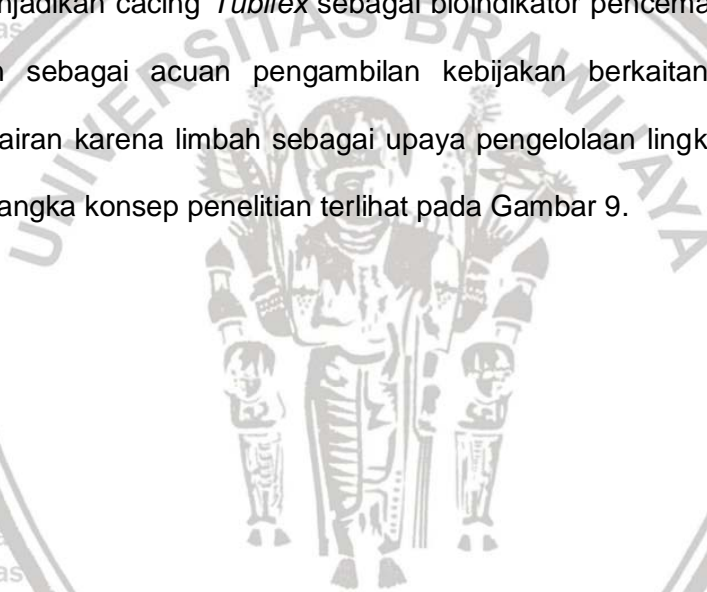
Pada lingkungan akuatik, kontaminan masuk ke dalam jaringan organisme dengan cara absorpsi secara langsung maupun tidak langsung (Miller, 2007; Kostnett, 2007). Organisme akuatik menyerap logam berat termasuk merkuri melalui saluran pernapasan, saluran pencernaan dan penetrasi kulit, dan terakumulasi di dalam jaringan (Withgott dan Breman, 2007; Plaa, 2007, Kostnett, 2007). Namun, absorpsi melalui saluran pernapasan lebih besar dibandingkan melalui saluran pencernaan dan kulit.

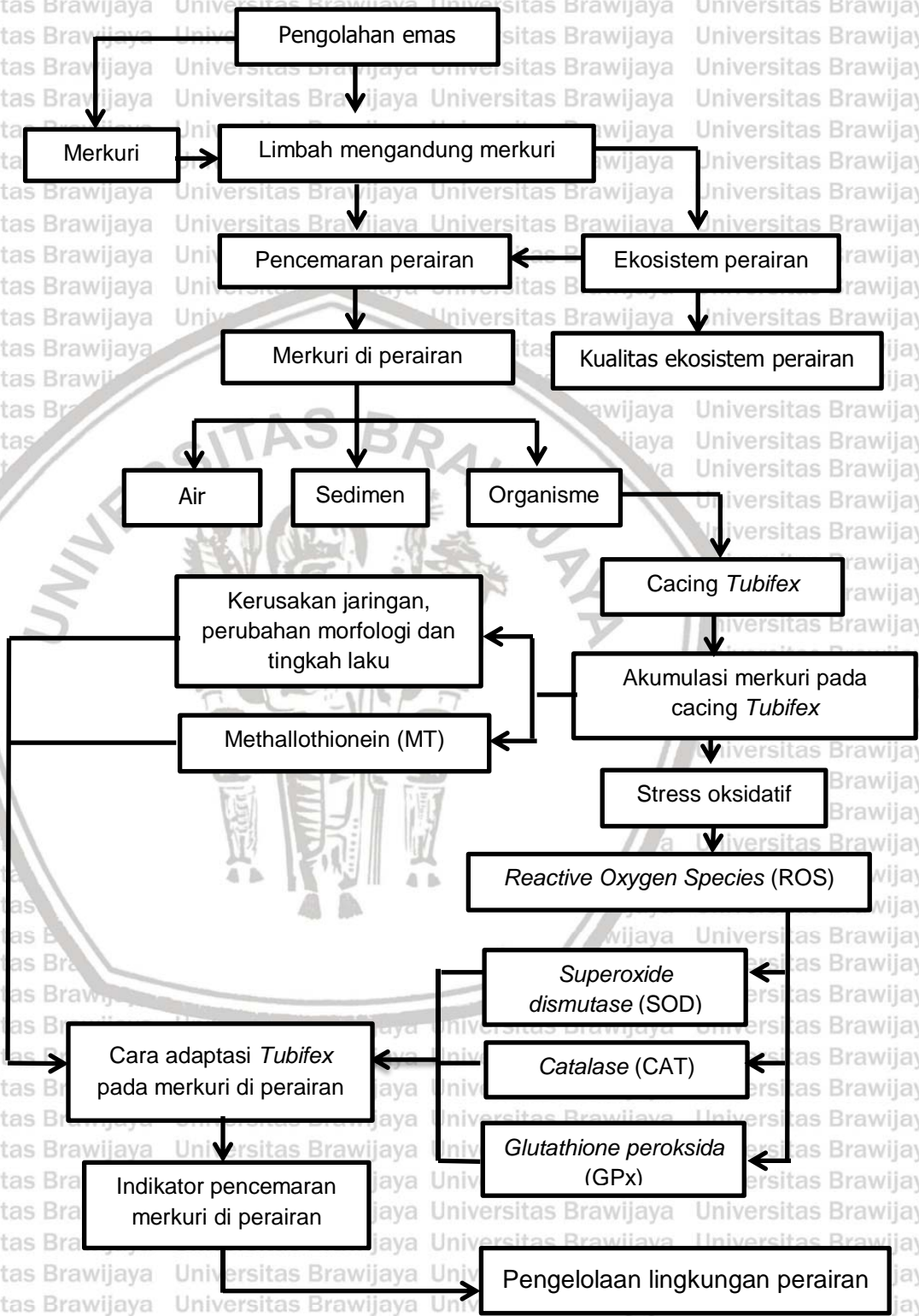
Logam merkuri teridentifikasi sebagai sumber pencemaran di perairan Desa Kejapanan Kabupaten Pasuruan sebagai lokasi penelitian. Di sekitar perairan tersebut, terdapat industri pengolahan logam emas yang menggunakan merkuri untuk proses pencucian logam dan limbah merkuri yang dihasilkan dibuang ke perairan. Pada perairan tersebut hidup beberapa jenis organisme, termasuk Cacing *Tubifex*.

Cacing *Tubifex* termasuk kelompok Annelida yang tahan terhadap pencemaran dan menjadi organisme terakhir yang hilang dari ekosistem perairan ketika polusi meningkat (Lucan-Bouché *et al.*, 1999) oleh karena itu, digunakan sebagai indikator pencemaran air (Lafont, 2001). Cacing *Tubifex* digunakan dalam penelitian ini karena cacing tersebut telah dijadikan sebagai organisme

model studi ekotoksikologi (Vytlačilova *et al.*, 2004) dan bioassay sedimen (Lotufo dan Fleeger, 2005).

Hasil penelitian pendahuluan (2017) menunjukkan bahwa cacing *Tubifex* mampu hidup pada perairan yang mengandung merkuri. Berkaitan dengan kemampuan cacing *Tubifex* untuk hidup pada perairan yang mengandung merkuri, maka diperlukan informasi tentang cara adaptasi cacing *Tubifex* pada perairan yang tercemar merkuri. Hasil eksplorasi cara adaptasi dan efek merkuri pada cacing *Tubifex* dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk menjadikan cacing *Tubifex* sebagai bioindikator pencemaran merkuri di perairan dan sebagai acuan pengambilan kebijakan berkaitan dengan pencemaran perairan karena limbah sebagai upaya pengelolaan lingkungan perairan. Uraian kerangka konsep penelitian terlihat pada Gambar 9.





Gambar 9. Kerangka Konsep Penelitian

### 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian ini terbagi menjadi tiga tahap (Tabel 5), dengan uraian sebagai berikut:

#### 3.2.1 Tahap I Kajian kondisi lingkungan perairan

Penelitian tahap I merupakan studi lingkungan untuk mendeskripsikan kondisi lingkungan perairan di Desa Kejaman Kecamatan Gempol Kabupaten Pasuruan yang meliputi aspek fisik, kimia dan biologi perairan. Data yang diambil meliputi data kualitas air yaitu sifat fisika air (suhu, warna); kimia air (pH, DO, BOD, COD, konsentrasi logam merkuri); aspek fisik sedimen (tekstur), aspek kimia sedimen (logam berat merkuri); konsentrasi logam berat pada cacing *Tubifex*.

Beberapa data diperoleh dengan cara pengukuran langsung di lokasi penelitian meliputi pH, suhu dan warna air, sedangkan data yang lain diperoleh dari pengujian di laboratorium yang mencakup DO, BOD, COD dan konsentrasi merkuri. Konsentrasi merkuri di air, sedimen dan cacing *Tubifex* diukur menggunakan metode *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan output yang diharapkan adalah tersedianya data kondisi lingkungan perairan (Gambar 10).

#### 3.2.2 Tahap II Penentuan toleransi konsentrasi merkuri pada *Tubifex*

Penelitian tahap II dilakukan untuk menentukan konsentrasi merkuri yang dapat ditoleransi oleh cacing *Tubifex*. Toleransi konsentrasi merkuri diperoleh dengan melakukan uji toksisitas merkuri pada cacing *Tubifex*. Pengujian toksisitas yang dilakukan adalah uji toksisitas akut dan subkronis. Uji toksisitas akut bertujuan untuk memperoleh *median lethal concentration* (LC<sub>50</sub>) dengan paparan selama 48 jam, sedangkan uji toksisitas subkronis bertujuan untuk



memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut (OECD, 2001). Uji toksisitas subkronis merupakan suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian bahan kimia dengan dosis berulang selama tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan (USEPA, 2002).

Uji toksisitas akut dilakukan melalui dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif. Uji pendahuluan dilakukan untuk memperoleh nilai ambang bawah (LC<sub>0</sub> 48 jam) dan ambang atas (LC<sub>100</sub> 24 jam). Nilai tersebut digunakan untuk menentukan dosis pada uji definitif. Nilai LC<sub>50</sub> 48 jam diperoleh dengan menggunakan analisis probit.

Pengujian dilakukan dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif. Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan penurunan konsentrasi merkuri harian. Konsentrasi merkuri yang digunakan pada uji toksisitas subkronis adalah 0%; 12,5%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari dosis LC<sub>50</sub> 48 jam. Uji definitif untuk menentukan persentase mortalitas dan respon cacing *Tubifex* pada saat paparan. Data dianalisis secara statistik menggunakan menggunakan Anova ( $\alpha < 0,05$ ) untuk kemudian dideskripsikan. Output dari uji toksisitas adalah nilai LC<sub>50</sub> 48 jam, persentase mortalitas cacing *Tubifex*, konsentrasi merkuri dan respon cacing pada saat paparan.

### 3.2.3 Tahap III Analisis efek paparan merkuri pada *Tubifex*

Penelitian tahap III bertujuan untuk memperoleh konsentrasi merkuri setelah paparan, menentukan kadar metallothionein (MT), kadar ROS, kadar CAT, kadar SOD, kadar GPx dan deskripsi kerusakan jaringan pada cacing *Tubifex* pada paparan akut dan subkronis.

Cacing *Tubifex* yang diuji pada tahap ini adalah cacing yang baru mati dan yang masih hidup setelah paparan merkuri subkronis. Cacing dinyatakan

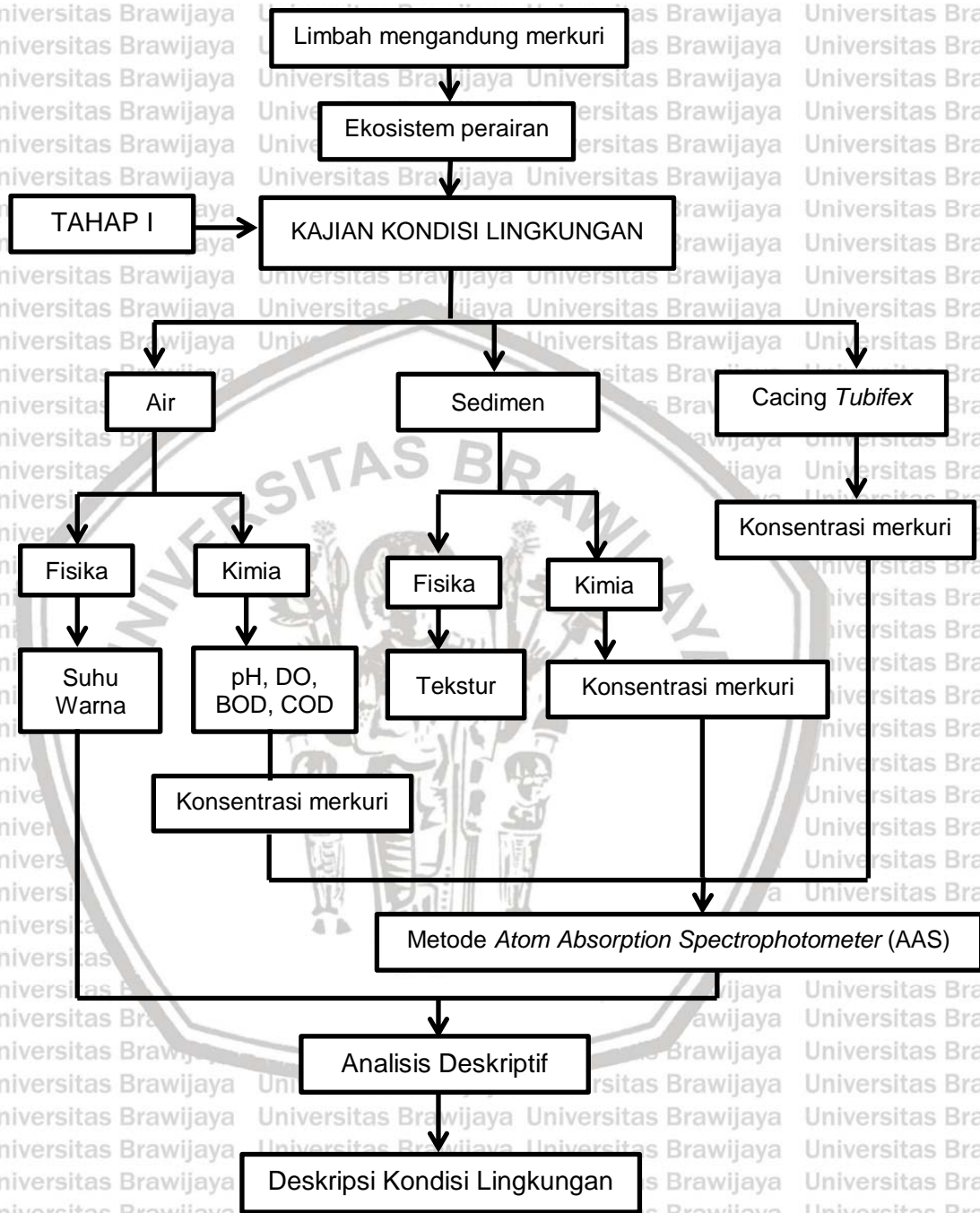
mati ketika tidak ada respon selama 10 detik terhadap gangguan dari luar (Rahman, 2017). Cacing yang mati sesaat kemudian langsung diambil untuk dilakukan preparasi dan pengujian histologi dengan menggunakan pewarnaan HE, penentuan konsentrasi merkuri dengan metode AAS, deskripsi morfologi dengan pengujian SEM dan penentuan persentase merkuri secara kuantitatif dalam jaringan dengan pengujian EDX, penentuan kadar metallothionein (MT) menggunakan metode ELISA, penentuan kadar ROS menggunakan metode spektrofotometri, penentuan kadar superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx) menggunakan SOD kit, CAT kit dan GPx kit.

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif. Output pada penelitian tahap ini adalah konsentrasi merkuri setelah paparan, deskripsi morfologi, kadar metallothionein (MT), kadar ROS, kadar CAT, kadar SOD, kadar GPx, dan deskripsi kerusakan jaringan setelah paparan (Gambar 12).

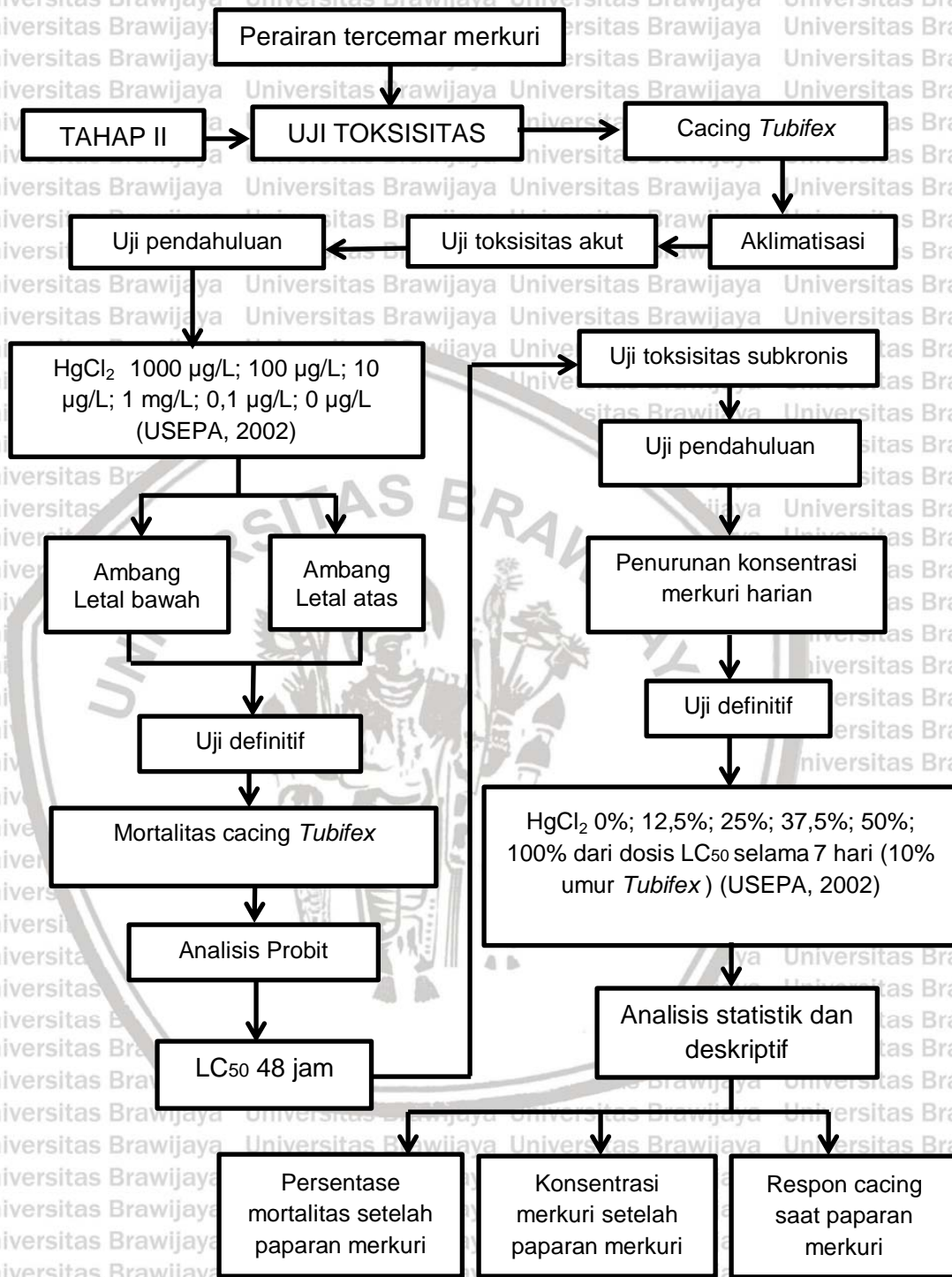
Tabel 5. Tahapan operasional penelitian

TAHAP	TUJUAN PENELITIAN	DATA YANG DIKUMPULKAN	METODE PENGUMPULAN DAN ANALISIS DATA	OUTPUT
1	2	3	4	5
I	Mengidentifikasi kualitas lingkungan pada aliran pembuangan limbah pencucian emas.	Fisika air (suhu, warna); kimia air (pH, DO, BOD, COD, konsentrasi merkuri); biologi (cacing <i>Tubifex</i> ; Fisika sedimen (tekstur), kimia sedimen (konsentrasi merkuri), konsentrasi merkuri pada cacing <i>Tubifex</i> .	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pengukuran pH, suhu dan warna air langsung di lapang.</li> <li>2. Pengukuran DO, COD, BOD dan konsentrasi merkuri air diuji di laboratorium.</li> <li>3. Penentuan tekstur dan konsentrasi merkuri pada sedimen diuji di laboratorium.</li> <li>4. Pengukuran konsentrasi merkuri di cacing <i>Tubifex</i> diuji di laboratorium.</li> <li>5. Pengukuran konsentrasi merkuri menggunakan metode AAS.</li> <li>6. Analisis data secara deskriptif.</li> </ol>	Data kualitas lingkungan
II	Menentukan konsentrasi merkuri yang dapat ditoleransi oleh cacing <i>Tubifex</i>	Uji toksisitas akut dan subkronis merkuri pada cacing <i>Tubifex</i>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Uji toksisitas akut: uji pendahuluan untuk memperoleh ambang letal bawah dan ambang letal atas dan uji definitif untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> 48 jam dengan analisis probit.</li> <li>2. Uji subkronis: uji pendahuluan untuk menentukan penurunan konsentrasi harian dan uji definitif untuk memperoleh mortalitas cacing <i>Tubifex</i> dan respon cacing <i>Tubifex</i> pada saat paparan.</li> <li>3. Data dianalisis secara statistik dengan Anova (<math>\alpha &lt; 0,05</math>), kemudian dideskripsikan.</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nilai LC<sub>50</sub> 48 jam</li> <li>• Mortalitas cacing <i>Tubifex</i> pada dosis subkronis.</li> <li>• Konsentrasi merkuri.</li> <li>• Respon cacing pada saat paparan merkuri.</li> </ul>

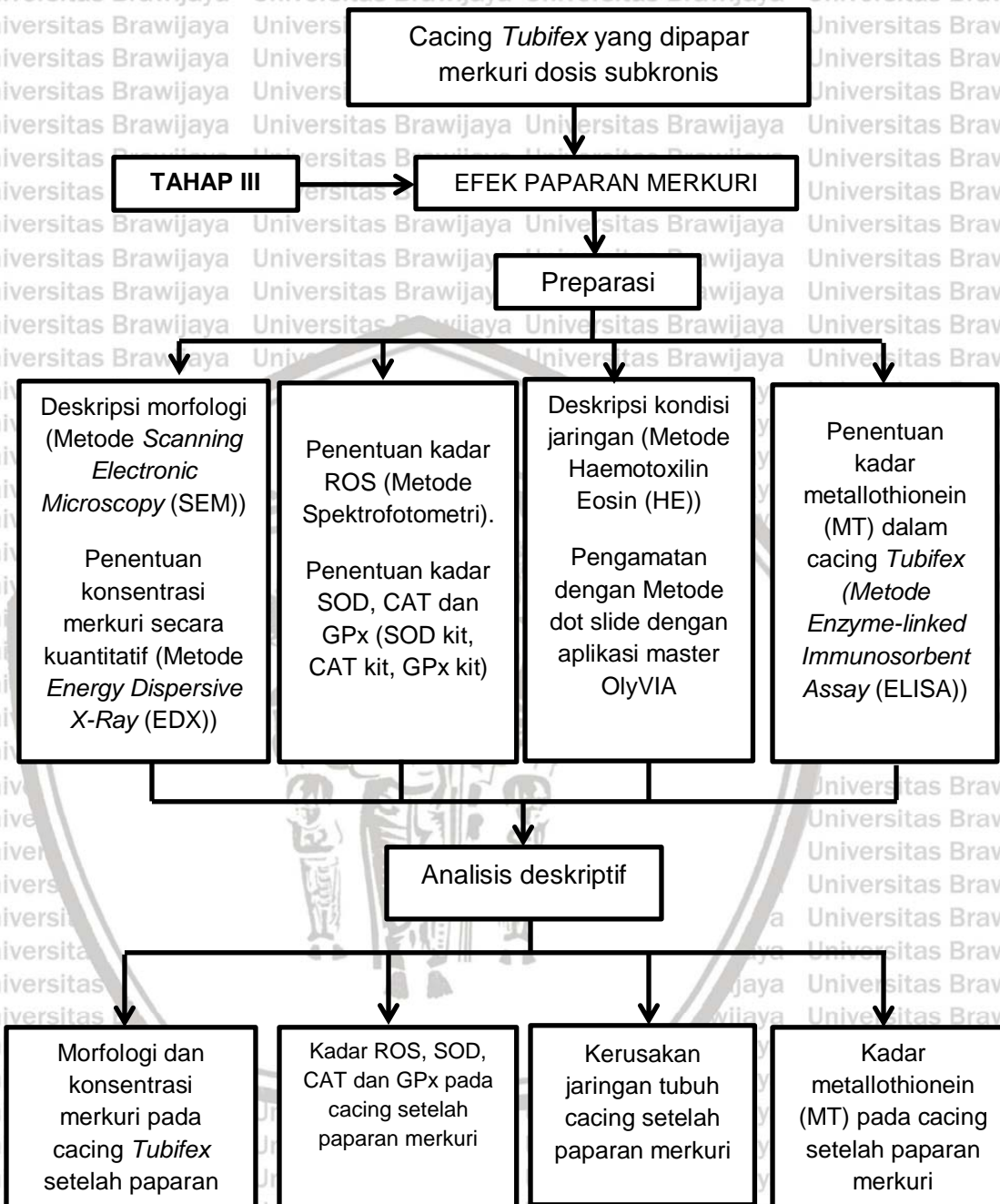
1	2	3	4	5
III	Menentukan kadar metallothionein (MT), <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS) pada <i>Tubifex</i> yang dipapar merkuri dan mengamati efek yang ditimbulkan oleh paparan merkuri pada cacing <i>Tubifex</i>	Cacing <i>Tubifex</i> yang mati dan hidup pada uji subkronis	<ol style="list-style-type: none"> <li>Cacing yang mati sesaat diambil untuk preparasi dan pewarnaan HE, penentuan konsentrasi merkuri dengan metode AAS, deskripsi morfologi dengan pengujian SEM dan penentuan elemen secara kuantitatif dalam jaringan dengan EDX, penentuan kadar metallothionein (MT) menggunakan metode ELISA, penentuan kadar ROS menggunakan metode spektrofotometri, penentuan kadar superoxide dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx) menggunakan SOD kit, CAT kit dan GPx kit serta deskripsi respon tingkah laku cacing pada saat dipapar.</li> <li>Hasil yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.</li> </ol>	Konsentrasi merkuri setelah paparan, deskripsi morfologi, kadar metallothionein (MT), kadar ROS, kadar CAT, kadar SOD, kadar GPx dan deskripsi kerusakan jaringan setelah paparan merkuri.



Gambar 10. Kerangka operasional penelitian tahap I



Gambar 11. Kerangka operasional penelitian tahap II



Gambar 12. Kerangka operasional tahap III

### 3.3 Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang telah dirumuskan, dapat diajukan beberapa hipotesis sebagai berikut :

1.  $H_0$  : Perairan di sekitar pembuangan limbah pengolahan emas belum tercemar.

$H_1$  : Perairan di sekitar pembuangan limbah pengolahan emas telah tercemar.

2.  $H_0$  : Cacing *Tubifex* tidak memiliki ambang batas toleransi terhadap merkuri.

$H_1$  : Cacing *Tubifex* memiliki ambang batas toleransi terhadap merkuri..

3.  $H_0$  : Paparan merkuri tidak menimbulkan efek pada cacing *Tubifex*.

$H_1$  : Paparan merkuri menimbulkan efek pada cacing *Tubifex*.





## BAB IV. METODE PENELITIAN

### 4.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Desa Kejapanan Kecamatan Gempol Kabupaten Pasuruan Jawa Timur, dari bulan Agustus 2017 sampai Mei 2018.

Sampel diambil pada sepanjang aliran air yang dilewati limbah pengolahan emas. Stasiun sampling ditentukan secara *purposive*. Lokasi pengambilan sampel sebanyak empat stasiun yaitu aliran air sebelum sumber pencemar (St1); aliran air tepat di sumber pencemar (St2) dan dua titik setelah sumber pencemar (St3 dan St4).

Pengujian kualitas air, pengukuran logam berat dan preparasi dilakukan di laboratorium pada lingkungan Universitas Brawijaya Malang (Laboratorium Reproduksi Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Fisiologi dan Ilmu Faal Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biosains) dan Laboratorium Sentral Universitas Negeri Malang.

### 4.2. Bahan dan Alat

#### 4.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel air, sampel sedimen dan sampel cacing *Tubifex* sebagai hewan uji serta bahan-bahan lain yang digunakan dalam pengujian di laboratorium. Uraian lengkap dari bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum pada Tabel 6.

Tabel 6. Bahan yang digunakan dalam penelitian

Nomor	Bahan	Kegiatan
1.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cacing <i>Tubifex</i> yang diperoleh dari lokasi penelitian</li> <li>• Cacing hasil budidaya (ukuran 1-3 cm).</li> </ul>	Hewan uji
2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sampel air limbah pengolahan emas</li> <li>• Sampel air di saluran pembuangan limbah.</li> </ul>	Pengukuran konsentrasi merkuri
3.	Sampel sedimen di lokasi penelitian	Pengukuran konsentrasi merkuri dan tekstur sedimen
4.	Lumpur, dedak, ampas tahu, kotoran ayam	Media kultur <i>Tubifex</i>
5.	Larutan HgCl <sub>2</sub>	Larutan untuk <i>treatment</i>
6.	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat; HNO <sub>3</sub> pekat; KmnO <sub>4</sub> 0,01 N	Pengukuran merkuri dengan metode AAS
7.	Formalin 4%; paraformaldehid (PFA); alkohol; larutan xylol murni; parafin; albumin; gliserin; haemotoxylin; eosin; kertas saring; aquades; canada balsam	Pewarnaan HE
8.	Buffer glutaraldehyde 3%; buffer osmium tetraoxide; larutan <i>Phosphat Buffer Saline</i> (PBS); air distilasi; etanol/aseton.	Preparasi SEM EDX

#### 4.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi alat yang digunakan untuk pengambilan dan pengukuran sampel di lapangan serta alat yang digunakan dalam pengujian laboratorium. Uraian alat yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada Tabel 7.

Tabel 7. Alat yang digunakan dalam penelitian

Nomor	Alat	Kegiatan
1.	Serok; wadah sampel	Pengambilan cacing <i>Tubifex</i> di perairan
2.	Botol gelap; botol terang	Pengambilan sampel air
3.	Sekop; wadah sampel	Pengambilan sampel sedimen
4.	<ul style="list-style-type: none"> <li>pH meter, termometer, DO meter,</li> <li>Pengukuran BOD dan COD menggunakan metode Winkler</li> </ul>	Pengukuran kualitas air
5.	Wadah hewan uji (wadah pemeliharaan dan wadah perlakuan); aerator; selang	Uji toksisitas
6.	Spektrofotometer, pemanas listrik; sentrifuge; gelas piala; gelas arloji, <i>Atomic Absorption Spectrophotometer</i> (Model Shimadzu AA-7000)	Metode AAS
7.	Sectio set; botol kaca; <i>tissue cassette</i> ; <i>tissue texture processor</i> ; mesin vakum; pinset; cetakan; kertas label; mikrotom; waterbath; kaca objek; inkubator	Pembuatan preparat jaringan
8.	Fish MT-2 ELISA Kit (Sandwich ELISA Kit) Cat. No. E0104Fi	Penentuan kadar MT kuantitatif
9.	Mikroskop Dot Slide Olympus SN 3K19322	Pengamatan histologi cacing <i>Tubifex hoffmeisteri</i> .
10.	Catalase Activity Kit (StressMarq, Biosciences inc.) Catalog SKT-215 (2x96 well kit) Quantitative colorimetric measurement of catalase acid	Penentuan kadar katalase (CAT)
11.	Cat: EGPX-100 EnzyChrom™ Glutathione Peroxidase Assay Kit	Penentuan kadar GPx
12.	Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Catalog K335-100). Linda Vista Avenue, Montain View. CA 94043 USA	Penentuan kadar SOD
13.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Scanning Electron Microscope Hitachi Tabletop Microscope TM3000.</li> <li>Scanning Electron Microscop INSPECT S50.</li> </ul>	Pengujian SEM EDX

### **4.3 Penelitian Tahap I (Kajian Kualitas Lingkungan)**

#### **4.3.1 Metode**

Penelitian pada tahap I menggunakan metode deskriptif. Data yang dikumpulkan adalah data primer dan sekunder. Data primer merupakan data yang diperoleh langsung dari sumber pertama melalui observasi, wawancara dan partisipasi aktif di lapangan (Siagian dan Sugiarto, 2000). Pada penelitian ini, data primer diperoleh dari hasil observasi, pengamatan langsung di lapangan dan uji laboratorium. Data sekunder merupakan data yang sudah diolah dan diperoleh dari pihak lain sebagai data pendukung. Data sekunder berupa nilai standar, analisis dari dampak suatu metode dan data perbandingan antara dua laporan (Almilia, 2011). Data sekunder yang dalam penelitian ini berasal dari jurnal-jurnal yang dijadikan sebagai acuan dalam penelitian. Penelitian tahap I bertujuan untuk memperoleh deskripsi lingkungan di sekitar tempat pembuangan limbah pengolahan emas.

#### **4.3.2 Prosedur penelitian**

Pada tahap ini dilakukan beberapa kegiatan yaitu penentuan jenis dan konsentrasi logam di lokasi penelitian serta pengukuran fisika-kimia air dan fisika-kimia sedimen.

##### **A. Penentuan jenis dan konsentrasi logam**

Penentuan jenis dan konsentrasi logam di perairan ditentukan dengan pengambilan sampel air, sedimen dan cacing *Tubifex* di lokasi penelitian untuk selanjutnya dianalisa aspek fisika dan kimia air dan sedimen.

##### **• Prosedur pengambilan sampel sebagai berikut:**

Sampel air yang diambil adalah air limbah pengolahan emas pada kolam penampungan dan di aliran pembuangan limbah. Sampel air diambil dan disimpan dalam botol gelap dan terang. Pengamatan fisika air seperti suhu,

warna dan pH dilakukan secara langsung di lokasi penelitian, sedangkan pengujian DO, BOD, COD dan konsentrasi logam berat dilakukan di laboratorium. Sampel sedimen diambil pada setiap stasiun sampling yang telah ditentukan. Sampel sedimen diambil menggunakan pipa paralon pada kedalaman 10-15 cm dari permukaan sedimen (Jamabo dan Chinda, 2010).

Sampel dipisahkan dari kotoran dan disaring menggunakan ayakan ukuran 2 mesh. Selanjutnya, sampel disimpan di dalam botol, disegel dan dimasukkan ke dalam kotak pendingin. Sampel disimpan dalam *freezer* sebelum dilakukan pengukuran (Singh *et al.*, 2007). Sampel sedimen diambil untuk diukur kadar logam merkuri (Hg) dan ditentukan tekstur dari sedimen.

Cacing *Tubifex* diambil pada stasiun sampling yang telah ditentukan.

Cacing diambil secara langsung dengan sedimen dan dipisahkan dari kotoran yang menempel. Kemudian cacing dicuci pada air mengalir sampai bersih dan disimpan dalam wadah. Cacing *Tubifex* yang telah bersih, kemudian diukur konsentrasi logamnya yaitu merkuri (Hg) dan ditentukan kadar metallothionein dalam tubuh cacing.

## **B. Pengukuran konsentrasi logam di perairan dengan metode *Atomic***

### ***Absorption Spectrophotometry (AAS)***

Pengukuran konsentrasi logam pada setiap sampel (air, sedimen dan cacing *Tubifex*) menggunakan metode *Atom Absorption Spectrophotometer* (AAS) berdasarkan SNI 01-2354-2006. Prosedur penetapan konsentrasi Hg mengacu pada (EPA, 2007).

#### **• Prosedur preparasi sampel**

Preparasi sampel sedimen yaitu dengan membersihkan sampel sedimen dari kotoran, kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu

40°C dan dihaluskan. Sampel sebanyak 1 gram dilarutkan ke dalam aquades, dikocok dan disentrifuge untuk diambil supernatannya.

Preparasi sampel cacing *Tubifex* yaitu membersihkan cacing dari kotoran yang menempel dan dicuci sampai bersih pada air mengalir.

Prosedur selanjutnya sama dengan preparasi sedimen. Preparasi sampel air yaitu dengan menyaring air agar bebas dari kotoran.

- **Prosedur pembuatan larutan standar Hg**

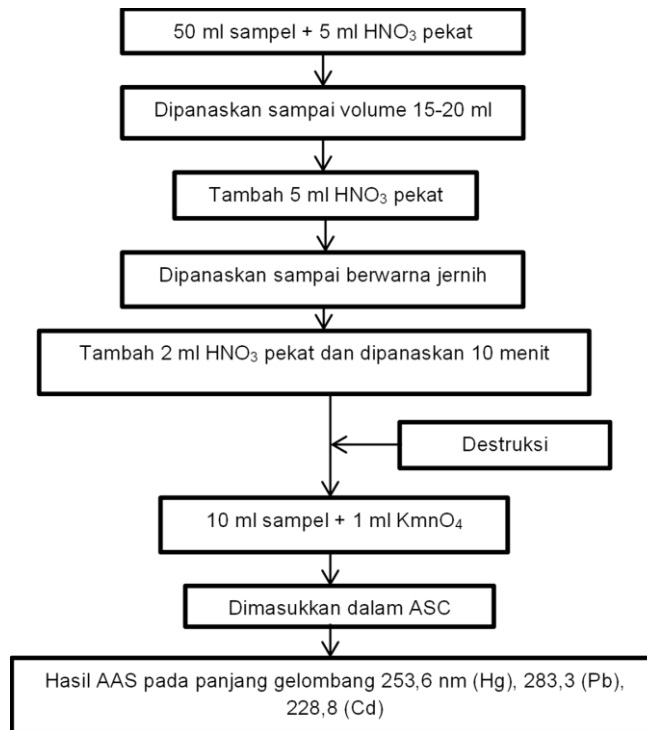
Pembuatan larutan standar Hg dan Cd dilakukan dengan mengambil 10 ml larutan induk Hg 1000 mg/L masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan HNO<sub>3</sub> 20% hingga garis tanda, lalu dihomogenkan. Pembuatan larutan Hg 10 ppm dibuat dengan mengambil 10 mL larutan standar Hg 100 ppm, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, diencerkan dengan HNO<sub>3</sub> 20% hingga garis tanda, lalu dihomogenkan. Masing-masing larutan standar Hg sesuai dengan larutan kerja diukur dengan AAS pada panjang gelombang 253,7 nm untuk Hg, kemudian hasilnya diplot menjadi kurva kalibrasi (Wulandari *et al.*, 2018).

- **Penetapan konsentrasi logam di air, sedimen dan cacing**

- Tubifex***

Prosedur pengukuran logam Hg dalam sampel (Gambar 13) sebagai berikut: Sampel/supernatan diambil 50 mL dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambahkan 5 mL HNO<sub>3</sub> pekat, dipanaskan perlahan sampai volumenya tinggal 15-20 mL. Selanjutnya ditambahkan 5 mL HNO<sub>3</sub> pekat lagi dan dipanaskan, kemudian ditambahkan asam dan dipanaskan sampai contoh air uji menjadi jernih, setelah itu ditambahkan lagi 2 ml HNO<sub>3</sub> pekat dan dipanaskan sekitar 10 menit, dilanjutkan

dengan proses destruksi. Sampel diambil 10 mL ditambahkan  $\text{KmnO}_4$  0.01N dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer dengan panjang gelombang 253,6 nm. Hasil pengukuran dalam AAS langsung dinyatakan sebagai hasil dan nilai logam.



Gambar 13. Prosedur pengukuran merkuri dengan metode AAS

### C. Pengukuran kualitas air

#### • Suhu, pH dan warna air

Suhu air secara langsung menggunakan termometer dengan cara memasukkan termometer ke dalam air selama  $\pm 5$  menit, angka pada termometer menunjukkan suhu air dalam  $^{\circ}\text{C}$ . Derajat keasaman (pH) air diukur secara langsung menggunakan pH meter dengan cara mencelupkan pH meter ke dalam air dan angka yang terbaca adalah nilai pH air, sedangkan warna air diamati secara visual.

- **Dissolved Oxygen (DO)**

Oksigen terlarut (DO), BOD dan COD diukur dengan metode analisis standar (APHA, 2005). *Dissolved oxygen* adalah konsentrasi oksigen yang terlarut di dalam air, berasal dari fotosintesis, difusi dari udara. Kadar oksigen terlarut dapat ditentukan dengan dua cara yaitu cara titrasi (metode Winkler) dan menggunakan DO meter. Prinsip analisis metode Winkler adalah pengikatan oksigen oleh pereduksi  $MnO_4$  menjadi  $Mn(OH)_2$  dan membebaskan  $I_2$ . Jumlah  $I_2$  yang dibebaskan sama dengan  $O_2$  yang ada di perairan. Metode DO meter adalah pembacaan secara digital dengan penghantaran menggunakan elektroda yang dicelupkan ke dalam air sampel.

Prosedur kerja metode Winkler sebagai berikut: air sampel dimasukkan ke dalam botol BOD sebanyak 125 ml lalu diberi  $MnSO_4$  1 ml dan  $NaOH + KI$  1 ml. Botol BOD ditutup dan diaduk kemudian didiamkan sehingga terbentuk endapan coklat.  $H_2SO_4$  pekat sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam larutan hingga endapan coklat berubah menjadi kuning tua. Sebanyak 25 ml air dituangkan ke dalam erlenmeyer kemudian dititrasi dengan Na-Thiosulfat sampai berwarna kuning muda. Setelah itu ditambahkan 2-3 tetes indikator amilum hingga berubah warna menjadi biru, lalu dititrasi lagi dengan Na-Thiosulfat hingga berubah menjadi bening tidak berwarna.

- **Biochemical Oxygen Demand (BOD)**

*Biochemical Oxygen Demand* menunjukkan jumlah oksigen dalam satuan ppm yang dibutuhkan oleh mikroorganisme untuk memecahkan bahan-bahan organik yang terdapat di dalam air. Pemeriksaan BOD diperlukan untuk menentukan beban pencemaran akibat air buangan penduduk atau industri.

Pengujian BOD menggunakan metode Winkler-Alkali iodida azida, adalah penetapan BOD yang dilakukan dengan cara mengukur berkurangnya kadar



oksigen terlarut dalam sampel yang disimpan dalam botol tertutup rapat, diinkubasi selama 5 hari pada suhu kamar. Dalam metode Winkler digunakan larutan  $MgSO_4$ ,  $FeCl_3$ ,  $CaCl_2$  dan buffer fosfat. Kemudian dilanjutkan dengan metode Alkali iodida azida dengan cara titrasi, dalam penetapan kadar oksigen terlarut digunakan pereaksi  $MnSO_4$ ,  $H_2SO_4$  dan alkali iodida azida. Sampel dititrasi dengan natrium thiosulfat memakai indikator amilum (Alaerts dan Santika, 1984). Penghitungan DO dan BOD menggunakan rumus berikut:

$$DO \text{ (mg/L)} = \frac{V \text{ Thiosulfat} \times N \text{ Thiosulfat} \times 1000 \times BeO_2 \times P}{V \text{ Sampel}}$$

$$BOD = DO_0 - DO_5$$

Keterangan:

$DO_0$  = Oksigen terlarut 0 hari

$DO_5$  = Oksigen terlarut 5 hari

$Be O_2 = 8$

P = Pengenceran

- **Chemical Oxygen Demand (COD)**

*Chemical Oxygen Demand* (kebutuhan oksigen kimia) adalah jumlah oksigen ( $mg O_2$ ) yang dibutuhkan untuk mengoksidasi zat-zat organik yang ada dalam satu liter sampel air, dimana pengoksidanya adalah  $K_2Cr_2O_7$  atau  $KMnO_4$ . Nilai COD merupakan ukuran bagi pencemaran air karena zat-zat organik yang secara alamiah dapat dioksidasi melalui proses mikrobiologis dan mengakibatkan berkurangnya oksigen terlarut di dalam air.

Pada pengukuran COD digunakan perak sulfat ( $Ag_2SO_4$ ) sebagai katalisator untuk mempercepat reaksi, sedangkan merkuri sulfat ditambahkan untuk menghilangkan gangguan klorida yang pada umumnya ada di dalam air buangan. Untuk memastikan bahwa hampir semua zat organik habis teroksidasi maka zat pengoksidasi  $K_2Cr_2O_7$  masih harus tersisa sesudah direfluks. Senyawa  $K_2Cr_2O_7$  yang tersisa menentukan berapa besar oksigen yang telah terpakai.

Sisa  $K_2Cr_2O_7$  tersebut ditentukan melalui titrasi dengan ferro ammonium sulfat (FAS). Reaksi yang berlangsung adalah sebagai berikut:



Indikator ferroin digunakan untuk menentukan titik akhir titrasi yaitu disaat warna hijau biru larutan berubah menjadi coklat merah. Sisa  $K_2Cr_2O_7$  dalam larutan blanko adalah  $K_2Cr_2O_7$  awal, karena diharapkan blanko tidak mengandung zat organik yang dioksidasi oleh  $K_2Cr_2O_7$ . Penghitungan COD menggunakan rumus berikut:

$$COD = \frac{(A - B) \times N \text{ FAS} \times 1000 \times BeO_2 \times P}{V \text{ sampel}}$$

Keterangan:

- A = mL titran blanko
- B = mL titrasi sampel
- N = Normalitas FAS
- Be  $O_2 = 8$
- P = Pengenceran

#### 4.4. Penelitian Tahap II (Uji Toksisitas Merkuri)

Penelitian pada tahap II terdiri dari dua tahap yaitu uji toksisitas akut dan uji toksisitas subkronik. Kedua tahap tersebut menggunakan metode eksperimen dengan rancangan penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan konsentrasi yang berbeda. Uji toksisitas akut bertujuan untuk memperoleh nilai LC<sub>50</sub>, sedangkan uji toksisitas subkronik untuk memperoleh tingkat mortalitas *Tubifex* setelah paparan  $HgCl_2$ . Kedua perlakuan uji toksisitas tersebut menggunakan konsentrasi larutan  $HgCl_2$  yang berbeda sebagai perlakuan. Prosedur uji toksisitas berdasarkan OECD (2001).

##### 4.4.1 Uji toksisitas akut

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi merkuri di perairan terhadap kemampuan cacing *Tubifex* dalam beradaptasi pada limbah

yang mengandung merkuri. Prosedur penelitian uji toksisitas akut dilakukan pada dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif. Kisaran lama pengujian adalah kelipatan 24 jam. Dosis yang digunakan berdasarkan skala logaritmik (Guthrie *et al.*, 1980). Pada penelitian ini, merkuri yang digunakan dalam bentuk senyawa merkuri klorida ( $\text{HgCl}_2$ ) dengan pelarut air distilasi. Kegiatan yang dilakukan dalam uji toksisitas akut adalah aklimatisasi cacing *Tubifex hoffmeisteri*, uji pendahuluan dan uji definitif.

### Aklimatisasi

Cacing *Tubifex* dicuci dengan air mengalir dan disimpan dalam kotak plastik 1L dengan air yang mengalir di laboratorium selama 48 jam untuk aklimatisasi. Selama aklimatisasi, cacing disimpan di bawah aliran air untuk memastikan terjadi proses pencucian dari kotoran dan ekskresi cacing. Aliran air juga menyediakan oksigen yang dibutuhkan untuk cacing *Tubifex* dan membantu detoksifikasi cacing dari kemungkinan logam praakumulasi yang signifikan. Selama periode aklimatisasi, cacing tidak diberi pakan untuk menjaga kualitas air.

### Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan ambang letal bawah ( $\text{LC}_{50}$  48 jam) dan ambang letal atas ( $\text{LC}_{100}$  24 jam). Konsentrasi ambang letal atas adalah konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% dari hewan uji. Konsentrasi ambang letal bawah adalah konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian sama sekali pada hewan uji (USEPA, 2002). Konsentrasi ambang letal atas dan ambang letal bawah digunakan untuk menentukan nilai *median lethal concentration* ( $\text{LC}_{50}$  48 jam).

Prosedur uji pendahuluan sebagai berikut :Cacing *Tubifex* yang telah diaklimatisasi dimasukkan ke dalam wadah dengan kepadatan 10 ekor setiap

100 mL larutan merkuri. Cacing yang diberi perlakuan sebanyak 50 ekor. Konsentrasi yang digunakan untuk pengujian berdasarkan skala logaritmik (Guthrie *et al.*, 1980) yaitu 1000 µg/L; 100 µg/L; 10 µg/L; 1 µg/L; 0,1 µg/L; 0 µg/L (USEPA, 2002) dan masing-masing perlakuan diulang tiga kali.

Estimasi persentase mortalitas cacing sebagai berikut: Pengamatan mortalitas hewan uji dilakukan pada periode waktu paparan 24 dan 48 jam (Yilmaz *et al.*, 2004). Parameter yang diamati meliputi perubahan morfologi dan respon cacing selama paparan. Mortalitas cacing *Tubifex* pada masing-masing perlakuan dihitung setelah paparan 48 jam. Selama paparan, cacing tidak diberi pakan untuk menghindari interaksi antara kontaminan dan pakan (Lucan-Bouché *et al.*, 1999) serta menjaga kualitas air. Seekor cacing dianggap mati ketika tidak ada respon dalam 10 detik setelah ada gangguan dari luar (Rand, 1985). Cacing yang mati dipindahkan dari akuarium pada saat terdeteksi dengan menggunakan pipet. Persentase mortalitas hewan uji dihitung dari jumlah hewan uji yang mati dibagi dengan jumlah total.

$$\text{Mortalitas (\%)} = (\text{jumlah hewan uji yang mati} / \text{total hewan uji}) \times 100\%$$

Berdasarkan hasil perhitungan jumlah mortalitas cacing *Tubifex* maka dapat ditentukan ambang letal bawah (LC<sub>0</sub> 48 jam) dan ambang letal atas (LC<sub>100</sub> 24 jam) (Van der Geest *et al.*, 1999). Setelah konsentrasi ambang letal atas dan letal bawah diperoleh, kemudian konsentrasi yang akan digunakan pada uji definitif ditentukan dengan menggunakan rumus logaritma. Penentuan konsentrasi tersebut adalah dengan menggunakan cara *Quantal Responses* menurut cara Finney (1971):

$$\text{Log } \frac{N}{n} = k \times \log \frac{a}{n} \dots\dots\dots (1)$$

$$\frac{a}{n} = \frac{b}{a} = \frac{c}{b} = \frac{d}{c} = \frac{e}{d} = \frac{x}{e} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

N = Konsentrasi ambang atas

n = Konsentrasi ambang bawah

a = Konsentrasi terkecil dalam deret konsentrasi yang digunakan

b = Konsentrasi ke-b dalam deret konsentrasi yang digunakan

c = Konsentrasi ke-c dalam deret konsentrasi yang digunakan

d = Konsentrasi ke-d dalam deret konsentrasi yang digunakan

x = Konsentrasi ke-x dalam deret konsentrasi yang digunakan

k = Jumlah interval konsentrasi yang diuji

#### Uji Definitif

Uji toksisitas akut definitif bertujuan untuk menentukan toksisitas (LC50)

merkuri pada *Tubifex* selama paparan 48 jam, pengamatan dilakukan setiap 24 jam. Nilai LC50 adalah konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji.

Nilai LC50 ditentukan dengan menggunakan analisis probit (Connell dan Miller, 1995).

Prosedur uji definitif sebagai berikut :Cacing *Tubifex* yang telah diaklimatisasi (50 ekor) dimasukkan ke dalam wadah yang berisi 500 mL air.

Konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  yang diujikan ditentukan berdasarkan ambang letal yang telah diperoleh pada uji pendahuluan yaitu 0  $\mu\text{g/L}$ ; 15,85  $\mu\text{g/L}$ ; 25,12  $\mu\text{g/L}$ ; 38,81  $\mu\text{g/L}$ ; 63,09  $\mu\text{g/L}$ ; 99,98  $\mu\text{g/L}$ . Larutan  $\text{HgCl}_2$  yang telah dibuat dimasukkan ke dalam wadah yang telah berisi air dan cacing *Tubifex*. Estimasi persentase mortalitas dilakukan sama dengan estimasi mortalitas pada uji pendahuluan dan pengamatan dilakukan setiap 24 jam (Yilmaz *et al.*, 2004). Parameter yang diamati meliputi perubahan morfologi dan respon cacing selama paparan.

Mortalitas cacing *Tubifex* pada masing-masing perlakuan dihitung setelah

paparan 48 jam. Persentase mortalitas cacing dihitung berdasarkan jumlah cacing yang mati dibagi dengan jumlah total cacing dikalikan 100%.

#### 4.4.2 Uji toksisitas subkronis

Setelah diperoleh hasil uji toksisitas akut, kemudian dilanjutkan dengan pengujian toksisitas subkronis. Uji toksisitas subkronis dilakukan melalui dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif.

Sebelum dilakukan kontaminasi, cacing disimpan dalam air distilasi selama dua hari untuk aklimatisasi. Dosis uji untuk paparan adalah 12,5%, 25%, 37,5%, 50% dan 100% dari konsentrasi LC<sub>50</sub> 48h yang telah dilakukan sebelumnya (83,15 µg/L). Kepadatan cacing sebesar 10 ekor per 100 mL larutan merkuri. Cacing yang tidak dipapar disimpan dalam air distilasi sebagai pembanding. Masing-masing percobaan diulang 3 kali dan selama paparan cacing tidak diberi pakan untuk menghindari interaksi antara kontaminan dan pakan (Bouché *et al.*, 1999) serta menjaga kualitas air.

##### Uji pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan penurunan konsentrasi merkuri harian. Pada uji pendahuluan, cacing yang telah diaklimatisasi dimasukkan ke dalam wadah yang telah berisi air 500 mL dengan 50 ekor cacing. Larutan HgCl<sub>2</sub> dibuat dengan konsentrasi 0%; 12,5%; 25%; 37,5%, 50% dan 100% dari dosis LC<sub>50</sub> 48 jam. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur konsentrasi merkuri sehingga diperoleh data penurunan konsentrasi merkuri harian yang akan digunakan sebagai dasar penentuan penambahan larutan HgCl<sub>2</sub> pada uji subkronis definitif.

##### Uji definitif

Langkah awal pada uji definitif adalah mengaklimatisasi cacing *Tubifex* selama dua hari, kemudian dipapar dengan konsentrasi HgCl<sub>2</sub> yang berbeda

(0%; 12,5%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari dosis LC<sub>50</sub> 48 jam). Cacing dipapar dengan HgCl<sub>2</sub> selama tujuh hari berturut-turut dengan dosis yang sama. Pengamatan dilakukan setiap hari terhadap mortalitas, respon cacing pada saat paparan dan konsentrasi merkuri pada tubuh cacing. Cacing yang telah mati sesaat dipreparasi untuk pengujian selanjutnya yang dilakukan pada penelitian tahap III.

#### 4.4.3 Respon tingkah laku dan kondisi fisik *Tubifex*

Respon tingkah laku diamati dengan menggunakan kasat mata dan kondisi fisik cacing diamati dengan kasat mata dan mikroskop. Pengamatan yang dilakukan meliputi sekresi mukosa, pergerakan cacing, pembentukan koloni dan kecenderungan respon tingkah laku yang lain dari cacing *Tubifex* diamati pada semua konsentrasi pada periode waktu yang berbeda.

#### 4.5 Penelitian tahap III (Efek Merkuri pada *Tubifex*)

Penelitian tahap III bertujuan untuk memperoleh deskripsi morfologi, konsentrasi dan sebaran merkuri setelah paparan, kadar metallothionein (MT), kadar ROS, kadar CAT, kadar SOD, kadar GPx dan deskripsi kerusakan jaringan setelah paparan merkuri.

##### 4.5.1 Deskripsi morfologi, konsentrasi dan sebaran merkuri dengan

##### Metode SEM-EDX (*Scanning Electron microscopes-Energy Dispersive X-Ray*)

SEM-EDX adalah sebuah instrument untuk melihat morfologi dan topografi serta kandungan unsur dari sebuah bahan baik organik maupun anorganik dan untuk *elemental mapping* (sebaran unsur), alat ini dapat melihat sampel sampai ukuran nanometer. Fitur yang dihasilkan kemudian dikomputasikan menggunakan software untuk menganalisis komponen material secara kuantitatif dan kaulitatif. Pada penelitian ini, SEM-EDX digunakan untuk

memperoleh deskripsi morfologi, konsentrasi dan sebaran merkuri dalam tubuh cacing *Tubifex* setelah paparan merkuri. Prosedur pengamatan SEM-EDX merujuk pada SOP pengoperasian alat dari laboratorium sentral Universitas Negeri Malang.

#### **Preparasi sampel**

Teknik preparasi untuk *Scanning Electron Microscope* (SEM) menurut Jastrow (1998) sebagai berikut: sampel difiksasi menggunakan 2,5% glutaraldehyde pada pH 7,2 selama 90 menit kemudian dicuci dan dipost-fiksasi dalam 1,5% osmium tetroxide pH 7,2 selama 40 menit dan dikeringkan. Setelah itu, dicuci dengan air distilasi dan didehidrasi (masing-masing 10 menit) dalam aseton 30%; 50% ; 70% ; 90% ; 95% ; 96% ; 99% (Specimen tidak boleh terkontaminasi dengan udara). Kemudian preparat dikeringkan dengan critical point pada 73,8 bar dan 31<sup>o</sup>C.

#### **Pengamatan preparat dengan SEM-EDX**

Preparat difiksasi pada *holder specimen* menggunakan colloid silver solution untuk coating yang dilanjutkan dengan pengamatan preparat dalam SEM-EDX Hitachi Tabletop Microscope TM3000 dan EDX INSPECT S50. Image dimapping untuk mendapatkan gambaran sebaran merkuri dalam tubuh cacing.

Sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam ruang sampel pada SEM. Setelah vakum, arus filamen diatur hingga optimal, perbesaran dan parameter yang akan dipakai untuk dianalisis dengan EDX, kemudian dilakukan pencacahan dan pemotretan pada posisi yang dipilih. Pencacahan dilakukan tiga kali pada posisi yang berbeda untuk setiap sampel (Handayani dan Wuryanto, 1996).

Prinsip kerja SEM adalah mendeteksi elektron yang dipancarkan oleh suatu sampel padatan ketika ditembak oleh berkas elektron berenergi tinggi



secara kontinu yang dipercepat di dalam *electromagnetic coil* yang dihubungkan dengan *cathode ray tube* (CRT) sehingga dihasilkan suatu informasi mengenai keadaan permukaan suatu sampel senyawa.

#### 4.5.2. Pengukuran kadar metallothionein (MT)

Pengukuran kadar metallothionein (MT) dalam tubuh cacing *Tubifex* menggunakan metode *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Metode

ELISA termasuk jenis *immunoassay* yang merupakan uji cepat dalam mendeteksi atau mengkuantifikasi jumlah antibodi atau antigen melawan virus, bakteri atau bahan lain. Metode ELISA terdiri dari teknik kualitatif dan kuantitatif.

Teknik kualitatif didasarkan pada antibodi berikatan pada antigen yang spesifik, sedangkan teknik kuantitatif didasarkan pada jumlah ikatan antigen-antibodi yang ditentukan dengan nilai absorbansi. Pada penelitian ini digunakan Fish MT-

2 ELISA Kit dengan prosedur sebagai berikut :

##### A. Prosedur isolasi protein

###### Tahap Homogenasi

Sampel digerus menggunakan mortar yang telah didinginkan dan ditambahkan 3 ml buffer homogenisasi (0,5 M sukrosa, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8,6, mengandung 0,01%  $\beta$ -mercaptoethanol) dalam plastik atau tabung kaca.

Menghomogenasi jaringan dengan menggunakan homogenizer jaringan.

Menambahkan 3 mL Aliquot (larutan induk) ke dalam homogenat. Aliquot dapat disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sebagai kontrol, jumlah yang diketahui dari standar untuk mengkalibrasi hasil sampel yang diperoleh.

###### Tahap ekstraksi

Homogenat disentrifugasi dengan kecepatan  $30.000 \times g$  selama 20 menit untuk mendapatkan supernatan yang mengandung metallothionein.

Menambahkan 1,05 ml etanol absolut dingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) dan 80 ml kloroform per 1

ml supernatan yang dihasilkan. Mensentrifugasi sampel dingin ( $0^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$ ) pada  $6000 \times g$  selama 10 menit. Menambahkan 3 ml etanol dingin pada supernatan yang dihasilkan dan menyimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam.

#### **Tahap Pemurnian dan Kuantifikasi Metallothionein**

Mensentrifugasi supernatan pada  $6000 \times g$  selama 10 menit. Mencuci supernatan yang dihasilkan dengan etanol, kloroform, dan larutan homogenisasi penyangga dengan perbandingan 87:1:12. Mensentrifugasi lagi pada  $6000 \times g$  selama 10 menit. Mengeringkan di bawah aliran gas nitrogen agar mempercepat pengeringan. Meresuspensi sampel dalam 300 ml larutan campuran dari 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7. Mensuspensi fraksi menjadi 4,2 ml, 0,43 mM 5,5 dithiobis (asam nitrobenzoic) dalam buffer fosfat 0,2 M, pH 8. Mendinginkan selama 30 menit pada suhu kamar untuk mengurangi konsentrasi sulfhidril. Membaca absorbansi pada 412 nm dalam spektrofotometer. Mencatat hasilnya.

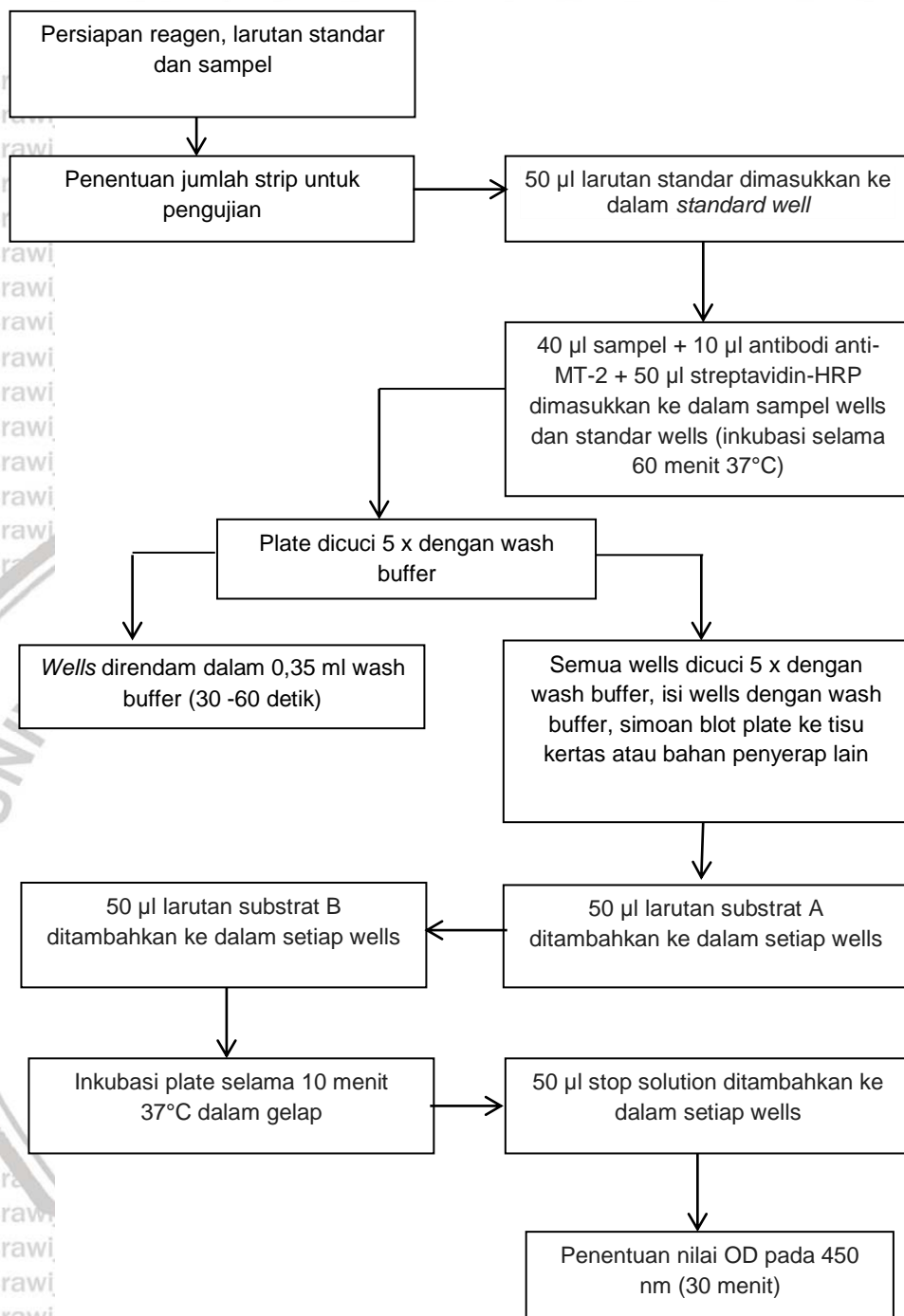
#### **Tahap Estimasi**

Sebuah kurva standar dengan glutation (GSH) digunakan sebagai acuan standar untuk kuantifikasi. GSH berisi satu sistein per molekul yang merupakan standar untuk mengukur sistein dalam analisis protein. Jumlah metallothionein dalam sampel diperkirakan menggunakan GSH yang standar, dengan asumsi bahwa 1 mol MT berisi 20 mol sistein. Sebagai contoh, dari kurva standar, jika didapatkan nilai absorbansi pada sampel 2,5, maka nilai  $x$  adalah 0,44 (dari perhitungan yang diperoleh persamaan kurva standar GSH adalah  $x = (2,5 - 0,0524) / 5,5553$ ). Dari hasil tersebut diperoleh kadar MT adalah  $0,44/20 = 0,022$   $\mu\text{mol}$ .

**B. Prosedur pengukuran kadar MT menggunakan Fish MT-2 ELISA Kit**

Semua reagen, larutan standar dan sampel disiapkan seperti yang dalam petunjuk. Simpan semua reagen pada suhu kamar sebelum digunakan. Uji ini dilakukan pada suhu kamar. Prosedurnya sebagai berikut: Menentukan jumlah strip yang diperlukan untuk pengujian. Masukkan strip di bingkai untuk digunakan. Strip yang tidak digunakan harus disimpan pada 2-8°C.

Menambahkan 50 µl standar ke dalam *standard well*. Menambahkan 40 µl sampel ke dalam *sampel wells* dan kemudian tambahkan 10 µl antibodi anti-MT-2 ke dalam *sampel wells*, kemudian ditambahkan 50 µl streptavidin-HRP ke dalam *sampel wells* dan *standar wells* (Bukan *control well*), kemudian dicampur dengan baik. Wadah ditutupi dengan *sealer* dan diinkubasi selama 60 menit pada 37°C. *Sealer* dilepaskan dan *plate* dicuci sebanyak 5 kali dengan *wash buffer*. Rendam *wells* dalam 0,35 ml *wash buffer* selama 30 – 60 detik untuk setiap pencucian. Untuk pencucian otomatis, semua *wells* dicuci 5 kali dengan *wash buffer*, isi *wells* dengan wash buffer, kemudian simpan blot plate ke tisu kertas atau bahan penyerap lainnya. Menambahkan 50 µl larutan substrat A ke setiap *wells* dan kemudian tambahkan 50 µl larutan substrat B ke masing-masing *wells*. Inkubasi *plate* yang ditutup dengan *sealer* selama 10 menit dengan suhu 37°C dalam gelap. Menambahkan 50 µl *stop solution* ke setiap *wells*, warna biru akan berubah menjadi kuning dengan segera. Menentukan kerapatan optik (nilai OD) dari masing-masing *wells* segera dengan menggunakan *a microplate reader set* pada panjang gelombang 450 nm dalam waktu 30 menit setelah menambahkan *stop solution*.



Gambar 14. Penentuan kadar MT menggunakan Fish MT-2 ELISA Kit

#### 4.5.3 Pengukuran kadar SOD pada cacing *Tubifex*

*Superoxide dismutase* (SOD) adalah salah satu enzim antioksidan yang paling penting, yang mengkatalisis dismutasi anion superoksida dan oksigen molekuler. Tingkat reduksi dengan anion superoksida secara linier terkait

dengan aktivitas xanthin oksidase (XO) dan dihambat oleh SOD. Oleh karena itu, aktivitas penghambatan SOD dapat ditentukan dengan metode kolorimetri.

#### Preparasi sampel

Prosedur preparasi sampel jaringan sebagai berikut: sampel jaringan direndam dengan larutan Phosphate Buffered Saline (PBS) atau 150 mM KCl, kemudian sampel dihomogenkan dalam *ice-cold* 0,1 M Tris atau HCl pada pH 7,4 yang mengandung 0,5% Triton X-100, 5 mM  $\beta$ -ME, 0,1 mg/ml PMSF. Jaringan homogenat disentrifuge pada 14.000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dikumpulkan dan dilusi ½ kali dengan buffer sampel dilusi. Buffer uji ditambahkan 920 $\mu$ L ke setiap kuvet.

#### Prosedur pengujian kadar SOD

*Sample solution* 20  $\mu$ l ditambahkan ke setiap sampel, dikosongkan 2 *well* dan tambahkan 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O ke setiap blank1 dan blank3. 200 ml *WST working solution* ditambahkan ke setiap *well*. 20 ml *dilution buffer* ditambahkan ke setiap *well* blank1 dan blank3. 20  $\mu$ l *enzym working solution* ditambahkan ke masing-masing sampel dan blank1 kemudian aduk rata. Catatan: karena superoksida akan segera terlepas setelah penambahan *enzym working solution* untuk setiap *well*, oleh karena itu diperlukan beberapa pipet untuk menghindari reaksi *time-lag* dari masing-masing *well*. *Plates* diinkubasikan pada suhu 37°C selama 20 menit. Hasil diperoleh dengan membaca absorbansi pada panjang gelombang 450 nm menggunakan *microplate reader* sehingga diperoleh data nilai Optical Density (OD) dari kadar Superoxid (Ungvari *et al.*, 2003). Tingkat aktivitas SOD dihitung mengikuti rumus:

Ratio of sample and blank rate :  $\text{Ratios/b} = \text{Rates} / \text{Rateb}$

SOD inhibition baseline (%) :  $\% \text{ Inhibition} - (1 - \text{Ratios/b}) * 100\%$

SOD activity :  $\text{SODs (U/mL)} = 1.25 * (\% \text{ Inhibition})$

#### 4.5.4 Pengukuran kadar CAT pada *Tubifex*

Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) adalah salah satu spesies oksigen reaktif yang paling sering terjadi. Hidrogen peroksida terbentuk di lingkungan atau sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik, proses pembentukan dismutasi superoksida atau sebagai produk dari aktivitas oksidase. Hidrogen peroksida yang berlebihan berbahaya bagi sebagian besar komponen sel.

Hidrogen peroksida dapat bertindak sebagai pembawa pesan kedua dalam jalur transduksi sinyal, aktivasi sel, kekebalan tubuh, proses peradangan, proliferasi sel dan apoptosis (Veal *et al.*, 2007).

Salah satu cara untuk menghilangkan peroksida adalah menggunakan enzim katalase, yang dikodekan oleh gen tunggal dan terdapat pada setiap spesies. Mamalia, termasuk manusia dan tikus, mengekspresikan katalase di semua jaringan, dan konsentrasi tinggi katalase dapat ditemukan di hati, ginjal dan eritrosit (Schisler dan Singh, 1991).

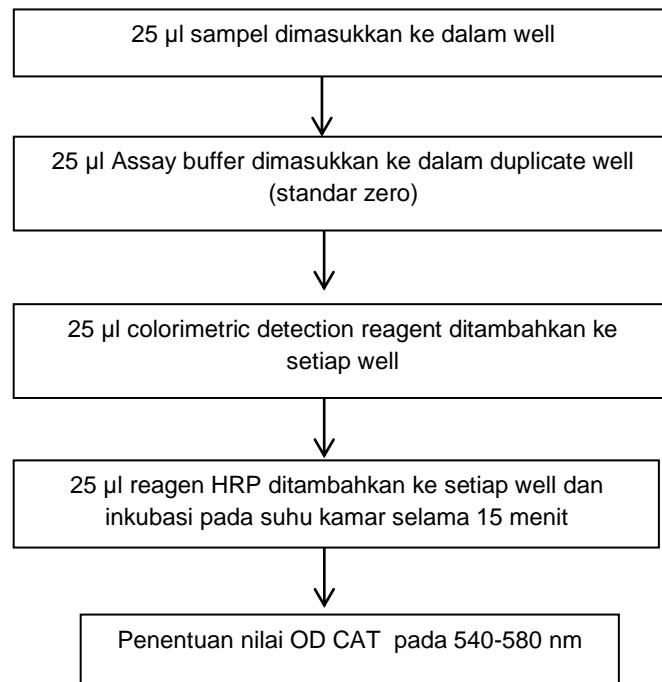
#### Preparasi sampel

Jaringan dicuci dengan *ice-cold* PBS sebelum diproses untuk menghilangkan sel darah merah atau gumpalan darah. Sampel dihomogenkan dalam 0,5-1 mL *Cold Assay Buffer* per 100 mg jaringan, kemudian dicentrifuge pada 10.000 x g selama 15 menit pada 4°C. Supernatan dikumpulkan dan segera diuji, atau simpan pada suhu  $\leq -70^\circ C$ . Supernatan diencerkan dalam *Assay Buffer* sebelum mengukur aktivitas katalase.

#### Prosedur pengujian aktivitas CAT

Sampel sebanyak 25  $\mu L$  dimasukkan ke dalam *duplicate well*, kemudian 25  $\mu L$  *Assay Buffer* dipipet dan dimasukkan ke dalam *duplicate well* sebagai standar Zero. 25  $\mu L$  *Hydrogen Peroxide Reagent* ditambahkan ke dalam setiap *well* dengan menggunakan *repeater pipet*, kemudian diinkubasi pada suhu

kamar selama 30 menit. 25  $\mu$ L *Colorimetric Detection Reagent* ditambahkan ke setiap *well* menggunakan *repeater pipet*. Reaksi diawali dengan menambahkan 25  $\mu$ L Reagen HRP ke setiap *well* menggunakan *repeater pipet*, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Nilai OD dibaca pada panjang gelombang 540-580 nm. Hasil dihitung dengan membaca rata-rata OD duplikat untuk setiap standar dan sampel. Sampel yang diperoleh harus dikalikan dengan faktor pengenceran untuk mendapatkan nilai sampel (Gambar 15).



Gambar 15. Penentuan aktivitas katalase (CAT)

#### 4.5.5 Pengukuran kadar GPx pada *Tubifex*

*Glutathione peroxidase* (GPx) berperan untuk melindungi organisme dari kerusakan oksidatif yaitu membantu mencegah terjadinya lipid peroksidasi membran seluler dengan menghilangkan peroksida bebas dalam sel. GPx mengkatalisis reaksi yang dibantu oleh glutathione reductase (GR).

**Preparasi sampel**

Sampel dibersihkan dari partikel apapun. Sampel jaringan sebanyak 10 mg dihomogenkan dalam 200 µL PBS kemudian disentrifuse pada 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan digunakan untuk pengujian. Apabila tidak segera digunakan, supernatan disimpan dalam freezer dengan suhu -80°C (selama 1 bulan).

**Prosedur pengujian aktivitas GPx**

*Working Reagent* sebanyak 90 µL dimasukkan ke masing-masing *well*. *Assay buffer* mengandung 5 µL Glutathione, 3 µL 35 mM NADPH dan 2 µL GR enzyme dibuat. 90 µL *Working Reagent* ditambahkan secepatnya ke dalam *sample well/control well* dan *plate* dikocok untuk mencampur. *Peroxide Solution* dimasukkan ke dalam empty 1,5 mL dan ditambahkan 1495 µL dH<sub>2</sub>O dan aduk rata dengan vortexing selama kurang dari 30 detik. Segera encerkan larutan dengan *diluted solution* 1:10 dalam dH<sub>2</sub>O untuk menghasilkan 1x *Substart solution*. 100 µL *substart solution* ke dalam semua *sample well* dan *control wells* ditambahkan dengan menggunakan *multi-channel pipettor*. *Plate* ditutup secepatnya agar tercampur dengan baik. Segera baca OD 340 nm (time zero, OD0) dan pada 4 menit (OD4). Cara menghitung: gunakan nilai OD pada 4 menit untuk standar NADPH. Penghitungan aktivitas GPx dari sampel menggunakan rumus berikut:

$$GPX \text{ Activity (U/L)} = \frac{\Delta OD_S - \Delta OD_B}{\text{Slope (mM}^{-1}) \times 4 \text{ (min)}} \times 1000 \times n$$

Keterangan:

- Faktor 1000 konversi mmoles menjadi µmoles.
- N adalah faktor dilution sampel
- Apabila aktivitas GPx lebih tinggi daripada 800 U/L atau awal OD340nm lebih besar daripada 1,5 dalam *sample wells*, encerkan sampel dalam dH<sub>2</sub>O dan ulangi pengujian. Kalikan hasilnya dengan faktor pengenceran. Satu unit adalah jumlah GPx yang



menghasilkan 1  $\mu$ mole GS-SG per menit pada pH 7,6 dan suhu kamar.

#### 4.5.6 Histologi *Tubifex* dengan pewarnaan Haemotoxylin-Eosin (HE)

##### Preparasi sampel

- Cacing *Tubifex* diawetkan dengan formalin 4% selama 24 jam.
- Sampel cacing dipindahkan ke dalam paraformaldehida (PFA) selama 24 jam (Tahap fiksasi).
- Tahap dehidrasi dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan alkohol 70%, 80% dan 90% masing-masing 1 jam.
- Tahap clearing dilakukan selama 1 jam dengan cara memasukkan sampel ke dalam larutan alkohol-xylol, setelah itu dimasukkan ke dalam xylol murni I, II dan III masing-masing selama 20 menit.
- Tahap infiltrasi dengan menggunakan parafin, sampel dimasukan ke dalam campuran xylol dan parafin cair dengan perbandingan 1:1 dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C selama 20 menit.
- Tahap embedding merupakan tahapan penanaman jaringan sampel yaitu parafin cair dituangkan ke dalam cetakan sampai penuh kemudian sampel dimasukkan atau dibenamkan ke dalam parafin tersebut. Jaringan sampel diletakkan pada dasar tengah dengan posisi melintang dan dibiarkan sampai parafin membeku atau mengeras.
- Tahap sectioning merupakan tahap pemotongan sampel jaringan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-6 mikron.
- Tahap affixing merupakan tahap perekatan menggunakan albumin dan gliserin dengan perbandingan 1:1, kemudian disimpan dalam kotak persediaan selama 24 jam.

- Tahap deparafinasi merupakan tahap untuk menghilangkan parafin dengan cara memasukkan sediaan ke dalam xylol selama 10 menit.

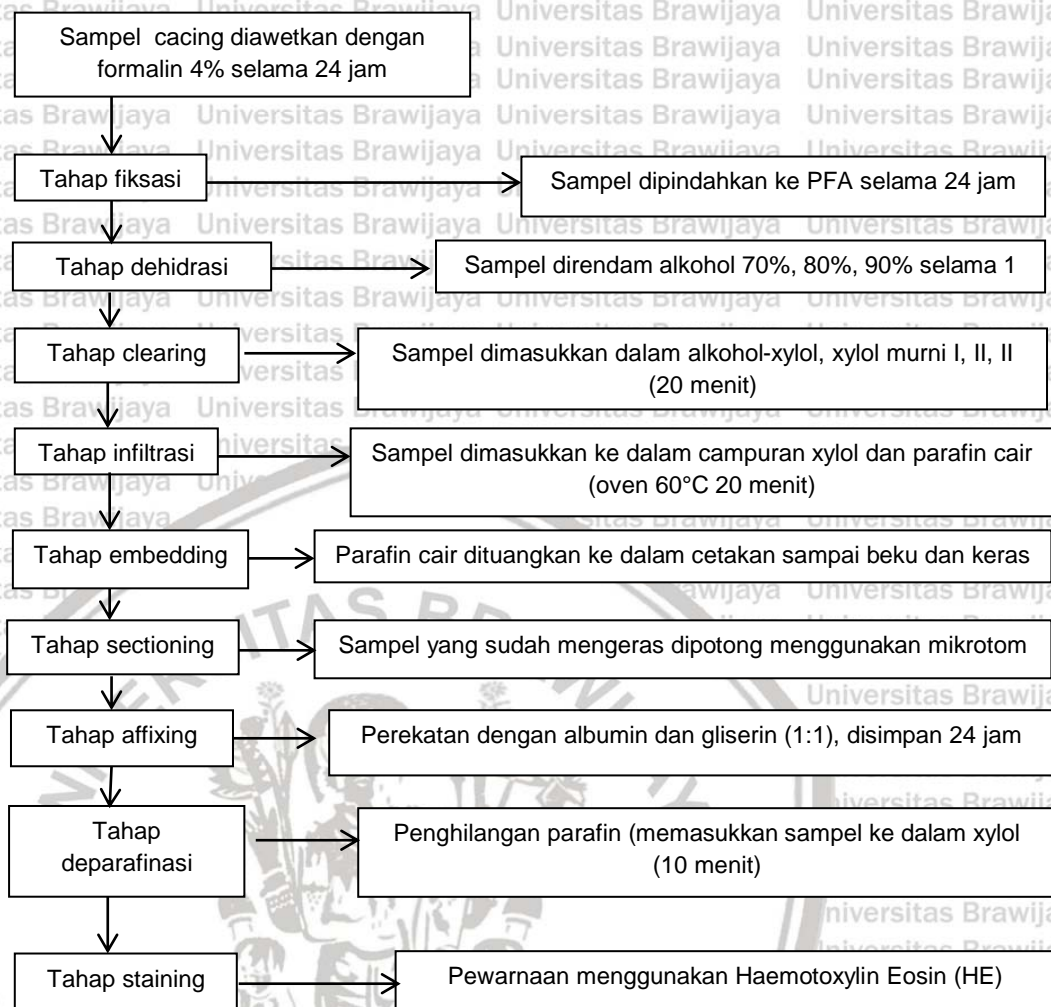
- Tahap staining atau tahap pewarnaan. Preparat yang telah jadi, diberi pewarnaan Haemotoxilin Eosin (HE). Sediaan histologis dihisap xylolnya dengan menggunakan kertas saring kemudian berturut-turut dimasukkan ke dalam larutan alkohol 99%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%, 40%, dan 30% masing-masing selama 5 menit lalu dicuci dengan aquades selama 5 menit, dicuci dengan air mengalir selama kurang lebih 2 menit.

- Preparat dimasukan ke dalam haemotoxylin selama 4 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir selama 10 menit, dimasukkan ke dalam aquades dan alkohol 50%, 60%, 70%, 90%, 95% masing-masing beberapa celupan.

- Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam eosin selama 1,5 menit dan dimasukan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 95%.

- Preparat dikeringanginkan, setelah kering dimasukan ke dalam xylol selama 15 menit. Preparat histologi ditetesi dengan Canada Balsem lalu ditutup dengan cover glass.

- Tahap mounting dan labelling merupakan tahap penutupan preparat dengan menggunakan kaca penutup (*cover glass*) dan memberi identitas pada preparat jaringan.



Gambar 16. Proses preparasi pewarnaan HE

### Pengamatan histologi

Irisan jaringan yang tipis diperiksa menggunakan mikroskop. Hasil yang diperoleh kemudian diamati, dianalisis dan diidentifikasi kerusakan pada jaringan cacing *Tubifex* yang dipapar merkuri pada konsentrasi yang berbeda.

Pengamatan preparat menggunakan aplikasi software master OlyVIA metode Dot Slide dengan Olympus SN 3K19322 sebagai pengganti mikroskop. Prosedur pengamatan dengan software Olyvia sebagai berikut: file foto dibuka langsung dengan software Olyvia, kemudian klik icon kaca pebesar dan klik ke foto pada bagian yang diinginkan. Perbesar foto sampau perbesaran 40 $\mu$ . Jika foto kurang

jas, dapat diatur pada kolom histogram yang berada di kanan foto. Scroll ke bawah dan sampai menemukan display enhancement, yang terdapat brightness, contrast dan gamma. Atur ketiga indikator tersebut hingga gambar benar-benar dapat diidentifikasi.

## 4.6 Metode Analisis

### 4.6.1 Penelitian tahap I

Hasil yang diperoleh pada penelitian tahap I dianalisis secara deskriptif.

Data yang dianalisis adalah kualitas air yang meliputi data fisik (suhu, warna, bau); data kimia (DO, pH, BOD, COD, merkuri) ; sedangkan warna dan tekstur sedimen serta kandungan merkuri diamati pula. Selain itu, diamati juga biologi cacing *Tubifex*. Korelasi antara konsentrasi merkuri di air, sedimen dan cacing *Tubifex* dianalisis dengan menggunakan SPSS versi 16.

### 4.6.2 Penelitian tahap II

Penentuan nilai LC50 dengan menggunakan analisis probit (Connell and Miller, 1995). Analisis probit umumnya digunakan pada toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif dari bahan kimia pada organisme hidup. Hal ini dilakukan dengan menguji respons organisme di bawah berbagai konsentrasi bahan kimia, kemudian membandingkan konsentrasinya hingga diperoleh hasilnya (Vincent, 2008). Pada analisis ini akan diperoleh tabel nilai probit, yaitu  $d$  (konsentrasi perlakuan),  $n$  (jumlah hewan uji),  $r$  (jumlah mortalitas), dan  $p$  (persentase mortalitas). Hubungan nilai logaritma dari konsentrasi bahan uji dengan nilai probit dari prosentase mortalitas hewan uji merupakan fungsi linier dari  $y=a+bx$  (Rand dan Petrocelli, 1985; Hendri et al., 2010). Nilai LC50 merupakan antilog konsentrasi. Analisis probit menggunakan SPSS versi 16.0 dan Minitab versi 14. Respon tingkah laku cacing dianalisis secara deskriptif.

#### 4.6.3 Penelitian tahap III

Hasil pengamatan pada penelitian tahap III yaitu tingkat akumulasi merkuri pada cacing *Tubifex*, tingkat kerusakan jaringan tubuh cacing *Tubifex*, kadar ROS, kadar CAT, kadar SOD, kadar GPx, kadar metallothionein (MT) dalam tubuh cacing *Tubifex* yang dipapar merkuri dianalisis secara deskriptif.



## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Deskripsi lingkungan perairan

#### 5.1.1 Konsentrasi Merkuri

Tabel 8 menunjukkan sampel St2 memiliki konsentrasi merkuri paling tinggi dibandingkan dengan lokasi yang lain, baik di air ( $0,0363 \pm 0,0050$  mg/L), sedimen ( $0,2683 \pm 0,0055$  mg/L) maupun di cacing *Tubifex* ( $0,2543 \pm 0,0065$  mg/L). Konsentrasi merkuri terendah pada sampel St4. Konsentrasi merkuri di sedimen dan di *Tubifex* lebih tinggi daripada merkuri di air.

Sampel St2 merupakan sampel yang diambil tepat di sumber pencemar. Sampel St1 diambil sebelum sumber pencemar yang memiliki konsentrasi merkuri cukup tinggi diikuti dengan sampel St3 dan St4 yang diambil pada lokasi setelah sumber pencemar. Hasil tersebut menjelaskan bahwa semakin dekat jarak lokasi dengan sumber pencemar maka semakin tinggi juga konsentrasinya.

Tabel 8. Konsentrasi merkuri (Hg) di air, sedimen dan cacing *Tubifex*

Sampel	Hg air (mg/L)	Hg sedimen (mg/L)	Hg <i>Tubifex</i> (mg/L)
St1	$0,0357 \pm 0,0050$	$0,2417 \pm 0,0031$	$0,1697 \pm 0,0074$
St2	$0,0363 \pm 0,0050$	$0,2683 \pm 0,0055$	$0,2543 \pm 0,0065$
St3	$0,0280 \pm 0,0020$	$0,1640 \pm 0,0001$	$0,0930 \pm 0,0056$
St4	$0,0277 \pm 0,0015$	$0,1413 \pm 0,0067$	$0,0917 \pm 0,0031$

Sumber: Data pada Tabel 8 diperoleh dari rata-rata  $\pm$  stdev pada masing-masing sampel (n=3)

Merujuk pada Peraturan Pemerintah (PP) Nomor 82 tahun 2001, konsentrasi merkuri maksimum yang direkomendasikan sebesar 0,001 mg/ hingga 0,002 mg/L.

Berdasarkan hal tersebut maka konsentrasi merkuri yang terkandung dalam air di lokasi penelitian telah melebihi batas maksimum yang direkomendasikan, hal ini menunjukkan bahwa perairan tersebut telah tercemar merkuri.

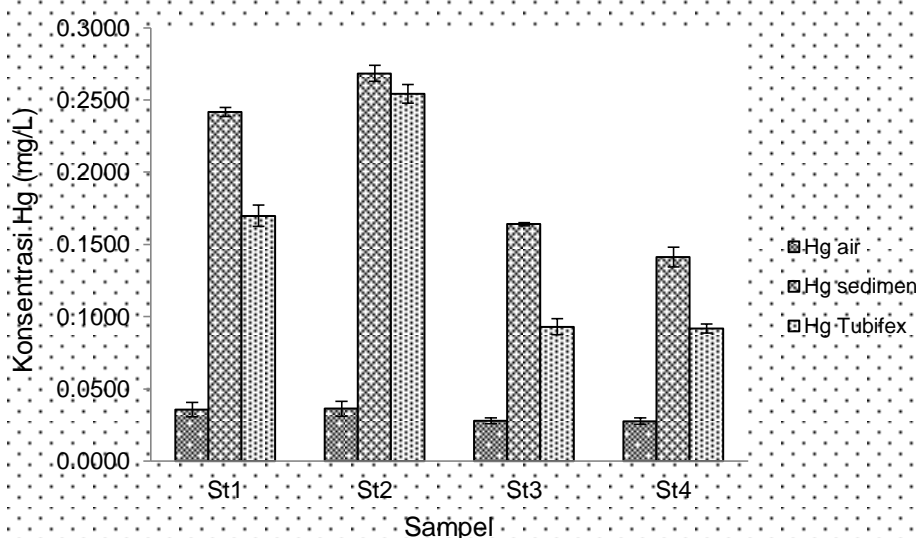
*International Association of Draging Companies /Central Dreging Association*

(IACD/CEDA) (1997) membagi baku mutu konsentrasi merkuri dalam sedimen menjadi 5 level yaitu level target (0,3 ppm); level limit (0,5 ppm); level tes (1,6 ppm); level intervensi (10 ppm) dan level bahaya (15 ppm), sedangkan hasil penelitian menunjukkan konsentrasi merkuri di lokasi penelitian berkisar antara  $0,1413 \pm 0,0067$  mg/L hingga  $0,2683 \pm 0,0055$  mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa merkuri di lokasi penelitian masih di bawah level target sehingga tidak terlalu berbahaya bagi lingkungan.

Gambar 17 menunjukkan bahwa konsentrasi merkuri di sedimen lebih tinggi daripada merkuri di air dan *Tubifex*. Merkuri yang masuk ke dalam perairan, selain terbawa aliran air dan terakumulasi dalam sedimen, juga terakumulasi di dalam tubuh organisme akuatik. Konsentrasi logam berat pada hewan akuatik berhubungan dengan beberapa parameter, antara lain kebiasaan makan dan tingkah laku organisme akuatik (Chen dan Folit, 2000), status tropik, sumber pencemaran logam, jarak hewan dengan sumber polutan dan keberadaan ion-ion lain dalam ekosistem (Giesy dan Wiener, 1997), suhu, transpor logam melalui membran dan laju metabolisme hewan, variasi musim dan akumulasi logam berat dalam jaringan (Chen dan Folit, 2000).

Merkuri dan senyawanya tidak memiliki peran dalam fungsi biologis tetapi jika terdapat di dalam organisme akuatik dapat menyebabkan efek sitokimia dan histopatologi. Senyawa merkuri organik dan merkuri inorganik memiliki efek pada sistem saraf pusat. Merkuri dalam bentuk merkuri klorida menyerang liver, saluran gastro internal dan ginjal (Vahter *et al.*, 2000; Ghosh, 2008). Merkuri bersifat tidak bisa terdegradasi secara biologi dan terakumulasi dalam ekosistem (Chen and Folt, 2000; Giesy and Wiener, 2000). Keberadaan merkuri dalam ekosistem akuatik

memberikan dampak negatif bagi kehidupan organisme akuatik dari tingkatan individu sampai pada struktur komunitas (Setijaningsih, 2010).



Gambar 17. Konsentrasi Hg (mg/L) dalam air, sedimen dan cacing *Tubifex* di perairan tempat pembuangan limbah pengolahan emas di Desa Kejapanan Kabupaten Pasuruan. Data diperoleh dari rata-rata pengambilan sampel  $\pm$  stdev (n=3). Semua data dibandingkan antar sampel dan standar deviasi sebagai *error bars*.

Merkuri merupakan salah satu logam berat yang memiliki toksisitas paling tinggi dibandingkan dengan logam berat yang lain. Toksisitas logam berat tergantung jenis, sifat kimia dan sifat fisik. Urutan toksisitas logam dari tertinggi sampai terendah sebagai berikut  $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Ag^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > As^{2+} > Cr^{2+} > Sn^{2+} > Zn^{2+}$  (Darmono, 1995).

Hasil pengukuran merkuri menunjukkan konsentrasi tertinggi terdapat pada sedimen. Jumlah logam berat yang terkandung di dalam sedimen menunjukkan tingkat pencemaran bagi badan air. Secara umum, kandungan logam berat di sedimen lebih tinggi daripada di air karena logam berat mempunyai sifat mudah mengikat dan mengendap di dasar perairan dan bersatu dengan sedimen (Harahap, 1991). Logam berat yang masuk ke dalam perairan akan mengalami pengendapan, pengenceran dan dispersi, kemudian diserap oleh organisme yang hidup di perairan tersebut (Chen *et*



al., 2012). Hutagalung (1991) menyatakan bahwa pengendapan logam terjadi karena berat jenis logam lebih tinggi dibandingkan dengan berat jenis air sehingga kandungan logam berat di sedimen menjadi lebih tinggi daripada di air.

Selain itu, logam berat mempunyai sifat yang mengikat bahan organik dan mengendap di dasar perairan, bersatu dengan sedimen sehingga kadar logam berat dalam sedimen jauh lebih tinggi dibandingkan di air (Hutagalung *et al.*, 1997). Menurut Rochyatun *et al.* (2006) bahwa kadar logam berat dalam sedimen lebih tinggi dibandingkan dengan logam berat dalam air karena terjadi akumulasi logam berat dalam sedimen yang disebabkan logam berat di air mengalami proses pengenceran dengan adanya pengaruh pola arus.

Ukuran partikel sedimen berperan penting terhadap daya akumulasi logam berat. Hal ini sesuai dengan pendapat Sahara (2009) yang menyatakan bahwa semakin kecil ukuran partikel, semakin besar kandungan logam beratnya. Hal ini disebabkan karena partikel sedimen yang halus memiliki luas permukaan yang lebih besar dengan kerapatan ion yang lebih stabil untuk mengikat logam berat. Amin (2002) menyatakan bahwa semakin kecil ukuran partikel sedimen akan semakin tinggi kandungan logam berat yang ada di dalamnya karena mempunyai daya akumulasi yang tinggi. Tipe sedimen dapat mempengaruhi kandungan logam berat dalam sedimen, dengan kategori kandungan logam berat dalam lumpur > lumpur berpasir > berpasir. Fraksi sedimen juga mempengaruhi kemampuan sedimen untuk menyerap merkuri. Konsentrasi logam berat meningkat seiring dengan semakin halusya sedimen (Koorzeniewski dan Neugabieuer, 1991; Widiastuti *et al.*, 2018).

Fraksi sedimen di lokasi pengambilan sampel adalah *silty loam* yang merupakan campuran pasir, debu dan liat dengan perbandingan 16% : 62% : 22%.

Tekstur sedimen *silty loam* dengan persentase debu lebih besar daripada persentase

pasir dan liat mempermudah merkuri untuk terakumulasi dalam sedimen karena ukuran partikel debu yang sangat halus. Tipe sedimen lempung berlumpur atau lempung berdebu akan meningkatkan akumulasi logam karena sedimen dengan fraksi lumpur/debu yang tinggi dapat mengikat logam lebih lama. Hal ini disebabkan adanya gaya tarik menarik elektrokimia antara partikel sedimen dengan partikel logam, pengikatan oleh partikel organik dan pengikatan oleh sekresi lendir organisme (Meregalli *et al.*, 2004).

Dinamika logam dalam air perlu diketahui untuk memantau tingkat pencemaran logam dalam lingkungan perairan. Kandungan logam dalam air dapat berubah dan sangat tergantung pada keadaan lingkungan dan iklim. Namun, kandungan dalam organisme umumnya akan selalu bertambah dari waktu ke waktu dalam proses bioakumulasi (Dewi *et al.*, 2014).

### 5.1.2 Korelasi merkuri di air, sedimen dan cacing *Tubifex*

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa konsentrasi merkuri di air, sedimen dan cacing *Tubifex* berkorelasi positif. Konsentrasi merkuri di air mempengaruhi konsentrasi merkuri di sedimen dan *Tubifex*. Korelasi konsentrasi merkuri di air dan sedimen ditunjukkan dengan persamaan  $Y=1,357+1,374 X$  dengan  $R^2=0,647$  (Lampiran 2). Koefisien korelasi (R) sebesar 0,804, menunjukkan 80,4% konsentrasi merkuri di sedimen dipengaruhi konsentrasi merkuri di air. Begitu pula dengan merkuri di air berkorelasi positif dengan konsentrasi merkuri di cacing *Tubifex* dengan persamaan  $Y=2,44+2,197X$  dan nilai  $R^2 = 0,629$  (Lampiran 3). Konsentrasi merkuri di cacing *Tubifex* dipengaruhi oleh merkuri di air sebesar 79,3%.

Merkuri di sedimen berkorelasi positif dengan konsentrasi di cacing *Tubifex*, dengan persamaan  $Y=0,236+1,561X$  dan nilai  $R^2 = 0,915$  (Lampiran 4). Koefisien korelasi sebesar 0,956. yang menunjukkan 95,6% konsentrasi merkuri di sedimen

mempengaruhi konsentrasi merkuri di *Tubifex*. Korelasi tersebut menunjukkan bahwa jika konsentrasi merkuri di air dan sedimen meningkat maka konsentrasi merkuri di cacing *Tubifex* juga meningkat.

### 5.1.3 Fisika Kimia air di perairan yang tercemar merkuri

Kondisi kualitas air di lokasi penelitian masih dalam batas normal kecuali BOD yang melebihi standar nilai yang direkomendasikan dalam PP 82 (2001). Derajat keasaman (pH) pada lokasi pengambilan sampel St2 menunjukkan memiliki pH terendah, namun Semua lokasi pengambilan sampel memiliki kondisi kualitas air yang cenderung seragam (Tabel 9).

Tabel 9. Fisika-kimia air pada perairan tempat pembuangan limbah pengolahan emas di Desa Kejapanan Kabupaten Pasuruan

Sampel	pH	Suhu (°C)	DO (mg/L)	BOD (mg/L)	COD (mg/L)
St1	7,03±0,15	29,03±0,10	7,22±0,19	44,67±2,52	66,33±1,53
St2	6,92±0,20	29,37±0,50	7,11±0,17	54,67±2,08	73,67±1,53
St3	7,52±0,09	28,73±0,15	7,27±0,15	36,00±1,00	53,33±1,53
St4	7,59±0,58	26,07±0,38	7,40±0,17	33,67±1,53	53,00±2,00
Standar nilai	5 - 9		0 - 6	2 - 12	10 - 100

Sumber: Data diolah dari rata-rata pengambilan sampel (n=3) ± stdev.

Hasil pengukuran kualitas air menunjukkan bahwa suhu masih dalam kisaran normal. Suhu berpengaruh pada kelarutan oksigen dalam air, ketika suhu meningkat, oksigen yang larut dalam air sedikit (EPA, 2001; Clean Water Team, 2004). Toksisitas logam dalam perairan sangat tergantung pada spesies dan kondisi lingkungan termasuk kualitas air (misal pH) yang sangat mempengaruhi bentuk kimia logam (EPA, 2017). Derajat keasaman (pH) netral, masih dalam kisaran optimal untuk air tawar (6.5 - 8) (Mccaffrey, 1995). Keasaman (pH) ditentukan oleh jumlah ion positif dan negatif dalam medium (Kirby dan Cravotta, 2005). Peningkatan pH menyebabkan peningkatan toksisitas karena menurunnya kompetisi antara ion Hg dengan ion-ion hidrogen (Agarwala *et al.*, 2006). Oksigen terlarut (DO) dan COD masih sesuai dengan

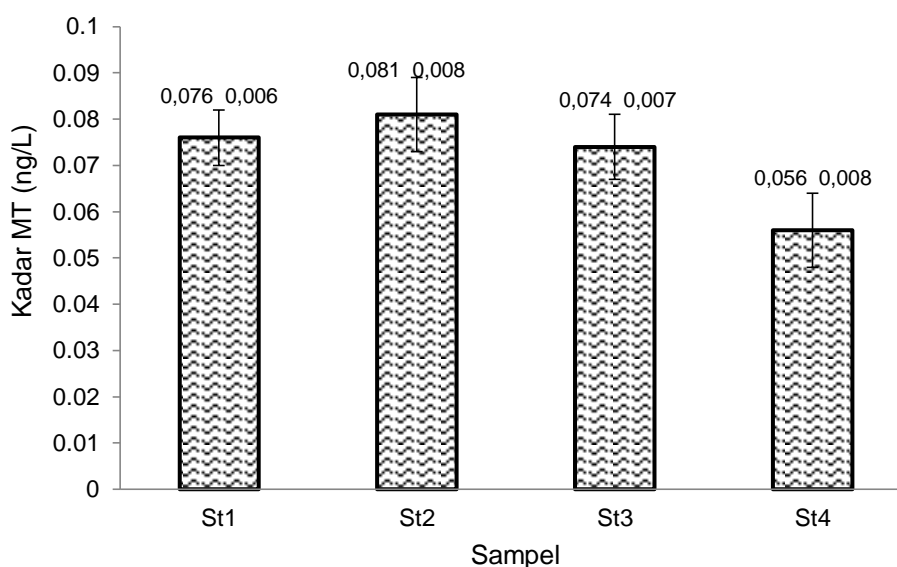
standar nilai, sedangkan BOD telah melebihi batas kisaran standar nilai maksimal yang direkomendasikan (Peraturan Pemerintah RI nomor 81 Tahun 2001). Jumlah oksigen terlarut (DO) menunjukkan kesehatan ekosistem, apabila oksigen tinggi maka tingkat pencemaran rendah dan sebaliknya (McCaffrey, 1995).

Pencemaran cenderung menurunkan konsentrasi DO karena proses dekomposisi zat organik berlangsung secara terus menerus dan memerlukan oksigen (Ann, 2002). Peningkatan kebutuhan oksigen menyebabkan tingkat BOD dan COD meningkat, namun nilai BOD selalu lebih rendah dari nilai COD. Nilai COD merupakan ukuran bagi pencemaran air oleh zat organik yang secara alamiah dapat dioksidasi melalui proses biologis dan dapat menyebabkan berkurangnya oksigen terlarut dalam air (EPA, 2017). Jumlah oksigen terlarut yang dibutuhkan bervariasi pada setiap spesies. Bottom feeder, kepiting, tiram dan cacing membutuhkan jumlah oksigen minimal (1-6 mg/L), sedangkan ikan air dangkal membutuhkan tingkat yang lebih tinggi (4-15mg/L) (Osmond *et al.*, 1997).

Parameter-parameter lingkungan seperti pH, salinitas, suhu dan karbon organik terlarut mempengaruhi penyerapan Hg (Pan dan Wang, 2011; Boening, 1999). Invertebrata berpotensi terpapar Hg(II) dan MeHg dari fase terlarut maupun sedimen, meskipun pengaruh dari absorpsi makanan lebih dominan (Gagnon dan Fisher, 1997). Perbedaan kadar MeHg pada invertebrata menunjukkan perbedaan pilihan makanan dan proses biodinamika (*uptake and loss*) antara merkuri anorganik dan MeHg. Invertebrata memiliki proporsi MeHg lebih rendah dibandingkan dengan ikan. Beberapa spesies ikan mengandung 91-95% Hg dalam tubuhnya, sedangkan pada invertebrata hanya 24-36% dari total Hg yang merupakan MeHg (Luoma dan Rainbow, 2008).

#### 5.1.4 Metallothionein pada *Tubifex* yang terpapar logam

Metallothionein ditemukan pada cacing *Tubifex* (Mosleh et al., 2007; Gillis et al., 2004) dengan kadar MT-Hg berkisar antara  $0,056 \pm 0,008$  ng/L -  $0,081 \pm 0,008$  ng/L. Kadar MT-Hg pada sampel St2 paling tinggi dibandingkan dengan sampel yang lain (Gambar 18). Penetapan kadar metallothionein (MT) dilakukan pada seluruh bagian tubuh (*whole body*) cacing *Tubifex*. Kadar MT-Hg dipengaruhi oleh konsentrasi merkuri yang terserap ke dalam tubuh cacing *Tubifex* ketika konsentrasi merkuri pada cacing tinggi maka kadar MT-Hg tinggi.



Gambar 18. Kadar MT (ng/L) pada cacing *Tubifex* yang terpapar logam di perairan tempat pembuangan limbah pengolahan emas di Desa Kejapanan Kabupaten Pasuruan. Data diperoleh dari rata-rata pengambilan sampel  $\pm$  standar deviasi dari masing-masing sampel (n=3)

Kadar MT-Hg meningkat ketika konsentrasi merkuri meningkat. Kadar MT-Hg dalam organisme dipengaruhi oleh konsentrasi cemaran logam (Amiard et al., 2006; Roesijadi, 2013), spesies dan organ yang terpapar (Dallinger dan Hunziker, 2000). Hertika et al. (2019) menemukan adanya hubungan positif antara logam berat dan ekspresi MT North East coast oysters.

Peningkatan kadar MT pada organisme termasuk beberapa spesies Anelida dapat dipergunakan sebagai biomarker spesifik dari paparan logam (Ruttkey-Nedecky *et al.*, 2013), namun pada organisme tertentu akan mengurangi sensitivitas organisme terhadap logam berat (menjadi kurang sensitif atau resisten) (Amiard *et al.*, 2006; Roesijadi, 2013). Penggunaan MT sebagai biomarker dapat digunakan untuk mengekspresikan "status kesehatan" lingkungan perairan (Amiard *et al.*, 2006) dan penilaian jumlah makroinvertebrata air termasuk *Tubifex* pada saluran air dapat memberikan indikasi kualitas air (Mccaffrey, 1995).

## 5.2 Uji toksisitas merkuri pada cacing *Tubifex*

### 5.2.1 Respon tingkah laku cacing *Tubifex* yang dipapar $HgCl_2$

Cacing *Tubifex* yang dipapar  $HgCl_2$  dengan dosis yang berbeda-beda menunjukkan respon tingkah laku yang bervariasi (Tabel 10). Pada paparan dosis 100%, *Tubifex* banyak mengalami kematian dalam waktu yang lebih singkat dibanding dengan paparan dosis lebih rendah.

Tabel 10. Respon tingkah laku *Tubifex* setelah tujuh hari paparan merkuri subkronis

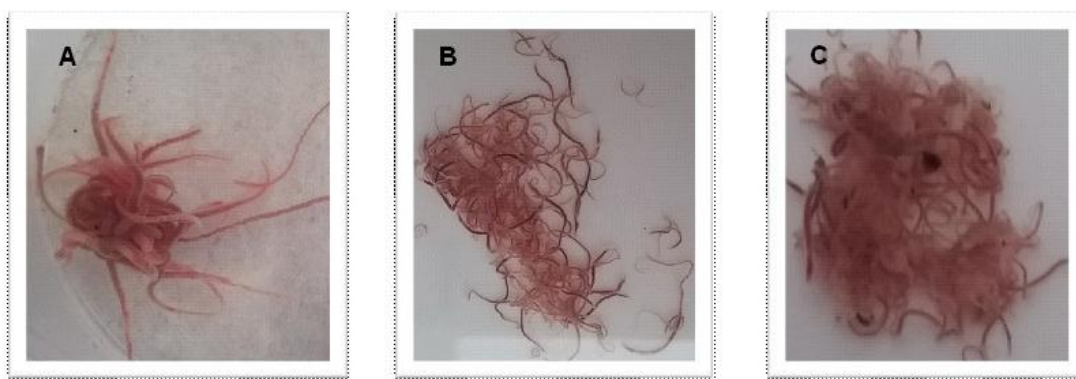
Dosis $HgCl_2$	Respon tingkah laku
100%	Cacing <i>Tubifex</i> bergerak lebih aktif setelah beberapa menit paparan dan mengeluarkan lendir lebih banyak daripada saat kondisi normal sampai menutupi keseluruhan tubuhnya dan beberapa saat kemudian cacing mengalami kematian.
50%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beberapa menit setelah dipapar, cacing mulai bergerak lebih aktif dan mengeluarkan lendir lebih banyak daripada kondisi normal, serta tubuhnya melingkar dengan diselimuti lendir.</li> <li>• Cacing mengalami fragmentasi tubuh menjadi dua bagian pada hari ke-2.</li> <li>• Pada hari ke-1 dan ke-2, sebagian besar cacing mati.</li> <li>• Pada pengamatan hari ke-3, jumlah cacing yang mati berkurang, namun setiap hari terjadi kematian sampai mencapai 84% pada hari terakhir pengamatan.</li> </ul>

- 37.5%
  - Gerakan cacing lebih aktif, mengeluarkan lendir lebih banyak, terpisah dari koloni, mensekresi lendir dan terjadi fragmentasi tubuh.
  - Sebagian besar cacing mati pada hari ke-1 dan ke-2.
  - Pada hari ke-3 terjadi proses fragmentasi tubuh.
  - Setiap hari terjadi kematian sampai akhir pengamatan, tingkat mortalitas mencapai 60%.
- 25%
  - Apabila dibandingkan dengan dosis 37.5% dan 50%, gerakan cacing kurang aktif, mengeluarkan lendir lebih banyak dari kondisi normal dan terpisah dari koloninya.
  - Kematian cacing terbanyak pada beberapa menit setelah paparan.
  - Gerakan cacing kembali normal setelah hari ke-2.
  - Setiap hari terjadi kematian cacing dan pada akhir pengamatan tingkat mortalitas lebih dari 50%.
- 12.5%
  - Respon cacing agak lambat, masih membentuk koloni, mensekresi sedikit lendir.
  - Kematian cacing terjadi pada beberapa saat setelah dipapar dan mulai beradaptasi setelah hari ke-2. Tingkat kematian kurang dari 50%.
- 0%
  - Tidak terjadi respon yang berarti, namun terjadi kematian dengan tingkat mortalitas 16.7%.

Keterangan: Dosis  $\text{HgCl}_2$  yang digunakan dalam paparan subkronis berdasarkan nilai  $\text{LC}_{50}$  48 jam yang diperoleh dari uji toksisitas akut ( $83,16 \mu\text{g/L}$ ).

*Tubifex* yang terpapar menunjukkan gerakan yang lebih aktif dan cenderung tidak beraturan. Respon yang sering teramati adalah perubahan aktivitas gerakan, kecenderungan menggumpal dan sekresi lendir. Pada cacing yang tidak dipapar merkuri ditemukan berkelompok satu sama lain dalam bentuk koloni. *Tubifex* menjadi lebih aktif dan frekuensi gerakan yang meningkat dalam dosis paparan yang lebih tinggi dan waktu paparan lebih lama. Gerakan meningkat secara kontinyu dan penggumpalan cenderung berkurang sehingga terlihat cacing terpisah sebagai individu tanpa koloni). Cacing tersebut terlihat mensekresikan lendir pada konsentrasi paparan yang lebih tinggi dan durasi paparan yang lebih lama untuk semua konsentrasi merkuri. Respon tingkah laku dan intensitas perubahan berbeda pada konsentrasi dan durasi paparan yang berbeda. Ada perbedaan tingkah laku dan waktu munculnya

respon, namun tidak ada pola yang jelas dalam respon tingkah laku untuk membedakan setiap konsentrasi (Gambar 19).



Gambar 19. Respon cacing *Tubifex* pada saat dipapar merkuri. (A) Koloni cacing *Tubifex* sebelum dipapar merkuri. (B) Individu *Tubifex* saling terpisah dari koloninya pada saat paparan. (C) *Tubifex* mengeluarkan lendir lebih banyak daripada kondisi normal pada saat dan setelah paparan. Gambar diambil menggunakan kamera dengan perbesaran 100x.

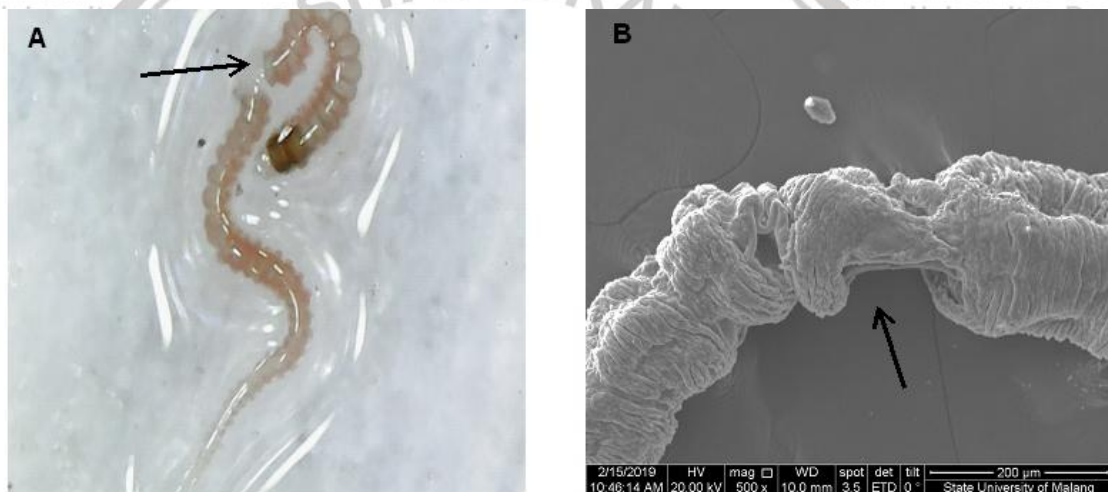
Cacing *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  konsentrasi tinggi pada paparan akut menunjukkan respon terhadap peningkatan aktivitas gerakan dan pengeluaran lendir sampai pada akhirnya mati pada durasi paparan sebelum 12 jam. Pada konsentrasi di bawah  $1000 \mu\text{g/L}$  menghasilkan respon yang sama, namun kecenderungan cacing mati setelah paparan 48 jam.

Pada paparan subkronis terlihat cacing yang dipapar dengan konsentrasi lebih tinggi menunjukkan respon gerakan yang lebih aktif dan cenderung persentase kematian lebih kecil daripada paparan akut. Hal ini berkaitan dengan besarnya konsentrasi dan lama waktu paparan. Pada paparan subkronis, konsentrasi yang digunakan lebih kecil daripada paparan akut dan durasi paparan yang lebih lama. Pada saat paparan subkronis, kematian cacing sebagian besar terjadi pada awal paparan, namun setelah dipapar secara terus menerus sampai akhir pengamatan (7 hari), cacing masih dapat bertahan hidup. Hal ini berkaitan dengan adaptasi cacing terhadap



logam berat. Hewan yang terpapar dengan merkuri telah menunjukkan perubahan neurologis dan perilaku yang merugikan (Ashe *et al.*, 1953).

Respon lain yang teramati pada cacing yang masih hidup adalah terjadinya proses fragmentasi tubuh cacing menjadi dua bagian yang biasa dikenal dengan autotomi (Gambar 20). Masing-masing bagian akan melakukan regenerasi sehingga menjadi bentuk cacing yang normal, namun pada penelitian ini sebagian besar cacing yang mengalami fragmentasi akan kematian. Tingkat perubahan atau kerusakan fisik bervariasi pada konsentrasi yang berbeda. Sebagian fragmentasi terjadi pada bagian belakang tubuh (posterior) untuk semua konsentrasi.



Gambar 20. Bagian tubuh cacing *Tubifex* yang mengalami fragmentasi setelah tujuh hari paparan  $HgCl_2$  subkronis. (A) Fragmentasi pada tubuh *Tubifex* (Gambar diambil dengan menggunakan mikroskop digital dengan perbesaran 40x) (B) Fragmentasi tubuh *Tubifex* (hasil pengamatan menggunakan *Scanning Electronic Microscopy /SEM* dengan perbesaran 500x).

Hasil studi tentang regenerasi penutupan luka akibat autotomi bagian longitudinal pada cacing hidup. Permukaan potongan ditutupi oleh satu lapisan sel epidermis dalam waktu 15 jam setelah terpotong. Bagian epidermis mendorong permukaan luka dengan migrasi sel-sel individual yang mirip dengan sel-sel epidermis

di bagian tubuh yang lain dan tidak terjadi mitosis di sekitar wilayah tersebut. Tidak ada lagi perubahan epidermis sampai 3 atau 4 hari, setelah itu dimulai saat pembesaran sel-sel dan proliferasi mulai aktif untuk melakukan regenerasi. Pembelahan sel paling aktif terjadi pada bagian dorso-anterior di mana terdapat prostomium dan ganglia otak baru. Sel-sel lapisan epidermis aktif dalam mitosis dan ada yang masuk ke dalam rongga tubuh. Epidermis baru pada regenerasi anterior muncul sepenuhnya oleh proliferasi dalam lapisan epidermal (Stone, 1933).

Regenerasi diamati setiap hari selama tujuh hari, di mana tidak ada cacing yang mati. Pada hari pertama, luka yang disebabkan oleh autotomi karena *sectioning* dengan scalpel (kontrol) telah tertutup. Autotomi diikuti oleh konstruksi otot melingkar pada tingkat septum dan selanjutnya ditutupi oleh epidermis. Setelah regenerasi hari pertama, terlihat migrasi sel. Sel-sel ini dicirikan dengan memiliki sitoplasma yang bersifat basofilik dan memiliki nuklei besar dengan nukleolus yang besar dan sangat padat (sel neoblast). Sel neoblast ini berasal dari segmen bagian anterior yang terjauh. Migrasi neoblast dideteksi di metamere kelima anterior sampai ke luka. Neoblast ini bermigrasi sepanjang tali saraf sampai mencapai lokasi amputasi untuk membentuk blastema. Neoblast yang bermigrasi ditandai dengan perubahan bentuk seperti berbentuk spindle, sedangkan neoblast teramobilisasi, melekat pada septa (pembatas antar rongga), berbentuk bulat. Pada 24 jam, migrasi neoblast tersusun dalam barisan beberapa sel di luar ujung tali saraf dan mulai membelah menjadi sel-sel yang lebih kecil.

Pada hari kedua, blastema (massa sel yang mampu tumbuh dan beregenerasi menjadi organ atau bagian tubuh), terus berkembang dengan pembagian akumulasi neoblast, sehingga menimbulkan regenerasi tunas. Sel-sel tambahan tidak

terdiferensiasi dan masih terakumulasi pada segmen bagian anterior. Pada bagian posterior akhir, usus berada di dekat epidermis, yang menjadi lebih tipis.

Pada hari ketiga dan keempat, sel regeneratif menjadi terorganisir sebagai jaringan di kedua sisi usus dan terjadi pembelahan mitosis pada jaringan ini, sedangkan sel neoblast bulat masih ada tetapi tidak membelah. Pada saat ini tidak terbentuk metamere baru. Sel epidermal bergabung dengan ujung posterior tali saraf, sesuai dengan tahap awal sebelum diferensiasi menjadi sel-sel saraf. Hari kelima regenerasi ditandai dengan pembentukan anus, sedangkan tunas regenerasi masih berkembang. Jumlah neoblast yang bergerak ke arah posterior ujung mengalami penurunan. Pada hari keenam, tanda-tanda pertama regenerasi metamerisme muncul. Delapan pembuluh darah melintang terbentuk dalam regenerasi. Regenerasi sel masih berkembang baik.

Pada hari ketujuh, diferensiasi sel ektodermal telah dimulai, kemudian menempel ke kabel saraf. Selain itu, terjadi pula pertumbuhan yang diduga coelom dari regenerasi dan pembentukan septa individu. Pengamatan hari ketujuh menunjukkan hanya satu segmen yang berkembang karena akumulasi neoblast dan pada saat ini, anus berfungsi. Sel basofilik yang besar terbagi menjadi pembuluh darah transversal yang lebih kecil. Regenerasi sel yang berproliferasi tumbuh sampai kelima coelom dan septa individu terbentuk. Selanjutnya nefridia, jaringan kloragogen dan otot usus terbentuk pada segmen baru (Bouché *et al.*, 2003).

### 5.2.2 Uji toksisitas akut

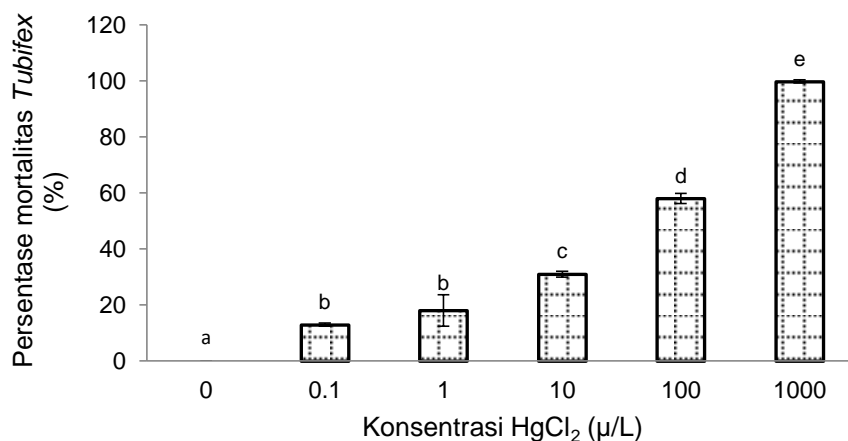
Uji toksisitas akut merkuri pada cacing *Tubifex* dilakukan dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif. Tahap uji pendahuluan dilakukan selama 48 jam untuk mencari konsentrasi ambang letal atas dan ambang letal bawah. Tahap pengujian

selanjutnya adalah uji definitif untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> selama 48 jam dengan pengamatan setiap 24 jam.

Determinasi LC<sub>50</sub> HgCl<sub>2</sub> pada cacing *Tubifex* dengan paparan selama 48 jam diperoleh berdasarkan nilai ambang letal bawah dan ambang letal atas. Konsentrasi ambang letal atas adalah konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% dari hewan uji, sedangkan konsentrasi ambang letal bawah adalah konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian sama sekali pada hewan uji (USEPA, 2002).

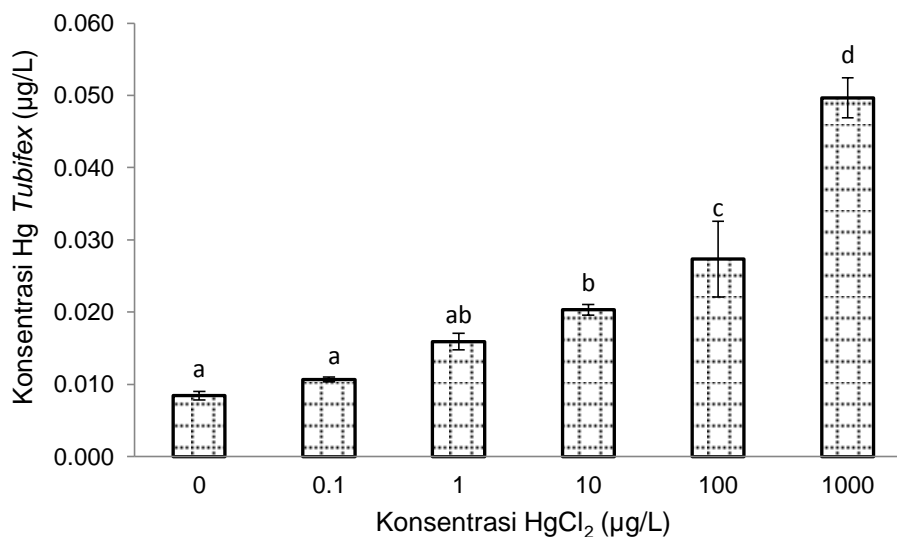
### Uji pendahuluan

Hasil yang diperoleh dari uji pendahuluan adalah pada cacing *Tubifex* tanpa paparan tidak terjadi kematian. Pada konsentrasi HgCl<sub>2</sub> tertinggi (1000 µg/L), kematian hewan uji mencapai 100%, sedangkan pada paparan HgCl<sub>2</sub> dengan konsentrasi yang berbeda menyebabkan jumlah mortalitas hewan uji yang bervariasi. Gambar 21 menunjukkan mortalitas cacing *Tubifex* meningkat seiring dengan semakin tingginya konsentrasi HgCl<sub>2</sub>.



Gambar 21. Persentase mortalitas *Tubifex* (%) pada paparan akut dengan konsentrasi HgCl<sub>2</sub> 0 µg/L; 0,1 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L; 1000 µg/L yang dibandingkan dengan kontrol.

Gambar 22 menunjukkan konsentrasi merkuri dalam cacing *Tubifex* setelah dipapar selama 48 jam. Konsentrasi merkuri dalam *Tubifex* tertinggi yaitu setelah paparan merkuri dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/L}$ . Pada paparan akut, mortalitas *Tubifex* dan konsentrasi merkuri menunjukkan peningkatan seiring dengan tingginya konsentrasi merkuri.



Gambar 22. Konsentrasi Hg ( $\mu\text{g/L}$ ) pada *Tubifex* setelah 48 jam paparan akut dengan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  0  $\mu\text{g/L}$ ; 0,1  $\mu\text{g/L}$ ; 1  $\mu\text{g/L}$ ; 10  $\mu\text{g/L}$ ; 100  $\mu\text{g/L}$ ; 1000  $\mu\text{g/L}$  yang dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

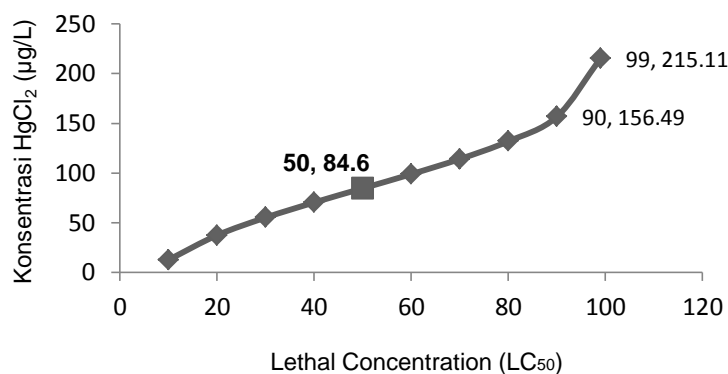
### Uji definitif

Rata-rata mortalitas cacing *Tubifex* pada uji definitif tertinggi pada pengamatan 48 jam sebesar 60% yaitu pada konsentrasi 99,98  $\mu\text{g/L}$ , sedangkan tanpa paparan tidak terjadi kematian. Pada uji toksisitas akut definitif, hewan uji tidak mengalami kematian. Hal ini sesuai dengan USEPA (2002), 20% merupakan batas kematian maksimum yang memungkinkan dalam uji toksisitas akut.

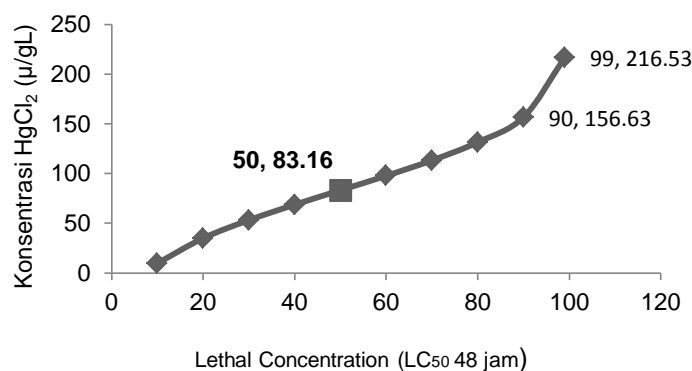
Tabel 11. Persentase mortalitas *Tubifex* pada konsentrasi  $HgCl_2$  uji definitif akut

Konsentrasi ( $\mu g/L$ )	Persentase mortalitas paparan 24 jam (%)	Persentase mortalitas paparan 48 jam (%)
0	0	0
15,85	7	9
25,12	14	15
38,81	27	27
63,09	35	36
99,98	59	60

Tabel 11 menunjukkan bahwa pada paparan selama 24 jam, konsentrasi merkuri 99,98  $\mu g/L$  menyebabkan mortalitas 59% dan paparan selama 48 jam menyebabkan mortalitas 60%. Berdasarkan hasil analisis probit diperoleh nilai  $LC_{50}$  24 jam sebesar  $84,60 \pm 3,77 \mu g/L$  dan nilai  $LC_{50}$  48 jam sebesar  $83,16 \pm 3,89 \mu g/L$  (Gambar 23 dan 24).



Gambar 23.  $LC_{50}$  24 jam paparan  $HgCl_2$  uji toksisitas definitif akut pada *Tubifex*



Gambar 24.  $LC_{50}$  48 jam paparan  $HgCl_2$  uji toksisitas definitif akut pada *Tubifex*

Gambar 24 menunjukkan peningkatan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  berbanding lurus dengan persentase mortalitas cacing *Tubifex*. Semakin tinggi konsentrasi  $\text{HgCl}_2$ , maka jumlah cacing *Tubifex* yang mati semakin banyak. Persentase kematian meningkat secara bertahap dengan meningkatnya konsentrasi logam berat merkuri klorida (Banavathu *et al.*, 2016).

Jika konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  lebih kecil dari 1000  $\mu\text{g/L}$  maka zat kimia tersebut sangat toksik, sedangkan apabila konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  antara 1000–10.000  $\mu\text{g/L}$  termasuk kategori sedang (Louis *et al.*, 1996). Berdasarkan pernyataan tersebut maka merkuri termasuk logam yang sangat toksik karena  $\text{LC}_{50}$  48 jam tercapai pada paparan  $\text{HgCl}_2$  dengan konsentrasi sebesar  $83,16 \pm 3,89 \mu\text{g/L}$ .

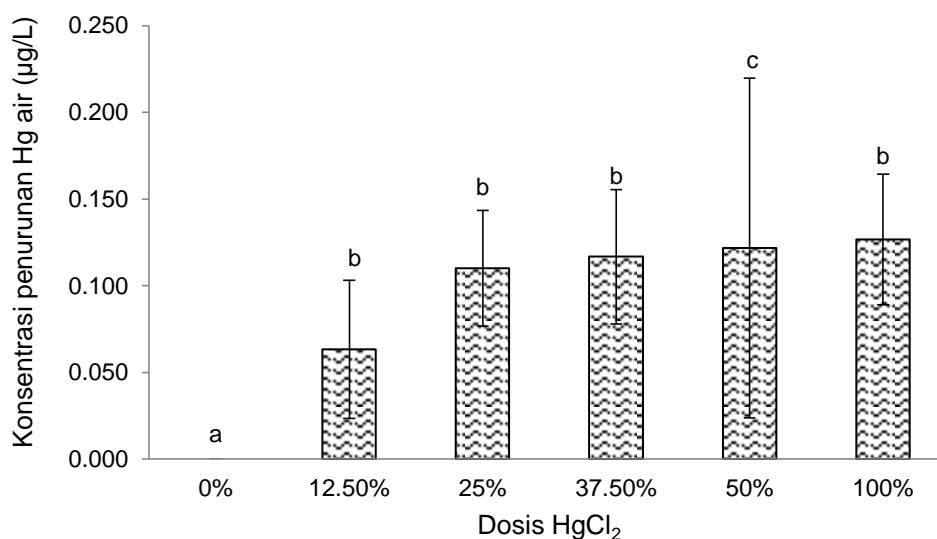
Logam berat seperti merkuri (Hg), kadmium (Cd) dan tembaga (Pb) bersifat toksik untuk hewan akuatik pada konsentrasi yang sangat rendah dan logam tersebut tidak berguna bagi kehidupan hewan akuatik (Gooley *et al.*, 2000). Merkuri termasuk salah satu logam berat yang tingkat toksisitasnya paling tinggi dibandingkan dengan logam yang lain dan dikenal sebagai salah satu polutan air yang paling berbahaya karena bersifat bioakumulatif dan *non-biodegradable* (Clarkson, 1990).

### 5.2.3 Uji toksisitas subkronis merkuri pada cacing *Tubifex*

#### Uji pendahuluan

Pengujian toksisitas subkronis dilakukan dua tahap yaitu uji pendahuluan dan uji definitif. Tahap uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui penurunan konsentrasi media uji setiap hari, sedangkan tahap uji definitif dilakukan untuk mengetahui persentase mortalitas dan konsentrasi merkuri di dalam tubuh hewan uji. Uji subkronis dilakukan selama tujuh hari, hal ini didasarkan pada 10% dari harapan hidup dari cacing *Tubifex* (70 hari). Hal ini sesuai dengan USEPA (2002), bahwa uji toksisitas subkronis pada hewan uji dilakukan selama 10% dari siklus hidupnya.

Pada uji pendahuluan diperoleh hasil bahwa setiap hari konsentrasi merkuri mengalami penurunan yang bervariasi pada setiap konsentrasi. Gambar 25 menunjukkan penurunan tertinggi pada paparan konsentrasi larutan  $\text{HgCl}_2$  100% ( $0,127 \pm 0,038 \mu\text{g/L}$ ) dan terendah pada konsentrasi 12,5% sebesar  $0,063 \pm 0,040 \mu\text{g/L}$ . Penurunan konsentrasi merkuri pada setiap perlakuan rata-rata lebih tinggi dari penurunan konsentrasi harian pada dosis 12,5%.



Gambar 25. Penurunan konsentrasi merkuri harian pada paparan subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  48 jam ( $83,16 \mu\text{g/L}$ ). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

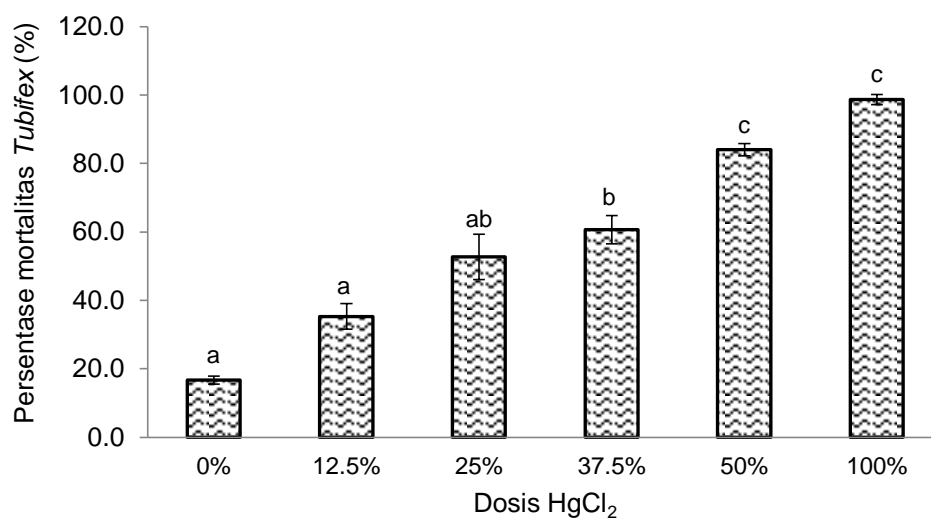
Penurunan konsentrasi merkuri harian untuk masing-masing perlakuan seragam, namun apabila dilihat dari nilainya maka penurunan konsentrasi semakin tinggi dengan meningkatnya konsentrasi paparan. Penurunan konsentrasi harian pada paparan subkronis digunakan untuk mengetahui jumlah larutan  $\text{HgCl}_2$  yang harus ditambahkan pada media uji definitif agar konsentrasinya konstan.



### Uji definitif

Pengujian dilanjutkan dengan uji toksisitas subkronis definitif. Berdasarkan hasil dari uji toksisitas subkronis pendahuluan, konsentrasi merkuri dan persentase mortalitas cacing *Tubifex* tertinggi pada paparan  $\text{HgCl}_2$  100%. Persentase kematian *Tubifex* setelah tujuh hari terpapar  $\text{HgCl}_2$  berkisar antara  $16,7 \pm 1,15\%$  hingga  $98,7 \pm 1,53\%$ .

Gambar 26 menunjukkan persentase kematian *Tubifex* setelah tujuh hari paparan  $\text{HgCl}_2$ . Persentase mortalitas tertinggi pada dosis 100% merkuri dan terendah pada cacing yang tidak terpapar (0% dari dosis merkuri sub-kronis). Mortalitas *Tubifex* setelah tujuh hari terpapar  $\text{HgCl}_2$  menunjukkan peningkatan dosis yang lebih tinggi.

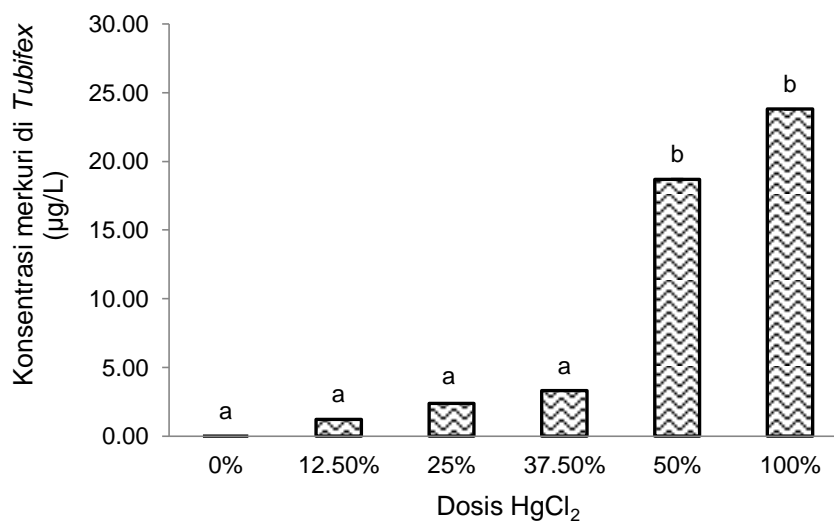


Gambar 26. Persentase mortalitas *Tubifex* setelah 7 hari paparan  $\text{HgCl}_2$  subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  48 jam ( $83,16 \mu\text{g/L}$ ). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

Konsentrasi merkuri di *Tubifex* setelah paparan  $\text{HgCl}_2$  selama tujuh hari berkisar antara  $0,01 \pm 0,001 \mu\text{g/L}$  hingga  $23,8 \pm 0,037 \mu\text{g/L}$ . Konsentrasi merkuri tertinggi pada dosis  $\text{HgCl}_2$  100% dan tingkat merkuri terendah pada dosis  $\text{HgCl}_2$  0%.

Konsentrasi merkuri dalam tubuh *Tubifex* meningkat pada dosis yang lebih tinggi (Gambar 27).

Konsentrasi merkuri dalam cacing *Tubifex* setelah paparan  $\text{HgCl}_2$  selama tujuh hari menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi paparan maka semakin tinggi pula konsentrasi merkuri dalam tubuh. Hal ini disebabkan pada uji toksisitas subkronis, paparan dilakukan setiap hari dengan dosis yang sama. Oleh karena sifat dari merkuri yang mudah terabsorpsi dan tidak bisa terurai, maka apabila cacing *Tubifex* dipapar setiap hari dengan dosis yang sama selama tujuh hari berturut-turut maka merkuri akan terakumulasi di dalam tubuh cacing, seiring dengan bertambahnya waktu dan konsentrasi paparan.



Gambar 27. Konsentrasi merkuri pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  48 jam (83,16  $\mu\text{g/L}$ ). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

Setelah tujuh hari paparan, persentase kematian tertinggi dari *Tubifex* adalah 100% dari dosis sub-kronis merkuri yang mencapai angka kematian hampir 100% dan mortalitas terendah adalah 0% dari dosis sub-kronis merkuri (Gambar 27). Persentase mortalitas meningkat seiring dengan tingginya dosis merkuri. Itu bisa dibuktikan

dengan tingginya kadar merkuri di tubuh *Tubifex* pada dosis merkuri yang lebih tinggi (Gambar 27).

*Tubifex* memiliki kemampuan mentoleransi merkuri yang terserap di tubuhnya. Pada dosis tertinggi, *Tubifex* tidak dapat mentolerir merkuri lebih dari 48 jam. Gupta (2012), menjelaskan bahwa distribusi merkuri organik setelah konsumsi ke kompartemen darah selesai dalam 30 jam. Kuantifikasi logam berat dalam tubuh organisme dapat melebihi batas kemampuan adaptasi individu (Yap *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Setiap individu memiliki toleransi yang berbeda terhadap logam berat, terutama merkuri. Berdasarkan *Environment Quality Standart* (EQS, 2006), *Ophryotrocha diadema* dapat toleransi dalam 28 hari; *Ctenodrilus serratus* mentolerir dalam 21-31 hari dengan paparan sub-kronis dari merkuri air asin, sedangkan pada dosis yang lebih rendah mortalitas *Tubifex* menunjukkan penurunan secara bertahap seiring dengan dosis merkuri yang lebih rendah.

Konsentrasi merkuri di tubuh *Tubifex* pada dosis subkronis 100% menunjukkan perbedaan nyata dengan dosis lain. Hal itu disebabkan dosis merkuri subkronis mempertahankan dosis yang sama selama periode paparan dan dimungkinkan *Tubifex* untuk menyerap merkuri secara maksimal dan terakumulasi dalam tubuhnya. Ye *et al.* (2016), melaporkan bahwa merkuri adalah logam larut dalam lemak yang mudah melintasi penghalang sel alveolar dan teroksidasi menjadi merkuri anorganik dan bergabung dengan protein dan menunjukkan efek kumulatif. Merkuri ada dalam beberapa bentuk: senyawa logam, anorganik, dan organik. Merkuri diserap melalui saluran pernapasan dan sulit diserap dalam saluran pencernaan (GI), merkuri anorganik biasanya diserap melalui saluran pernapasan, dalam nilai kecil juga diserap melalui kulit (3-4%) atau saluran pencernaan (GI) (2-10%). Merkuri anorganik secara alami mengalir ke laut, sungai, atau aliran. Jika merkuri masuk ke dalam air, dengan

bantuan bakteri dan plankton diubah menjadi logam merkuri dan metilmerkuri.

Metilmerkuri adalah jenis utama merkuri organik dengan sifat paling beracun pada tubuh organisme hidup, biasanya ditemukan dalam bentuk metilmerkuri dan dimethylmercury yang mudah diserap ke dalam saluran GI ( $\geq 95\%$ ) dan saluran pernapasan (80%).

Merkuri yang terdapat di perairan dan sedimen masuk ke dalam tubuh cacing *Tubifex* dengan cara absorpsi melalui mukosa dan kulit luar, masuk ke lapisan epidermis dan ke lapisan dermis. Merkuri dibawa masuk ke dalam tubuh melewati membran secara pasif dengan cara difusi. Merkuri yang akan menuju membran sel target harus melalui beberapa membran kapiler sampai di membran organel subseluler (mitokondria, lisosom, nukleus) (Trush, 2008)

Penyebab toksisitas merkuri adalah oksidasi merkuri inorganik dalam proses dimetilasi merkuri inorganik, berikatan dengan thiols dalam pembentukan radikal bebas, berikatan dengan enzim dan thiols dalam enzim dan struktur protein (Jaishankar *et al.*, 2015). Berdasarkan kemampuan merkuri dalam merusak struktur protein yang menyebabkan kerusakan sel maka jaringan cacing *Tubifex* yang terpapar merkuri mengalami kerusakan dan cacing mengalami stres oksidatif.

#### **Fisika-kimia air pada uji toksisitas akut**

Tabel 12 menunjukkan fisika-kimia air pada saat uji toksisitas. Parameter fisika-kimia dari media paparan tidak bervariasi. Fluktuasi suhu air sangat sedikit ( $24-25^{\circ}\text{C}$ ). Oksigen terlarut (DO) berada dalam kisaran normal (4-6 mg/L). pH berkisar antara 7,4-8,6. Pada penelitian ini media yang digunakan adalah air, hal ini bertujuan untuk menghindari keberadaan zat organik atau senyawa lain yang bisa berdampak terpecahnya ion logam antara larutan uji dan organisme. Selama percobaan, tidak diberikan pakan untuk menghindari fluktuasi yang disebabkan oleh limbah metabolik

cacing. Jadi, hanya konsentrasi dan durasi paparan yang diharapkan menjadi satu-satunya sumber variasi dalam perlakuan.

Tabel 12. Kualitas air pada uji toksisitas akut

Waktu Pengamatan	pH	Suhu (°C)	DO (mg/L)
24 jam	7,8 - 8,4	24	4-6
48 jam	8,2 - 8,6	25	4-6

Tingkat akumulasi dan toksisitas logam bervariasi tergantung suhu, pH, jumlah padatan terlarut, alkalinitas (Hamelink *et al.*, 1994; Sorensen, 1991), konduktivitas, jumlah bahan organik hadir dalam medium (Sparling, 2016). Toksisitas menurun dengan peningkatan pH dan/atau alkalinitas (Brković-Popović dan Popović, 1977). Suhu juga merupakan faktor penting dalam toksisitas akut jangka pendek (Rathore and Khangarot, 2002).

Toksisitas logam terhadap organisme dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan yaitu suhu, derajat keasaman (pH), DO (oksigen terlarut) dan alkalinitas. Suhu adalah faktor fisik lingkungan yang mempengaruhi aktivitas mikroorganisme air terhadap logam berat tersebut (Agarwala, 2006; Babich dan Stotzky, 2001). Efek yang ditimbulkan akibat kenaikan suhu adalah terjadinya guncangan suhu, meningkatnya kepekaan organisme akuatik terhadap parasit, penyakit dan toksin, menurunnya kadar oksigen perairan dan meningkatnya kebutuhan organisme akan oksigen.

Peningkatan pH menyebabkan toksisitas meningkat. Hal ini merupakan akibat menurunnya kompetisi antara ion Cd, Pb maupun Hg dengan ion-ion hidrogen dengan peningkatan pH larutan (Babich dan Stotzky, 2001; Agarwala, 2006). Batas toleransi organisme akuatik adalah pH 5-9, apabila ada polutan yang mengganggu sistem buffer perairan akan dapat menimbulkan gangguan yang serius bagi organisme akuatik (Miller, 2007; Leidy, 2000). Pada perairan yang tercemar nilai alkalinitas menggambarkan basa dan hidroksil, sedangkan pada perairan yang alami dan normal

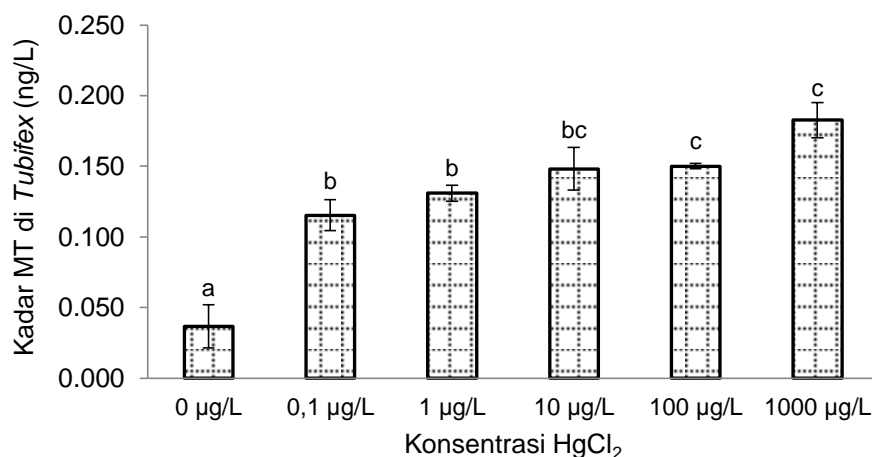
nilai alkalinitas menggambarkan nilai kebasaaan dari karbonat dan bikarbonat (Sunu, 2001; Agarwal, 2006).

### 5.3 Metallothionein (MT) pada *Tubifex*

#### 5.3.1 Kadar MT pada paparan akut

Kadar MT pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  dosis akut dengan konsentrasi yang bervariasi menunjukkan bahwa paparan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  1000  $\mu\text{g/L}$  menghasilkan kadar MT paling tinggi ( $0,183 \pm 0,012$  ng/L) dibandingkan dengan konsentrasi lebih rendah. Pada cacing *Tubifex* yang tidak dipapar  $\text{HgCl}_2$  menghasilkan kadar MT sebesar  $0,037 \pm 0,015$  ng/L merupakan kadar terendah (Gambar 28).

Berdasarkan hasil pengukuran kadar MT terlihat bahwa cacing *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$ , menghasilkan kadar MT yang tinggi seiring dengan peningkatan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  (Gambar 28). Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  maka semakin meningkat kadar MT yang dihasilkan oleh cacing *Tubifex*.

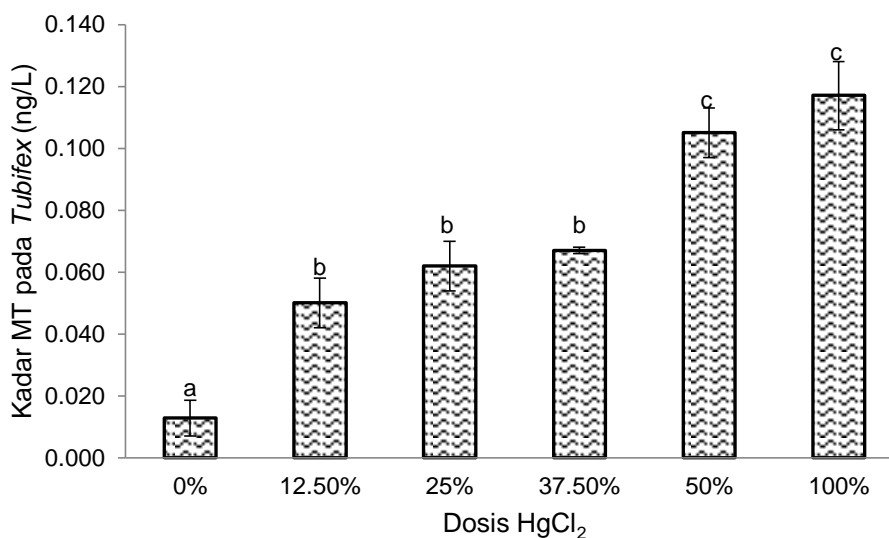


Gambar 28. Kadar MT (ng/L) pada *Tubifex* setelah 48 jam paparan akut dengan konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  0  $\mu\text{g/L}$ ; 0,1  $\mu\text{g/L}$ ; 1  $\mu\text{g/L}$ ; 10  $\mu\text{g/L}$ ; 100  $\mu\text{g/L}$ ; 1000  $\mu\text{g/L}$  yang dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

### 5.3.2 Kadar MT pada paparan subkronis

Kadar MT-Hg pada *Tubifex* yang terpapar  $\text{HgCl}_2$  pada dosis sub-kronis dengan berbagai konsentrasi merkuri (0%, 12,5%, 25%, 37,5%, 50%, 100% dari dosis LC50) menunjukkan bahwa paparan 100%  $\text{HgCl}_2$  menghasilkan kadar MT tertinggi ( $0,117 \pm 0,011 \mu\text{g/L}$ ) dibandingkan dengan dosis lain. *Tubifex* yang tidak terpapar  $\text{HgCl}_2$  (paparan 0%  $\text{HgCl}_2$ ) memiliki tingkat MT sebesar  $0,019 \pm 0,009 \mu\text{g/L}$  yang merupakan level terendah di antara perlakuan yang lain (Gambar 29).

Berdasarkan hasil pengukuran MT pada cacing *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  dosis subkronis terlihat bahwa konsentrasi tertinggi menghasilkan kadar MT tertinggi pula, sedangkan cacing *Tubifex* yang tidak dipapar  $\text{HgCl}_2$  menunjukkan kadar MT terendah. Paparan  $\text{HgCl}_2$  sebesar 50% dan 100% menunjukkan kadar MT yang tinggi.



Gambar 29. Kadar MT pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi LC50 48 jam ( $83,16 \mu\text{g/L}$ ). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

Konsentrasi logam yang tinggi di dalam sel meningkatkan konsentrasi metallothionein (Cherian dan Goyer, 1978; Viarengo, 2002). Konsentrasi MT dalam

organisme dipengaruhi oleh konsentrasi bahan pencemar logam (Amiard *et al.*, 2006; Roesijadi, 1994; Couillard, 1993). Metallothionein berpartisipasi langsung terhadap pertahanan antioksidan dan dapat diinduksi oleh ROS (Davies dan Cousins, 2000). Mosleh *et al.* (2005) menemukan bahwa paparan pestisida pada *Tubifex* meningkatkan kadar MTs dan berkorelasi dengan peningkatan sistem antioksidan dalam tubuh cacing. Namun masih sedikit studi yang terkait dengan penggunaan MTs atau sistem antioksidan sebagai biomarker pencemaran pada Tubificidae.

Merkuri (Hg) yang diserap oleh tubuh akan diikat oleh protein dengan berat molekul rendah yang disebut thionein membentuk gugus kompleks protein-logam dengan nama metallothionein yang disintesis dalam hati. Pengikatan logam berat membentuk metallothionein merupakan mekanisme pertahanan dan perlindungan yang mencegah logam tersebut mempengaruhi protein penting dalam proses metabolisme tubuh (Katzung, 2007; Kosnett, 2007; Plaa, 2007; Soemirat, 2005; Klaasen, 2001).

Menurut Roesijadi (1994), metallothionein mempunyai peran utama dalam regulasi intraselular berbagai logam seperti tembaga, seng, dan kadmium. Perbaikan sintesis MT terkait dengan peningkatan kapasitas untuk mengikat logam dan untuk melindungi pengikatan dari toksisitas logam. Metallothionein terlibat dalam beragam fungsi intraselular (Davis dan Cousins, 2000), antara lain berperan dalam detoksifikasi logam berat dan mempertahankan homeostasis ion logam esensial. Hal ini disebabkan karena logam memiliki afinitas yang tinggi (Klaassen *et al.*, 2009). Metallothionein berperan penting pada fasilitasi distribusi dan ekskresi berbagai senyawa logam (Almstier, 2001; Soemirat, 2017).

Metallothionein (MT) dianggap sebagai protein yang terlibat dalam proses detoksifikasi dari logam esensial yang tidak penting dan berlebih. Reaksi radikal



hidroksil dengan MT kira-kira 340 kali lipat lebih tinggi dari pada GSH (Thornalley dan Vasak, 1995). Menurut Amiard *et al.*, (2006), peningkatan kadar MT pada organisme tertentu akan mengurangi tingkat kepekaan organisme terhadap logam berat atau menjadi kurang sensitif dan menjadi resisten. Menurut Binz dan Kagi (2000), metallothionein adalah satu-satunya senyawa biologis yang berinteraksi dengan logam di dalam tubuh organisme. Interaksi antara protein dengan ion logam akan membentuk gugus trombosit-tiolat. Menurut Roesijadi (1994), MT dapat meningkat dengan meningkatnya paparan Cadmium (Cd).

MT diekspresikan dengan cara khusus pada jaringan, terutama di bagian yang mengakumulasi logam. Pengikatan tembaga ke MT menyebabkan pendaran tembaga berwarna oranye yang terakumulasi dalam sel midgut. Demikian juga logam berat yang lain akan terikat sedemikian rupa, sehingga dalam waktu singkat mampu memicu aktivasi gen MT, sehingga menghasilkan umpan balik negatif pada ekspresi gen MT (Egli *et al.*, 2006). Ekspresi metallothionein pada organisme menunjukkan bahwa pada organisme tersebut terjadi paparan logam tertentu (Hanson, 2008).

Banyak penelitian telah menunjukkan induksi MT oleh logam pada vertebrata dan invertebrata, sebagai akibat terjadinya pencemaran logam (Mosleh *et al.*, 2004). Hal ini merupakan awal penggunaan MT sebagai biomarker pencemaran logam yang terjadi di alam. Diantara faktor-faktor yang mempengaruhi secara tidak langsung mempengaruhi konsentrasi MT, adalah suhu dan pH (Serafim *et al.*, 2002) serta salinitas (Leung *et al.* 2002). Hal lainnya terkait dengan karakteristik dari individu, terutama ukuran dan umur (Leung *et al.*, 2002; Serafim *et al.*, 2002). Selain itu, faktor yang mempengaruhi dapat berupa oksigen terlarut/DO (Ivankovic *et al.*, 2005).

Merkuri berperan penting dalam merusak struktur protein tersier dan kuaterner serta mengubah fungsi sel dengan melekat pada kelompok selenohidril dan sulfhidril

yang bereaksi dengan metil merkuri sehingga menghambat struktur seluler. Hal ini mengintervensi proses transkripsi dan translasi yang mengakibatkan hilangnya ribosom dan retikulum endoplasma serta aktivitas sel pembunuh alami. Integritas seluler juga terpengaruh sehingga menyebabkan pembentukan radikal bebas. Berdasarkan ikatan dengan logam berat, meskipun ikatan merkuri sulfhidril stabil dan dibagi ke sulfhidril yang terdiri dari ligan, ikatan merkuri sulfhidril juga memberikan kontribusi kelompok sulfhidril bebas untuk meningkatkan mobilitas logam dalam ligan (Bernhoft, 2011).

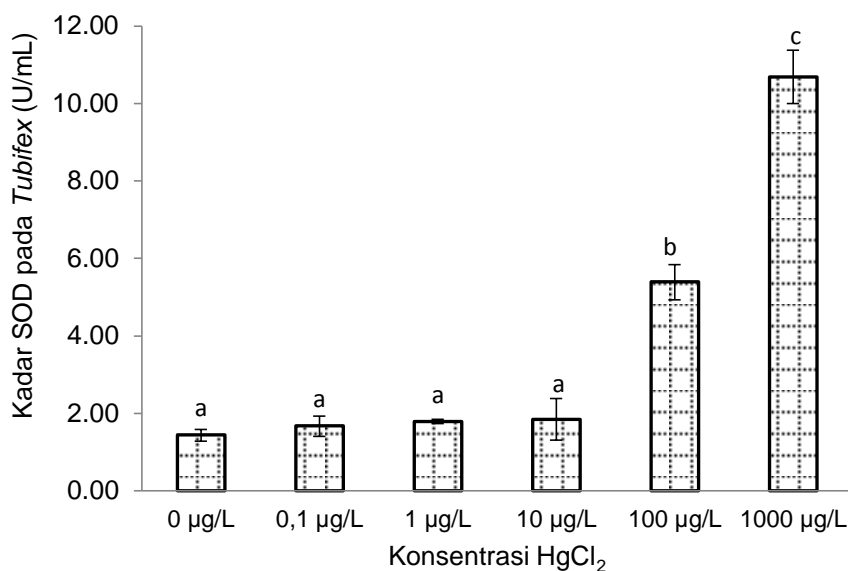
Metalothionein merupakan polipeptida yang memiliki banyak ikatan sistein (cys), memiliki berat molekul yang rendah dan merupakan protein pengikat logam. Protein ini mengandung kelompok thiol (sulfhidril, -SH) dalam jumlah yang besar. Kelompok thiol mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien termasuk Zn, Hg, Cu dan Cd. Residu sulfhidril dari Cys mampu mengikat logam dimana satu ion logam diikat oleh tiga residu -SH atau satu ion logam dengan dua residu -SH yang ada pada Cys, membentuk struktur tetrahedral tettrathiolate (Schultze *et al.*, 1988; Robbins *et al.*, 1991). Pada hewan, logam akan terikat pada residu cys dalam formasi ligan-cys-(thiolate) dengan cara pertukaran ion logam misalnya ion Zn tergantikan dengan ion Cu, Cd atau Hg (Duncan *et al.*, 2006). MT mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan logam dapat berlangsung dengan mudah karena ikatan MT terhadap logam memiliki Stabilitas termodinamik yang tinggi dan stabilitas kinetik yang rendah (Zangger *et al.*, 2001).

**5.4 Aktivitas antioksidan pada *Tubifex***

**5.4.1 Kadar SOD, CAT dan GPx pada *Tubifex* paparan HgCl<sub>2</sub> akut**

**Kadar SOD**

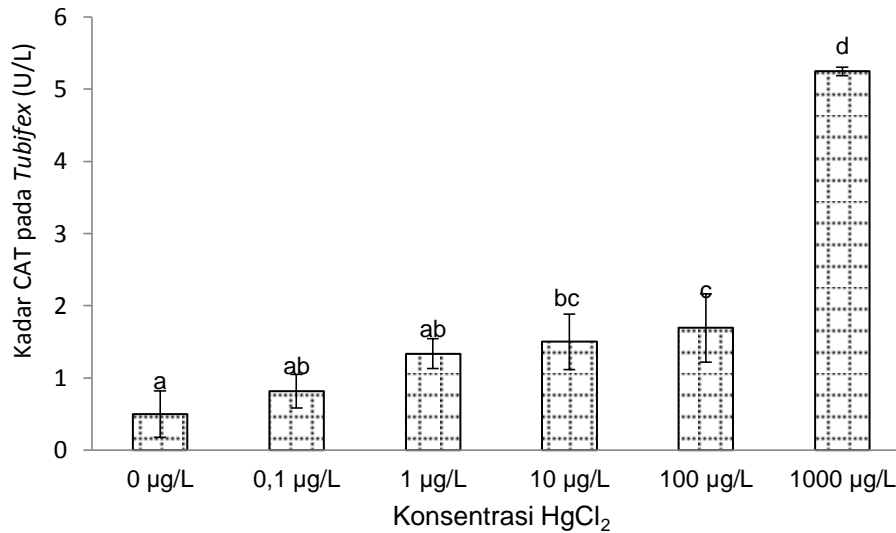
Gambar 30 menunjukkan bahwa paparan HgCl<sub>2</sub> dengan dosis 1000 µg/L menghasilkan SOD paling tinggi (10,68±0,69 U/mL) dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi yang lain. Namun, konsentrasi HgCl<sub>2</sub> yang lainnya menunjukkan SOD yang hampir sama. Cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan SOD sebesar 1,44±0,15 U/mL.



Gambar 30. Kadar SOD (U/mL) pada *Tubifex* setelah 48 jam paparan akut dengan konsentrasi HgCl<sub>2</sub> 0 µg/L; 0,1 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L; 1000 µg/L yang dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

**Kadar CAT**

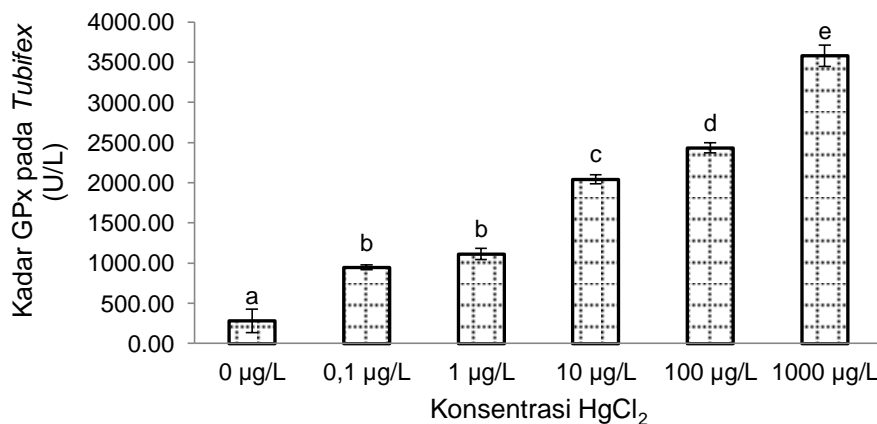
Paparan HgCl<sub>2</sub> dengan dosis 1000 µg/L menghasilkan katalase (CAT) yang paling tinggi (5,249±0,059 U/L) dibandingkan dengan konsentrasi yang lain. Cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan CAT yang paling rendah yaitu 0,502±0,321 U/L (Gambar 31).



Gambar 31. Kadar CAT (U/L) pada *Tubifex* setelah 48 jam paparan akut dengan konsentrasi HgCl<sub>2</sub> 0 µg/L; 0,1 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L; 1000 µg/L yang dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

#### Kadar GPx

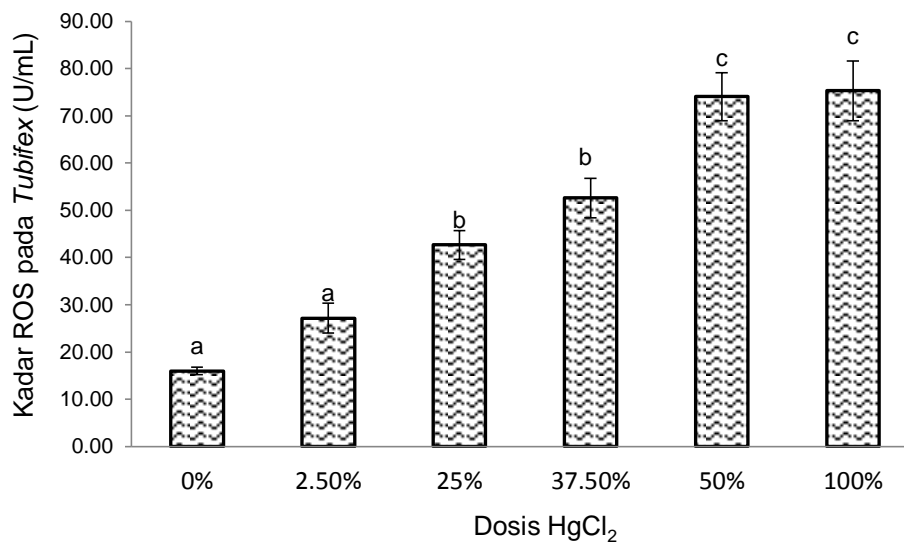
Paparan HgCl<sub>2</sub> tertinggi pada perlakuan konsentrasi 1000 µg/L menghasilkan GPx yang paling tinggi (3580,82±132,7 U/L). Cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan GPx paling rendah sebesar 281,69±136,9 U/L (Gambar 32).



Gambar 32. Kadar GPx (U/L) pada *Tubifex* setelah 48 jam paparan akut dengan konsentrasi HgCl<sub>2</sub> 0 µg/L; 0,1 µg/L; 1 µg/L; 10 µg/L; 100 µg/L; 1000 µg/L yang dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

#### 5.4.2 Kadar ROS *Tubifex* yang dipapar $\text{HgCl}_2$ (subkronis)

Kadar ROS pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  dosis subkronis ditunjukkan pada Gambar 33. Paparan dengan konsentrasi paling tinggi menunjukkan kadar ROS yang tinggi yaitu pada paparan  $\text{HgCl}_2$  dengan konsentrasi 100%, kadar ROS sebesar  $75,29 \pm 6,29$  U/mL. Apabila dibandingkan dengan *Tubifex* yang tidak dipapar, maka semua *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  menunjukkan kadar ROS yang lebih tinggi.



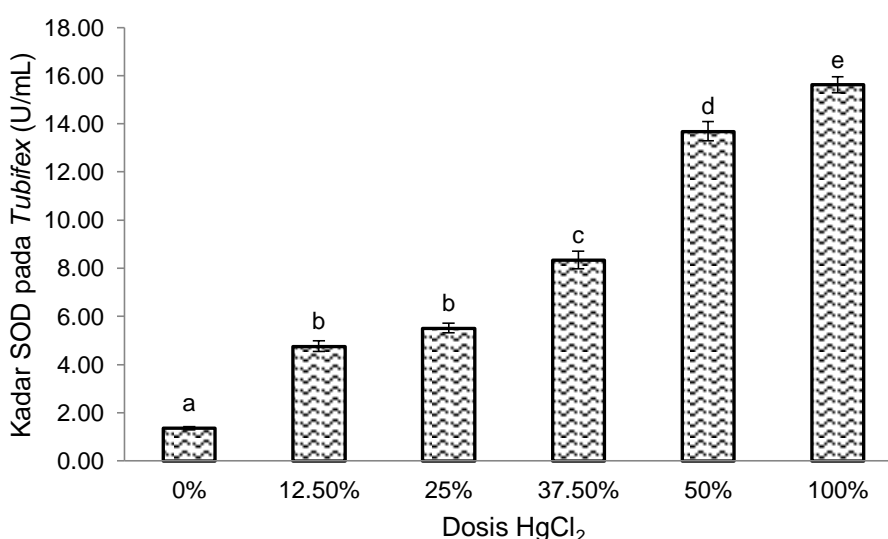
Gambar 33. Kadar ROS pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi  $\text{LC}_{50}$  48 jam ( $83,16 \mu\text{g/L}$ ). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol ( $P < 0,05$ ).

Spesies oksigen reaktif (ROS) adalah produk sampingan dari metabolisme sel normal. ROS dalam jumlah rendah dan sedang bermanfaat karena dapat membunuh dengan menyerang patogen dan dapat menginduksi penyembuhan luka dan jaringan (Bhattacharyya *et al.*, 2014). Sebaliknya, pada konsentrasi tinggi, ROS bisa menyebabkan kerusakan pada struktur sel, membran lipid, protein dan asam nukleat. Logam berat termasuk Hg adalah eksogen umum sebagai sumber ROS dan dapat secara langsung atau tidak langsung menginduksi terbentuknya ROS. Selanjutnya,

pembentukan ROS mengganggu homeostasis ion logam, mengatasi perlindungan antioksidan tubuh, peroksidasi lipid dan proses modifikasi protein meningkat (Valko *et al.*, 2006).

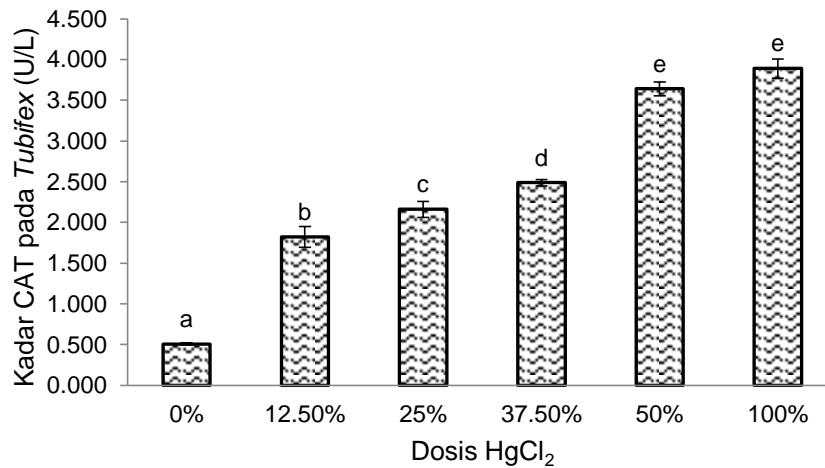
#### 5.4.3 Kadar SOD, CAT dan GPx pada *Tubifex* (subkronis)

Pada paparan HgCl<sub>2</sub> dosis subkronis, kadar SOD tertinggi yang dihasilkan oleh cacing *Tubifex* yaitu pada paparan HgCl<sub>2</sub> 100% sebesar 15,62±0,33 U/mL, dan yang terendah pada dosis paparan HgCl<sub>2</sub> 12,5% sebesar 4,76±0,21 U/mL, sedangkan pada cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan SOD sebesar 1,36±0,06 U/mL, paling rendah dibandingkan dengan yang dipapar (Gambar 34).



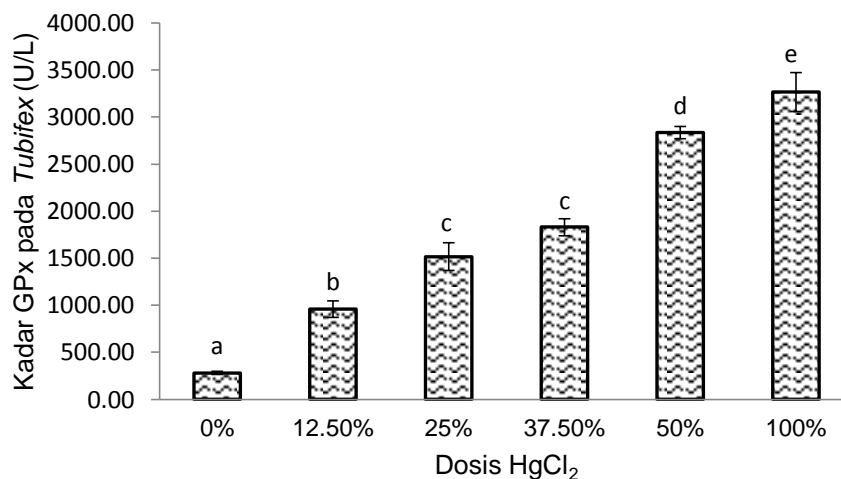
Gambar 34. Kadar SOD pada *Tubifex* yang dipapar HgCl<sub>2</sub> subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi LC<sub>50</sub> 48 jam (83,16 µg/L). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

Catalase (CAT) yang dihasilkan oleh cacing *Tubifex* yang dipapar HgCl<sub>2</sub> pada dosis subkronis paling tinggi pada konsentrasi 100% sebesar 3,89±0,12 U/L. Cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan CAT sebesar 0,51±0,01 U/mL (Gambar 35).



Gambar 35. Kadar CAT pada *Tubifex* yang dipapar HgCl<sub>2</sub> subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi LC<sub>50</sub> 48 jam (83,16 µg/L). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

Pada paparan HgCl<sub>2</sub> dosis subkronis, kadar GPx paling tinggi dihasilkan oleh cacing *Tubifex* pada paparan HgCl<sub>2</sub> 100% sebesar 3268,13±207,03 U/L. Cacing *Tubifex* yang tidak dipapar HgCl<sub>2</sub> menghasilkan GPx sebesar 280,31±17,15 U/L (Gambar 36).



Gambar 36. Kadar GPx pada *Tubifex* yang dipapar HgCl<sub>2</sub> subkronis dengan dosis 0%; 12,50%; 25%; 37,5%; 50%; 100% dari konsentrasi LC<sub>50</sub> 48 jam (83,16 µg/L). Semua perlakuan dibandingkan dengan kontrol (P<0,05).

Cacing *Tubifex* menghasilkan SOD, CAT dan GPx yang tinggi pada konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  tinggi (dosis akut). Hal ini menunjukkan bahwa paparan  $\text{HgCl}_2$  dengan konsentrasi yang semakin tinggi maka SOD, CAT dan GPx yang dihasilkan *Tubifex* semakin tinggi pula. SOD, CAT dan GPx yang dihasilkan *Tubifex* merupakan respon dari tubuh *Tubifex* untuk menetralkan terjadinya stres oksidatif karena logam.

*Tubifex* yang tidak dipapar  $\text{HgCl}_2$  menghasilkan SOD, CAT dan GPx. Hal ini berkaitan dengan sumber terjadinya Stress oksidatif yaitu kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi organisme. SOD, CAT dan GPx merupakan antioksidan seluler yang diproduksi oleh tubuh pada saat terjadi tekanan yang menyebabkan peningkatan kadar ROS. Pada saat terjadi peningkatan kadar ROS, tubuh akan merespon dengan memproduksi enzim CAT, GPx dan SOD (Widayati, 2012).

*Superoxide dismutase* (SOD) merupakan antioksidan endogen yang mengkatalisis radikal superoksida ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) menjadi hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), sehingga SOD disebut sebagai *scavenger* atau pembersih superoksid ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Tun, 2006; Landmesser, 2002; Brown, 2004). *Superoxide dismutase* (SOD) berperan penting dalam melindungi sel terhadap gangguan oksidan yaitu *oxidative Stress* yang dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit dan proses degenerasi seperti ketunaan dan karsinogenesis (Ames dan Shigenaga, 1992).

Senyawa  $\text{H}_2\text{O}_2$  merupakan salah satu senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan pada proses metabolisme di dalam sel. Peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) merupakan sumber toksik berbagai macam penyakit karena dapat bereaksi menimbulkan kerusakan jaringan. Selain itu,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dianggap sebagai metabolit kunci karena Stabilitasnya relatif tinggi, cepat menyebar dan terlibat dalam sirkulasi sel (Murray, 2001; Mueller, 1997).



Katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx) mempunyai sifat yang sama dalam mengkatalisis  $H_2O_2$ . Namun, GPx mempunyai aktivitas yang tinggi terhadap  $H_2O_2$  daripada katalase. Hal ini disebabkan adanya perbedaan kinetik dari kedua enzim tersebut. Katalase mengkatalisis  $H_2O_2$  secara linier sesuai dengan konsentrasi  $H_2O_2$ , sedangkan GPx menjadi jenuh pada konsentrasi  $H_2O_2$  di bawah  $10^{-5}$  mol/L. Ketika konsentrasi  $H_2O_2$  sangat rendah atau pada kondisi normal maka GPx mempunyai peran yang lebih dominan untuk mengkatalisis  $H_2O_2$  daripada katalase (Mueller, 1997).

Hg dapat menyebabkan sistem disfungsi kekebalan tubuh dengan menginduksi sel sehingga terjadi apoptosis pada sel imun (Ben-Ozer *et al.*, 2000).

#### 5.4.4 Sistem pertahanan tubuh cacing *Tubifex* terhadap stres lingkungan

Organisme memiliki sistem pertahanan tubuh terhadap stres lingkungan. Pada sel normal, derivatif oksigen dinetralkan atau dihilangkan dengan adanya mekanisme pertahanan alami yang melibatkan antioksidan enzimatik (*superoxide dismutase*, *catalase*, *glutathione peroxidase*) dan antioksidan non-enzimatik (vitamin C dan E, glutathione, selenium) (Bartsch dan Nair, 2000; Sies, 1991). Sel yang terpapar stress oksidatif secara terus menerus, memiliki berbagai mekanisme pertahanan agar dapat bertahan hidup.

Merkuri mempunyai afinitas terhadap lipid dalam tubuh organisme sehingga cenderung lebih mudah terakumulasi dan terbiomagnifikasi dibandingkan dengan logam yang lain (Ravichandran, 2004). Merkuri di perairan menimbulkan resiko ekotoksikologi tinggi terhadap organisme perairan dan masih sedikit diketahui jalur penyerapan merkuri oleh cacing *Tubifex*. Namun, serapan logam dapat terjadi melalui membran dermal (Zagury *et al.*, 2006). Merkuri dalam bentuk ion yang masuk ke dalam tubuh organisme akan membentuk radikal bebas, yang menjadi salah penyebab terjadinya kerusakan sel, melalui peningkatan ROS dan menyebabkan terjadinya

peroksidase membran (Wu *et al.*, 2011). Kerusakan jaringan yang disebabkan merkuri melalui transpor pasif karena logam berat yang masuk ke dalam tubuh dalam bentuk ion. Transpor pasif tidak memerlukan energi sehingga membran sel tidak sampai mengalami nekrotik atau kerusakan sel (Suaniti, 2007).

Merkuri di perairan merupakan stresor bagi cacing *Tubifex* sehingga mengganggu homeostasis sel. Merkuri masuk ke dalam tubuh *Tubifex* dan terakumulasi akan memicu terbentuknya ROS akibat dari dinonaktifkannya enzim-enzim antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) dan glutathion peroxidase (GPx) (Kohen, 2002). Kondisi lingkungan yang tidak sesuai, akan menimbulkan respon imun bawaan yang dimiliki organisme. Cacing Oligochaeta (Annelida) memiliki respon imun humoral dan selular terhadap keberadaan stresor lingkungan (Karaca *et al.*, 2011).

Pada rongga tubuh (coelom) Oligochaeta terdapat sel coelomocytes yang dihasilkan oleh sel kloragogen (Homa *et al.*, 2005) dan berperan dalam sistem kekebalan tubuh cacing. Sel coelomocytes berfungsi untuk melindungi sel, fagositosis, mensintesis dan mengekskresi aglutinine yang berperan dalam respon imun humoral (Engelmann *et al.*, 2011). Sel coelomocytes terdiri dari basofil, acidofil, neutrofil, granulosit dan sel kloragogen yang menghasilkan pseudopodia yang berperan dalam fagositosis, kecuali sel kloragogen yang memproduksi molekul sitotoksik dan antibakteri. Efek logam berat pada organisme ditentukan oleh konsentrasi dan lama waktu paparan. Cacing *Tubifex* menyerap merkuri melalui kulit secara langsung sehingga jalur serapan yang pertama kali adalah permukaan kulit.

## 5.5 Deskripsi histologi cacing *Tubifex* setelah paparan $HgCl_2$

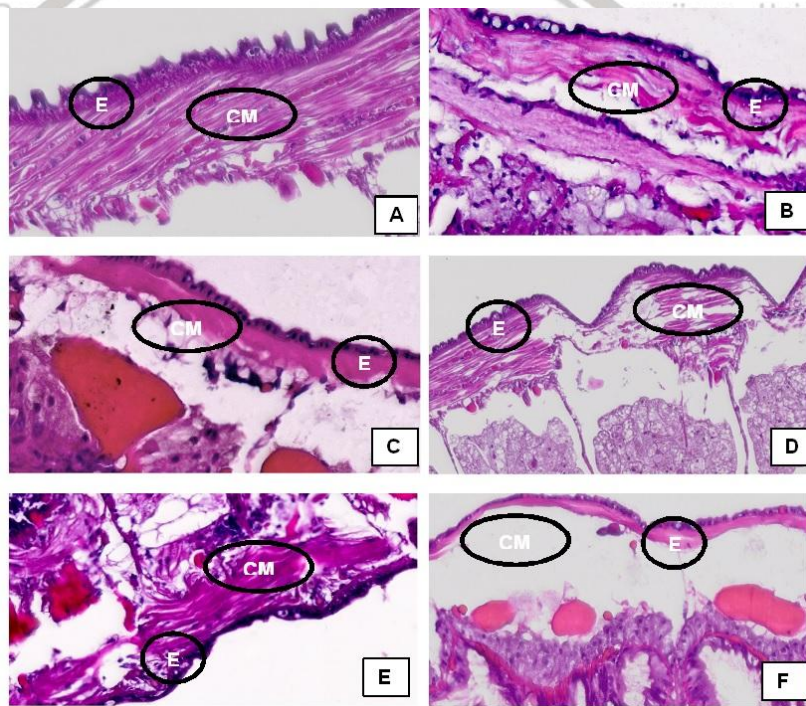
Histologi *Tubifex* yang dipapar  $HgCl_2$  pada paparan subkronis meliputi kondisi normal (tanpa paparan) sebagai pembanding untuk menentukan kerusakan jaringan

pada cacing setelah paparan. Kondisi jaringan tubuh cacing *Tubifex* tanpa paparan menunjukkan sel masih dalam kondisi yang normal/lengkap, artinya bahwa pada cacing masih memiliki lapisan kutikula, lapisan epidermis yang terdiri dari sel goblet, sel gada dan sel albumen, lapisan *circular muscle* dan *longitudinal muscle* (Gambar 48). Menurut Lofty dan Edwards (1977) bahwa dinding tubuh cacing terdiri dari lapisan kutikula yang berada pada lapisan paling luar yang berfungsi sebagai pelindung organ-organ pada lapisan epitel yang terlihat seperti pori-pori kecil yang dihubungkan oleh bulu-bulu halus dan sel-sel sensorik, lapisan epidermis, lapisan jaringan saraf, lapisan *circular muscle* dan lapisan *longitudinal muscle* serta peritonium (lapisan yang memisahkan dinding tubuh dengan coelom. Berdasarkan hasil pengamatan histologi, terjadi perubahan bentuk dan ukuran rongga tubuh pada setiap segmen serta terjadi kerusakan jaringan di sekitar rongga dan bulu-bulu halus mengalami semakin jarang.

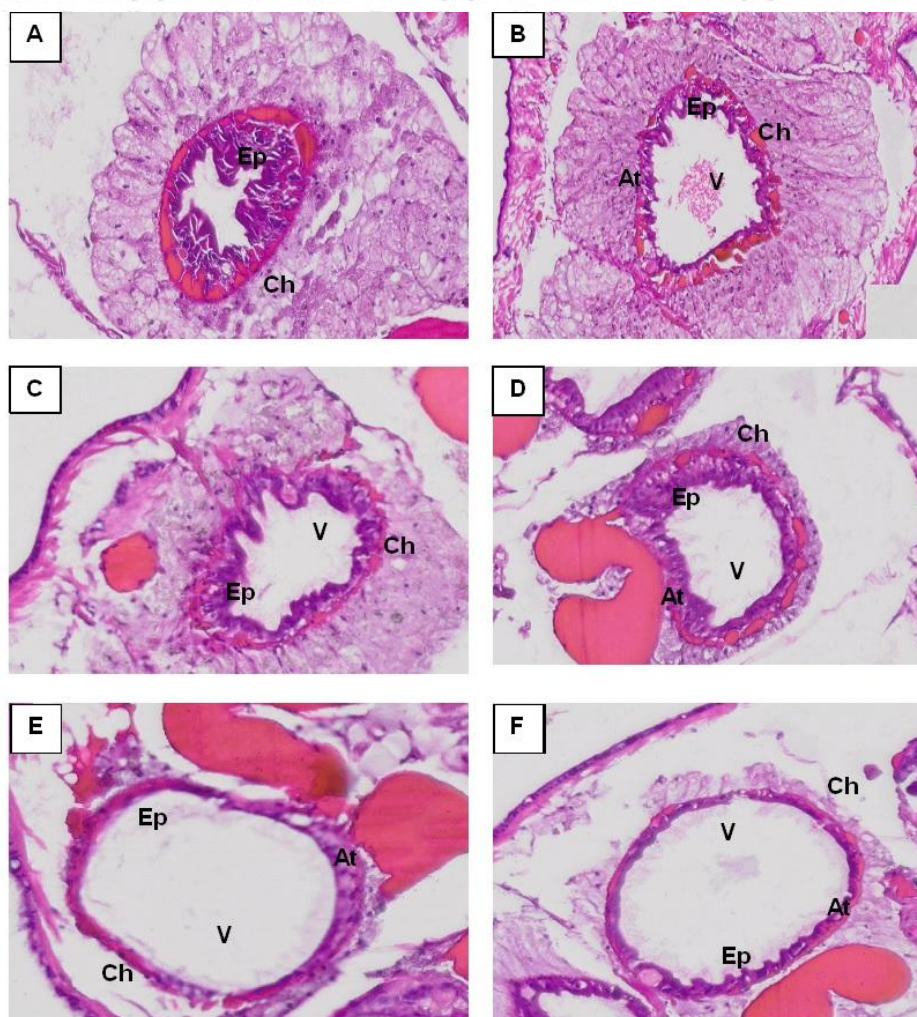
Pada *Tubifex* yang dipapar merkuri menunjukkan perubahan sel terutama pada cacing yang dipapar dengan dosis tinggi. Kerusakan sel yang teridentifikasi pada jaringan cacing *Tubifex* yang dipapar merkuri adalah nekrosis dan atrofi. Nekrosis adalah kematian sel dan jaringan hidup yang disebabkan oleh faktor eksternal antara lain keracunan, infeksi atau trauma. Nekrosis terjadi karena kerusakan membran, lisosom mengeluarkan enzim ke sitoplasma dan menghancurkan sel. Atrofi adalah proses fisiologis umum reabsorpsi dan kerusakan jaringan yang melibatkan apoptosis, menyebabkan berkurangnya massa otot.

Cacing *Tubifex* yang tidak terpapar merkuri terlihat lapisan epidermis masih kompak, namun sebaliknya pada cacing yang terpapar, lapisan epidermis menjadi tidak kompak atau terpisah-pisah. Akibat yang ditimbulkan oleh akumulasi logam berat termasuk merkuri berupa kerusakan fisik (degenerasi dan nekrosis) dan gangguan fisiologi (gangguan enzim dan metabolisme) (Darmono, 2001).

Pada *Tubifex* yang dipapar dengan konsentrasi yang rendah menunjukkan perubahan yang kecil apabila dibandingkan dengan tanpa paparan. Namun cacing yang dipapar dengan konsentrasi yang tinggi menunjukkan pembesaran rongga. Kerusakan yang terjadi pada lapisan epidermis cacing *Tubifex* berkaitan dengan sifat *Tubifex* yang melakukan pertukaran gas melalui kulit. Pada saat cacing melakukan pertukaran gas, maka merkuri yang berada di lingkungannya akan ikut terabsorpsi masuk ke dalam tubuh dan terakumulasi sehingga menyebabkan kerusakan jaringan (Gambar 37 dan Gambar 38).



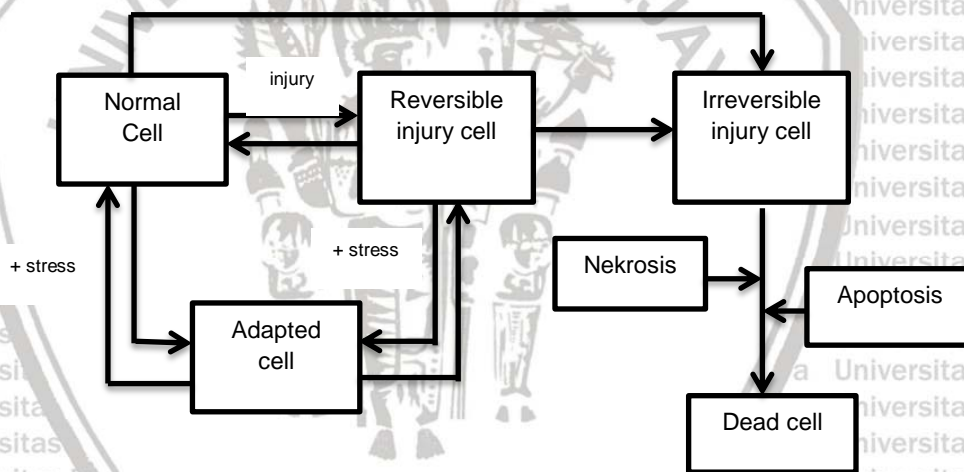
Gambar 37. Histologi dinding tubuh cacing *Tubifex* potongan melintang menunjukkan bagian epidermis (E), lapisan otot melingkar (CM). (A) Penampakan jaringan epidermis *Tubifex* tanpa paparan. (B) Penampakan histologi epidermis *Tubifex* yang dipapar subkronis pada dosis 12,5%. (C) Penampakan histologi epidermis *Tubifex* yang dipapar subkronis pada dosis 25%. (D) Penampakan histologi epidermis *Tubifex* yang dipapar subkronis pada dosis 37,5%. (E) Penampakan histologi epidermis *Tubifex* yang dipapar subkronis pada dosis 50%. (F); Penampakan histologi epidermis *Tubifex* yang dipapar subkronis pada dosis 100%. Gambar diperoleh dari pewarnaan HE yang diamati menggunakan software Olyvia sistem dot slide dengan perbesaran 40x.



Gambar 38. Histologi usus cacing *Tubifex* tanpa paparan (A) paparan subkronis dosis 12,5% (B) dosis 25% (C); dosis 37,5% (D); dosis 50% (E); dosis 100% (F), dengan perbesaran 40x. Ep=Epitel usus; Ch=Chloragogen. Sel epitel usus dan chloragogen terlihat mengalami perubahan bentuk dan cenderung terjadi vakuolasi (V) dan atrofi (At) terutama pada paparan dosis 50% (E) dan 100% (F). Gambar diperoleh dari pewarnaan HE yang diamati menggunakan software Olyvia sistem dot slide dengan perbesaran 40x.

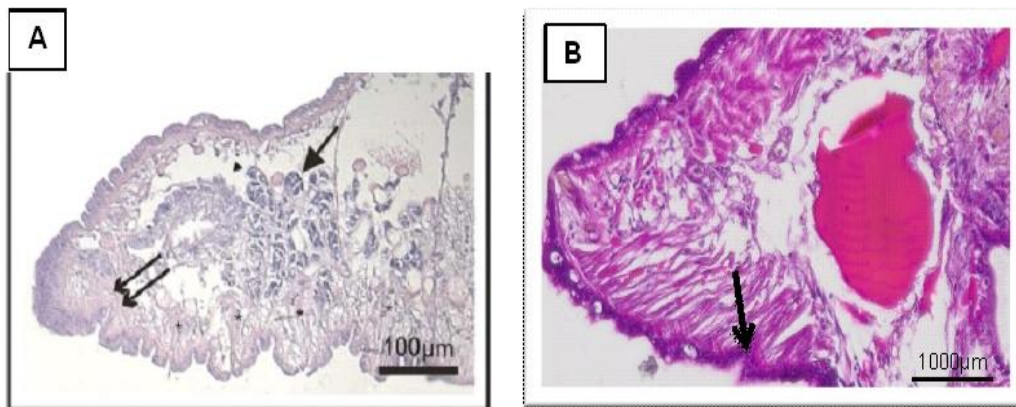
Merkuri dapat terakumulasi di dalam jaringan organisme perairan. Hewan menyerap merkuri melalui makanan dan terakumulasi pada jaringan (Withgott dan

Breman, 2007; Plaa, 2007; Kostnett, 2007). Pada lingkungan akuatik, kontaminan masuk ke dalam jaringan organisme dengan cara absorpsi langsung dan tidak langsung (Miller, 2007; Kostnett, 2007). Absorpsi merkuri melalui saluran pernapasan biasanya cukup besar. Cacing *Tubifex* bernapas melalui kulit sehingga merkuri di perairan ikut terabsorpsi melalui kulit. Logam akan terbawa oleh darah yang kemudian didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh. Kerusakan jaringan karena logam terdapat pada jalan masuk atau tempat akumulasi (Darmono, 2001). Mekanisme kerusakan sel karena stres lingkungan dimulai dari sel normal yang akan melakukan adaptasi terhadap keberadaan stresor di lingkungannya, namun apabila sel tersebut tidak bisa beradaptasi maka akan mengalami kerusakan dan kematian (Gambar 39).



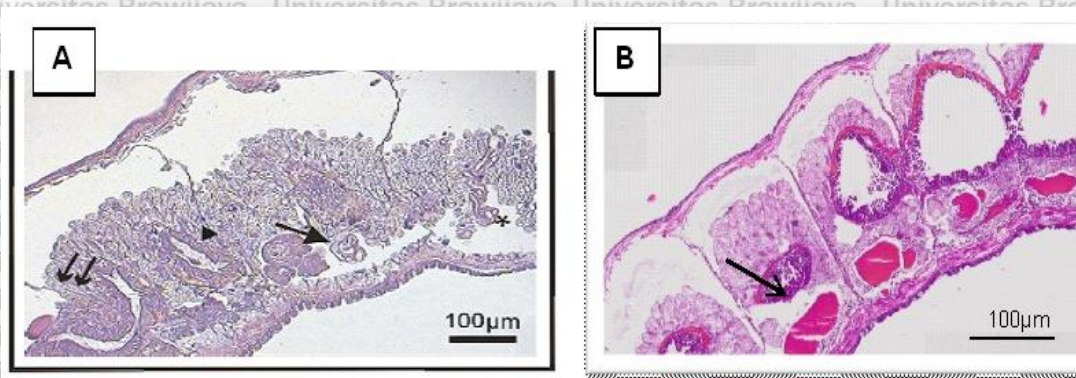
Gambar 39. Mekanisme kerusakan sel karena tekanan lingkungan

Gambar 40 menunjukkan bagian anterior cacing yang normal tanpa ada paparan merkuri. Jaringan cacing *Tubifex* yang telah terpapar merkuri terjadi perubahan. Apabila dibandingkan dengan cacing yang normal, maka terlihat bahwa pada cacing yang dipapar merkuri bentuk mulut mengalami perubahan di bagian ventral, ukuran mulutnya mengecil dengan bagian epidermis yang tidak rata.



Gambar 40. Lima segmen pertama *T. tubifex*. (A) Mulut berada di permukaan ventral (tanda panah ganda) dari segmen pertama. Empat segmen lainnya dapat diidentifikasi melalui keberadaan ventral setae. Kelenjar pharyngeal (panah) berada di segmen ke-4 dan ke-5 dan meluas ke rongga tubuh segmen ke-3 (panah). (B) Bagian anterior *Tubifex* yang terpapar merkuri (mulut di segmen pertama: tanda panah).  
 Sumber: Angelica (2007)

Gambar 41 menunjukkan saluran pencernaan pada *Tubifex*. Pada cacing yang dipapar merkuri terjadi perubahan pada nephridia pada bagian praseptum. Apabila dibandingkan dengan yang tanpa paparan, maka cacing yang dipapar terlihat terbentuk rongga yang cukup besar. Hal ini menunjukkan adanya kerusakan pada sel chloragogen. Jumlah sel chloragogen berkurang dengan terbentuknya rongga. Seperti dalam semua Tubificids, saluran pencernaan memiliki bentuk tabung lurus memanjang dari mulut, terletak di permukaan ventral dari prostomium ke anus, yang terletak di pygidium. Mulai dari segmen keenam, saluran pencernaan dikelilingi oleh sel-sel kelenjar khusus yang dikenal sebagai sel chloragogen (Angelica, 2007).



Gambar 41. Bagian segmen 5 (sudut kiri bawah) sampai segmen 8 *T. tubifex*. (A) Dari segmen 6 massa sel kloragogen (panah ganda) terlihat mengelilingi saluran pencernaan (kepala panah). Metanephridia terletak pada segmen ke-7 dan menempati dua segmen yaitu di bagian pra-septum (panah) dan bagian pasca septum (tanda bintang). (B) Bagian saluran pencernaan *T. tubifex* yang terpapar merkuri.  
Sumber : Angelica (2007)

Jenis kerusakan jaringan yang ditemukan pada dinding tubuh dan usus cacing *Tubifex* dikuantitatifkan dengan menggunakan skoring untuk memperoleh persentase kerusakan jaringan. Berdasarkan hasil skoring, kerusakan jaringan dengan persentase lebih dari 50% yaitu pada paparan dosis 100%, sedangkan pada dosis 50%, persentase kerusakan jaringan hampir mencapai 50%. Hal ini menandakan bahwa semakin tinggi dosis paparan menyebabkan tingkat kerusakan jaringan yang tinggi. Cacing *Tubifex* tanpa paparan mengalami kerusakan jaringan agak ringan. Kerusakan tersebut diduga terjadi karena adanya tekanan dari lingkungan atau senyawa kimia yang terkandung di dalam tubuh cacing. Namun kerusakannya masing tergolong agak ringan. Berdasarkan kategori kerusakan jaringan dari Suswandari (2005), cacing *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  dengan dosis yang berbeda menunjukkan kerusakan agak ringan sampai sedang (Tabel 13).

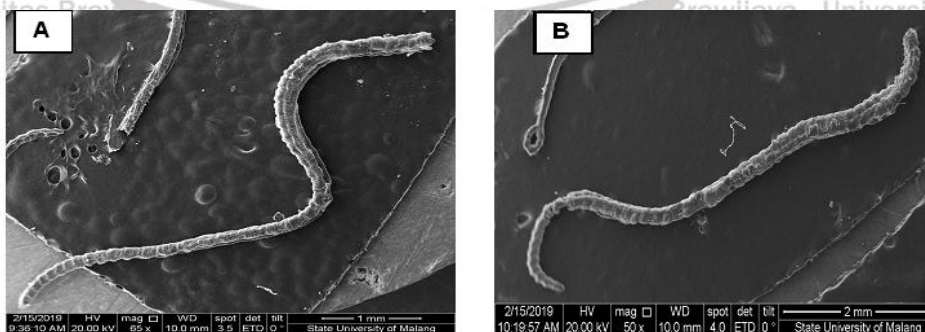


Tabel 13. Presentase kerusakan jaringan cacing *Tubifex* setelah 7 hari paparan merkuri subkronis

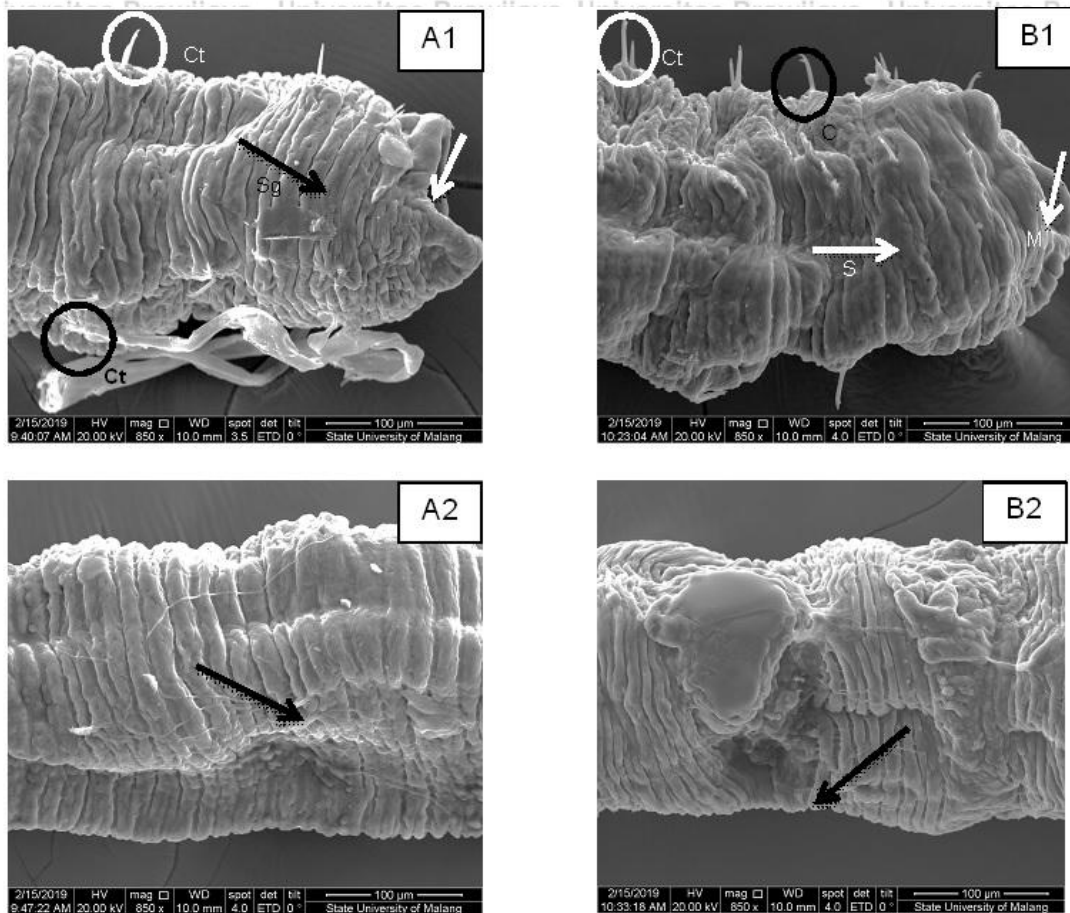
Dosis HgCl <sub>2</sub>	Presentase kerusakan jaringan (%)	Kategori kerusakan jaringan	Jenis kerusakan jaringan
0%	8,473	Kerusakan jaringan:	Atrofi
12,5%	25,041	• 1% - ≤25% (agak ringan)	Nekrosis
25%	30,624	• 26% - ≤50% (ringan)	Vakuolasi
37,5%	42,256	• 51% - ≤75% (sedang)	
50%	49,179	• 76% - ≤100% (agak berat)	
100%	68,763	• >100% (rusak berat)	

### 5.6 Morfologi dan ukuran cetae pada *Tubifex*

Hasil uji SEM-EDX menunjukkan morfologi secara utuh dari cacing *Tubifex* tanpa paparan (perbesaran 50x) tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata dengan cacing yang telah dipapar (Gambar 42). Namun dengan perbesaran 850x terlihat perbedaannya seperti jarak antar segmen lebih lebar pada cacing setelah dipapar dibandingkan tanpa paparan dan terlihat jelas segmen yang akan mengalami fragmentasi (Gambar 43). Pada bagian kulit luar anterior dan tengah tubuh cacing terdapat setae.



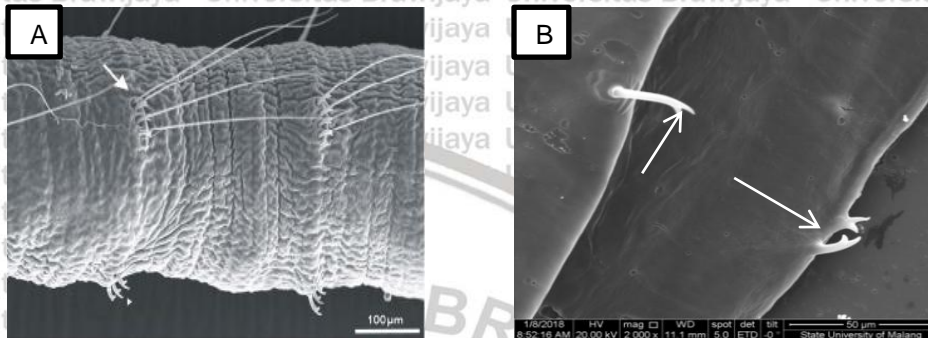
Gambar 42. Morfologi cacing *Tubifex* (A) tanpa paparan merkuri dengan perbesaran 65x dan (B) setelah 7 hari paparan merkuri dengan perbesaran 50x. Gambar diperoleh dari hasil pengamatan dengan menggunakan SEM.



Gambar 43. Morfologi bagian anterior dan tengah tubuh cacing *Tubifex*. (A1) Bagian kepala *Tubifex* yang tidak dipapar merkuri. (A2) Bagian tengah tubuh *Tubifex* setelah dipapar merkuri. (B1) Bagian kepala *Tubifex* setelah dipapar merkuri. (B2) Bagian tengah tubuh *Tubifex* setelah dipapar merkuri. Gambar diperoleh dari pengamatan menggunakan SEM dengan perbesaran 850x.

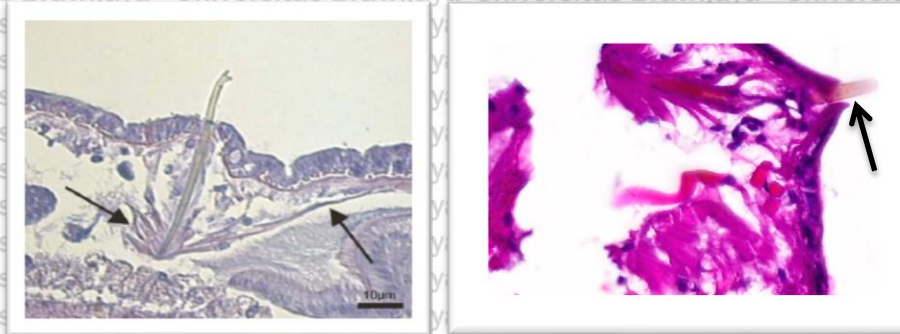
Gambar 44 menunjukkan morfologi cetae pada *Tubifex* tanpa paparan, paparan akut dan paparan subkronis. Ketiga paparan tersebut menunjukkan bentuk setae yang berbeda. Pada cacing yang tidak dipapar, ujung setae bercabang, bentuk setae pada paparan akut ujungnya runcing dan ada yang terbelah sedikit, sedangkan setae pada paparan subkronis tidak jelas bentuknya karena sebagian patah. Setae merupakan bulu halus yang melekat pada parapodia, berfungsi untuk membantu melekat pada substrat. Parapodia merupakan rambut halus pada setiap segmen untuk membantu

pergerakan. Tipe setae pada *Tubifex* ada tiga yaitu setae rambut, setae pectinate dan setae bifid. Setae penting dalam taksonomi oligochaeta akuatik. Setae merupakan satu-satunya kriteria identifikasi untuk oligochaeta yang tidak dewasa secara seksual (Steinlechner, 1987).



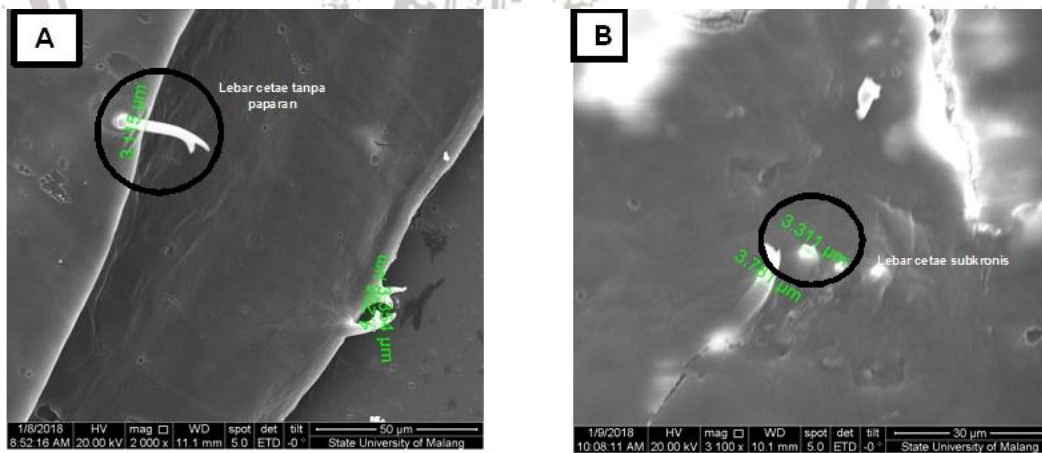
Gambar 44. Jenis setae pada *Tubifex*. (A) Jenis setae yang berbeda terdapat pada tubuh *T. tubifex*; bundel dorso-lateral (panah) yang terdiri dari pectinate dan rambut; dan bundel ventro-lateral (panah) yang terdiri dari setae Tubifid (Angelica, 2007), (B). Morfologi setae pada cacing *Tubifex* tanpa paparan merupakan hasil pengamatan menggunakan SEM dengan perbesaran 2000x.

Setae memiliki ukuran yang bervariasi (Bouche *et al.*, 1999). Pada paparan subkronis terlihat terjadi perubahan panjang setae. Apabila dibandingkan dengan panjang cetae pada *Tubifex* yang tidak dipapar (8,772  $\mu\text{m}$ ) maka terlihat cetae pada paparan dengan konsentrasi tinggi (100%) menunjukkan panjang cetae yang lebih kecil (2,567  $\mu\text{m}$ ). Namun untuk lebar cetae tidak menunjukkan perbedaan antara cacing yang tidak dipapar (3,315  $\mu\text{m}$ ) dan yang dipapar (3,311  $\mu\text{m}$ ). Gambar 45 menunjukkan histologis serat otot epitel yang mengontrol gerakan cetae.

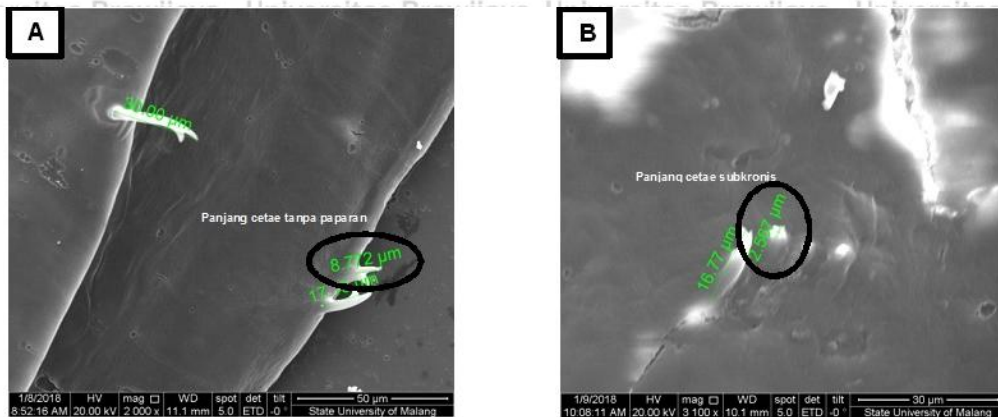


Gambar 45. (A) Histologis serat otot epitel (panah) yang mengontrol gerakan setae (Angelica, 2007). (B). Histologi setae pada *Tubifex* (panah), gambar diperoleh dari pewarnaan HE yang diamati dengan dot slide menggunakan aplikasi software Olyvia dengan perbesaran 80x.

Gambar 46 dan Gambar 47 menunjukkan lebar dan panjang dari cetae pada cacing *Tubifex* yang dipapar subkronis dan tanpa paparan. Pada gambar tersebut terlihat bahwa lebar dan panjang dari setae bervariasi pada paparan subkronis. Namun terjadi kerusakan setae pada saat paparan subkronis.



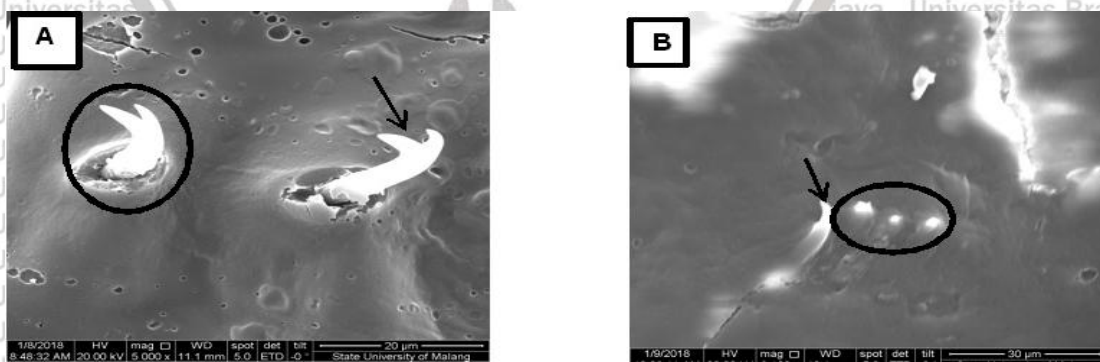
Gambar 46. Lebar setae cacing *Tubifex* (A) Lebar setae yang tidak dipapar merkuri . Gambar merupakan hasil pengamatan menggunakan SEM dengan perbesaran 2000x. (B) Lebar setae setelah dipapar merkuri subkronis, hasil pengamatan SEM dengan perbesaran 3100x (B)



Gambar 47. Panjang setae cacing *Tubifex* (A) Panjang setae yang tidak dipapar, (B) gambar hasil pengamatan SEM dengan perbesaran 2000x. (B) Panjang setae setelah dipapar merkuri subkronis, gambar hasil pengamatan SEM dengan perbesaran 3100x (B)

Bentuk setae pada cacing *Tubifex* yang tidak dipapar  $HgCl_2$ , bagian ujungnya membentuk seperti cabang dan permukaan pangkal setae rata. Namun pada cacing *Tubifex* paparan subkronis, sebagian setae patah dan mengalami kerusakan serta permukaan di sekitar pangkal setae tidak rata.

Perubahan bentuk dan kerusakan permukaan tubuh *Tubifex* berkaitan dengan konsentrasi dan lama waktu paparan. Berdasarkan hasil pengamatan, *Tubifex* yang tidak dipapar  $HgCl_2$  tidak mengalami perubahan morfologi. Namun yang dipapar  $HgCl_2$  100% dan diamati setelah 168 jam terdapat perbedaan morfologi (Gambar 48).



Gambar 48. Kerusakan setae pada *Tubifex*. (A) Bentuk setae pada *Tubifex* yang tidak dipapar merkuri, gambar hasil pengamatan menggunakan SEM dengan perbesaran 5000x. (B) Kerusakan setae pada *Tubifex* yang dipapar merkuri subkronis, gambar hasil pengamatan menggunakan SEM dengan perbesaran 3100x.

Perubahan bentuk setae berkaitan dengan cara *Tubifex* mengabsorpsi logam dari lingkungannya. Bagian luar tubuh cacing *Tubifex* terdiri dari setae yang melindungi kulit dan bagian epidermis kulit. Kulit merupakan bagian terpenting dalam kelangsungan hidup cacing *Tubifex* karena semua zat-zat yang terkandung di dalam lingkungan akan diserap oleh cacing *Tubifex* melalui permukaan kulitnya. Peran setae sangat penting dalam menyaring zat-zat yang akan masuk ke dalam tubuh melalui kulit. Apabila ada bahan-bahan pencemar di lingkungan baik di air maupun sedimen maka yang terpapar terlebih dulu adalah setae pada *Tubifex*.

### 5.7 Konsentrasi dan sebaran merkuri pada cacing *Tubifex*

Berdasarkan hasil pengujian SEM-EDX, pada *Tubifex* terkandung beberapa elemen (C, O, Na, Al, Si, P, S, Cl, K, dan Ti) dengan persentase berat yang didominasi oleh C dan O (Gambar 58). Elemen-elemen tersebut merupakan elemen organik esensial yang dibutuhkan oleh organisme dalam proses metabolisme tubuh. Sebagian elemen tersebut adalah elemen organik kecuali Al, Si dan Ti. Aluminium (Al), Silikon(Si) dan Titanium (Ti) termasuk golongan metal yang dimanfaatkan oleh organisme.

Pada *Tubifex* yang dipapar  $HgCl_2$  ditemukan merkuri (Hg) dan zinc (Zn) yang tidak terkandung pada cacing tanpa paparan merkuri. Zinc atau biasa disebut dengan seng merupakan mineral esensial yang sangat penting bagi tubuh dan membantu proses pertumbuhan (Hambidge dan Krebs, 2007), sedangkan merkuri merupakan logam yang sangat toksik dan terakumulasi di dalam tubuh organisme (Pacyna *et al.*, 2010). Pada saat merkuri masuk ke dalam tubuh organisme, maka akan mengganggu proses metabolisme. Keberadaan seng di dalam tubuh akan meningkat pada saat ada merkuri karena salah satu fungsi Zn di dalam tubuh organisme adalah memperkuat sistem kekebalan tubuh, membantu pertumbuhan sel, membantu penyembuhan luka,

membantu menguraikan karbohidrat. Pada prinsipnya Hg di alam dalam bentuk mineral adalah cinnabar (HgS), bersama dengan kelompok mineral metacinnabar di mana variabel jumlah Zn dan Fe sebagai pengganti untuk Hg, dan Se pengganti S (Mihaljevic, 1999).

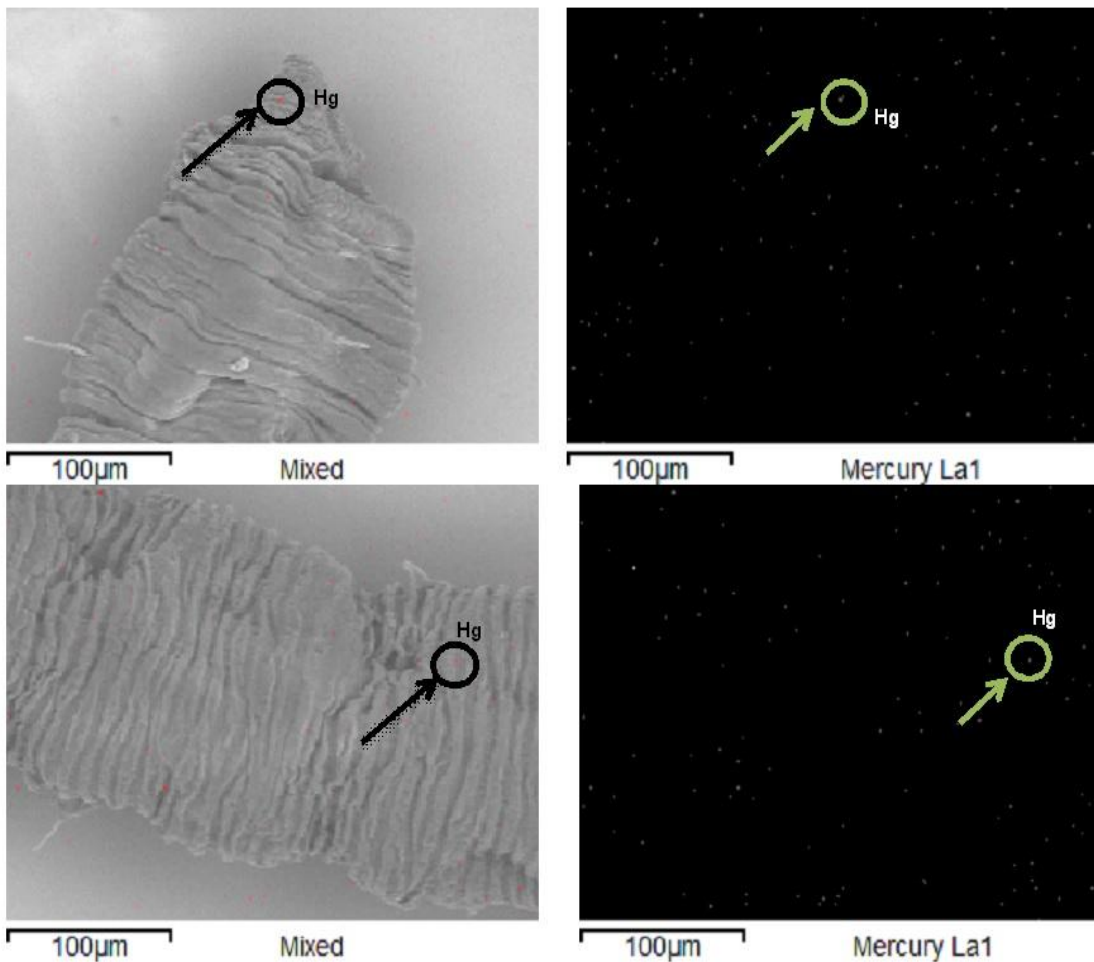
Merkuri yang dilepaskan ke lingkungan seringkali tersuspensi atau terikat pada senyawa organik yang ditemukan di tanah atau air di sekitarnya (Sanborn dan Brodberg, 2006). Merkuri organik, terbentuk ketika merkuri bergabung dengan karbon, dengan sendirinya dapat ditemukan dalam berbagai bentuk: dimethylmercury ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg), phenylmercury (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Hg<sup>+</sup>), ethylmercury (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Hg<sup>+</sup>), dan methylmercury (CH<sub>3</sub>Hg). Metilmerkuri menjadi masalah lingkungan dan kesehatan yang tertinggi (UNEP, 2002). Semua bentuk tersebut terjadi secara alami pada konsentrasi rendah (ATSDR, 2012).

Akumulasi merkuri pada organisme akuatik dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk individu masing-masing spesies, sumber Hg, fisika-kimia kualitas air dan tingkat polutan. Tingginya dosis yang digunakan untuk paparan memiliki efek yang signifikan pada bioavailabilitas dan bioakumulasi merkuri pada organisme terutama di air tawar (Chumchal *et al.*, 2008; Lambertsson *et al.* 2006; Canário *et al.*, 2009; Hüge *et al.*, 2014; Zamani *et al.*, 2014).

Sebaran merkuri pada cacing yang dipapar ditunjukkan pada Gambar 48. Merkuri menyebar pada seluruh tubuh cacing (*whole body*) baik di bagian anterior, bagian tengah dan bagian posterior. Merkuri menyebar di permukaan tubuh cacing yang ditandai titik-titik merah.

### Element Maps

Project: New project  
 Acc. Voltage: 15.0 kV  
 Resolution: 256 x 192 pixels  
 Viewed Resolution: 100%  
 Process Time: 5  
 Image Width: 321.0  $\mu\text{m}$   
 Mixed map: Mercury La1(red) [with image]



Gambar 49. Sebaran merkuri pada *Tubifex* setelah paparan merkuri, bagian anterior dan bagian tengah yang ditandai bintang merah dan putih (panah).

Gambar merupakan hasil Mapping EDX.

Pada *Tubifex*, merkuri diserap melalui lapisan kulit, seiring proses pertukaran gas (respirasi). *Tubifex* memiliki kebiasaan hidup dengan melakukan respirasi melalui kulit. Bagian depan tubuh terbenam di dalam sedimen di mana ekornya dibiarkan di air



untuk meningkatkan pembentukan aliran air untuk mempercepat pertukaran gas (Vivien *et al.*, 2014).

### 5.8 Elemen-elemen pada cacing *Tubifex* setelah paparan merkuri (subkronis)

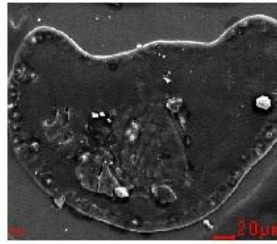
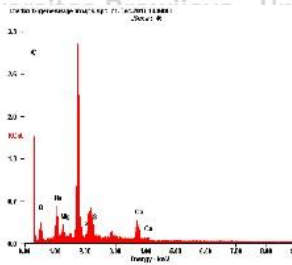
Hasil pengamatan EDX menunjukkan beberapa elemen terdeteksi terdapat di dalam tubuh cacing *Tubifex*. Pada *Tubifex* yang tidak dipapar  $\text{HgCl}_2$  mengandung elemen karbon (C), oksigen (O), natrium (Na), magnesium (Mg), fosfor (P) dan kalsium (Ca) dan karbon merupakan elemen yang mendominasi (74,72%) di dalam tubuh cacing (Gambar 52). Sedangkan pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$ , mengandung O, Na, P, Ca, S, K, Fe dan Hg. Berdasarkan hasil tersebut, terlihat bahwa karbon (C) dan magnesium (Mg) di dalam tubuh *Tubifex* pada saat tidak dipapar hilang dan digantikan oleh sulfur (S), kalium (K), besi (Fe) dan merkuri (Hg) pada cacing yang dipapar. Hal ini mengindikasikan bahwa terjadi perubahan bentuk elemen-elemen yang ada di dalam tubuh cacing dan terjadi pertukaran ion. Pada saat setelah dipapar dengan merkuri, proses metabolisme di dalam tubuh cacing mengalami gangguan disebabkan adanya toksin yang masuk ke dalam tubuhnya.

Elemen-elemen tersebut merupakan elemen esensial yang dibutuhkan oleh organisme untuk proses metabolisme. Elemen Ca, P, Mg, Na dan K merupakan unsur mineral makro yang berperan penting dalam aktivitas fisiologis dan metabolisme tubuh (McDowell, 1992). Mineral mikro (Fe, Cu, Zn, Mn, Co) dibutuhkan hanya dalam jumlah kecil, apabila di dalam tubuh dalam jumlah besar dapat bersifat racun (Widodo, 2002). Sebagian elemen yang dapat menyebabkan keracunan antara lain elemen esensial (Cu, Zn, Se) dan non esensial (Hg, Pb dan As) (Darmono, 1995).

Berdasarkan hasil pengamatan EDX, cacing *Tubifex* yang tidak dipapar  $\text{HgCl}_2$  didominasi oleh elemen karbon (68,03%), diikuti oleh oksigen (18%), natrium (5,61%), Magnesium (1,96%), Pospor (1,15%), Kalsium (4,25%). Elemen-elemen tersebut

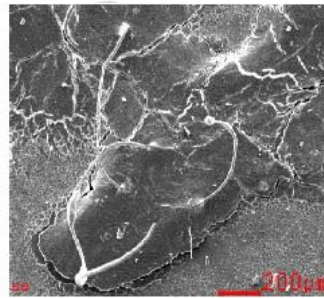
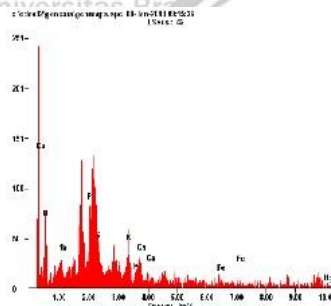
terdapat juga pada cacing yang tidak mengalami paparan. Namun pada cacing yang dipapar terdapat elemen sulfur (S), kalium (K) dan besi (Fe). Masing-masing elemen memiliki persentase yang berbeda-beda. Pada paparan akut maupun subkronis, jenis elemen sama, namun persentasenya berbeda. Besi (Fe) lebih rendah pada paparan subkronis dan magnesium (Mg) hanya pada cacing yang tidak dipapar. Besi (Fe) sebagai alat angkut elektron dalam sel, berperan dalam sistem enzimatik dan membantu fungsi otot. Magnesium (Mg) sebagai kofaktor enzim dan berperan dalam metabolisme karbohidrat dan lemak, membantu rileksasi otot. Besi (Fe) dan magnesium (Mg) menyebabkan penurunan absorpsi fosfor (P) (Piliang, 2002). Fosfor merupakan mineral kedua terbanyak dalam tubuh dengan distribusi menyerupai distribusi Ca. Fosfor (P) umumnya ditemukan dalam bentuk phospholipid, asam nukleat dan phosphoprotein. Kalium lebih tinggi pada paparan subkronis daripada akut, sedangkan kalsium lebih rendah. Kalsium berperan sebagai penyusun sel dan jaringan (McDonald *et al.*, 2002). Kalium berperan dalam metabolisme energi dan sintesis glikogen dan protein (Almastier, 2010).

Apabila dilihat dari persentase elemen dalam *Tubifex* menunjukkan bahwa masing-masing elemen mengalami perubahan dengan adanya perubahan konsentrasi  $HgCl_2$  dan lama paparan. Apabila ditinjau dari konsentrasi dan lama waktu paparan, pada paparan akut, konsentrasi  $HgCl_2$  yang digunakan lebih tinggi dan waktu paparan lebih singkat (48 jam) dibandingkan konsentrasi dan lama paparan pada subkronis (168 jam).



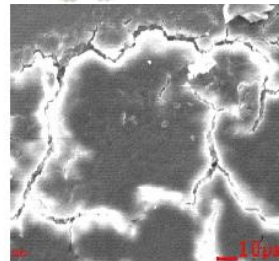
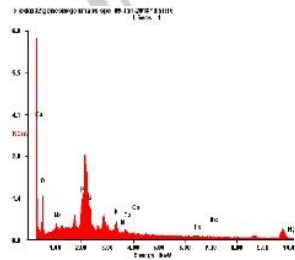
Element	Wt (%)	At (%)
C	68,03	77,72
O	18,00	15,44
Na	5,61	3,35
Mg	1,96	1,11
P	1,15	0,51
Ca	4,25	1,45

Gambar 50. Elemen-elemen pada *Tubifex* tanpa paparan merkuri. Gambar merupakan hasil pengamatan EDX.



ELEMENT	Wt (%)	At (%)
O	45,35	65,36
Na	07,33	7,35
P	12,28	9,14
Ca	06,91	3,97
S	09,17	6,59
K	09,13	5,38
Fe	03,58	1,48
Hg	06,27	0,72

Gambar 51. Elemen-elemen pada *Tubifex* yang dipapar merkuri dosis akut. Gambar merupakan hasil pengamatan EDX

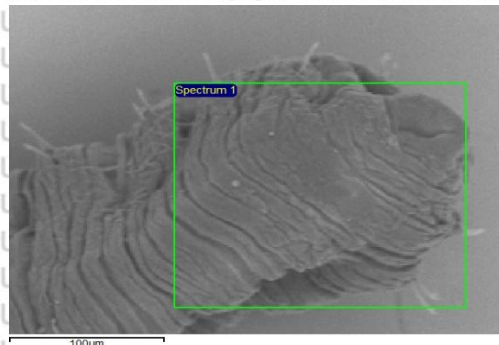


ELEMENT	Wt (%)	At (%)
O	33,38	59,64
Na	07,61	9,46
P	11,48	10,6
Ca	03,34	2,38
S	06,22	5,54
K	10,39	7,59
Fe	02,30	1,18
Hg	25,27	3,60

Gambar 52. Elemen-elemen pada *Tubifex* yang dipapar merkuri dosis subkronis. Gambar merupakan hasil pengamatan EDX.

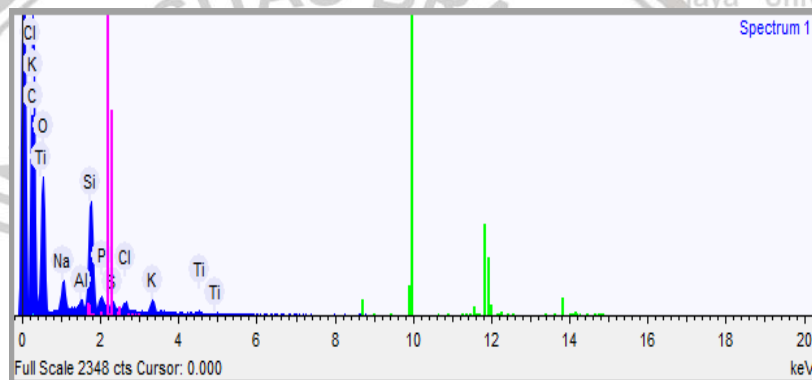
Pada paparan subkronis konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  yang digunakan rendah tetapi dilakukan berulang dengan jangka waktu paparan yang lama. Pada paparan subkronis, konsentrasi beberapa elemen mengalami perubahan konsentrasi yang cukup besar yaitu O, S dan Hg. Konsentrasi kedua elemen tersebut (O dan S) lebih tinggi pada paparan akut, kecuali merkuri. Hal ini terkait dengan konsentrasi dan waktu paparan, semakin tinggi konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  dan semakin lama paparan maka konsentrasi merkuri dalam *Tubifex* semakin tinggi. Namun untuk kedua elemen (O dan S) mengalami penurunan. Hal ini terkait dengan perubahan proses metabolisme dalam tubuh cacing karena masuknya merkuri ke dalam tubuh cacing. Sulfur merupakan komponen penting protein pada semua jaringan.

Pada bagian anterior cacing *Tubifex* tanpa paparan merkuri mengandung beberapa elemen (Gambar 53). Pada *Tubifex* yang dipapar  $\text{HgCl}_2$  menunjukkan perbedaan elemen yang terkandung di dalamnya. Pada cacing yang telah dipapar  $\text{HgCl}_2$  menunjukkan adanya elemen merkuri (Hg) dan zinc (Zn), yang tidak ada pada cacing tanpa paparan (Gambar 54).

Image Width: 321.0  $\mu\text{m}$ **Acquisition conditions:**

Acquisition time (s) 48.5 Process time 5

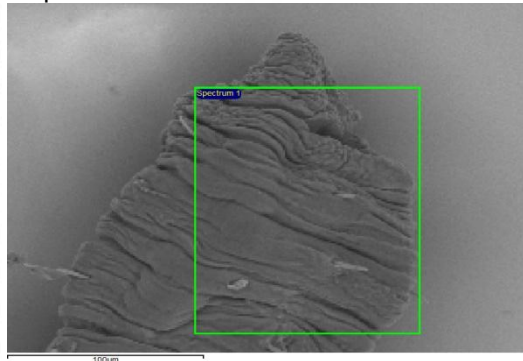
Accelerating voltage (kV): 15.0



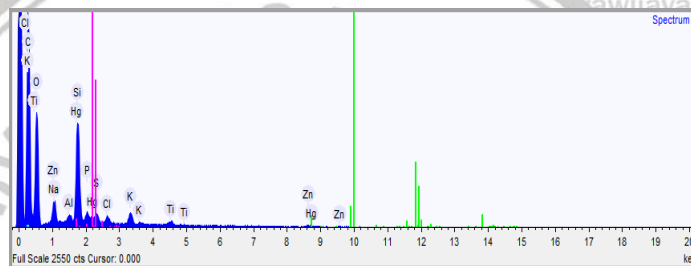
Element	Weight %
Carbon	53.230
Oxygen	37.604
Sodium	1.608
Aluminum	0.290
Silicon	4.570
Phosphorus	0.578
Sulfur	0.334
Chlorine	0.575
Potassium	0.891
Titanium	0.320

Gambar 53. Elemen-elemen pada *Tubifex* yang tidak dipapar merkuri.

Gambar merupakan hasil pengamatan SEM-EDX.

**Electron Image**Image Width: 267.5  $\mu\text{m}$ **Acquisition conditions**

Acquisition time (s): 91.5 ; Process time: 5; Accelerating voltage (kV): 15.0

**Summary result**

Element	Weight %
Carbon	51.075
Oxygen	37.670
Sodium	1.319
Aluminium	0.347
Silicon	5.303
Phosphorus	0.508
Sulfur	0.429
Chlorine	0.530
Potassium	1.044
Titanium	0.522
Zinc	0.889
Mercury	0.364

Gambar 54. Elemen-elemen pada *Tubifex* setelah 7 hari dipapar  $\text{HgCl}_2$ . Gambar merupakan hasil pengamatan SEM-EDX.

Berdasarkan hasil pengujian SEM-EDX, pada *Tubifex* yang tidak dipapar merkuri terkandung beberapa elemen (C, O, Na, Al, Si, P, S, Cl, K, dan Ti) dengan persentase berat yang didominasi oleh C dan O (Gambar 53). Elemen-elemen tersebut merupakan elemen organik esensial yang dibutuhkan oleh organisme dalam proses metabolisme tubuh. Sebagian elemen tersebut adalah elemen organik kecuali Al, Si

dan Ti. Aluminium (Al), Silikon(Si) dan Titanium (Ti) termasuk golongan metal yang dimanfaatkan oleh organisme.

Pada *Tubifex* yang dipapar  $HgCl_2$  ditemukan merkuri (Hg) dan zinc (Zn) yang tidak terkandung pada cacing tanpa paparan. Zinc atau biasa disebut dengan Seng merupakan mineral esensial yang sangat penting bagi tubuh dan membantu proses pertumbuhan (Hambidge and Krebs, 2007), sedangkan merkuri merupakan logam yang sangat toksik dan terakumulasi di dalam tubuh organisme (Pacyna *et al.*, 2010).

Pada saat merkuri masuk ke dalam tubuh organisme, maka akan mengganggu proses metabolisme. Di dalam tubuh, MT memiliki fungsi sebagai antioksidan dan berkaitan dengan homeostasis  $Zn^{2+}$ . MT dalam tubuh berikatan dengan  $Zn^{2+}$  dan membentuk Zn-MT. Ketika ada Hg masuk ke dalam tubuh, Zn-MT akan mengeluarkan fungsi lain seperti *neuroprotection*, mediator antiinflamasi dan *controlling cellular Zinc homeostasis*.(Chung *et al.*, 2008; Drozd *et al.*, 2018; Rice *et al.*, 2016). Dalam peranannya sebagai antioksidan, ketika sel mengalami stres akan menstimulasi peningkatan ROS dan oksidan lain dengan cara melepaskan Zinc (II) dari ikatannya (MT) dan akan membentuk fraksi Zinc (II) bebas dan MT mengikat Hg (Branislav *et al.*, 2013).

### 5.9 Deskripsi efek paparan merkuri pada *Tubifex*

Setelah tujuh hari paparan, persentase mortalitas tertinggi dari *Tubifex* dicapai pada dosis merkuri 100% dengan angka kematian hampir 100% dan mortalitas terendah pada 0%. Persentase kematian meningkat seiring dengan tingginya dosis merkuri. Hal ini bisa dibuktikan dengan tingginya konsentrasi merkuri dalam tubuh *Tubifex* pada dosis paparan yang lebih tinggi.

*Tubifex* memiliki kemampuan mentoleransi merkuri yang terserap ke tubuhnya.

Namun dari hasil penelitian, pada dosis tertinggi, *Tubifex* tidak dapat mentolerir merkuri

lebih dari 48 jam. Diperkirakan 48 jam adalah batas waktu untuk *Tubifex* bisa mentolerir paparan merkuri. Gupta (2012), menjelaskan bahwa distribusi merkuri organik setelah konsumsi ke kompartemen darah selesai dalam 30 jam. Kuantifikasi logam berat dalam tubuh organisme dapat melebihi batas kemampuan adaptasi individu (Yap *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012).

Merkuri adalah salah satu logam non-esensial yang mampu menginduksi sintesis MT (Roméo *et al.*, 2003; Amiard *et al.*, 2006). Umumnya, merkuri dibagi menjadi beberapa bentuk yaitu merkuri anorganik yang meliputi unsur atau logam merkuri ( $Hg^0$ ), mercurous ( $Hg^{2+}$ ), mercuric ( $Hg^{++}$ ) dan merkuri organik (Bernhoff *et al.*, 2012). Ketika logam merkuri menyebar ke ekosistem alami, ion logam akan menumpuk di dalam tubuh melalui penyerapan langsung atau tidak langsung melalui rantai makanan. Metabolisme logam berat di dalam tubuh organisme adalah faktor utama untuk menentukan toksisitas logam (Yoo *et al.*, 2002).

Metallothionein (MT) adalah protein dengan berat molekul rendah yang mampu mengikat logam yang didominasi oleh kelompok tiol (-SH) (Romero-Isart dan Vašák, 2002; Mieiro *et al.*, 2011). MT terdapat pada bakteri, tanaman, invertebrata, dan vertebrata (Henkel dan Krebs, 2004; Coyle *et al.*, 2002), dan berperan penting untuk melindungi sel dari paparan logam esensial dengan konsentrasi tinggi, serta berperan dalam detoksifikasi logam non-esensial seperti merkuri dan kadmium (Roesijadi, 1996; Viarengo *et al.*, 2000). Kemampuan ini terkait dengan proses detoksifikasi logam berat di dalam organisme yang mengeluarkan metallothionein (Hall, 2002).

Semua invertebrata air akan menyerap dan mengakumulasi logam di dalam tubuh baik dibutuhkan atau tidak untuk metabolisme (Rainbow, 2002). *Tubifex* adalah sejenis cacing air tawar termasuk Tubificid kelompok Oligochaeta yang hidup di permukaan air atau sedimen. *Tubifex* dapat menjadi bioindikator pencemaran bagi



organisme yang lebih tinggi dalam tingkatan trofik karena mampu hidup di lingkungan yang tercemar (Łuszczek-Trojnar *et al.*, 2014). Selain itu cacing *Tubificid* adalah bagian penting dari rantai makanan detritus yang berpotensi sebagai bio-akumulator logam berat dan digunakan sebagai organisme uji untuk sedimen *bioassay* (Amiard *et al.*, 2006).

Induksi MT tergantung pada durasi paparan dan konsentrasi logam Hamza-Chaffai *et al.* (1995). Dalam hal ini, akumulasi logam berat pada tubuh *Tubifex* terkait dengan total MT- Hg yang disintesis dalam tubuh cacing. Oleh karena MT- Hg memiliki fungsi sebagai pengikat ion logam Hg dan pada kondisi tertentu MT- Hg akan berhenti disintesis, sehingga ketika MT-Hg tidak lagi disintesis, saat itu merupakan kemampuan tertinggi dari *Tubifex* dalam membentuk MT-Hg. Pernyataan ini didukung oleh Carricavur *et al.* (2018), bahwa polychaetes yang dipapar oleh Cd menunjukkan kadar MT meningkat secara signifikan hanya pada 1.300 dan 2000 µgCd/L dibandingkan dengan kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan persentase mortalitas, konsentrasi merkuri dan MT-Hg di *Tubifex* tertinggi pada paparan subkronis dosis 100% dan terendah pada dosis 0%. Kadar MT-Hg tidak berbeda secara signifikan antara paparan dosis 100% dan 50%, namun persentase mortalitas dan konsentrasi merkuri di tubuh *Tubifex* secara signifikan berbeda pada 100% dibandingkan dengan semua perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian dapat diartikan bahwa kemampuan maksimal *Tubifex* dalam mensintesis MT-Hg yaitu pada dosis merkuri 50% paparan sub-kronis, dengan persentase mortalitas dan konsentrasi merkuri tertinggi pada dosis paparan 100%.

Merkuri adalah logam berat yang merupakan stressor untuk organisme akuatik. Berbagai stresor fisik, kimia, dan polusi dapat menyebabkan gangguan pensinyalan homeostatis seluler, kelangsungan hidup dan sel (Afanas'ev, 2010; Rocha *et al.*,

2010). Gangguan homeostatis seperti stimulasi pertumbuhan, pensinyalan dan kelangsungan hidup sel dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap stresor. Selain itu, berbagai stresor juga meningkatkan produksi antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione peroksidase (GPx) (Izyumova *et al.*, 2010)

Tubuh memproduksi enzim antioksidan internal untuk menetralkan berbagai stresor yang masuk ke dalam tubuhnya. Peningkatan kadar logam berat dalam tubuh organisme akuatik menyebabkan peningkatan kadar antioksidan internal karena tingkat radikal bebas juga meningkat. Kaonga *et al.* (2010), menjelaskan bahwa ketidakmampuan *T. tubifex* untuk mengakumulasi logam berat lain dapat dikaitkan dengan tingkat metabolisme dan buang air yang tinggi. Radikal bebas adalah produk reaksi yang dikatalisasi oleh logam. Radikal bebas diproduksi oleh neutrofil dan makrofag selama peradangan, dan merupakan produk sampingan dari rantai pernapasan mitokondria. Sementara itu, Superoksida dismutase (SOD) adalah enzim yang secara bergantian mengkatalisasi reduksi (atau partisi) radikal superoksida ( $O_2^*$ ) menjadi molekul oksigen ( $O_2$ ) atau hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), sedangkan katalase (CAT) dan glutathione peroxidase (GPx) merupakan enzim yang mengubah Hidrogen Peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  yang tidak berbahaya bagi sel organisme (Halliwell, 2006). Superoksida adalah produk sampingan dari metabolisme oksigen yang dapat menyebabkan kerusakan sel (Cadenas, 1989). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar SOD, CAT dan GPx pada *Tubifex* yang terpapar merkuri dosis subkronis tertinggi pada dosis 100% dan terendah pada dosis 0%. Hal ini terkait dengan kadar ROS pada *Tubifex* setelah paparan merkuri. Ketika stres oksidatif tinggi yang ditunjukkan tingginya kadar ROS maka terlihat terjadi peningkatan kadar SOD, CAT dan GPx.

Kondisi histologis *Tubifex* setelah paparan subkronis merkuri menunjukkan terjadi kerusakan pada lapisan epidermis terkait dengan sifat *Tubifex* yang melakukan pertukaran gas melalui kulit. Kerusakan juga terjadi pada sel kloragogen yang memiliki fungsi berkaitan dengan kekebalan tubuh cacing. Kerusakan jaringan tersebut menunjukkan bahwa tubuh cacing sedang mengalami tekanan dari lingkungan karena masuknya merkuri ke dalam tubuh. Setelah paparan subkronis selama 7 hari, jaringan pada cacing *Tubifex* menunjukkan tingkat kerusakan agak ringan sampai sedang, namun terlihat dengan semakin tingginya dosis paparan maka persentase kerusakan jaringan semakin meningkat. Hal ini terlihat pada persentase kerusakan pada paparan 100% yaitu sebesar 68,763%, lebih tinggi dari dosis lain.

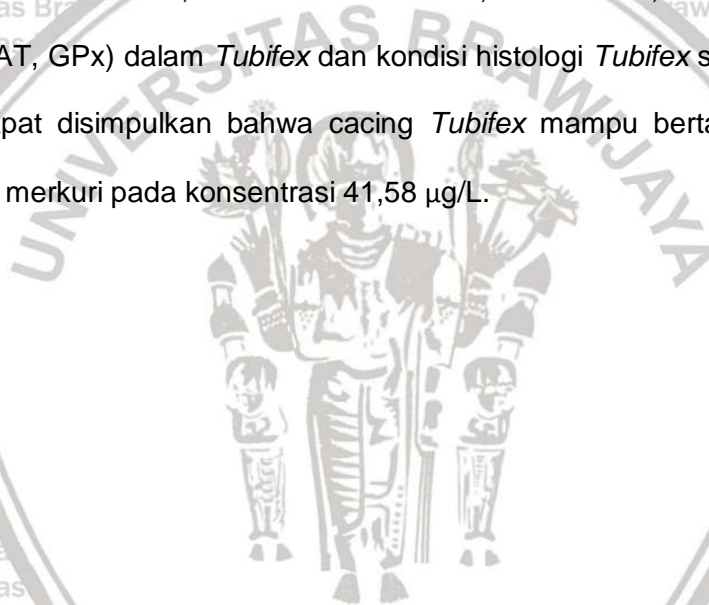
Pada saat *Tubifex* melakukan pertukaran gas, logam dalam air diserap ke dalam tubuh karena logam berat dapat masuk ke dalam jaringan tubuh organisme akuatik melalui beberapa jalur termasuk saluran pernapasan, pencernaan dan penetrasi kulit. Adsorpsi logam melalui saluran pernapasan biasanya cukup besar. Logam tersebut dibawa oleh darah yang kemudian didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh. Kerusakan jaringan tubuh disebabkan oleh akumulasi logam. Konsekuensi dari akumulasi logam berat adalah kerusakan fisik (degenerasi dan nekrosis) dan gangguan fisiologis (gangguan enzim dan metabolisme). Jamal *et al.* (2013), menjelaskan bahwa perubahan fisiologis, tanda-tanda keracunan, dan gejala seperti nekrosis dan klorosis yang disebabkan oleh tingginya kadar logam berat, dalam hal ini nikel dalam sedimen.

Merkuri merupakan salah satu logam berat yang sangat toksik tidak seharusnya terdapat di perairan karena banyak menimbulkan efek negatif terhadap organisme akuatik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 16% cacing *Tubifex* mampu bertahan hidup di air tercemar merkuri dengan dosis paparan 50% yang setara dengan

konsentrasi merkuri sebesar 41,58 µg/L. Namun, *Tubifex* yang masih hidup mengalami tekanan yang ditunjukkan dengan peningkatan kadar ROS dan kadar antioksidan internal (SOD, CAT dan GPx) sebagai respon adanya stres oksidatif. Selain itu, terjadi pula kerusakan jaringan pada *Tubifex*, namun masih dalam kondisi rusak agak ringan sampai sedang.

### 5.10 Kebaharuan Penelitian

Berdasarkan persentase mortalitas *Tubifex* yang dipapar merkuri, konsentrasi merkuri dalam *Tubifex*, kadar metalothionein, kadar ROS, kadar antioksidan internal (SOD, CAT, GPx) dalam *Tubifex* dan kondisi histologi *Tubifex* setelah paparan merkuri maka dapat disimpulkan bahwa cacing *Tubifex* mampu bertahan hidup di perairan tercemar merkuri pada konsentrasi 41,58 µg/L.



## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 KESIMPULAN

1. Konsentrasi logam merkuri (Hg) yang terdapat di aliran pembuangan limbah pengolahan emas telah melebihi ambang batas maksimum yang direkomendasikan dan terdeteksi terkandung di air, sedimen dan pada cacing *Tubifex* dengan konsentrasi tertinggi tepat pada sumber pembuangan limbah.

2. Cacing *Tubifex* mampu mentoleransi merkuri pada konsentrasi 83,16  $\mu\text{g/L}$  (LC<sub>50</sub> 48 jam). Persentase mortalitas dan konsentrasi merkuri pada cacing *Tubifex* berbanding lurus dengan konsentrasi merkuri di air.

3. Kadar MT, SOD, CAT dan GPx tinggi ketika konsentrasi merkuri meningkat. Kondisi histologi pada cacing yang dipapar merkuri (subkronis) menunjukkan terjadinya kerusakan setae, sel epidermis dan sel chloragogen serta terjadi atrofi, nekrosis dan vakuolasi dengan tingkat kerusakan agak ringan sampai sedang. *Tubifex* pada saat dipapar merkuri menunjukkan gerakan yang lebih aktif, cenderung memisahkan diri, mengeluarkan lendir lebih banyak dan terjadi fragmentasi tubuh.

### 6.2 SARAN

1. Perlu penelitian lanjutan berkaitan dengan perubahan bentuk (transformasi) merkuri dalam tubuh cacing *Tubifex* agar dapat digunakan sebagai agen bioremediasi

2. Perlu dilakukan penelitian berkaitan dengan pemanfaatan *Tubifex* sebagai bioremediator merkuri dalam perairan,

## DAFTAR PUSTAKA

Abdel-Baki A.S., Dkhil M.A. and Al-Quraishy S. 2011. Bioaccumulation of some heavy metals in tilapia fish relevant to their concentration in water and sediment of Wadi Hanifah, Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, 10(13), 2541–2547. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1772>

Adeyemo O.K. 2008. Histological alterations observed in the liver and brain of *Clarias gariepinus* exposed to chronic sublethal dose of lead. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(3), 105–114.

Afnas'ev I. 2010. Signaling by Reactive Oxygen and Nitrogen Species In Skin Diseases. *Current drug Metabolism*; 11, 409-414.

Agarwala P., Agarwala P., Reddy M. and Sopory S.K. 2006. The role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. *Plant Cell Rep*, 25(3), 1263–1274. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2011.0072>

Agus C., Sukandarrumidi and Wintolo D. 2005. The Impact of Liquid Waste of Gold Processing on the River Water Quality and the Method for Minimizing the Impnct by Using Zeolite Case Study of the Traditional Gold Mine in Jendi Wllage District Selogiri Wonogiri Sub Province Central Java Province, Indon. *Manusia Dan Lingkungan*, 12(1), 13–19.

Ahluwalia S.S. and Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243–2257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>

Alaerts G., and S.S Santika. 1984. Metode Penelitian Air. Usaha Nasional. Surabaya. Indonesia.

Almatsier S. 2010. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: Gramedia.

Almilia L.S. 2011. Analisa Komperasi Indeks Internet financial reporting Pada Website Perusahaan Go Publik di Indonesia. Seminar Nasional Aplikasi Teknologi Informasi (SNATI 2011)

Ames B.N. and Shigenaga M.K. 1992. Oxidants are a major contribution to aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663: 85-96.

American Public Health Association (APHA). 2005. Standard Methods for The examination of Water and Waste Water, 21<sup>st</sup> Edition. Eaton. ADLS Clesceri, Ew Rice., AE Greenberg (eds). APHA, American Water Works Associaion (AWWA), and Water Environment Federation (WEF), Washington DC.

Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J., and Rainbow P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>

Amin B. 2002. Distribusi logam berat Pb, Cu, dan Zn pada Sedimen-sedimen di perairan Telaga Tujuh Karimun Kepulauan Riau. *Jurnal Natur Indonesia* 5(1):9-16.

Angelica C. 2007. Investigation On The Morphological And Molecular Polymorphism Of *Tubifex* (Clitellata: Tubificidae) Species Complex. Fische E. Naturali Dipartimento Di Biologia Facoltà Di Scienze Matematiche, Università Degli Studi Di Milano.

Ann B. 2002. Dissolved Oxygen and the Water Quality Standards. *Washington State Department of Ecology*, (02).

Ashe, W.F., Largent, E.H., Dutra, F.F., Hubbard, D.M., and Blackstone, M. 1953. Behavior of mercury in the animal organism following inhalation. *AMA Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.* 7:19-43. [PubMed].

Astutik L.W. and Zulaika E. 2015. Medium yang Mengandung Logam Pb. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*, 4(1), 1–4.

Asztalos E., Italiano F., Milano F., Maróti P., and Trotta M. 2010. Early detection of mercury contamination by fluorescence induction of photosynthetic bacteria. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9(9), 1218–1223. <https://doi.org/10.1039/c0pp00040j>

Babich H. And G. Stotzky. 2001. Influence of Chemical Speciation On The Toxicity of Heavy Metals to The Mikrobiota. Dalam J.O. Nriagu 9eds). *Aquatic Toxicology A. Wiley Interscience Publication. New York p.* 1-46.

Badan Standardisasi Nasional. (2004). Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-6989.8-2004, Air dan air limbah-Bagian 8: Cara uji timbal (Pb) dengan Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)-nyala. *Ics 13.060.50*.

Banavathu S.N., Nageswara Rao N.R and Jagadish N.M., 2016. Acute toxicity of mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) on survival and behavioural responses of freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton). *International Journal of Fisheries and aquatic Studies* 2016; 4(5):323-327

Barceló A., Barbé F., de la Peña M., Vila M., Pérez G., Piérola J. and Agustí A.G.N. 2006. Antioxidant status in patients with sleep apnoea and impact of continuous positive airway pressure treatment. *European Respiratory Journal*, 27(4), 756–760. <https://doi.org/10.1183/09031936.06.00067605>

Barregard, L., Fabricius-Lagging E., Lundh T., Mölne J., Wallin M., Olausson M., dan Sallsten G. 2010. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex of living kidney donors: Impact of different exposure sources. *Environmental Research*, 110(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.10.010>.

Bartsch H., and Nair J. 2000. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: Markers for lipid peroxidation and oxidative stress. *Toxicology*, 153(1–3), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00307-3)

Bhattachayya A., Chattopadhyay R., Mitra S. And Crowe S.E. 2014. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev* 2014 94(2): 329-54 doi: 10.1152/physrev.00040.2012 [PubMed].

- Beldowski J., and Pempkowiak J. 2007. Mercury transformations in marine coastal sediments as derived from mercury concentration and speciation changes along source/sink transport pathway (Southern Baltic). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72(1-2), 370-378. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.10.007>
- Ben-Ozer E.Y., Allen J.R., McCabe M.J. and Randall G.W. 2000. Mercuric chloride damages cellular DNA by a non-apoptotic mechanism. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 470(1): 19-27.
- Bernhoff R.A. 2012. Mercury toxicity and treatment: a review of the literature. *Journal of environmental and public health*. 2012.
- Bettoso N., Acquavita A., Aietti A.D., and Mattassi G. 2013. The Marano and Grado Lagoon: a Brief Synopsis on the Aquatic Fauna and Fisheries Resources. *ANNALES Ser. Hist. Nat.*, 3(January), 135-142.
- Bhattacharya A.K., Mandal S.N., and Das S.K. 2009. Bioaccumulation of Zinc, Copper and Lead in Upper Stretch of Gangetic West Bengal. *Trends in Applied Sciences Research*, 2(6), 492-499. <https://doi.org/10.3923/tasr.2007.492.499>
- Bhattacharya A.K., Mandal S.N. and Das S.K. 2009. Heavy Metals Accumulation in Water, Sediment and Tissues of Different Edible Fishes in Upper Stretch of Gangetic West Bengal. *Trends in Applied Sciences Research*, 3(1), 61-68. <https://doi.org/10.3923/tasr.2008.61.68>.
- Binz P.A. and Kagi J.H.R. 2000. Metallothionein: molecular evolution classification. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkh"auser Verlag, Basel, 7-13.
- Biovison. 2009. Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit (Catalog K335-100). Linda Vista Avenue, Montain View. CA 94043 USA
- Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40, 1335-1351.
- Bouché M-L, Arnoult F, Vernet G. 2003. Caudal Regeneration in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) Following Copper Exposure. *Invertebrate Biology*, 122(1): 42-51. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/3227146> <http://www.jstor.org/stable/pdfplus/3227146.pdf>.
- Branislav Ruttkay-Nedecky , Lukas Nejdil , Jaromir Gumulec, Ondrej Zitka, Michal Masarik, Tomas Eckschlagler , Marie Stiborova , Vojtech Adam and Rene Kizek. 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 6044-6066; doi:10.3390/ijms14036044.
- Brković-Popović I, Popović M. 1977. Study on the toxicity of mercury, copper, zinc and trinitroresorcinol on *Lebistes reticulatus*. Short-term bio-assay-method of survival]. *Arh Hig Rada Toksikol.* 28(1):3-16. PubMed.gov. NCBI.
- Cadenas E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 79-110.



Carpenè E., Andreani G. and Isani G. 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(SUPPL. 1), 35–39. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.09.011>

Cairns B., Campagne M., van Bruggen N., Thibodeaux H. and Lowe D.G. 2018. Increased Binding Activity at an Antioxidant-Responsive Element in the Metallothionein-1 Promoter and Rapid Induction of Metallothionein-1 and -2 in Response to Cerebral Ischemia and Reperfusion. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5200–5207. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2014-05200.2000>

Carricavur, A. D., Boudet, L. C., Romero, M. B., Polizzi, P., Marcovecchio, J. E., and Gerpe, M. 2018. Toxicological responses of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute, subchronic and chronic exposure to cadmium. *Ecotoxicology and environmental safety*, 149, 217-224.

Cemeli E., Baumgartner A., and Anderson D. (2009). Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 681(1), 51–67. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.05.002>.

Chemical-Specific Health Consultation for Joint EPA/ATSDR National Mercury Cleanup Policy Workgroup Action Levels For Elemental Mercury Spills March 22, 2012. Prepared by Division of Toxicology and Environmental Medicine Prevention, Response and Medical Support Branch Emergency Response Team. Agency for toxic substances and disease registry.

Cherian M.G. and Goyer R.A. 1978. Minireview: Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity of metal. *Life Sci.* 23, 1–10.

Chen C.Y. and Folit C.L. 2000. Bioaccumulation and diminution of arsenic and lead in a freshwater food web. *Environ Sci Technol* 34: 3878-3884

Chen C.Y., Pickhardt P.C., Xu M.Q., and Folt C.L. 2008. Mercury and arsenic bioaccumulation and eutrophication in Baiyangdian Lake, China. *Water, Air, and Soil Pollution*, 149, 115-124.

Chen C.W., Chen C.-F., and Dong C.-D. 2012. Distribution and accumulation of mercury in sediments of Kaohsiung River Mouth, Taiwan. *APCBEE Procedia*, 1, 153-158.

Chung, R.S.; Hidalgo, J.; West, A.K. New insight into the molecular pathways of metallothionein-mediated neuroprotection and regeneration. *J. Neurochem.* 2008, 104, 14–20. [CrossRef] [PubMed]

Clean Water Team. (2004). Dissolved Oxygen Fact Sheet. *The Clean Water Team Guidance Compendium for Watershed Monitoring and Assessment*, 1–5. Retrieved from [http://www.waterboards.ca.gov/water\\_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3110en.pdf](http://www.waterboards.ca.gov/water_issues/programs/swamp/docs/cwt/guidance/3110en.pdf)

Ciutat A., Weber O., Gérino M., and Boudou A. 2006. Stratigraphic effects of tubificids in freshwater sediments: a kinetic study based on X-ray images and grain-size analysis. *Acta Oecologica*, 30(2), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.04.004>

Clarkson T.W. and Magos L. 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(8), 609–662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>.

Compeau G.C., and Bartha R. 1985. Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(2), 498–502.

Connell D.W. 2005. Basic Concepts of Environmental Chemistry. Second Edition. Taylor & Francis Group, LCC.

Connell D W and Miller J G 1995 Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran. Penerjemah Yanti Koestoer. Jakarta (ID): UI Press.

Cope W.G., Wiener J.G. and Rada R.G. 1990. Mercury accumulation in yellow perch in wisconsin seepage lakes: relation to lake characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 931–940. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090711>

Cotton A. and Geoffrey W. 1989. Kimia Anorganik Dasar. Penerjemah: Suhati Suharto. Pendamping: Yanti R.A. Koestoer. Cetakan Pertama. Jakarta. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).

Couillard Y., Campbell P.G.C. and Tessier A. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnology and Oceanography*, 38(2), 299–313. <https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.2.0299>

Coyle P., Philcox J., Carey L., and Rofe, A. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(4), 627-647.

Dallinger, R., & Hunziker, P. E. (2000). Metallothioneins in terrestrial invertebrates : Structural aspects , biological significance and implications for their use as biomarkers.

Das K., Siebert U., Gillet A., Dupont A., Di-Poï C., Fonfara, and De Pauw-Gillet M.C. 2008. Mercury immune toxicity in harbour seals: Links to in vitro toxicity. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-52>

Dafoe L.T., Rygh A.L., Yang B., Gingras M.K., and Pemberton S.G. 2011. a New Technique for Assessing Tubificid Burrowing Activities, and Recognition of Biogenic Grading Formed By These Oligochaetes. *Palaios*, 26(1), 66–80. <https://doi.org/10.2110/palo.2010.p10-023r>

Darmono. 1995. Logam dalam sistem biologi makhluk hidup. Universitas Indonesia Press. Jakarta. p 112.

Darmono. 2001. Lingkungan Hidup dan Pencemaran. UI-Press. Jakarta.

Das K., Siebert U., Gillet A., Dupont A., Di-Poï C., Fonfara S. and De Pauw-Gillet M.C. 2008. Mercury immune toxicity in harbour seals: Links to in vitro toxicity. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 7, 1–17. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-52>

- Dash H.R., Mangwani N. and Das S. 2014. Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2642–2653. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2206-8>
- Davidson P.W., Myers G.J., and Weiss B. 2004. Mercury Exposure and Child Development Outcomes. *Pediatrics*, 113(4), 1023–1029.
- Davies S.R. and Cousins R., 2000. Metallothionein expression in animal: a physiological perspective and function. *Rec. Adv. Nutri. Sci*, 1085– 1088.
- Delmas-Beauvieux M.C., Peuchant E., Couchouron A., Constans J., Sergeant C., Simonoff M., Pellegrin J.L., Leng B., Conri C., Clerc M., 1996. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1996 Dec;64(6):971.
- Dewi N.K., Purwanto and Sunoko H.R. 2014. Metallothionein in The Fish Liver as Biomarker of Cadmium ( Cd ) Pollution in Kaligarang River Semarang. *J. Manusia Dan Lingkungan*, 21(3), 304–309.
- Drozd, A.;Wojewska, D.; Peris-Díaz, M.D.; Jakimowicz, P.; Kr\_e zel, A. Crosstalk of the structural and zinc buffering properties of mammalian metallothionein-2. *Metallomics* 2018, 10, 595–613. [CrossRef] [PubMed]
- Duncan E.K.S. and Stillman M. 2006. The “magic numbers” of metallothionein. Literature Review (PDF Available) in *Metallomics* 3(5):444-63 · March 2011. DOI: 10.1039/c0mt00102c · Source: PubMed
- Duruibe J.O., Ogwuegbu M.O.C., and Egwurugwu J.N. 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *Int. J. Phys. Sci.*, 2(5), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.09.146>
- Effendi H. 2000. Telaahan Kualitas Air. Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB Bogor.
- Egli D., Dome`nech J., Selvaraj A., Balamurugan K., Hua H., Capdevila M., The four members of the Drosophila metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metals homeostasis and detoxification. *Genes Cell* 2006;11:647–58.
- Encyclopedia of Life, [eol.org/pages/620440/details](http://eol.org/pages/620440/details). 2016.
- Engelmann P., B. Opper, and P. Nemeth. 2011. Interactions of Intracellular Calcium and Immune Response in Earthworms. *Minireview. ISJ* 8: 78-84, 2011. ISSN 1824-307X.
- EPA. 2001. Parameters of Water Quality: Interpretation of Water Quality, 133.
- EPA. 2007. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry, 34.
- EPA. 2017. Biochemical Oxygen Demand (BOD)/ Chemical Oxygen Demand (COD), as an indicator of organic pollution, 1–25. Retrieved from [https://dec.vermont.gov/sites/dec/files/documents/wsmd\\_swms\\_Appendix\\_B\\_Pollutants.pdf](https://dec.vermont.gov/sites/dec/files/documents/wsmd_swms_Appendix_B_Pollutants.pdf).

EQS. 2006. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Priority Substance No.21 Mercury and its Compounds. CAS-No. 7439-97-6. 2006

Fergusson J. 1990. *The heavy elements : chemistry , environmental impact and health effects*. Oxford (England): Pergamon Press.

Finney D. J. 1971 *Probit analysis* Cambridge (GB): Cambridge Univ. Press.

Frank C.L. 1996. Basic toxicology – fundamentals, targets organs and risk assesment. Washington: Taylor & Francis

Fukuhara H. 1987. The effect of tubificids and chironomids on particle redistribution of lake sediment. *Ecological Research*, 2(3), 255–264. <https://doi.org/10.1007/BF02349778>

Gagnon C. And Fisher N.S. 1997. Bioavailability of sediment bound methyl and inorganic mercury to a marine bivalve. *Environ. Sci. Technol* 31: 993-998.

Gaur V.K., Gupta S.K., Pandey S.D., Gopal K. and Misra V. 2005. Distribution of heavy metals in sediment and water of river Gomti. *Environmental Monitoring and Assessment*, 102(1–3), 419–433. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-6395-6>

Ghosh A., Sil P.C. 2008. A protein from *Cajanus indicus* Spreng protects liver and kidney against mercuric chloride induced oxidative stress. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:1651-1658.

Giesy J.P., and Wiener J.G. 1997. Frequency distributions of trace metal concentrations in five freshwater fishes. *Trans Am Fish Soc* 106: 393-402.

Gilmour C.C. and Henry E.A. 1991. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution*, 71(2–4), 131–169. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90031-Q](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90031-Q)

Gillis, P.L., Reynoldson, T.B., Dixon, D.G., 2004. Natural variation in ametallothionein-like protein in *Tubifex tubifex* in the absence of metalexposure. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 58, 22–28.

Gooley G.J., Gavine F.M., Dalton W, De Silva S.S., Bretherton M., Samblebe, M. 2000. Feasibility of aquaculture in dairy manufacturing wastewater to enhance environmental performance and offset costs. Final Report DRDC Project No. MAF001. Marine and Freshwater Resources Institute, Snobs Creek.

Grandjean P., Satoh H., Murata K. and Eto K. 2010. Adverse effects of methylmercury: Environmental health research implications. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1137–1145. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901757>

Gupta, R.C. 2012. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*: Academic press.

Guthrie F. and Jerome J. 1980. *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier New York.

Hambidge, K. M. and Krebs, N. F. (2007). "Zinc deficiency: a special challenge". *J. Nutr.* 137: 1101. PMID 17374687.

- Hall J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1–11. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.366.1>
- Halliwell B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is.pdf. *Plant Physiology*, 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073.312>
- Handayani A., and Wuryanto. 1996. Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah. PPNY-BATAN, Yogyakarta.
- Hanson N. 2008. Does Fish Health Matter? The Utility of Biomarkers in Fish for environmental Assessment. Ph.D. Thesis Department of Plant and Environmental Sciences University of Gothenburg.
- Harahap S. 1991. Tingkat pencemaran air Kali Cakung ditinjau dari sifat fisika-kimia khususnya logam berat dan keanekaragaman jenis hewan benthos makro. IPB. 167 p.
- Harris H.H., Pickering I.J. and George G.N. 2003. The Chemical Form of Mercury in Fish – Supporting Online Material. *Science*, 301(August 2003), 1203–1203. <https://doi.org/10.1126/science.1085941>
- Hamelink J.L., Landrum P.F., Bergman H.L. and Benson W.H. 1994. Bioavailability : Physical, Chemical and Biological Interactions. Boca Raton F.L: Lewis Publishers.
- Hamza-Chaffai A., Cosson R., Amiard-Triquet C., and El Abed A. 1995. Physico-chemical forms of storage of metals (Cd, Cu and Zn) and metallothionein-like proteins in gills and liver of marine fish from the Tunisian coast: ecotoxicological consequences. *Comparative biochemistry and physiology part c: Pharmacology, toxicology and endocrinology*, 111(2), 329-341
- Hazra B., Sarkar R., Biswas S. and Mandal N. 2010. Comparative study of the antioxidant and reactive oxygen species scavenging properties in the extracts of the fruits of Terminalia chebula, Terminalia belerica and Emblica officinalis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10 (1), 2 - 15.
- He Z.L., Yang X.E., and Stoffella P.J. 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hendri M., Gusti D. and Jetun T. 2010. Konsentrasi Letal (LC50-48 jam) Logam Tembaga (Cu) dan Logam Kadmium (Cd) Terhadap Tingkat Mortalitas Juwana Kuda Laut (Hippocampus spp.). *Jurnal Penelitian Sains*. 13(1): 26-30.
- Henkel G., and Krebs B. 2004. Metallothioneins: zinc, cadmium, mercury, and copper thiolates and selenolates mimicking protein active site features—structural aspects and biological implications. *Chemical reviews*, 104(2), 801-824
- Herawati N., Suzuki S., Hayashi K., Rivai I. F., and Koyama H. 2000. Cadmium, Copper, and Zinc Levels in Rice and Soil of Japan, Indonesia, and China by Soil Type. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 64, 33–39.

- Hertika A.M.S., Kusriani K., Indrayani E., Yona D., and Putra R.B.D.S. 2019. Metallothionein expression on oysters (*Crassostrea cuculata* and *Crassostrea glomerata*) from the southern coastal region of East Java. *F1000Research*, 8(0), 56. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17381.1>
- Homa J., Oichawa E., Sturzenbaum S.R., Morgan A.J., Plytcycz B. 2005. Early-Phase Immunodetection of Metallothionein and Heat Shock Proteins in Extruded Earthworm Coleomyces After Dermal Exposure to Metal Ions. *Environmental Pollution* 135: 275-280. doi: 10.1016/j.envpol.2004.10.019.
- Hutagalung H.P. 1991. Pencemaran Laut Oleh Logam Berat dalam Beberapa Perairan Indonesia. Puslitbang. Oseanografi LIPI. Jakarta.
- Hutagalung H.P., D. Setia P., and Khozanah. 1997. Organochlorine, oil and heavy metals in Siak estuary, Riau, Indonesia. In Vigers, G., K.S. Ong, C. McPherson, N. Millson, I. Watson and A. Tang (eds). ASEAN Marine Environmental management: Quality Criteria and Monitoring for Aquatic Life and Human Health Protection. Proceedings of the ASEAN Canada Technical Conference on Marine Science (24 - 29 June 1996), Penang, Malaysia. EVS Environmental Consultants, North Vancouver and Department of Fisheries Malaysia. 817 pp.
- IADC/CEDA. 1997. International Association of Dredging Companies (IADC)/Central Dredging Association (CEDA), Environmental Aspects of Dredging. CEDA Secretariat, Radex Building, Rotterdamseweg 183c, 2629 HD Delft. The Netherlands (Investigation, Interpretation and Impact). ISBN 90-75254-08-3. <http://www.dredging.org/content.asp?pages8>.
- Ivanković D., Pavičić J., Erk M., Filipović-Marjić V. and Raspor B. 2005. Evaluation of the *Mytilus galloprovincialis* Lam. digestive gland metallothionein as a biomarker in a long-term field study: seasonal and spatial variability. *Marine Pollution Bulletin* 50:1303-1313.
- Izyumov D.S., Domnina L.V., Nepryakhina O.K., Avetisyan A.V., Golyshev S.A., Ivanova O. Y. and Chernyak B.V. 2010. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants — the “Skulachev-ion” derivatives. *Biochemistry (Moscow)*, 75(2), 123–129. <https://doi.org/10.1134/s000629791002001x>.
- Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B.B., and Beeregowda K.N. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- Jamal, Q., Durani P., Khan, K., Munir, S., Hussain, S., Munir, K., and Anees, M. 2013. Heavy metals accumulation and their toxic effects. *Journal of Bio-Molecular Sciences (JBMS)*, 1(1), 27-36.
- Jan, A. T., Murtaza, I., Ali, A., and Haq, Q.M.R. 2009. Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1529-1537.
- Jastrow J. D., Miller R. M. and Lussenhop J. (1998) Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biol. Biochem.* 30, 905–916.

Kanchana-aksorn W. and Petpiroon S. 2008. Study on *Limnodrilus hoffmeisteri* Population Response to Different Organic Enrichment in Laboratory Condition. *Proceedings*. Retrieved from [http://www.conference.phuket.psu.ac.th/proceedings/PSU\\_OPEN\\_WEEK\\_2008/data/sci/1\\_8-Study.pdf](http://www.conference.phuket.psu.ac.th/proceedings/PSU_OPEN_WEEK_2008/data/sci/1_8-Study.pdf)

Kaonga, C.C., J. Kumwenda and H.T. Mapoma, 2010. Accumulation of lead, cadmium, manganese, copper and zinc by sludge worms; *Tubifex tubifex* in sewage sludge. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 7: 119-126.

Karaca A., Engelmann P., Cooper E.L., Opper B. and Nemeth P. 2011. Biology of Earthworms Earthworm Innate Immune System. In *Soil Biology*, 24 # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011 (pp. 229-245). Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-14636-7>.

Kasterl J.L., Klump J.V., Meyerl J., Krezoskil J. and Smith M.E. 1984. Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparede (Tubificidae) using two different methods. *Hydrobiologia*, 111, 181-184.

Katzung B.G. 2007. Basic and Clinical Pharmacology. Book: 10th ed. Boston: McGraw Hill.

Kefer J.G., Argawal A. and Sabanegh E. 2009. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International journal of urology* 2009; 16: 49-57.

Kevin C., Kregel, Hannah J. and Zhang. 2006. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292:R18-R36

Khengarot B.S. 1991. Toxicity of Metals to a Freshwater Tubificid Worm , *Tubifex tubifex* ( Muller ). *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 46, 906-912.

Kim J.R., Yoon H.W., Kwon K.S., Lee S.R. and Rhee S.G. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Ann Biochem* 2000;283:214-21.

Kirby C.S., and Cravotta C.A. 2005. Net alkalinity and net acidity 1 : Theoretical considerations. *Applied Geochemistry*, 20, 1920-1940. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2005.07.002>

Klaaseen C.D., 2001. Casarett and Doull's Toxicology : The basic science of Poison, 6<sup>th</sup> Ed. Mc. Graw Hill. New York.

Klaassen C.D. 2009. Casarett And Doull ' s Toxicology, The Basic Science Of Toxicology, 1225-1226.

Koedrith P. and Y. R. Seo, 2011. "Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 12, pp. 9576-9595

Kohen R. and Nyska A. 2002. Oxidation of Biological System : Oxidative Stress Phenomena, Antioxidant, Redox Reaction and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 30:620-650.

Koorzeniewski, K. dan Neugabieuer, E. 1991. Heavy Metal Contamination in Fish The Polish Zone at Southern Baltic. *Mar. Poll. Bull.* 23: 687-689

Kosnett M.J. 2019. Chapter 57. Heavy Metal Intoxication & Chelators. *Basic & Clinical Pharmacology*, 1–29. Retrieved from [http://0-www.accessmedicine.com.library.lausys.georgetown.edu/popup.aspx?alD=4522897&print=yes\\_chapter](http://0-www.accessmedicine.com.library.lausys.georgetown.edu/popup.aspx?alD=4522897&print=yes_chapter).

Kovacic P. and Osuna Jr. 2005. Mechanisms of Anti-Cancer Agents Emphasis on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Current Pharmaceutical Design*, 6(3), 277–309. <https://doi.org/10.2174/1381612003401046>

Kunwar A. and Priyadarsini K. 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *Journal of Medical and Allied Sciences* 1 (2), 53 - 60.

Lafont M. 2001. A conceptual approach to the biomonitoring of freshwater: The Ecological Ambience System. *Journal of Limnology*, 60(SUPPL. 1), 17–24. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2001.s1.17>.

Lagauzere S., Raphaele T, Jean-Marc B. 2009. Ecotoxicity of Uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) Exposed to Contaminated sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (2009) 527-537

Laurenco J., Ana S., Fernando C., Joao O., Margarida M., Sonia M., Fernando G., Ruth P. 2011. Histopathological Changes In The Earthworm *Eisenia andrei* Associated With The Exposure To Mtals And Radionuclides. *Chemosphere* 85: 1630-1634. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.08.027

Leidy R.A. 2000. Threespine Stickleback. Baylands Ecosystem Species and Community Profiles Pages 118-120 in San Francisco Estuary Project c/o San Francisco Bay Regional Water Quality Control Board.

Leung K.M.Y., Svavarsson J., Crane M. and Morrirt D. 2002. Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). *Journal of experimental marine biology and ecology* 274 (2), 175-189.

Li X., Liu L., Wang Y., Luo G., Chen X., Yang X. and He X. 2012. Integrated assessment of heavy metal contamination in sediments from a coastal industrial basin, NE China. *PloS one*, 7(6), e39690.

Liu Y., Ma L., Li Y., and Zheng L. 2007. Evolution of heavy metal speciation during the aerobic composting process of sewage sludge. *Chemosphere*, 67(5), 1025–1032. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.10.056>.

Liu Y. 2017. Molecular Systematics of *Limnodrilus* (Annelida : Clitellata ). Sweden: University of Gothenburg.

Lotufo G.R. and Fleeger J.W. 1996. Toxicity of Sediment-Associated Pyrene and Phenanthrene To *Limnodrilus Hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(9), 1508–1516. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015<1508:tosapa>2.3.co;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015<1508:tosapa>2.3.co;2)

Louis A.H., Diana L.W., Patricia H., Elizabeth R.S. 1996. Pesticides and Aquatic Animals. Virginia Cooperative Extension, Virginia State University, Virginia. p24



Luoma S.N. and P.S. Rainbow. 2008. Metal contamination in aquatic environments: Science and lateral Management. Cambridge University press, UK. 556 p.

Lucan-Bouché M.L., Biagianti-Risbourg S., Arsac F. and Vernet G. 1999. An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquatic Toxicology*, 45(1), 9–17. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00091-5).

Łuszczek-Trojnar E., Sroka K., Klaczak A., Nowak M., and Popek W. 2014. Bioaccumulation and purification of cadmium in *Tubifex tubifex*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(4), 939-946.

Lutter R. and Elisabeth I., 2002. Mercury in the Environment : A Volatile Problem. This article was published in the November 2002 issue of Environment Vol. 44, No. 9: 24-40. Post with permission. *Heldref Publication*, 2002. [www.heldref.org/html/env.html](http://www.heldref.org/html/env.html)

Makker K., Agarwal A. and Sharma R. 2009. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Med Res*, 129(4), 357–367.

Mariom, Sharmin N.L. and Md. Fazlul A.M. 2016. Identification of genera of tubificid worms in Bangladesh through morphological study. *Asian J. Med. Biol. Res.*, 2 (1), 27-32; doi: 10.3329/ajmbr.v2i1.27565.

Matisoff G., Fisher J.B. and Matis S. 1985. Effects of benthic macroinvertebrates on the exchange of solutes between sediments and freshwater. *Hydrobiologia*, 122(1), 19–33. <https://doi.org/10.1007/BF00018956>

Matisoff G., Wang X. and McCall P.L. 1999. Biological redistribution of lake sediments by tubificid oligochaetes: *Branchiura sowerbyi* and *Limnodrilus hoffmeisteri/Tubifex tubifex*. *Journal of Great Lakes Research*, 25(1), 205–219. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(99\)70729-X](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(99)70729-X)

Meregalli G., A.C. Vermeullen and F. Ollivier. 2004. The Use of Chironomid in an Insitu Test for Sediment Toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Savety* 47:231-238.

Mermillod-Blondin F., Nogaro G., Datry, T., Malard F. and Gibert J. 2005. Do tubificid worms influence the fate of organic matter and pollutants in stormwater sediments? *Environmental Pollution*, 134(1), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.024>

Mccaffrey, S. (1995). Water Quality Parameters & Indicators. *Waterwatch New South Wales*, 0–3.

MacDonald P., Edwards R.A. and Greenhalg J.F.D. 2002. Animal Nutrition. 6th Edition. Longman, London and New York. 543p.

McDowell L.R. 1992. Minerals in animal and human nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition. Academic Press, San Diego. p524.

Merritt K.A. and Amirbahman A. 2009. Mercury methylation dynamics in estuarine and coastal marine environments - A critical review. *Earth-Science Review*. 96: 54-66.

Mieiro C., Bervoets L., Joosen S., Blust R., Duarte A., Pereira M., and Pacheco M. 2011. Metallothioneins failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish-Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere*, 85(1), 114-121

Mihaljevic, M., 1999. Mercury. In: C.P. Marshall & R.W. Fairbridge (Eds.), *Encyclopedia of Geochemistry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Germany, 387-389.

Miller T.G. 2007. *Living in The Environment : Principle, Connection and Solutions*, Singapore : Thompson books/Cole.

Miwa S., Beckman K.B. and Muller F.L. 2008. *Oxidative stress in aging : from model systems to human diseases*. Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/toc/fy0805/2007942719.html>

Mohiuddin K.M., Ogawa Y., Zakir H.M., Otomo K. and Shikazono N. 2011. Heavy metals contamination in water and sediments of an urban river in a developing country. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 8(4), 723–736. <https://doi.org/10.1007/bf03326257>.

Mosleh Y.Y, Paris-Palacios S, Ahmed M.T., Mahmood F.M., Osman M.A., Biagianti-Risbourg S. 2007. Effects of Chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Chemosphere* 67 (2007) 167-175.

Mosleh Y.Y, Paris-Palacios S, Biagianti-Risbourg S. 2006. Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms *Tubifex tubifex* (oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* Vol. 64, Issue 1. p121-128. Elsevier.

Mosleh YY, Michel C, Severine P, Sylvie B. 2004. Metallothionein induction in aquatic oligochaeta *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environmental Toxicology Wiley Periodicals, Inc* 88-93. doi: 10.3002/tox.10153.

Monperrus M., Tessier E., Amouroux D., Leynaert A., Huonnic P. and Donard O.F.X. 2007. Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 107(1), 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2007.01.018>

Morel F.M.M., Kraepiel A.M.L. and Amyot M. 2002. the Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1), 543–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.543>

Mueller M.J. 1997. Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant* 100: 653-663.

Murray RK, 2009. Sel Darah Merah dan Sel Darah Putih. . Dalam: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, editor. *Biokimia Harper*. Jakarta: EGC. p.636-52.

Murthy L.N., Mohan C.O., Ravishankar C.N., and Badonia R. 2013. Biochemical quality and heavy metal content of fish meal and squid meal produced in Veraval, Gujarat. *Indian J. Fish*, 60(3), 113–117.

Murtini J.T., Yennie Y., dan Ariyani F. 2003. Penelitian pencemaran logam berat di Selat Madura dan Selat Bali. Prosiding Seminar Nasional Perikanan Indo-nesia 2003. Sekolah Tinggi Perikanan. Jakarta. 1 : p. 83–93.

Naaz A., and Anshumali A. 2015. Seasonal Variation in Ph and Alkalinity of Groundwaters in Sidhi District, Central India. *Current World Environment*, 10(3), 1017–1021. <https://doi.org/10.12944/cwe.10.3.34>.

Nandan M., Sankhl, M.S., Kumar R., Agrawal P. and Kumari M. 2016. Heavy Metals Contamination in Water and their Hazardous Effect on Human Health-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(10), 759–766. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.510.082>.

Nazaruddin, Aliza D., Aisyah S., Zainuddin and Syafrizal. 1998. Gambaran Histopatologis Hepatopankreas Udang Windu ( *Penaeus monodon* ) Akibat Infeksi Virus Hepatopancreatica Parvovirus ( HPV ) Histopathological Changes of Tiger Shrimp ( *Penaeus monodon* ) Hepatopankreas infected. *Jurnal Kedokteran Hewan*, ISSN : 197, 27–29.

Nazarudin Z., Muhimmah I. and Fidiansih I. 2017. Segmentasi Citra untuk Menentukan Skor Kerusakan Hati secara Histologi. *Seminar Nasional Informatika Medis (SNIMed) VIII*, 15, 15–21.

Nogaro G., Mermillod-Blondin F., Montuelle B., Boisson J.C., Lafont M., Volat B. and Gibert, J. 2007. Do tubificid worms influence organic matter processing and fate of pollutants in stormwater sediments deposited at the surface of infiltration systems? *Chemosphere*, 70(2), 315–328. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.002>

OECD, 2001. OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method.

OECD 423. 2001. OECD 420. Acute Oral Toxicity, Acute Toxic Class Method. *OECD Guideline for Testing of Chemicals*, (December), 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>

Osmond, D. L., Gannon, R. W., Gale, J. A., Line, D. E., Knott, C. B., Phillips, K. A., and Spooner, J. 1997. WATERSHEDSS: A decision support system for watershed-scale nonpoint source water quality problems. *Journal of the American Water Resources Association*, 33(2), 327–341. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1997.tb03513.x>

Oztetik E., Cicek A. and Arslan N. 2013. Early antioxidative defence responses in the aquatic worms (*Limnodrilus* sp.) in Porsuk Creek in Eskisehir (Turkey). *Toxicology and Industrial Health*, 29(6), 541–554. <https://doi.org/10.1177/0748233712442734>.

Pacyna, E. G., Pacyna, J. M., Sundseth, K., Munthe, J., Kindbom, K., Wilson, S., and Maxson, P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment*, 44(20), 2487–2499. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.06.009>

Palar H. 2008. Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat. Rineka Cipta, Jakarta.

- Pan K. and Wang W.X. 2012. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. *Sci. Total Environ.* 2012. 421: 3-16. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.03.013 [PubMed].
- Patra M. and Sharma A. 2000. Mercury Toxicity in Plants. *The Botanical Review*, 66(379-422).
- Paris-Palacios S, Mosleh YY, Almohamad M, Delahaut L, Conrad A, Arnoult F, Biagianni-Risbourg S. 2010. Toxic effects and bioaccumulation of the herbicide isoproturon in *Tubifex tubifex* (Oligochaete, Tubificidae): A study of significance of autotomy and its utility as a biomarker. *Aquatic Toxicology* 98: 8-14.
- Pennak R.W. 1978. *Freshwater Invertebrates of United States* 2 nd.
- Peraturan Pemerintah Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran.
- Pinder A.M. and Ohtaka A. 2014. Annelida : Clitellata, Oligochaeta. In *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/233727100>
- Pinkus R., Weiner L.M., Daniel V. Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-k B, and glutathione S-transferase gene expression. *J Biol Chem* 1996;271:13422-9.
- Plaa G.L. 2007. Introduction to Toxicology : Occupational & Environmental in Katzung B.G. (ed) : Basic & Clinical Pharmacology, 10<sup>th</sup> Ed (International Ed), Boston, New Yoork : Mc Graw Hill p. 958-970.
- Priambodo K. and T. Wahyuningsih. 2001. Budidaya Pakan Alami untuk Ikan. PT Penebar Swadaya, Jakarta.
- Purnawan S., Rismawati S. dan Prismawiryanti. 2013, Distribusi logam merkuri pada sedimen laut di sekitar muara sungai Poboya, *Online Jurnal of Natural Science* Vol. 2 (1); 18-24).
- Ragi M.S. and Jaya D.S. 2014. Distribution and Diversity of Oligochaetes in Selected Ponds of Thiruvananthapuram District, Kerala, South India. *Advances in Ecology, 2014*, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/138360>
- Rahman M.A. 2017. Bioaccumulation and toxicity of cadmium, chromium and lead to live fish food , the tubificid worms ( *Tubifex* spp .). Department of Fisheries, University of Dhaka Bangladesh.
- Rainbow, P. S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, 120(3), 497-507
- Rand G.M. and Petrocelli, S.R. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application. Washington DC (US): Hemisphere Publishing Cooperation.
- Rathore R.S. and Khangarot B.S. 2002. Effects of Temperature on sensitivity of sludge worm *Tubifex tubifex* Müller to selected heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 2002 53(1): 27-36 [PubMed].
- Ravichandran M. 2004. Interactions Between Mercury and Dissolved Organic Matter A Review. *J. Chemosphere* 55 : 319-331

- Raivel, Syarfina, Puspita D., Apriajum M. and Endang P. 2016. Analisis kadar zat merkuri yang digunakan pada area tambang emas rakyat desa wumbubangka kecamatan rarowatu utara kabupaten bombana provpinsi sulawesi tenggara. *Proceeding Seminar Nasional Kebumian Ke-9*.
- Rhani H.C. 2012. Faktor – Faktor Yang Berhubungan Dengan Kadar Merkuri (Hg) Pada Tanah Pemukiman Warga Di Sekitar Lokasi Penambangan Emas Tradisional (Studi Kasus Di Desa Jendi, Kecamatan Selogiri, Kabupaten Wonogiri, Provinsi Jawa Tengah). *Fkm Undip*, 1.
- Reynoldson T.B., Thompson S.P. and Bamsey J.L. 1991. A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm *Tubifex tubifex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(8), 1061–1072. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100811>.
- Rice, J.M.; Zweifach, A.; Lynes, M.A. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4(+) T cell activation. *BMC Immunol*. 2016, 17, 13. [CrossRef]
- Rocha, M., Mijares A.H., Malpartida, K.G. 2010. Mitochondria-Targeted Antioxidant Peptides Current Pharmaceutical design; 16, 3124-3131).
- Rodriguez P. and Reynoldson T.B. 2011. *The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes. The Pollution Biology of Aquatic Oligochaetes*. © Springer Science+Business Media B.V. 2011. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1718-3>.
- Roesijadi. (2013). Metallothionein Induction as Response to Metal Exposure Animals G . Roesijadi a Measure in Aquatic of. *Environmental Health Perspectives*, 102(Suppl. 12), 91–95. Retrieved from <http://ehp.niehs.nih.gov/members/1994/Suppl-12/91-96roesijadi/roesijadi-full.html>
- Roesijadi G. 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative biochemistry and physiology part c: Pharmacology, toxicology and endocrinology*, 113(2), 117-123.
- Roesijadi G. 1999. The basis for increased metallothionein in a natural population of *Crassostrea virginica*. *Biomarkers*, 4(6), 467–472.
- Roesijadi G. and Fowler B.A. 1991. Purification of Invertebrate Metallothioneins. *Methods in Enzymology*, 205(C), 263–273. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)05106-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)05106-6)
- Rochayatun E., Edward dan Rozak A. 2003 . Kandungan Logam Berat Pb, Cd, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn dan Fe Dalam Air Laut dan Sedimen Di Perairan Kalimantan Timur . *Jurnal Oseanologi dan Limnologi*, (Online), 35 (1): 51-71. Amin B. 2002. Distribusi logam berat Pb, Cu, dan Zn pada Sedimen-sedimen di perairan Telaga Tujuh Karimun Kepulauan Riau. *Jurnal Natur Indonesia* 5(1):9-16.

Roméo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., and Girard, J. P. 2003. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 122(3), 369-378.

Romero-Isart, N., and Vašák M. 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *Journal of inorganic biochemistry*, 88(3-4), 388-396.

Rothenberg S.E., Rf. Ambrose and J.A. Jay. 2008. Mercury cycling in surface water, pore water and sediments of Mugu Lagoon, CA, USA. *Environmental Pollution*. 154:32-45.

Ruttkay-Nedecky B, Lukas N, Jaromir G, Ondrej Z, Michal M, Tomas E, Marie S, Vojtech A and Rene K. 2013. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int.J.Mol.Sci*, 14, 6044-6066. doi: 10.3390/ijms14036044.

Sahara E. 2009. Distribusi Pb dan Cu pada Berbagai Ukuran Partikel Sedimen di Pelabuhan Benoa. *Jurnal Kimia* 3 (2) : 75-80 hlm.

Saint-Denis M, Fabrot F, Narbonne JF, Ribera D. Glutathione, glutathione related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 1998; 35: 602–614.

Sani, U. 2011. Determination of some heavy metals concentration in the tissues of Tilapia and Catfishes. *Biokemistri*, 23(2), 73–80.

Schisler N. J., and Singh, S. M. (1991). A quantitative genetic analysis of tissue-specific catalase activity in *Mus musculus*. *Biochemical Genetics*, 29(1–2), 65–89. <https://doi.org/10.1007/BF00578241>

Serafim M.A. Company R.M., Bebianno M.J. and Langston W.J. 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar Environ Res.* 2002 Sep-Dec;54(3-5):361-5.

Setiawati M.D. 2009. Uji Toksisitas Kadmium Dan Timbal Pada Mikroalga *Chaetoceros gracilis*.

Setijaningsih L. 2010. Pencemaran logam berat di perairan waduk cirata Jawa Barat. *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V*:681-690

Shanmugam A., Palpandi C. and Kesavan K. 2007. Bioaccumulation of Some Trace Metals (Mg, Fe, Zn, Cu) from Begger's Bowl Cymbium melo (Solander, 1786) (A Marine Neogastropod). *Research Journal of Environmental Sciences*, 1(4), 191–195. <https://doi.org/10.3923/rjes.2007.191.195>.

Shi J., Zhang G., Jiang G., and Li X. 2010. Mercury profiles in sediments of the Pearl River Estuary and the surrounding coastal area of South China. *Environmental Pollution*, 158(5), 1974–1979. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.01.033>.

Siagian D. dan Sugiarto. 2000. Metode Statistika; Untuk Bisnis dan Ekonomi. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.

- Sies H. 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine*, 91(3 SUPPL. 3), 31–38. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
- Simons, M., and Raposo, G. 2009. Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007>
- Singh R. and Rustagi N. 2010. Mercury and health care. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 14(2), 45–48. <https://doi.org/10.4103/0019-5278.72240>
- Siregar Y.I., Zamri A. dan Putra H., 2012. Penyerapan Timbal (Pb) pada Sistem Organ Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.). *Jurnal Ilmu Lingkungan*,
- Siregar T.H. and Murtini J.T. 2008. Kandungan Logam Berat pada Beberapa Lokasi Perairan Indonesia pada Tahun 2001 sampai dengan 2005. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*, 3(1), 7–15. <https://doi.org/10.15578/squalen.v3i1.165>.
- Soegianto, A., 2007. "Trace Metal Concentrations in Shrimp and Fish Collected from Gresik Coastal Waters , Indonesia," vol. 33, pp. 235–238, 2007
- Soemirat J. 2005. Toksikologi Lingkungan. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Soemirat, J. 2017. Toksikologi Lingkungan ISBN 978-979-420-976-9 UGM Press Univrsity Publisher Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. p 222.
- Soemirat J. and Ariesyadi H.D. 2017. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta, Indonesia: UGM Press Universitas Gadjah Mada. Retrieved from <http://ugmpress.ugm.ac.id/id/product/lingkungan/toksikologi-lingkungan>
- Sorensen E.M. 1991. Metal Poisoning in Fish, CRC Press., 285-328.
- Stone R.G. 1933. The effects of X-Rays on anterior regeneration in *Tubifex tubifex*. *Journal of Morphology* Vol 54 no 2 1933:303-320.
- Suhendrayatna. 2001. Bioremoval Logam Berat Dengan Menggunakan Mikroorganisme: Suatu Kajian Kepustakaan. *Seminar On-Air Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21*, 1-14 Februari 2001.
- Supriharyono. 2009. Konservasi Ekosistem Sumberdaya Hayati, Penerbit Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Sutherland D.E.K. and Stillman M.J. 2011. The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics*, 3(5), 444–463. <https://doi.org/10.1039/c0mt00102c>
- Sunu P. 2001. Melindungi lingkungan dengan menerapkan ISO 1400. PT. Gramedia Widia Sarana Indonesia. Jakarta.
- Sumah Y. And Aunurohim. 2013. Bioakumulasi logam berat timbal 9PB) dn hubungannya dengan laju pertumbuhan ikan mujair (*Oreochromis mossambicus*). *Jurnal Sains dan Seni POMITS* Vo. 2, No. 2 (2013) 2337-3520 (2301-928X Print).

Timm T. and Veldhuijzen van Zanten H.H. 2006. Freshwater Oligochaeta of North-West Europe. The World Biodiversity Database, Interactive identification system for the European limnofauna, CD-ROM Series, Biodiversity Center of ETI, Multimedia Interactive Software, Macintosh & Windows Version 1.0. Amsterdam.

Tomson M.B., Kan A.T., Fu G. and Cong L. 2006. Measurement of Total Alkalinity and Carboxylic Acid and Their Relation to Scaling and Corrosion. *SPE Journal*, 11(01), 103–110. <https://doi.org/10.2118/87449-pa>.

Toppo S., Flohé L., Ursini F., Vanin S. and Maiorino M. 2009. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(11), 1486–1500. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.04.007>

Thornalley P.J. and Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Acta* 827: 36-44.

Turan B. 2010. Role of Antioxidants in Redox Regulation of Diabetic Cardiovascular Complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(8), 819–836. <https://doi.org/10.2174/138920110793262123>

Trush M.A. 2008. Absorption, Distribution and Excretion. Bloomberg School of Public Health. John Hopkins.

UNEP ANNUAL REPORT FOR 2002. United Nations Environment Programme (2002) URI: <http://hdl.handle.net/20.500.11822/8556>

Ungvari Z., Csiszar, A., Edwards, J. G., Kaminski, P. M., Wolin, M. S., Kaley, G. and Koller, A. 2003. Increased Superoxide Production in Coronary Arteries in Hyperhomocysteinemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(3), 418–424. <https://doi.org/10.1161/01.atv.0000061735.85377.40>

United States Environmental Protection Agency. 2010. Mercury Study Report to Congress: Overview. *Mercury Study Report to Congress, I*, 4. Retrieved from <http://www.epa.gov/hg/reportover.htm>

US EPA United States Environmental Protection Agency. 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms: Fifth Edition. *Epa/821/R02/012*, (October), 266. <https://doi.org/Fifth Edition October 2002>

Tyler G.M.J., and Spollman S.E. 2009. *Living in the Environment Concept, Connections, and Solutions* (Sixteenth). 10 Davis Drive Belmont, CA 94002-3098 USA. Retrieved from [https://www.legalaid.nsw.gov.au/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0017/22445/CLSP-Guidelines.pdf](https://www.legalaid.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0017/22445/CLSP-Guidelines.pdf)

United States Environmental Protection Agency. 2010. Mercury Study Report to Congress: Overview. *Mercury Study Report to Congress, I*, 4. Retrieved from <http://www.epa.gov/hg/reportover.htm>.



- Vahter M.A., Kesson A., Lind B., Bjo'rs U., Schu'tz A., Berglund M. 2000. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ Res Section A*. 2000; 84:186-194.
- Valko M., Morris, H., and Cronin, M. T. D. 2005. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.*, 12:1161–1208.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. and Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- van Der Geest H.G., Greve G.D., de Haaas E.M., Scheper B.B., Kraak M.H.S., Stuijzand S.C., Augustijn K.H. and Admiral W., 1999. Survival and Behavioural Responses of Larvae of the Caddisfly *Hydropsyche angustipennis* to copper and Diazinon. *Environ. Toxic. Chem.*, Vol.18, No. 9, pp. 1965-1971.
- Veal E., Day A.M. and Morgan B.A. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 26(1), 1–14. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_8)
- Velásquez L. and Dussan J. 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 713–716. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.044>.
- Vetriani C., Chew Y.S., Miller S.M., Yagi J., Coombs J., Lutz R.A. and Barkay T. 2005. Mercury Adaptation among Bacteria from a Deep-Sea Hydrothermal Vent. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 220–226. <https://doi.org/10.1128/aem.71.1.220-226.2005>
- Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., and Panfoli I. (2000). Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 46(2), 407-417
- Viarengo A., Burlando B., Dondero F., Arro A.M. and Fabbri R. 2002. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers*, 4(6), 455–466. <https://doi.org/10.1080/135475099230615>
- Vincent K. 2008. Probit Analysis <http://userwww.sfsu.edu/probit/ProbitAnalysis.pdf>
- Vivien R., Tixier G. and Lafont M. 2014. Use of oligochaete communities for assessing the quality of sediments in watercourses of the Geneva area (Switzerland) and Artois-Picardie basin (France): Proposition of heavy metal toxicity thresholds. *Ecohydrology and Hydrobiology*, 14(2), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.ecohyd.2014.03.003>
- Vorob'ev D.S., Frank Y.A., Lushnikov S.V., Zaloznyi N.A. and Noskov Y.A. 2010. Oil decontamination of bottom sediments using *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: Tubificidae). *Contemporary Problems of Ecology*, 3(1), 15–18. <https://doi.org/10.1134/s1995425510010042>.

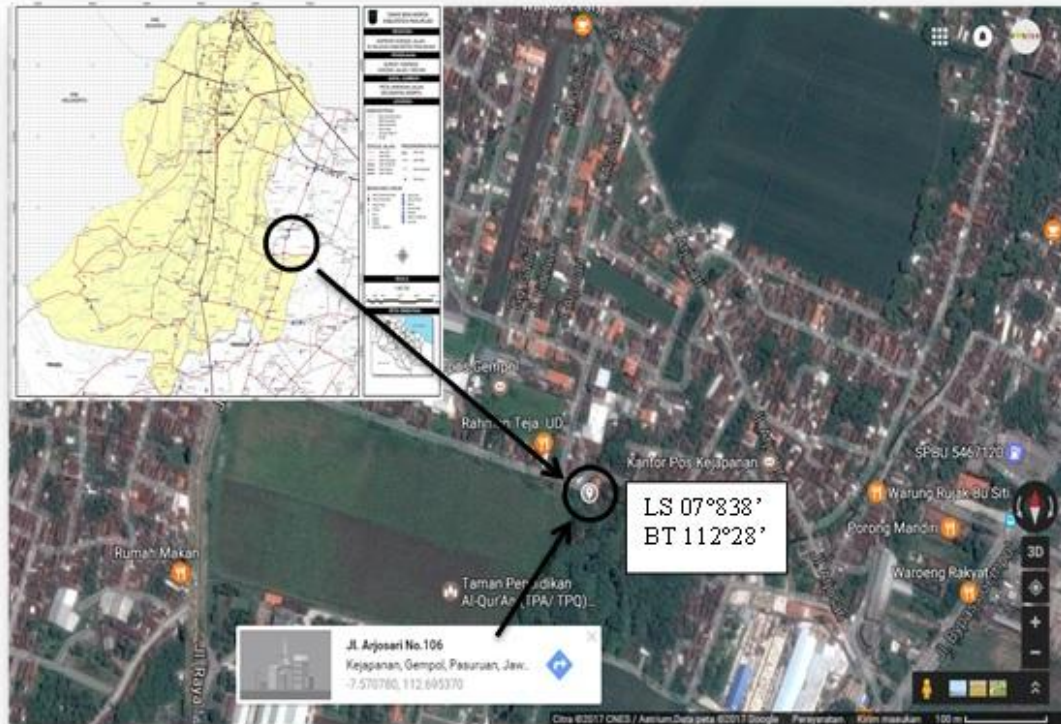
- Vytlačilova J., Chobot V., Laakso I. and Vuorela P. 2004. *Tubifex tubifex* MÜLL. ? Photosensitive Organism. *Cent Eur J Publ Healt*, 12(6), 89–93.
- Wang, Z., Zhang, L., Gu, X., Shen, Q., Fan, C., Shen, J., & Shang, J. 2010. Impact of different benthic animals on phosphorus dynamics across the sediment-water interface. *Journal of Environmental Sciences*, 22(11), 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(09\)60305-3](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(09)60305-3)
- Wang S. and Shi X. 2001. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222, 3–9.
- Wang, Z., Zhang, L., Gu, X., Shen, Q., Fan, C., Shen, J., & Shang, J. 2010. Impact of different benthic animals on phosphorus dynamics across the sediment-water interface. *Journal of Environmental Sciences*, 22(11), 1674–1682. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(09\)60305-3](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(09)60305-3)
- Wardhana W.A. 2004. Dampak Pencemaran Lingkungan. Edisi Revisi. Penerbit Andi Offset, Yogyakarta.
- Wiederholm T. and Dave G. 1989. Toxicity of metal polluted sediments to *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Hydrobiologia* 176/177, 176(177), 411–417.
- Widayati E. 2012. Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant Eni. *Majalah Ilmiah Sultan Agung*, 50(128), 26–32.
- Widiastuti, I. M., Hertika, A. M. S., Musa, M., & Arfiati, D. 2019. the Determination of Heavy Metals in Water Flowed With Metal Washing Waste. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 87(3), 116–124. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2019-03.15>
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas Main*. Jakarta Indonesia: Kanisius. Retrieved from [http://pustaka.poltekkes-pdg.ac.id:80/index.php?p=show\\_detail&id=1645](http://pustaka.poltekkes-pdg.ac.id:80/index.php?p=show_detail&id=1645) [http://pustaka.poltekkes-%0Apdg.ac.id:80/images/docs/Antioksidan\\_alami\\_%26\\_radikal\\_bebas\\_002.jpg.jpg](http://pustaka.poltekkes-%0Apdg.ac.id:80/images/docs/Antioksidan_alami_%26_radikal_bebas_002.jpg.jpg)
- Winfrey R. and Rudd W.M. 1990. Formation of methylmercury in low pH lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9, 853–869.
- Wiener J.G., Krabbenhoft D.P., Heinz G.H. and Scheuhammer A.M., 2003. Ecotoxicology of Mercury. In : Handbook of Ecotoxicology (D.J. Hoffman, B.A. Rattner., G.A. Burton, Jr. And J. Cairns, eds), 2<sup>nd</sup> edn, pp 409-464, CRC Press, Boca raton, FL.
- Winter H. 1982 . The hazards of cadmium in man and animals. *J. App. Toxicol.* 2(2) :61-67 Hutagalung H.P., D. Setiapermana and Khozanah. 1997. Organochlorine, oil and heavy metals in Siak estuary, Riau, Indonesia. In Vigers, G., K.S. Ong, C. McPherson, N. Millson, I. Watson and A. Tang (eds). ASEAN Marine Environmental management: Quality Criteria and Monitoring for Aquatic Life and Human Health Protection. Proceedings of the ASEAN Canada Technical Conference on Marine Science (24 - 29 June 1996), Penang, Malaysia. EVS Environmental Consultants, North Vancouver and Department of Fisheries Malaysia. 817 pp.
- Whitgott J., and Brennan S., 2007. Environment : The Science Behind the stories. San Fransisco; Pearson Benjamin Cummings

- Woodward G. 2009. Biodiversity, ecosystem functioning and food webs in fresh waters: Assembling the jigsaw puzzle. *Freshwater Biology*, 54(10), 2171–2187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02081.x>.
- Wulandari D.D., Andini A. and Puspitasari A. 2018. Determination Of Mercury (Hg) and Cadmium (Cd) in Cosmetic with Atomic Absorption Spectroscopy(AAS). *Journal of Medical Laboratory Science/Technology*, 1(2), 103–110.
- Yang S.W., Yan Z.G., Xu F.F., Wang S.R. and Wu F.C. 2012. Development of freshwater aquatic life criteria for Tetrabromobisphenol A in China. *Environmental Pollution*, 169, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.023>
- Yap, C., Ismail, A., and Tan, S. 2009. Effect of body size on heavy metal contents and concentrations in green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) from Malaysian coastal waters. *Pertanika J. Sci. & Technol*, 17(1), 61–68.
- Ye, B.-J., Kim, B.-G., Jeon, M.-J., Kim, S.-Y., Kim, H.-C., Jang, T.-W., and Hong, Y.-S. 2016. Evaluation of mercury exposure level, clinical diagnosis and treatment for mercury intoxication. *Annals of occupational and environmental medicine*, 28(1), 5.
- Yilmaz M., Gül A. and Karaköse E. 2004. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere*, 56(4), 375–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.067>
- Yoo, H., Lee, H., and Jeong, W., 2002. Prreparation of ion exchanger from waste paper cup and removal characteristics of heavy metals. *Journal od Kor. Environ Si*, 11, 993–999.
- Yorulmaziar E. And A. Gul. 2003. Investigation of acute toxicity of cadmium sulfate ( $\text{CdSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) and behavioral changes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus* Val, 1844). *Chemosphere*. 53: 1005–1010.
- Zangger K., Shen G., Öz G., Otvos J.D. and Armitage I.M. 2015. Oxidative dimerization in metallothionein is a result of intermolecular disulphide bonds between cysteines in the  $\alpha$ -domain. *Biochemical Journal*, 359(2), 353–360. <https://doi.org/10.1042/bj3590353>.
- Zhang L., Lyman S., Mao H., Lin C.J., Gay D.A., Wang, S., and Wania F. 2017. A synthesis of research needs for improving the understanding of atmospheric mercury cycling. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 17(14), 9133–9144. <https://doi.org/10.5194/acp-17-9133-2017>.
- Zhang L., You B., He W., Shang J. and Fan C. 2014. The role of tubificid worms (*Limnodrilus hoffmeisteri*) in sediment resuspension: a microcosm study. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, 50(3), 253–260. <https://doi.org/10.1051/limn/2014013>.
- Zhang X., Tian Y., Wang Q., Chen L. and Wang X. 2012. Heavy metal distribution and speciation during sludge reduction using aquatic worms. *Bioresource Technology*, 126, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.015>.

Zhang Z.S., Zheng D.M., Wang Q.C., Guo X.L., 2009. Bioaccumulation of Total and Methyl Mercury in Three Earthworm Species (*Drawida* sp., *Allolobophora* sp. and *Limnodrillus* sp.,). *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 83 : 937-942.



Lampiran 1. Peta Lokasi Penelitian



Lampiran 2. Korelasi antara Hg air dan Hg sedimen

**Correlations**

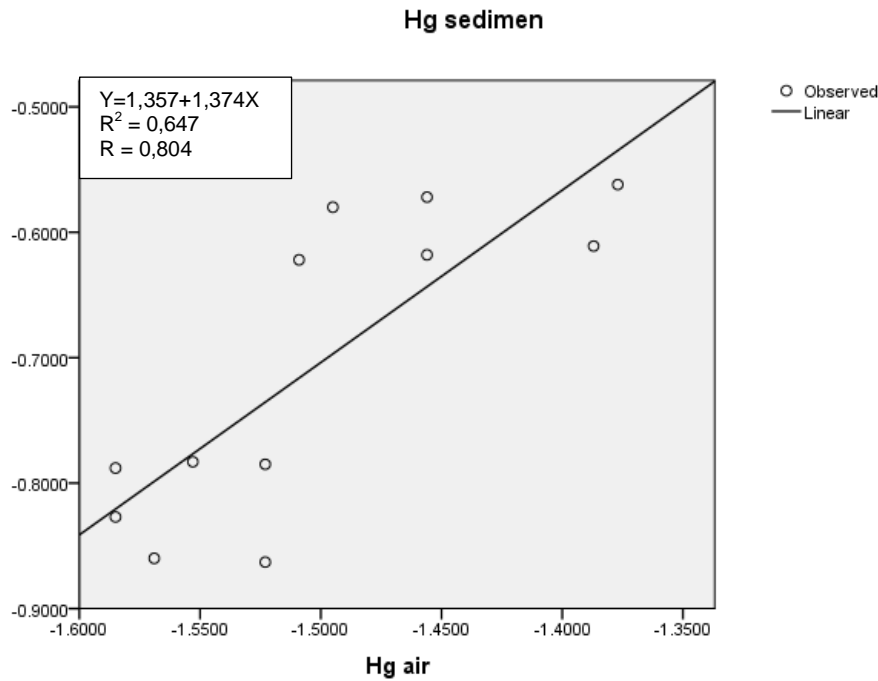
**Descriptive Statistics**

	Mean	Std. Deviation	N
Hg air	-1.501500E0	.0706637	12
Hg sedimen	-.705917	.1207149	12

**Correlations**

		Hg air	Hg sedimen
Hg air	Pearson Correlation	1	.804**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	12	12
Hg sedimen	Pearson Correlation	.804**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	12	12

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 3. Korelasi antara Hg air dan Hg Tubifex

**Correlations**

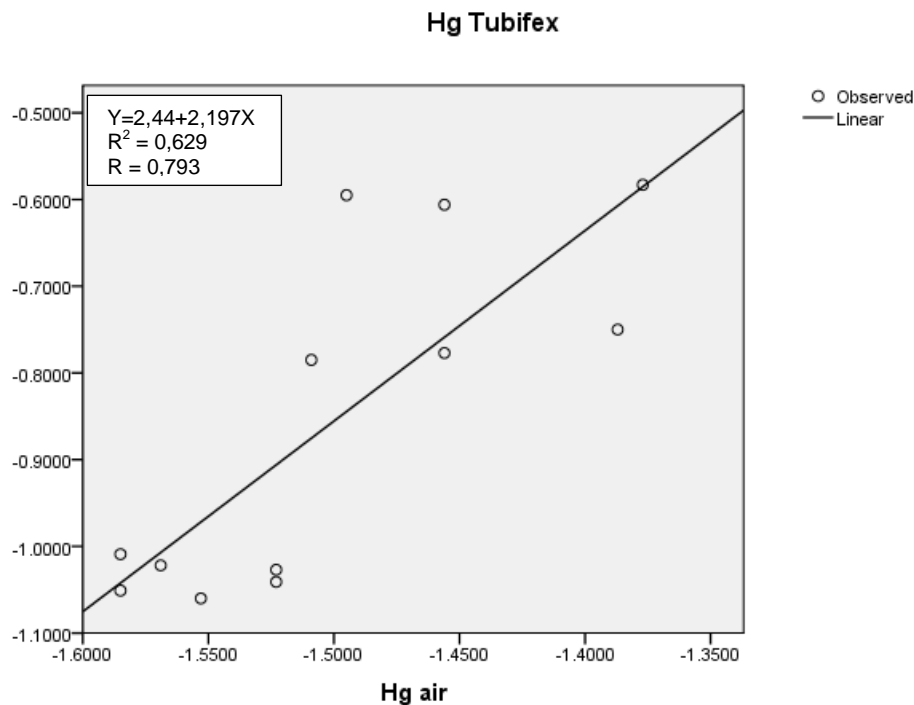
**Descriptive Statistics**

	Mean	Std. Deviation	N
Hg air	-1.501500E0	.0706637	12
Hg Tubifex	-.858833	.1957837	12

**Correlations**

		Hg air	Hg Tubifex
Hg air	Pearson Correlation	1	.793**
	Sig. (2-tailed)		.002
	N	12	12
Hg Tubifex	Pearson Correlation	.793**	1
	Sig. (2-tailed)	.002	
	N	12	12

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 4. Korelasi antara Hg sedimen dan Hg Tubifex

**Correlations**

**Descriptive Statistics**

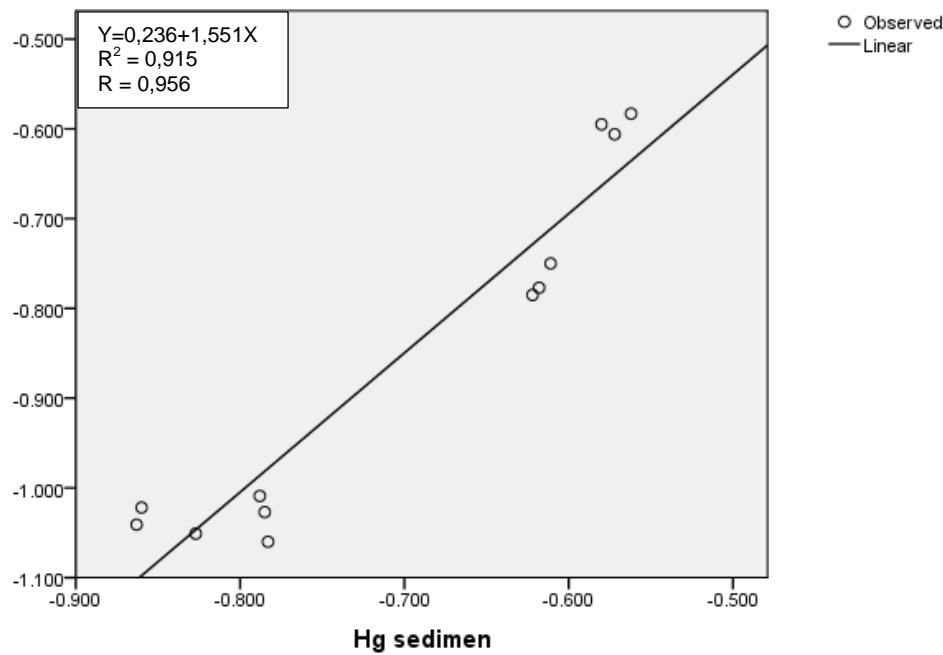
	Mean	Std. Deviation	N
Hg sedimen	-.70592	.120715	12
Hg Tubifex	-.85883	.195784	12

**Correlations**

		Hg sedimen	Hg Tubifex
Hg sedimen	Pearson Correlation	1	.956**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	12	12
Hg Tubifex	Pearson Correlation	.956**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	12	12

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Hg Tubifex**





Lampiran 5. LC50 48 jam (SPSS versi 16.0)

Perlakuan	Konsentrasi (µg/L)	Log10 konsentrasi	Total organisme (ekor)	Rata-rata mortalitas	Mortalitas (%)
K	0	0	100	0,00	0
A	15,85	1,20	100	8,67	9
B	25,12	1,40	100	15,33	15
C	38,81	1,59	100	27,33	27
D	63,09	1,80	100	36,33	36
E	99,98	2,00	100	60,00	60

Perlakuan	Konsentrasi (µg/L)	Log10 konsentrasi	% mortalitas	Probit
K	0,00	0,00	0	0
A	15,85	1,20	9	3,66
B	25,12	1,40	15	3,96
C	38,81	1,59	27	4,39
D	63,09	1,80	36	4,64
E	99,98	2,00	60	5,25

SUMMARY

OUTPUT

*Regression Statistics*

Multiple R	0,990037305
R Square	0,980173865
Adjusted R Square	0,973565153
Standard Error	0,100206171
Observations	5

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	1,48927617	1,48927617	148,3154192	0,001191925
Residual	3	0,03012383	0,010041277		
Total	4	1,5194			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95,0%	Upper 95,0%
Intercept	1,29688	0,25709	5,04429	0,01502	0,47868	2,11507	0,47868	2,11507
X Variable 1	1,92936	0,15842	12,17848	0,00119	1,42519	2,43354	1,42519	2,43354

Intercept 1,296876125

X Variable 1 1,929364127

$$Y = 1,929X + 1,297$$

$$5 = 1,929X + 1,297$$

X 1,919647486

LC50 83,10889073



Lampiran 6. Persentase Mortalitas *Tubifex* pada paparan merkuri akut

**Descriptive Statistics**

	Mean	Std. Deviation	N
HASIL	3.67222E1	34.530133	18
PERLAKUAN	3.5000	1.75734	18

**ANOVA**

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20206.944	5	4041.389	773.883	.000
Within Groups	62.667	12	5.222		
Total	20269.611	17			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable:HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-13.333333	1.865873	.000	-19.60065	-7.06601
		B	-18.000000	1.865873	.000	-24.26732	-11.73268
		C	-31.000000	1.865873	.000	-37.26732	-24.73268
		D	-58.000000	1.865873	.000	-64.26732	-51.73268
		E	-100.000000	1.865873	.000	-106.26732	-93.73268
	A	K	13.333333	1.865873	.000	7.06601	19.60065
		B	-4.666667	1.865873	.198	-10.93399	1.60065
		C	-17.666667	1.865873	.000	-23.93399	-11.39935
		D	-44.666667	1.865873	.000	-50.93399	-38.39935
		E	-86.666667	1.865873	.000	-92.93399	-80.39935
	B	K	18.000000	1.865873	.000	11.73268	24.26732
		A	4.666667	1.865873	.198	-1.60065	10.93399
		C	-13.000000	1.865873	.000	-19.26732	-6.73268
		D	-40.000000	1.865873	.000	-46.26732	-33.73268
		E	-82.000000	1.865873	.000	-88.26732	-75.73268
	C	K	31.000000	1.865873	.000	24.73268	37.26732
		A	17.666667	1.865873	.000	11.39935	23.93399
		B	13.000000	1.865873	.000	6.73268	19.26732
		D	-27.000000	1.865873	.000	-33.26732	-20.73268
		E	-69.000000	1.865873	.000	-75.26732	-62.73268

D	K	58.000000	1.865873	.000	51.73268	64.26732
	A	44.666667	1.865873	.000	38.39935	50.93399
	B	40.000000	1.865873	.000	33.73268	46.26732
	C	27.000000	1.865873	.000	20.73268	33.26732
	E	-42.000000	1.865873	.000	-48.26732	-35.73268
E	K	100.000000	1.865873	.000	93.73268	106.26732
	A	86.666667	1.865873	.000	80.39935	92.93399
	B	82.000000	1.865873	.000	75.73268	88.26732
	C	69.000000	1.865873	.000	62.73268	75.26732
	D	42.000000	1.865873	.000	35.73268	48.26732

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### HASIL

PERLAK	UAN	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	.00000					
	A	3		1.33333E1				
	B	3		1.80000E1				
	C	3			3.10000E1			
	D	3				5.80000E1		
	E	3					1.00000E2	
Sig.			1.000	.198	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 7. Konsentrasi Hg di *Tubifex* pada paparan merkuri akut

ANOVA					
HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	5	.001	110.995	.000
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.004	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	PERLA KUAN					
		A	-.002233	.002030	.872	-.00905	.00459
		B	-.007500	.002030	.028	-.01432	-.00068
		C	-.011900	.002030	.001	-.01872	-.00508
		D	-.018867	.002030	.000	-.02569	-.01205
	A	E	-.041200	.002030	.000	-.04802	-.03438
		K	.002233	.002030	.872	-.00459	.00905
		B	-.005267	.002030	.172	-.01209	.00155
		C	-.009667	.002030	.005	-.01649	-.00285
		D	-.016633	.002030	.000	-.02345	-.00981
	B	E	-.038967	.002030	.000	-.04579	-.03215
		K	.007500	.002030	.028	.00068	.01432
		A	.005267	.002030	.172	-.00155	.01209
		C	-.004400	.002030	.319	-.01122	.00242
		D	-.011367	.002030	.001	-.01819	-.00455
C	E	-.033700	.002030	.000	-.04052	-.02688	
	K	.011900	.002030	.001	.00508	.01872	
	A	.009667	.002030	.005	.00285	.01649	
	B	.004400	.002030	.319	-.00242	.01122	
	D	-.006967	.002030	.044	-.01379	-.00015	
D	E	-.029300	.002030	.000	-.03612	-.02248	
	K	.018867	.002030	.000	.01205	.02569	
	A	.016633	.002030	.000	.00981	.02345	
	B	.011367	.002030	.001	.00455	.01819	
	C	.006967	.002030	.044	.00015	.01379	
		E	-.022333	.002030	.000	-.02915	-.01551

E	K	.041200	.002030	.000	.03438	.04802
	A	.038967	.002030	.000	.03215	.04579
	B	.033700	.002030	.000	.02688	.04052
	C	.029300	.002030	.000	.02248	.03612
	D	.022333	.002030	.000	.01551	.02915

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

	PERLUKUAN	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	.00843				
	A	3	.01067	.01067			
	B	3		.01593	.01593		
	C	3			.02033		
	D	3				.02730	
	E	3					.04963
	Sig.		.872	.172	.319	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 8. Kadar Metallothionein (MT) pada *Tubifex* setelah paparan merkuri akut

ANOVA					
Hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.037	5	.007	58.261	.000
Within Groups	.002	12	.000		
Total	.039	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-.078667	.009220	.000	-.10963	-.04770
		B	-.094333	.009220	.000	-.12530	-.06337
		C	-.111333	.009220	.000	-.14230	-.08037
		D	-.113333	.009220	.000	-.14430	-.08237
		E	-.146000	.009220	.000	-.17697	-.11503
	A	K	.078667	.009220	.000	.04770	.10963
		B	-.015667	.009220	.557	-.04663	.01530
		C	-.032667	.009220	.037	-.06363	-.00170
		D	-.034667	.009220	.025	-.06563	-.00370
		E	-.067333	.009220	.000	-.09830	-.03637
	B	K	.094333	.009220	.000	.06337	.12530
		A	.015667	.009220	.557	-.01530	.04663
		C	-.017000	.009220	.476	-.04797	.01397
		D	-.019000	.009220	.366	-.04997	.01197
		E	-.051667	.009220	.001	-.08263	-.02070
C	K	.111333	.009220	.000	.08037	.14230	
	A	.032667	.009220	.037	.00170	.06363	
	B	.017000	.009220	.476	-.01397	.04797	
	D	-.002000	.009220	1.000	-.03297	.02897	
	E	-.034667	.009220	.025	-.06563	-.00370	
D	K	.113333	.009220	.000	.08237	.14430	
	A	.034667	.009220	.025	.00370	.06563	
	B	.019000	.009220	.366	-.01197	.04997	
	C	.002000	.009220	1.000	-.02897	.03297	
	E	-.032667	.009220	.037	-.06363	-.00170	

E	K	.146000	.009220	.000	.11503	.17697
	A	.067333	.009220	.000	.03637	.09830
	B	.051667	.009220	.001	.02070	.08263
	C	.034667	.009220	.025	.00370	.06563
	D	.032667	.009220	.037	.00170	.06363

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hasil

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup>					
K	3	.03667			
A	3		.11533		
B	3		.13100	.13100	
C	3			.14800	
D	3			.15000	
E	3				.18267
Sig.		1.000	.557	.366	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.





Lampiran 9. Kadar SOD di *Tubifex* pada paparan akut

ANOVA					
HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	203.486	5	40.697	229.384	.000
Within Groups	2.129	12	.177		
Total	205.615	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-.238000	.343918	.979	-1.39319	.91719
		B	-.357000	.343918	.896	-1.51219	.79819
		C	-.412667	.343918	.829	-1.56786	.74253
		D	-3.952333	.343918	.000	-5.10753	-2.79714
		E	-9.246000	.343918	.000	-10.40119	-8.09081
	A	K	.238000	.343918	.979	-.91719	1.39319
		B	-.119000	.343918	.999	-1.27419	1.03619
		C	-.174667	.343918	.995	-1.32986	.98053
		D	-3.714333	.343918	.000	-4.86953	-2.55914
		E	-9.008000	.343918	.000	-10.16319	-7.85281
	B	K	.357000	.343918	.896	-.79819	1.51219
		A	.119000	.343918	.999	-1.03619	1.27419
		C	-.055667	.343918	1.000	-1.21086	1.09953
		D	-3.595333	.343918	.000	-4.75053	-2.44014
		E	-8.889000	.343918	.000	-10.04419	-7.73381
C	K	.412667	.343918	.829	-.74253	1.56786	
	A	.174667	.343918	.995	-.98053	1.32986	
	B	.055667	.343918	1.000	-1.09953	1.21086	
	D	-3.539667	.343918	.000	-4.69486	-2.38447	
	E	-8.833333	.343918	.000	-9.98853	-7.67814	
D	K	3.952333	.343918	.000	2.79714	5.10753	
	A	3.714333	.343918	.000	2.55914	4.86953	
	B	3.595333	.343918	.000	2.44014	4.75053	
	C	3.539667	.343918	.000	2.38447	4.69486	
	E	-5.293667	.343918	.000	-6.44886	-4.13847	

E	K	9.246000	.343918	.000	8.09081	10.40119
	A	9.008000	.343918	.000	7.85281	10.16319
	B	8.889000	.343918	.000	7.73381	10.04419
	C	8.833333	.343918	.000	7.67814	9.98853
	D	5.293667	.343918	.000	4.13847	6.44886

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HASIL

PERLAK UAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup>				
K	3	1.43667		
A	3	1.67467		
B	3	1.79367		
C	3	1.84933		
D	3		5.38900	
E	3			1.06827E1
Sig.		.829	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 10. Kadar CAT di *Tubifex* setelah paparan merkuri akut

**ANOVA**

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44.526	5	8.905	93.496	.000
Within Groups	1.143	12	.095		
Total	45.669	17			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-.316667	.251988	.802	-1.16307	.52974
		B	-.833667	.251988	.054	-1.68007	.01274
		C	-.999667	.251988	.018	-1.84607	-.15326
		D	-1.191667	.251988	.005	-2.03807	-.34526
		E	-4.746667	.251988	.000	-5.59307	-3.90026
	A	K	.316667	.251988	.802	-.52974	1.16307
		B	-.517000	.251988	.371	-1.36341	.32941
		C	-.683000	.251988	.144	-1.52941	.16341
		D	-.875000	.251988	.041	-1.72141	-.02859
		E	-4.430000	.251988	.000	-5.27641	-3.58359
	B	K	.833667	.251988	.054	-.01274	1.68007
		A	.517000	.251988	.371	-.32941	1.36341
		C	-.166000	.251988	.983	-1.01241	.68041
		D	-.358000	.251988	.715	-1.20441	.48841
		E	-3.913000	.251988	.000	-4.75941	-3.06659
C	K	.999667	.251988	.018	.15326	1.84607	
	A	.683000	.251988	.144	-.16341	1.52941	
	B	.166000	.251988	.983	-.68041	1.01241	
	D	-.192000	.251988	.969	-1.03841	.65441	
	E	-3.747000	.251988	.000	-4.59341	-2.90059	
D	K	1.191667	.251988	.005	.34526	2.03807	
	A	.875000	.251988	.041	.02859	1.72141	
	B	.358000	.251988	.715	-.48841	1.20441	
	C	.192000	.251988	.969	-.65441	1.03841	
	E	-3.555000	.251988	.000	-4.40141	-2.70859	

E	K	4.746667	.251988	.000	3.90026	5.59307
	A	4.430000	.251988	.000	3.58359	5.27641
	B	3.913000	.251988	.000	3.06659	4.75941
	C	3.747000	.251988	.000	2.90059	4.59341
	D	3.555000	.251988	.000	2.70859	4.40141

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

PERLUKUAN	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup> K	3	.50200			
A	3	.81867	.81867		
B	3	1.33567	1.33567	1.33567	
C	3		1.50167	1.50167	
D	3			1.69367	
E	3				5.24867
Sig.		.054	.144	.715	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 11. Kadar GPx di *Tubifex* setelah paparan merkuri akut

ANOVA					
Hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.133E7	5	4266758.006	491.506	.000
Within Groups	104171.820	12	8680.985		
Total	2.144E7	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-666.868000 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-922.39609	-411.33991
		B	-831.455667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1086.98376	-575.92758
		C	-1.763246E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-2018.77442	-1507.71824
		D	-2.153924E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-2409.45176	-1898.39558
		E	-3.299128E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-3554.65609	-3043.59991
	A	K	666.868000 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	411.33991	922.39609
		B	-164.587667	7.607446E1	.320	-420.11576	90.94042
		C	-1.096378E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1351.90642	-840.85024
		D	-1.487056E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1742.58376	-1231.52758
		E	-2.632260E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-2887.78809	-2376.73191
	B	K	831.455667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	575.92758	1086.98376
		A	164.587667	7.607446E1	.320	-90.94042	420.11576
		C	-931.790667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1187.31876	-676.26258
		D	-1.322468E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1577.99609	-1066.93991
		E	-2.467672E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-2723.20042	-2212.14424
C	K	1763.246333 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	1507.71824	2018.77442	
	A	1096.378333 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	840.85024	1351.90642	
	B	931.790667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	676.26258	1187.31876	
	D	-390.677333 <sup>†</sup>	7.607446E1	.003	-646.20542	-135.14924	
	E	-1.535882E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1791.40976	-1280.35358	
D	K	2153.923667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	1898.39558	2409.45176	
	A	1487.055667 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	1231.52758	1742.58376	
	B	1322.468000 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	1066.93991	1577.99609	
	C	390.677333 <sup>†</sup>	7.607446E1	.003	135.14924	646.20542	
	E	-1.145204E3 <sup>†</sup>	7.607446E1	.000	-1400.73242	-889.67624	

E	K	3299.128000	7.607446E1	.000	3043.59991	3554.65609
	A	2632.260000	7.607446E1	.000	2376.73191	2887.78809
	B	2467.672333	7.607446E1	.000	2212.14424	2723.20042
	C	1535.881667	7.607446E1	.000	1280.35358	1791.40976
	D	1145.204333	7.607446E1	.000	889.67624	1400.73242

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hasil

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>						
K	3	2.81690E2				
A	3		9.48558E2			
B	3		1.11315E3			
C	3			2.04494E3		
D	3				2.43561E3	
E	3					3.58082E3
Sig.		1.000	.320	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 12. Persentase mortalitas *Tubifex* setelah 7 hari paparan merkuri subkronis

ANOVA					
HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3440.667	5	688.133	49.945	.000
Within Groups	165.333	12	13.778		
Total	3606.000	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

	(I) PERLAK UAN	(J) PERLAK UAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-9.333333	3.030707	.079	-19.51324	.84657
		B	-18.000000	3.030707	.001	-28.17991	-7.82009
		C	-22.000000	3.030707	.000	-32.17991	-11.82009
		D	-33.666667	3.030707	.000	-43.84657	-23.48676
		E	-41.000000	3.030707	.000	-51.17991	-30.82009
	A	K	9.333333	3.030707	.079	-.84657	19.51324
		B	-8.666667	3.030707	.114	-18.84657	1.51324
		C	-12.666667	3.030707	.013	-22.84657	-2.48676
		D	-24.333333	3.030707	.000	-34.51324	-14.15343
		E	-31.666667	3.030707	.000	-41.84657	-21.48676
	B	K	18.000000	3.030707	.001	7.82009	28.17991
		A	8.666667	3.030707	.114	-1.51324	18.84657
		C	-4.000000	3.030707	.770	-14.17991	6.17991
		D	-15.666667	3.030707	.002	-25.84657	-5.48676
		E	-23.000000	3.030707	.000	-33.17991	-12.82009
C	K	22.000000	3.030707	.000	11.82009	32.17991	
	A	12.666667	3.030707	.013	2.48676	22.84657	
	B	4.000000	3.030707	.770	-6.17991	14.17991	
	D	-11.666667	3.030707	.022	-21.84657	-1.48676	
	E	-19.000000	3.030707	.000	-29.17991	-8.82009	
D	K	33.666667	3.030707	.000	23.48676	43.84657	
	A	24.333333	3.030707	.000	14.15343	34.51324	
	B	15.666667	3.030707	.002	5.48676	25.84657	
	C	11.666667	3.030707	.022	1.48676	21.84657	
	E	-7.333333	3.030707	.223	-17.51324	2.84657	
E	K	41.000000	3.030707	.000	30.82009	51.17991	
	A	31.666667	3.030707	.000	21.48676	41.84657	
	B	23.000000	3.030707	.000	12.82009	33.17991	
	C	19.000000	3.030707	.000	8.82009	29.17991	
	D	7.333333	3.030707	.223	-2.84657	17.51324	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hasil

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>						
K	3	1.60000E1				
A	3	2.71667E1				
B	3		4.26667E1			
C	3		5.26133E1			
D	3			7.40417E1		
E	3			7.52917E1		
Sig.		.054	.098	.999		

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.





Lampiran 13. Konsentrasi Hg di *Tubifex* setelah paparan merkuri subkronis

ANOVA					
HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1572.631	5	314.526	74.660	.000
Within Groups	50.553	12	4.213		
Total	1623.184	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable:HASIL

	(I) PERLA KUAN	(J) PERLA KUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-1.100000	1.675864	.984	-6.72909	4.52909
		B	-2.233333	1.675864	.763	-7.86243	3.39576
		C	-3.200000	1.675864	.441	-8.82909	2.42909
		D	-18.533333	1.675864	.000	-24.16243	-12.90424
		E	-23.666667	1.675864	.000	-29.29576	-18.03757
	A	K	1.100000	1.675864	.984	-4.52909	6.72909
		B	-1.133333	1.675864	.981	-6.76243	4.49576
		C	-2.100000	1.675864	.803	-7.72909	3.52909
		D	-17.433333	1.675864	.000	-23.06243	-11.80424
		E	-22.566667	1.675864	.000	-28.19576	-16.93757
	B	K	2.233333	1.675864	.763	-3.39576	7.86243
		A	1.133333	1.675864	.981	-4.49576	6.76243
		C	-.966667	1.675864	.991	-6.59576	4.66243
		D	-16.300000	1.675864	.000	-21.92909	-10.67091
		E	-21.433333	1.675864	.000	-27.06243	-15.80424
	C	K	3.200000	1.675864	.441	-2.42909	8.82909
		A	2.100000	1.675864	.803	-3.52909	7.72909
		B	.966667	1.675864	.991	-4.66243	6.59576
		D	-15.333333	1.675864	.000	-20.96243	-9.70424
		E	-20.466667	1.675864	.000	-26.09576	-14.83757
	D	K	18.533333	1.675864	.000	12.90424	24.16243
		A	17.433333	1.675864	.000	11.80424	23.06243
		B	16.300000	1.675864	.000	10.67091	21.92909
		C	15.333333	1.675864	.000	9.70424	20.96243
		E	-5.133333	1.675864	.082	-10.76243	.49576

E	K	23.666667	1.675864	.000	18.03757	29.29576
	A	22.566667	1.675864	.000	16.93757	28.19576
	B	21.433333	1.675864	.000	15.80424	27.06243
	C	20.466667	1.675864	.000	14.83757	26.09576
	D	5.133333	1.675864	.082	-.49576	10.76243

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

	PERLUKUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	.13333		
	A	3	1.23333		
	B	3	2.36667		
	C	3	3.33333		
	D	3		1.86667E1	
	E	3		2.38000E1	
	Sig.		.441	.082	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 14. Kadar Metallothionein (MT) di *Tubifex* setelah paparan merkuri subkronis

ANOVA					
Hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.025	5	.005	82.568	.000
Within Groups	.001	12	.000		
Total	.025	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-.045667	.006295	.000	-.06681	-.02452
		B	-.057333	.006295	.000	-.07848	-.03619
		C	-.062000	.006295	.000	-.08315	-.04085
		D	-.101000	.006295	.000	-.12215	-.07985
		E	-.112333	.006295	.000	-.13348	-.09119
	A	K	.045667	.006295	.000	.02452	.06681
		B	-.011667	.006295	.471	-.03281	.00948
		C	-.016333	.006295	.172	-.03748	.00481
		D	-.055333	.006295	.000	-.07648	-.03419
		E	-.066667	.006295	.000	-.08781	-.04552
	B	K	.057333	.006295	.000	.03619	.07848
		A	.011667	.006295	.471	-.00948	.03281
		C	-.004667	.006295	.972	-.02581	.01648
		D	-.043667	.006295	.000	-.06481	-.02252
		E	-.055000	.006295	.000	-.07615	-.03385
C	K	.062000	.006295	.000	.04085	.08315	
	A	.016333	.006295	.172	-.00481	.03748	
	B	.004667	.006295	.972	-.01648	.02581	
	D	-.039000	.006295	.001	-.06015	-.01785	
	E	-.050333	.006295	.000	-.07148	-.02919	
D	K	.101000	.006295	.000	.07985	.12215	
	A	.055333	.006295	.000	.03419	.07648	
	B	.043667	.006295	.000	.02252	.06481	
	C	.039000	.006295	.001	.01785	.06015	
	E	-.011333	.006295	.500	-.03248	.00981	

E	K	.112333	.006295	.000	.09119	.13348
	A	.066667	.006295	.000	.04552	.08781
	B	.055000	.006295	.000	.03385	.07615
	C	.050333	.006295	.000	.02919	.07148
	D	.011333	.006295	.500	-.00981	.03248

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Hasil

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup>					
K	3	.00433			
A	3		.05000		
B	3		.06167		
C	3		.06633		
D	3			.10533	
E	3			.11667	
Sig.		1.000	.172	.500	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 15. Kadar ROS pada *Tubifex* setelah 7 hari paparan merkuri subkronis

ANOVA					
Hasil	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8792.251	5	1758.450	103.018	.000
Within Groups	204.833	12	17.069		
Total	8997.084	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

	(I) Perilaku	(J) Perilaku	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	A	-11.166667	3.373366	.054	-22.49754	.16420
		B	-26.666667	3.373366	.000	-37.99754	-15.33580
		C	-36.613333	3.373366	.000	-47.94420	-25.28246
		D	-58.041667	3.373366	.000	-69.37254	-46.71080
		E	-59.291667	3.373366	.000	-70.62254	-47.96080
	A	K	11.166667	3.373366	.054	-.16420	22.49754
		B	-15.500000	3.373366	.006	-26.83087	-4.16913
		C	-25.446667	3.373366	.000	-36.77754	-14.11580
		D	-46.875000	3.373366	.000	-58.20587	-35.54413
		E	-48.125000	3.373366	.000	-59.45587	-36.79413
B	K	26.666667	3.373366	.000	15.33580	37.99754	
	A	15.500000	3.373366	.006	4.16913	26.83087	
	C	-9.946667	3.373366	.098	-21.27754	1.38420	
	D	-31.375000	3.373366	.000	-42.70587	-20.04413	
	E	-32.625000	3.373366	.000	-43.95587	-21.29413	
C	K	36.613333	3.373366	.000	25.28246	47.94420	
	A	25.446667	3.373366	.000	14.11580	36.77754	
	B	9.946667	3.373366	.098	-1.38420	21.27754	
	D	-21.428333	3.373366	.000	-32.75920	-10.09746	
	E	-22.678333	3.373366	.000	-34.00920	-11.34746	
D	K	58.041667	3.373366	.000	46.71080	69.37254	
	A	46.875000	3.373366	.000	35.54413	58.20587	
	B	31.375000	3.373366	.000	20.04413	42.70587	
	C	21.428333	3.373366	.000	10.09746	32.75920	
	E	-1.250000	3.373366	.999	-12.58087	10.08087	

E	K	59.291667	3.373366	.000	47.96080	70.62254
	A	48.125000	3.373366	.000	36.79413	59.45587
	B	32.625000	3.373366	.000	21.29413	43.95587
	C	22.678333	3.373366	.000	11.34746	34.00920
	D	1.250000	3.373366	.999	-10.08087	12.58087

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

PERLA KUAN	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup> K	3	.13333		
A	3	1.23333		
B	3	2.36667		
C	3	3.33333		
D	3		1.86667E1	
E	3		2.38000E1	
Sig.		.441	.082	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 16. Kadar SOD di *Tubifex* setelah paparan merkuri subkronis

## ANOVA

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	453.353	5	90.671	1.118E3	.000
Within Groups	.973	12	.081		
Total	454.326	17			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	PERLA	-3.404667	.232482	.000	-4.18555	-2.62378
		PERLA	-4.155000	.232482	.000	-4.93589	-3.37411
		KUAN	-6.978000	.232482	.000	-7.75889	-6.19711
		KUAN	-12.331667	.232482	.000	-13.11255	-11.55078
		KUAN	-14.266000	.232482	.000	-15.04689	-13.48511
	A	K	3.404667	.232482	.000	2.62378	4.18555
		PERLA	-.750333	.232482	.062	-1.53122	.03055
		KUAN	-3.573333	.232482	.000	-4.35422	-2.79245
		KUAN	-8.927000	.232482	.000	-9.70789	-8.14611
		KUAN	-10.861333	.232482	.000	-11.64222	-10.08045
B	K	4.155000	.232482	.000	3.37411	4.93589	
	PERLA	.750333	.232482	.062	-.03055	1.53122	
	KUAN	-2.823000	.232482	.000	-3.60389	-2.04211	
	KUAN	-8.176667	.232482	.000	-8.95755	-7.39578	
	KUAN	-10.111000	.232482	.000	-10.89189	-9.33011	
C	K	6.978000	.232482	.000	6.19711	7.75889	
	PERLA	3.573333	.232482	.000	2.79245	4.35422	
	KUAN	2.823000	.232482	.000	2.04211	3.60389	
	KUAN	-5.353667	.232482	.000	-6.13455	-4.57278	
	KUAN	-7.288000	.232482	.000	-8.06889	-6.50711	
D	K	12.331667	.232482	.000	11.55078	13.11255	
	PERLA	8.927000	.232482	.000	8.14611	9.70789	
	KUAN	8.176667	.232482	.000	7.39578	8.95755	
	KUAN	5.353667	.232482	.000	4.57278	6.13455	
	KUAN	-1.934333	.232482	.000	-2.71522	-1.15345	

E	K	14.266000	.232482	.000	13.48511	15.04689
	A	10.861333	.232482	.000	10.08045	11.64222
	B	10.111000	.232482	.000	9.33011	10.89189
	C	7.288000	.232482	.000	6.50711	8.06889
	D	1.934333	.232482	.000	1.15345	2.71522

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

HASIL

	PERLAK UAN	N	Subset for alpha = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	1.35867					
	A	3		4.76333				
	B	3		5.51367				
	C	3			8.33667			
	D	3				1.36903E1		
	E	3					1.56247E1	
	Sig.			1.000	.062	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.





Lampiran 17. Kadar CAT di *Tubifex* setelah 7 hari paparan merkuri subkronis

**ANOVA**

HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.946	5	4.589	625.854	.000
Within Groups	.088	12	.007		
Total	23.034	17			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	PERLA	-1.246333	.069918	.000	-1.48118	-1.01149
		KUAN	-1.688667	.069918	.000	-1.92351	-1.45382
		A	-1.958000	.069918	.000	-2.19285	-1.72315
		B	-3.142000	.069918	.000	-3.37685	-2.90715
		E	-3.321667	.069918	.000	-3.55651	-3.08682
	A	K	1.246333	.069918	.000	1.01149	1.48118
		B	-.442333	.069918	.000	-.67718	-.20749
		C	-.711667	.069918	.000	-.94651	-.47682
		D	-1.895667	.069918	.000	-2.13051	-1.66082
		E	-2.075333	.069918	.000	-2.31018	-1.84049
	B	K	1.688667	.069918	.000	1.45382	1.92351
		A	.442333	.069918	.000	.20749	.67718
		C	-.269333	.069918	.022	-.50418	-.03449
		D	-1.453333	.069918	.000	-1.68818	-1.21849
		E	-1.633000	.069918	.000	-1.86785	-1.39815
C	K	1.958000	.069918	.000	1.72315	2.19285	
	A	.711667	.069918	.000	.47682	.94651	
	B	.269333	.069918	.022	.03449	.50418	
	D	-1.184000	.069918	.000	-1.41885	-.94915	
	E	-1.363667	.069918	.000	-1.59851	-1.12882	
D	K	3.142000	.069918	.000	2.90715	3.37685	
	A	1.895667	.069918	.000	1.66082	2.13051	
	B	1.453333	.069918	.000	1.21849	1.68818	
	C	1.184000	.069918	.000	.94915	1.41885	
	E	-.179667	.069918	.179	-.41451	.05518	

E	K	3.321667	.069918	.000	3.08682	3.55651
	A	2.075333	.069918	.000	1.84049	2.31018
	B	1.633000	.069918	.000	1.39815	1.86785
	C	1.363667	.069918	.000	1.12882	1.59851
	D	.179667	.069918	.179	-.05518	.41451

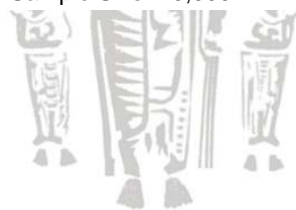
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**HASIL**

PERLA KUAN	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	.51133					
	A	3		1.75767				
	B	3			2.20000			
	C	3				2.46933		
	D	3					3.65333	
	E	3						3.83300
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.179

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 18. Kadar GPx di *Tubifex* setelah 7 hari paparan merkuri subkronis

ANOVA					
HASIL	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.008E7	5	4016881.608	115.931	.000
Within Groups	415786.817	12	34648.901		
Total	2.050E7	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: HASIL

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K	PERLA KUAN	-678.396333	1.519844E2	.008	-1188.90001	-167.89265
		PERLA KUAN	-1.234451E3	1.519844E2	.000	-1744.95501	-723.94765
		PERLA KUAN	-1.548770E3	1.519844E2	.000	-2059.27382	-1038.26646
		PERLA KUAN	-2.553605E3	1.519844E2	.000	-3064.10868	-2043.10132
		PERLA KUAN	-3.109152E3	1.519844E2	.000	-3619.65568	-2598.64832
	A	PERLA KUAN	678.396333	1.519844E2	.008	167.89265	1188.90001
		PERLA KUAN	-556.055000	1.519844E2	.030	-1066.55868	-45.55132
		PERLA KUAN	-870.373810	1.519844E2	.001	-1380.87749	-359.87013
		PERLA KUAN	-1.875209E3	1.519844E2	.000	-2385.71235	-1364.70499
		PERLA KUAN	-2.430756E3	1.519844E2	.000	-2941.25935	-1920.25199
	B	PERLA KUAN	1234.451333	1.519844E2	.000	723.94765	1744.95501
		PERLA KUAN	556.055000	1.519844E2	.030	45.55132	1066.55868
		PERLA KUAN	-314.318810	1.519844E2	.363	-824.82249	196.18487
		PERLA KUAN	-1.319154E3	1.519844E2	.000	-1829.65735	-808.64999
		PERLA KUAN	-1.874701E3	1.519844E2	.000	-2385.20435	-1364.19699
C	PERLA KUAN	1548.770143	1.519844E2	.000	1038.26646	2059.27382	
	PERLA KUAN	870.373810	1.519844E2	.001	359.87013	1380.87749	
	PERLA KUAN	314.318810	1.519844E2	.363	-196.18487	824.82249	
	PERLA KUAN	-1.004835E3	1.519844E2	.000	-1515.33854	-494.33118	
	PERLA KUAN	-1.560382E3	1.519844E2	.000	-2070.88554	-1049.87818	
D	PERLA KUAN	2553.605000	1.519844E2	.000	2043.10132	3064.10868	
	PERLA KUAN	1875.208667	1.519844E2	.000	1364.70499	2385.71235	
	PERLA KUAN	1319.153667	1.519844E2	.000	808.64999	1829.65735	
	PERLA KUAN	1004.834857	1.519844E2	.000	494.33118	1515.33854	
	PERLA KUAN	-555.547000	1.519844E2	.030	-1066.05068	-45.04332	

E	K	3109.152000	1.519844E2	.000	2598.64832	3619.65568
	A	2430.755667	1.519844E2	.000	1920.25199	2941.25935
	B	1874.700667	1.519844E2	.000	1364.19699	2385.20435
	C	1560.381857	1.519844E2	.000	1049.87818	2070.88554
	D	555.547000	1.519844E2	.030	45.04332	1066.05068

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### HASIL

	PERLUKUAN	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>	K	3	2.80306E2				
	A	3		9.58703E2			
	B	3			1.51476E3		
	C	3			1.82908E3		
	D	3				2.83391E3	
	E	3					3.38946E3
	Sig.		1.000	1.000	.363	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



Lampiran 19. Persentase kerusakan jaringan tubuh *Tubifex* setelah dipapar merkuri subkronis

Hasil skoring kerusakan jaringan

Lapang pandang	Konsentrasi					
	0%	12,50%	25%	37,50%	50%	100%
LP1	1	1	1	3	3	3
LP2	1	1	2	2	2	4
LP3	1	2	2	3	2	4
LP4	1	2	2	2	3	3
LP5	1	2	2	2	3	3
Modus	1	2	2	2	3	3

Persentase kerusakan total jaringan (%)

Lapang pandang	Konsentrasi					
	0%	12,50%	25%	37,50%	50%	100%
LP1	2,755	13,333	15,033	44,290	43,932	53,100
LP2	7,475	20,780	25,641	37,138	39,125	75,500
LP3	14,394	35,065	36,591	54,594	49,013	80,547
LP4	7,975	31,099	42,710	34,667	57,928	65,465
LP5	9,764	24,930	33,145	40,594	55,897	69,205
Rerata	8,473	25,041	30,624	42,256	49,179	68,763

Rumus kerusakan jaringan :

Persentase kerusakan sel = (Jumlah sel yang rusak / Jumlah sel yang dianalisis)x100%

Kategori kerusakan menurut Suswandari, 2005:

- 0 = tidak ada kerusakan (normal)
- 1 = kerusakan histologi 1% - ≤25% (agak ringan)
- 2 = kerusakan histologi 26% - ≤50% (ringan)
- 3 = kerusakan histologi 51% - ≤75% (sedang)
- 4 = kerusakan histologi 76% - ≤100% (agak berat)
- 5 = kerusakan histologi >100% (rusak berat)