

**EKSPRESI *Heat Shock Protein (HSP70)* PADA INSANG RAJUNGAN
(*Portunus pelagicus*) YANG TERINDIKASI LOGAM BERAT TIMBAL (Pb) DI
KAWASAN MANGROVE KABUPATEN PASURUAN JAWA TIMUR**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**DIAN PERMATASARI
NIM. 115080101111067**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

**EKSPRESI *Heat Shock Protein (HSP70)* PADA INSANG RAJUNGAN
(*Portunus pelagicus*) YANG TERINDIKASI LOGAM BERAT TIMBAL (Pb) DI
KAWASAN MANGROVE KABUPATEN PASURUAN JAWA TIMUR**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**DIAN PERMATASARI
NIM. 115080101111067**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

SKRIPSI
EKSPRESI *Heat Shock Protein (HSP70)* PADA INSANG RAJUNGAN
(*Portunus pelagicus*) YANG TERINDIKASI LOGAM BERAT TIMBAL (Pb) DI
KAWASAN MANGROVE KABUPATEN PASURUAN JAWA TIMUR

Oleh :
DIAN PERMATASARI
NIM. 115080101111067

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 13 Juli 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. :
Tanggal :

Dosen penguji I

Prof. Dr. Ir. DIANA ARFIATI, MS.
NIP. 19591230 198503 2 002
Tanggal :

Dosen Penguji II

Dr. YUNI KILAWATI, S.Pi., M.Si.
NIP. 19730702 20051 2 001
Tanggal :

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Prof. Ir. YENNY RISJANI, DEA, Ph.D
NIP.19610523 198703 2 003
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. UUN YANUHAR, S.Pi, MSi
NIP. 19730404 200212 2 001
Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. ARNING W. EKAWATI, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, JUNI 2014

Mahasiswa,

DIAN PERMATASARI
NIM. 115080101111067

UCAPAN TERIMA KASIH

PENELITIAN INI ADALAH SEBAGIAN DARI PROGRAM PENELITIAN YANG
DIADAKAN OLEH Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., PhD.

DENGAN JUDUL:

EKSPRESI *Heat Shock Protein (HSP70)* PADA INSANG RAJUNGAN
(*Portunus pelagicus*) YANG TERINDIKASI LOGAM BERAT TIMBAL (Pb) DI
KAWASAN MANGROVE KABUPATEN PASURUAN JAWA TIMUR

YANG MELIBATKAN MAHASISWA S1:

1. RIZAL BABIL YASARI AKBAR
2. DIAN PERMATASARI
3. DEBORA ANGELYTA Br. SEMBIRING



Mengetahui,
Ketua Peneliti

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., PhD.
NIP.19610523 198703 2 003

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan Kedua orang tua yaitu ayahanda Mochammad Yusuf dan Ibu Anik Widayati, Nenek tercinta Riami, kakak tersayang Rizal Nay Soamole, Riska Dwi Fatmawati, Yosi Yuniardi, adik tersayang Intan Puspita Dewi, keponakan lucu Robert Sabila Rosad dan Rivaldo Akbar Valencia dan seluruh keluarga besar terima kasih atas do'a, semangat, kasih sayang dan dukungannya.
2. Ibu Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D dan Ibu Dr. Uun Yanuhar, S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
3. Ibu Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS dan Ibu Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si selaku dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang bermanfaat dan membangun bagi penulis.
4. Mukhamad Vikram Ali Angkola Hutasuhut selaku my "boy friend" yang selalu menemani, mendukung, dan memberikan semangat kepada penulis. Terima kasih banyak abang, sulit dirangkakan dalam kata.
5. Terima kasih banyak kepada tim "**LDR**", Lueky dengan wajah polosnya yang sok imut dan Rissa yang seru banget dan gak bisa diem sedikitpun. Mkasih buat support dan motivasinya ya!!!!
6. Teman – teman "**PEJOEANG Prof. Yenny**", Debora, Babil, Meta, Bitu, Umi. Terimakasih atas kerjasama dan semangat yang luar biasa ini yaa hahaha.
7. Untuk **DKC PasScout 13.34**, Amirul Mukminin, Winda Nurjannah, Rina Pakpahan, Anjar Pribadi, Efa Cayaningsih, Galuh Citra, Rafli Iskandar, Richu Ridho, Shalehudin Ilyas, M.Yusuf, Alvian Yanuhar, Widjiati, Zainuri, serta Mak Sepri dan Babe. Terima kasih untuk supportnya ya, maaf anak-anakku sering ditinggal dan kadang gak keurus,,hehehehe
8. **Rekan-rekan MSP 2011**; Duta, Fahmi, Endri, mak Entin, Chea, Anggi, Elva, Intan, Lufi, Damai, Icahn, Yovan, Aries, Ridha, pasangan DURAT (Selvi dan Nicko) dan temen2 **MSP2011** lainnya yang tidak tersebutkan namanya satu persatu yang telah memberikan do'a dan bantuan ikut berperan dalam memperlancar dalam menyelesaikan tugas akhir.

9. **Laboran laboratorium Ilmu-ilmu Perairan** bu Elma, pak sul, mbak Hawa dan mbak Mega; **Laboran Laboratorium Biomedik**, mbak Suci; **Laboran Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH)**, mbak Fitri terima kasih sudah melayani tim kami dengan kesabaran dan baik hati.
10. Terima kasih banyak **Pak Sodik** udah bantuin nangkap rajungan, susah banget, Pak,,,heehhehe!!!!
11. Untuk **sumbersari 215E** Gek Eby, Emak Tika, Ance Rani Tarigan, Ulee cantiq, Vivi, Irna, Hilmi, Hasna, Fitri, Oink, Dini, Mira, Firdi, Mega semoga lancar skripsi dan tesisnya semuaaaa, dan terima kasih untuk Ibu kost tercintrong maaf sering bikin kesel.
12. **Rekan-Rekan Tim Asisten Praktikum Ilmu Tanah**; Bu coas pada masanya Ance Rani Tarigan, Fani, Pipit, Nicko, Cahyo, Dita, Nayaka, Cece, Anita, Randy, Yayuk, mbak Apink, mbak Christin, Mas Sam, etc. Dan laboran Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan ikan pak Yit dan pak Udin.
13. **Rekan KKN KEL. 25**; Dani, emak, Firman, Peny, Avi, Tomi, Fajar, Boru, Bunga, Desi, Pak Ustadz, Fina, Febri, mami, Kak Duth, dan rekan lainnya yang belum tersebut namanya.
14. **Sosial Media**, terima kasih sudah menjadi tempat sampah untuk saya. Terima kasih instagram, path, whatsapp, dan facebook yang turut menyumbang semangat dan kata-kata optimis di pagi dan malam hari.
15. Kepada berbagai pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan Tugas Akhir.

Malang, Juli 2015

Penulis

RINGKASAN

DIAN PERMATASARI. Skripsi mengenai Ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP70) pada Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*) yang Terindikasi Logam Berat Timbal (Pb) di Kawasan Mangrove Kabupaten Pasuruan Jawa Timur (dibawah bimbingan **Prof. Ir. YENNY RISJANI, DEA., PhD. dan Dr. UUN YANUHAR, S.Pi., M.Si**).

Kondisi rajungan dilihat dari organnya terutama insang secara khas berasosiasi dengan hutan bakau di daerah tersebut, sehingga kondisi insang rajungan yang tidak normal akan memberikan dampak yang serius terhadap populasi rajungan. Kerusakan pada sel yang disebabkan oleh keracunan logam Pb bisa meningkatkan sensitivitas terhadap inveksi viral dan bakteri. Pada umumnya, polutan apapun dapat menyebabkan stress dalam biota ekosistem. *Heat Shock Protein* (HSP) merupakan ekspresi yang biasa digunakan sebagai indicator stress seluler pada hewan dan sinyal seluler intra untuk induksi dari HSP70. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis ekspresi protein HSP70 pada sampel jaringan insang rajungan yang terpapar logam berat dengan analisis *western blot*. Penelitian ini dilaksanakan di tiga pantai utara Pasuruan yaitu Pantai Kedawang, pantai Mlaten, dan pantai Penunggul serta analisis *western blot* dilaksanakan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran dan LSIH Universitas Brawijaya, Malang. Sedangkan waktu penelitian yaitu mulai bulan Maret sampai Mei 2015.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP70) yang terdeteksi pada sampel jaringan insang rajungan (*Portunus pelagicus*) dari perairan yang mengandung polutan logam berat Pb pada ketiga lokasi penelitian. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu survey. Penelitian dimulai dengan penangkapan sampel rajungan, kemudian dilanjutkan dengan pembedahan organ insang yang akan diamati ekspresi HSP70 nya, selanjutnya dilakukan pada tahapan isolasi protein, elektroforesis protein dengan metode SDS-PAGE, dan analisis reaksi antigen dengan metode *Western Blotting*. Data pendukung yang digunakan dalam penelitian ini data kualitas air yang meliputi suhu, salinitas pH, DO, dan TSS.

Kadar logam berat Pb pada pantai Kedawang rata-rata sebesar 0,126 ppm; pantai Mlaten sebesar 0,140 ppm; pantai Penunggul sebesar 0,10 ppm. Sedangkan kadar logam berat Pb pada sedimen masing-masing lokasi penelitian yaitu pada pantai Kedawang sebesar 3,147 ppm; pantai Mlaten sebesar 3,713 ppm; pantai Penunggul sebesar 3,267 ppm. Kadar logam berat Pb pada insang rajungan di masing-masing lokasi penelitian yaitu pada pantai Kedawang sebesar 0,121 ppm; pantai Mlaten sebesar 0,145 ppm; serta pada pantai Penunggul sebesar 0,083 ppm. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa pada pantai Mlaten memiliki kadar logam berat Pb tertinggi pada ketiga sampel. Hal ini disebabkan karena banyaknya aktivitas manusia yang merusak lingkungan pantai tersebut, seperti pembuangan limbah rumah tangga, pembuangan limbah pengasapan ikan, serta aktivitas kapal motor nelayan yang melintas maupun bersandar untuk pengisian bahan bakar, pergantian oli, pengecatan kapal, sehingga banyak menghasilkan logam berat Pb yang berbahaya bagi kehidupan biota perairan.

Hasil SDS-PAGE insang rajungan (*Portunus pelagicus*) pada ketiga lokasi penelitian memperoleh hasil yang sama yaitu 1 pita protein dengan Berat Molekul (BM) sebesar 72,3 kDa. Pita tersebut diduga golongan dari keluarga HSP yaitu HSP70 (72,3 kDa). Peningkatan total kandungan beberapa protein (konsentrasi dan jumlah) dan juga penurunan beberapa protein lain pada organisme diakibatkan adanya suatu perlakuan atau kondisi lingkungan yang berubah. Jumlah pita protein menunjukkan adanya respon organisme terhadap perubahan lingkungan serta hilangnya pita protein menandakan terjadinya degradasi protein akibat penurunan kualitas lingkungan.

Berdasarkan hasil elektroforesis insang rajungan yang memiliki spesifikasi berat molekul 72,3 kDa, maka dapat dideteksi adanya ekspresi protein HSP70 di ketiga lokasi penelitian tersebut. Hasil pengujian *Western Blot* diperoleh Berat Molekul protein yang sama yaitu sebesar 72,3 kDa. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pita mayor memiliki ketebalan dan intensitas warna yang lebih besar dibandingkan dengan pita-pita lainnya, sehingga diketahui bahwa pita mayor itu merupakan pita protein yang memiliki konsentrasi lebih tinggi dibandingkan dengan pita minor. Dengan demikian, dapat diduga bahwa terjadi ekspresi HSP70 pada ketiga sampel insang rajungan tersebut yaitu ditandai dengan Berat Molekul (BM) sebesar 72,3 kDa yang termasuk dalam keluarga HSP70 yaitu berkisar antara 68-73 kDa. HSP ini berfungsi sebagai biomarker karena HSP70 merupakan indikator sensitive kondisi stress yang diakibatkan oleh stresor lingkungan. Hasil pengukuran kualitas air yaitu suhu perairan berkisar 29-31^oC, salinitas berkisar 11-25 ppt, pH berkisar antara 8-8,33, DO berkisar antara 4-5 ppm, dan TSS memiliki kisaran antara 41-57 ppm.

Kesimpulan yang dapat diambil dalam penelitian ini yaitu pada deteksi HSP70 menggunakan metode *Western Blotting* menunjukkan nilai pita protein sebesar 72,3 kDa. Nilai pita protein tersebut termasuk dalam keluarga HSP70 yaitu berkisar antar 68-73 kDa. Hal ini membuktikan bahwa terjadi ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP70) pada insang rajungan (*Portunus pelagicus*) yang terpapar polutan logam berat Pb pada ketiga lokasi penelitian.

Saran yang dapat diberikan pada penelitin ini yaitu sebaiknya untuk penelitian tentang ekspresi HSP70 dilakukan penelitian laboratorium agar lebih mudah untuk menentukan penyebab spesifik terekspresinya protein tersebut. Selain itu sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi HSP70 yang disebabkan oleh polutan lainnya.

KATA PENGANTAR

Puji syukur saya panjatkan khadirat Allah SWT, karena berkat rahmat dan hidayah Nya lah saya dapat menyelesaikan Laporan penelitian Skripsi yang berjudul “Ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP70) pada Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*) yang Terpapar Logam Berat Pb di Kawasan Mangrove Kabupaten Pasuruan Jawa Timur”. Dalam penyusunan Laporan Penelitian Skripsi ini tentunya tidak sedikit hambatan yang saya hadapi. Namun kami menyadari bahwa dalam penyusunan Laporan ini berjalan dengan baik atas bantuan, dorongan dan bimbingan dari orang tua maupun dosen – dosen Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Semoga Laporan Penelitian Skripsi ini dapat bermanfaat dan menjadi sumbangan pemikiran bagi pihak yang membutuhkan, khususnya bagi penulis sehingga tujuan yang diharapkan dapat tercapai, Amin.

Malang, Juli 2015

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|--|------|
| HALAMAN JUDUL..... | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| PERNYATAAN ORISINALITAS..... | iii |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | iv |
| RINGKASAN | vii |
| KATA PENGANTAR | ix |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR LAMPIRAN | xiv |
| 1. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat..... | 4 |
| 1.5 Waktu dan Tempat..... | 4 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) | |
| 2.2.1 Klasifikasi | 5 |
| 2.2.2 Morfologi dan Anatomi..... | 5 |
| 2.2.3 Habitat dan Penyebaran..... | 7 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4 Kualitas Air Rajungan | 8 |
| 2.2 Morfologi Insang Rajungan | 11 |
| 2.3 Logam Berat Pb | |
| 2.3.1 Karakteristik Logam Berat Pb | 14 |
| 2.3.2 Pencemaran Logam Berat Pb pada Perairan Mangrove..... | 15 |
| 2.3.3 Pencemaran Logam Berat Pb pada Insang Rajungan | 17 |
| 2.4 Heat Shock Protein | |
| 2.4.1 Pengertian dan Fungsi Heat Shock Protein (HSP) | 20 |
| 2.4.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70) | 22 |
| 2.4.3 Sintesis HSP70 pada Insang Rajungan | 23 |
| 2.5 Analisis Western Blot | 26 |
| 2.6 Roadmap Hasil Penelitian Mengenai Pencemaran Logam Berat Pb (Timbal) di Pantai Utara Pasuruan dan Ekspresi HSP70 Akibat Terpapar Logam Berat dengan Analisis Western Blot | 28 |
| 3. MATERI DAN METODE | |
| 3.1 Materi Penelitian | 30 |
| 3.2 Alat dan Bahan..... | 30 |
| 3.3 Metode Penelitian | 30 |
| 3.4 Teknik Pengambilan Sampel | 33 |
| 3.5 Prosedur Penelitian | 33 |
| 3.5.1 Preparasi Protein (Isolasi Protein) | 33 |
| 3.5.2 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE..... | 34 |
| A. Menyiapkan Sampel..... | 34 |
| B. Pembuatan Media/gel Elektroforesis SDS-PAGE..... | 35 |
| C. Running Elektroforesis SDS-PAGE..... | 36 |
| D. Running Sampel | 37 |
| E. Pewarnaan CBB Media/ Gel SDS-PAGE | 37 |
| 3.5.3 Pengukuran Berat Molekul Protein Sampel | 38 |
| 3.5.4 Pembuatan Kurva Standart Berat Molekul..... | 38 |
| 3.5.5 Analisis Reaksi Antigen dengan Metode Western Blot | 39 |
| 3.5.6 Parameter Pendukung Kualitas Air..... | 40 |
| A. Parameter Fisika Air..... | 40 |

B. Parameter Kimia Air 41

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Keadaan Umum Lokasi Pengambilan Sampel 43

 4.1.1 Lokasi dan Kondisi Mangrove..... 43

4.2 Kadar Logam Berat Pb pada Perairan, Sedimen, dan Insang Rajungan di Pantai Utara Pasuruan 48

 4.2.1 Kadar Logam Berat Pb pada Perairan dan Sedimen 50

 4.2.2 Kadar Logam Berat Pb pada Insang Rajungan..... 54

4.3 Kadar protein Organ Insang Rajungan 56

4.4 Profil Protein Organ Insang Rajungan Menggunakan Metode SDS-PAGE dan Deteksi HSP70 Menggunakan Metode Western Blotting 57

4.5 Data Kualitas Air 66

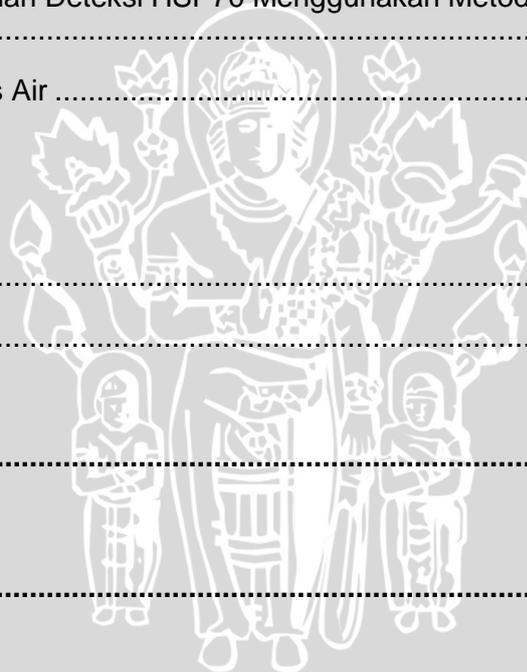
5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan 75

5.2 Saran 75

DAFTAR PUSTAKA..... 76

LAMPIRAN 84



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. Morfologi Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>)..... | 5 |
| 2. Anatomi Rajungan (<i>Portunus pelagicus</i>) | 6 |
| 3. Insang yang Terpapar Polutan..... | 18 |
| 4. Skematik Kerusakan sel akibat adanya stresor | 19 |
| 5. Mekanisme Pembentukan Protein Stres HSP70..... | 24 |
| 6. Persamaan Garis Kurva Kalibrasi Berat Molekul..... | 38 |
| 7. Kondisi Mangrove Pantai Kedawang..... | 45 |
| 8. Kondisi Mangrove Pantai Mlaten | 46 |
| 9. Kondisi Mangrove Pantai Penunggul..... | 48 |
| 10. Grafik Kadar Logam Berat pada Perairan di Lokasi Penelitian | 50 |
| 11. Grafik Kadar Logam Berat Pb pada Sedimen di Lokasi Penelitian ... | 52 |
| 12. Grafik Kadar Logam Berat pada Insang Rajungan | 54 |
| 13. Profil Protein Insang Rajungan dengan Elektroforesis SDS-PAGE dan Hasil Analisis HSP70 Menggunakan Metode Western Blot | 59 |
| 14. Grafik Linear Pita Protein Marker Insang Rajungan | 60 |



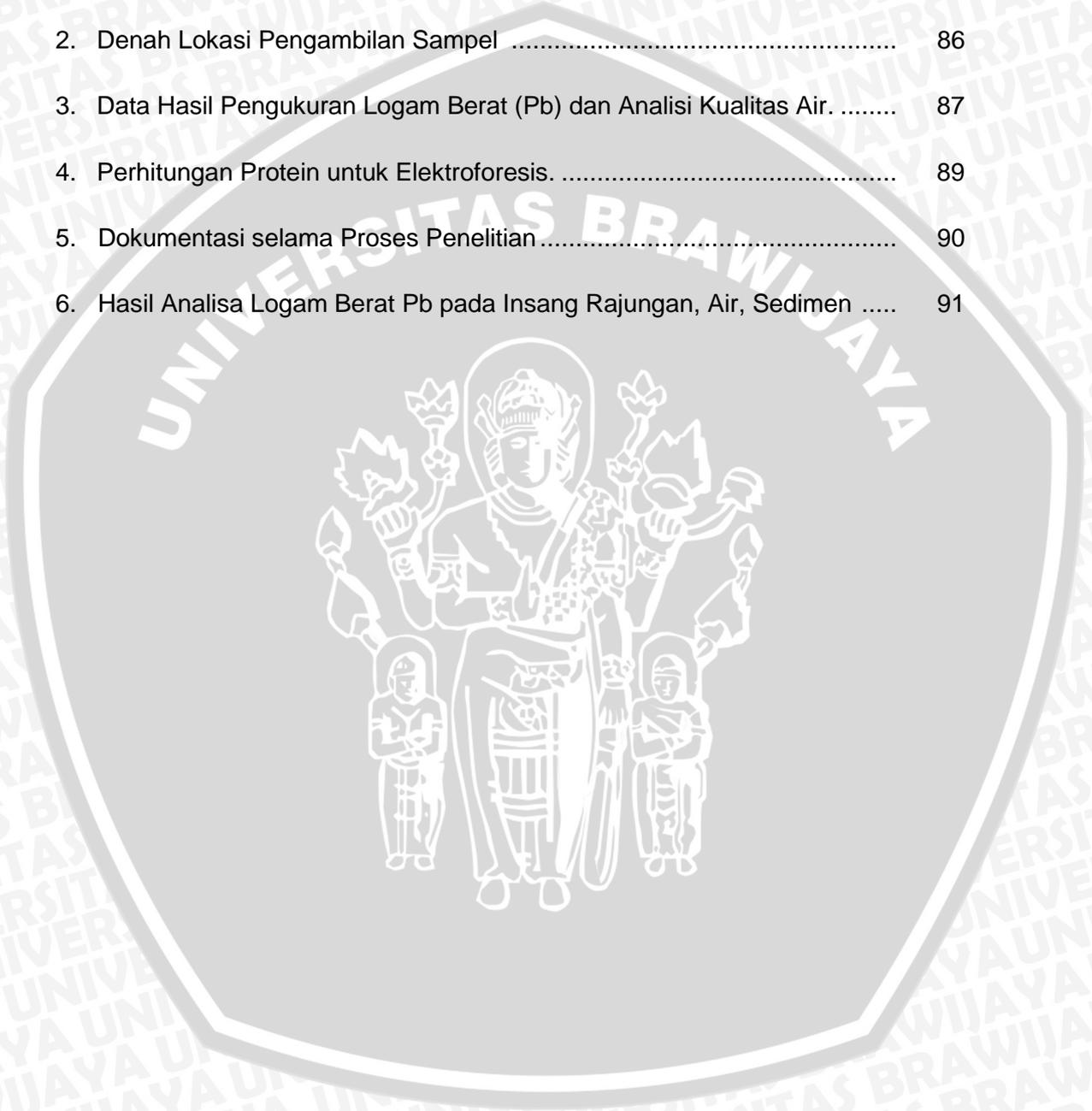
DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 1. Hasil Penelitian tentang Pencemaran Logam Berat Pb..... | 27 |
| 2. Hasil Penelitian tentang Heat Shock Protein (HSP70) | 31 |
| 3. Komposisi Larutan Staining dan Destaining..... | 40 |
| 4. Hasil Pengukuran Logam Berat Pb | 52 |
| 5. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Marker..... | 63 |
| 6. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Insang Rajungan pada Pantai Kedawang | 64 |
| 7. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Insang Rajungan pada Ketiga Lokasi Penelitian | 66 |
| 8. Data Hasil Pengukuran Kualitas Air..... | 68 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Alat dan Bahan yang Digunakan dalam Penelitian | 84 |
| 2. Denah Lokasi Pengambilan Sampel | 86 |
| 3. Data Hasil Pengukuran Logam Berat (Pb) dan Analisa Kualitas Air. | 87 |
| 4. Perhitungan Protein untuk Elektroforesis. | 89 |
| 5. Dokumentasi selama Proses Penelitian | 90 |
| 6. Hasil Analisa Logam Berat Pb pada Insang Rajungan, Air, Sedimen | 91 |







1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di antara berbagai jenis krustasea di Indonesia, rajungan (*Portunus pelagicus*) merupakan jenis yang mempunyai nilai ekspor tinggi dalam bentuk rajungan beku, maupun kemasan daging rajungan dalam kaleng. Selain dagingnya, cangkang rajungan kering juga di ekspor sebagai bahan chitosan. Chitosan dapat digunakan sebagai bahan pengawet makanan karena bersifat antibakterial (Juwana *et al.*, 2009).

Namun, kini semakin banyak dijumpai perilaku masyarakat dan industri yang kurang peduli terhadap lingkungan seperti membuang sampah maupun limbah cair yang tidak melalui proses pengolahan limbah di buang ke badan air sehingga menimbulkan kerusakan pada badan air seperti terjadinya sedimentasi, eutrofikasi, terdapatnya kandungan pestisida dalam air yang nantinya sampai ke laut. Selain itu banyaknya aktivitas perikanan seperti aktivitas kapal motor nelayan yang melintas maupun bersandar untuk pengisian bahan bakar, pergantian oli, pengecatan kapal, sehingga banyak menghasilkan limbah logam berat Pb yang berbahaya bagi biota perairan. Menurut Murtini (2006), menyatakan bahwa proses masuknya timbal (Pb) ke dalam perairan yaitu melalui pengendapan dan jatuhnya debu yang mengandung Pb hasil pembakaran bensin, erosi, dan limbah industri. Siaka (2008) menambahkan, umumnya cat anti korosi pada kapal motor mengandung timbal (Pb). Selain itu, Pb dapat digunakan sebagai zat tambahan bahan bakar dan pigmen timbal dalam cat yang merupakan penyebab utama peningkatan kadar Pb di lingkungan (Darmono, 1995 dalam Erlangga, 2007).

Penyerapan logam oleh *crustacea* akan diakumulasi pada jaringan tubuhnya terutama pada insang. Insang berperan pada proses respirasi, keseimbangan asam basa, regulasi ionik dan osmotik karena adanya jaringan epithelium branchial yang menjadi tempat berlangsungnya transport aktif antara organisme dan lingkungan. Tingginya kerusakan pada struktur insang akan berpengaruh pada proses metabolisme enzim dan osmoregulasi pada rajungan. Selain itu kerusakan pada sel yang di sebabkan oleh keracunan logam Pb atau faktor lain, sebagai contoh yaitu kondisi stress, bisa meningkatkan sensitivitas terhadap invensi viral dan bakteri. Hal ini dapat dengan cepat meningkatkan tingkat resiko kematian pada rajungan (Soegianto, 2004).

Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa terjadi kerusakan wilayah pesisir dan hutan mangrove dibuktikan dengan adanya perubahan hasil melalui uji kualitas air dimana setiap wilayah pantai tersebut sudah mengalami kerusakan yang perlu diperhatikan. Sebagai contoh dapat dilihat dari perubahan histopatologi insang rajungan (*Portunus pelagicus*) yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dimana terdeteksi beberapa kerusakan seperti kongesti, fusi, edema, dan hyperplasia (Permatasari, 2014). Kerusakan yang terjadi pada organ insang rajungan (*Portunus pelagicus*) disebabkan oleh berbagai macam pencemaran seperti bahan pencemar logam berat.

Organisme intertidal telah banyak digunakan dalam studi respon stres molekul, terutama produksi heat shock protein (HSP), yaitu HSP70. Produksi protein ini adalah cara untuk menanggapi lingkungan seluler yang terganggu, melindungi sel terhadap stres proteotoxic. Dengan demikian, protein seperti HSP70 telah dilaporkan untuk merespon beberapa tekanan, antara lain termasuk hipertermia, polusi, asidosis, stres osmotik, hipoksia, Reaktif Spesies oksigen (ROS), UV dan infeksi, Banyak faktor-faktor ini berlaku untuk organisme zona

intertidal, sehingga relevan dengan mempelajari bagaimana Hsp bervariasi dengan perubahan kondisi lingkungan (Madeira *et al.*, 2014).

Pada umumnya, polutan apapun dapat menyebabkan stres dalam biota ekosistem. Oleh karena itu, *Heat Shock Protein* (HSP) merupakan ekspresi yang biasa digunakan sebagai indikator stres selular pada hewan dan sinyal selular intra untuk induksi dari HSP70 (Sherman and Goldberg, 2001). Heat shock protein berfungsi untuk menjaga integritas protein dengan adanya respon terhadap keadaan lingkungan akibat logam berat atau bahan kimia (Iwama *et al.*, 1998).

Untuk itu diperlukan suatu biomarker sebagai alat dalam biomonitoring lingkungan. Ekspresi protein seperti HSP70 dapat dijadikan sebagai biomarker untuk mengetahui pengaruh suatu stresor pada tingkat seluler guna mendeteksi secara dini keberadaan stresor tersebut dalam lingkungan kawasan mangrove Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas maka masalah yang dirumuskan dalam penelitian ini yaitu bagaimana ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP 70) terhadap keberadaan total logam berat Pb pada insang rajungan (*Portunus pelagicus*) dengan kondisi yang berbeda-beda pada tiga lokasi.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP 70) yang terdeteksi pada sampel jaringan insang rajungan (*Portunus pelagicus*) pada perairan yang mengandung polutan logam berat Pb di ketiga lokasi penelitian.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

Memberikan informasi mengenai status kondisi rajungan (*Portunus pelagicus*) dilihat dari organ insang sebagai sistem pernapasan melalui analisis western blot yang menampilkan ekspresi *Heat Shock Protein (HSP 70)* sebagai biomarker kesehatan rajungan terhadap pengaruh polutan logam berat Pb dari lingkungan kawasan mangrove di tiga lokasi tersebut.

1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai langkah awal dalam menyusun suatu protein rekombinan berbahan materi hayati untuk selanjutnya bisa digunakan dalam perancangan vaksin untuk rajungan (*Portunus pelagicus*) ataupun spesies ikan lain terhadap infeksi yang berasal dari polutan logam berat.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di tiga pantai utara yang memiliki ekosistem mangrove berbeda yaitu Pantai Kedawang, Pantai Mlaten, dan Pantai Penunggul Kabupaten Pasuruan, Provinsi Jawa Timur, bulan Maret - Mei 2015. Sedangkan untuk pengukuran parameter kualitas air dilakukan di laboratorium Lingkungan dan Bioteknologi Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dan untuk analisis Western Blot dilakukan di Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rajungan (*Portunus pelagicus*)

2.1.1 Klasifikasi

Rajungan adalah salah satu anggota filum crustacea yang memiliki tubuh beruas-ruas. Klasifikasi rajungan (*Portunus pelagicus*) menurut Saanin (1984) adalah sebagai berikut :

| | |
|-----------|-----------------------------|
| Filum | : Arthropoda |
| Kelas | : Crustacea |
| Sub kelas | : Malacostraca |
| Ordo | : Eucaridae |
| Sub ordo | : Decapoda |
| Famili | : Portunidae |
| Genus | : Portunus |
| Spesies | : <i>Portunus pelagicus</i> |

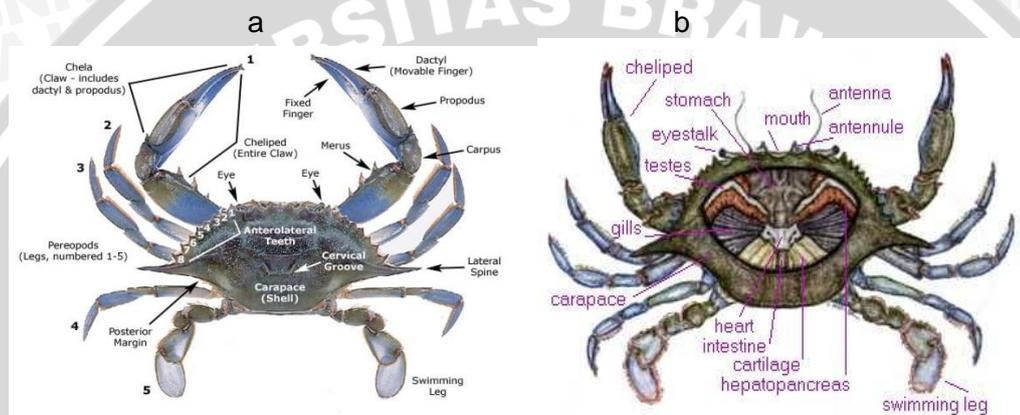


Gambar 1. Gambar morfologi Rajungan (*Portunus pelagicus*)

2.1.2 Morfologi dan Anatomi Rajungan

Menurut Nontji (1986), ciri morfologi rajungan mempunyai karapaks berbentuk bulat pipih dengan warna yang sangat menarik kiri kanan dari karapas terdiri atas duri besar, jumlah duri-duri sisi belakang matanya 9 buah. Rajungan

dapat dibedakan dengan adanya beberapa tanda-tanda khusus, diantaranya adalah pinggiran depan di belakang mata, rajungan mempunyai 5 pasang kaki, yang terdiri atas 1 pasang kaki (capit) berfungsi sebagai pemegang dan memasukkan makanan kedalam mulutnya, 3 pasang kaki sebagai kaki jalan dan sepasang kaki terakhir mengalami modifikasi menjadi alat renang yang ujungnya menjadi pipih dan membulat seperti dayung. Oleh sebab itu, rajungan dimasukan kedalam golongan kepiting berenang (swimming crab).



Gambar 2. Anatomi Rajungan (*Portunus pelagicus*). (a) Rajungan tampak atas (b) Rajungan tampak bawah

Rajungan mempunyai warna yang cerah kebiru-biruan, memiliki 2 buah capit yang panjang, 3 pasang kaki jalan dan sepasang kaki renang. Bagian tubuh eksternalnya terdiri atas antenna, antenulla, abdomen, karapas, celiped, mata, lateral spines, mulut, sponge, kaki renang dan kaki jalan. Sedangkan bagian tubuh internalnya terdapat insang, hati, hepatopankreas, usus, perut, testis/ovum, dan tulang rawan. Seperti yang dijelaskan oleh Nontji (1986), dimana ciri morfologi rajungan mempunyai karapaks berbentuk bulat pipih dengan warna yang sangat menarik kiri kanan dari karapas terdiri atas duri besar, jumlah duri-duri sisi belakang matanya 9 buah. Rajungan dapat dibedakan dengan adanya beberapa tanda-tanda khusus, diantaranya adalah pinggiran depan di belakang mata, rajungan mempunyai 5 pasang kaki, yang terdiri atas 1

pasang kaki (capit) berfungsi sebagai pemegang dan memasukkan makanan kedalam mulutnya, 3 pasang kaki sebagai kaki jalan dan sepasang kaki terakhir mengalami modifikasi menjadi alat renang yang ujungnya menjadi pipih dan membundar seperti dayung. Oleh sebab itu, rajungan dimasukan kedalam golongan kepiting berenang (*swimming crab*).

2.2.3 Habitat dan Penyebaran

Menurut Moosa (1980), habitat rajungan adalah pada pantai bersubstrat pasir, pasir berlumpur dan di pulau berkarang, juga berenang dari dekat permukaan laut (sekitar 1 m) sampai kedalaman 65 meter. Nyabakken (1986), mengemukakan bahwa rajungan hidup sebagai binatang dewasa di daerah estuaria dan di teluk pantai. Rajungan betina bermigrasi ke perairan yang bersalinitas lebih tinggi untuk menetasakan telurnya dan begitu stadium larvanya dilewati rajungan muda tersebut bermigrasi kembali ke muara estuaria.

Kepiting rajungan (*Portunus pelagicus*) sangat rentan dan gampang stress jika mengalami perubahan lingkungan. Menurut Nontji (1993) dalam Indriyani (2006), Rajungan hidup pada habitat pantai dengan dasar pasir, pasir lumpur, dan juga di laut terbuka. Rajungan biasanya diam di dasar perairan dan hidup di dasar perairan sampai di kedalaman 65 meter, tapi sesekali dapat juga terlihat berada dekat dipermukaan laut. Menurut Romimohtarto, (2000) dalam Sulkifli *et al.* (2009), Habitat portunidae adalah menyebar di perairan dangkal dan berlumpur dengan perairan yang tidak begitu dalam antara 10 – 15 m.

2.2.4 Kualitas Air Rajungan

Beberapa persyaratan kualitas air yang perlu diperhatikan antara lain kualitas fisika air yaitu suhu. Pada parameter kualitas kimia air terdiri dari: salinitas, pH, DO dan TSS.

A. Parameter Fisika Air

1. Suhu

Suhu merupakan faktor abiotik yang berperan penting dalam pengaturan aktifitas hewan akuatik. Suhu air mempengaruhi proses fisiologi ikan seperti respirasi, metabolisme, konsumsi pakan, pertumbuhan, tingkah laku, dan reproduksi serta mempertahankan hidup.

Perubahan suhu yang tinggi dalam perairan laut akan mempengaruhi proses metabolisme aktivitas tubuh dan syaraf rajungan. Kordi (2010), menyatakan pengaruh suhu secara tidak langsung adalah mempengaruhi metabolisme, daya larut gas-gas, termasuk oksigen serta berbagai reaksi kimia di dalam air. Semakin tinggi suhu air semakin tinggi pula laju metabolisme rajungan, yang berarti semakin besar konsumsi oksigennya padahal kenaikan suhu tersebut mengurangi daya larut oksigen dalam air. Menurut pendapat Galil (2006), kisaran temperatur yang dibutuhkan rajungan (*Portunus pelagicus*) yaitu 15 °C hingga 25°C.

2. Salinitas

Salinitas berperan sangat penting dalam pemeliharaan larva krustasea seperti zoea rajungan. Perubahan salinitas akan mempengaruhi sifat fungsional dan struktur tubuh organisme. Hal yang sama juga akan mengubah konsentrasi cairan tubuhnya sesuai dengan lingkungannya dengan kombinasi proses osmosis dan difusi, sehingga akan mempengaruhi proses molting.

Salinitas berpengaruh terhadap reproduksi, distribusi dan osmoregulasi. Perubahan salinitas tidak langsung berpengaruh terhadap perilaku biota tetapi berpengaruh terhadap perubahan sifat kimia air (Brotowidjoyo, *et al.* 1995 dalam Agus, 2008). Biota air laut mengatasi kekurangan air dengan mengkonsumsi air laut sehingga kadar garam dalam cairan tubuh bertambah. Dalam mencegah terjadinya dehidrasi akibat proses ini kelebihan garam harus dibatasi dengan jalan mengekskresi klorida lebih banyak lewat urine yang isotonik. Kepiting mengatur ion plasmanya agar tekanan osmotik didalam cairan tubuh sebanding dengan kapasitas regulasi.

Menurut Susanto (2007), rajungan umumnya hanya hidup di laut dengan salinitas sekitar 32-34 ppt, hasil yang didapat lebih rendah daripada kisaran salinitas yang umumnya dibutuhkan rajungan, hal ini dapat terjadi karena selain lokasi pengambilan sampel yang dekat dengan daerah estuary, banyak buangan dari limbah-limbah rumah tangga maupun limbah domestik yang mencemari kawasan mangrove sebagai habitat dari rajungan (*Portunus pelagicus*).

B. Parameter Kimia Air

1. pH

Menurut Ali (2005), yang menyatakan bahwa pH suatu perairan merupakan salah satu parameter yang penting dalam pemantauan kualitas perairan. Organisme perairan memiliki kemampuan yang berbeda dalam mentoleransi pH perairan. Kematian lebih sering diakibatkan oleh pH yang rendah daripada disebabkan pH yang tinggi. Batas toleransi organisme perairan terhadap pH bervariasi dan dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain suhu, oksigen terlarut, alkalinitas, adanya berbagai anion dan kation serta jenis stadia organisme.

Setiap perairan mempunyai pH yang tidak sama tergantung pada lingkungan perairannya dan setiap organisme mempunyai batas toleransi terhadap pH yang berbeda. pH air berpengaruh terhadap proses penguraian bahan makanan, jenis dan susunan zat dalam lingkungan perairan dan ketersediaan unsur hara. Zaidin *et al.* (2013), menyatakan bahwa kisaran pH untuk pertumbuhan rajungan yang baik yaitu mendekati pH netral yaitu 7 hingga 8.

2. DO (*Dissolved Oxygen*)

Oksigen terlarut merupakan variabel kimia yang mempunyai peran penting sekaligus menjadi faktor pembatas bagi kehidupan biota air (Ali, 2005). Boyd (1982) dalam Kordi dan Andi (2007), salinitas adalah kadar seluruh ion-ion yang terlarut didalam air. Komposisi ion-ion pada air laut dapat dikatakan mantap dan didominasi oleh ion-ion tertentu seperti klorida, karbonat, bikarbonat, sulfat, natrium, kalium dan magnesium.

Menurut Connel dan Miller (1995) dalam Mulya (2000), menyatakan bahwa secara ekologis konsentrasi oksigen terlarut juga menurun dengan adanya penambahan bahan organik, karena bahan organik tersebut akan diuraikan oleh mikroorganisme yang mengkonsumsi oksigen yang tersedia. Berdasarkan hasil analisa oksigen terlarut di perairan ekosistem mangrove masih dalam kisaran normal dan baik untuk kehidupan kepiting. Menurut Effendi (2003), menyatakan bahwa kadar oksigen terlarut di perairan biasanya kurang dari 10 mg/l. Sedangkan menurut pendapat Adi (2011), oksigen terlarut didalam air antara 4-6 ppm dianggap paling ideal untuk tumbuh dan berkembang larva.

3. TSS (*Total Suspended Solid*)

Zat padat tersuspensi (*Total Suspended Solid*) adalah semua zat padat (pasir, lumpur, dan tanah liat) atau partikel-partikel yang tersuspensi dalam air dan dapat berupa komponen hidup (biotik) seperti fitoplankton, zooplankton, bakteri, fungi, ataupun komponen mati (abiotik) seperti detritus dan partikel-partikel anorganik (Tarigan dan Edward, 2003).

Konsentrasi TSS dipengaruhi oleh kekeruhan dan kecerahan perairanyang disebabkan oleh padatan tersuspensi berupa partikel anorganik, partikel organik atau campuran dari keduanya. Partikel-partikel tersebut berasal dari macam-macam sumber, misal dari *run-off*, aliran sungai, buangan industri, rumah tangga, kikisan tanah atau erosi tanah terbawa hingga badan air (Edward dan Abdul, 2003).

2.2 Morfologi Insang Kepiting Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Pernapasan adalah proses pengikatan oksigen (O_2) dan pengeluaran karbondioksida (CO_2) oleh darah melalui permukaan alat pernafasan. Proses pengikatan O_2 juga dipengaruhi perbedaan tekanan parsial O_2 antara perairan dengan darah. Perbedaan menyebabkan gas-gas berdifusi ke dalam darah ke luar melalui alat pernapasan seperti insang (Fujaya, 2004). Insang adalah organ vital dalam proses respirasi, merupakan organ pertama yang berhubungan langsung dengan bahan toksik di dalam perairan, dengan permukaan yang luas dan terbuka. Bagian ini menjadi sasaran utama bagi bahan toksik yang ada di dalam perairan. Struktur jaringan insang yang tersusun atas epitel tipis selapis dan secara langsung berhubungan dengan zat toksik di lingkungan, mengakibatkan organ tersebut mudah mengalami kerusakan (Wong, 2000 dalam Widayati, *et al.*, 2011).

Insang terbentuk dari lengkungan tulang rawan yang mengeras, dengan beberapa filamen insang yang terdiri dari banyak lamella. Lamella inilah yang menjadi tempat pertukaran gas pada insang yang terdiri dari sel-sel epitel pada bagian luar, membran dasar dan sel-sel tiang sebagai penyangga bagian dalam. Epitelium mengandung jaringan pembuluh darah kapiler yang digunakan untuk menutupi pinggiran lamella insang yang tidak menempel pada lengkung insang.

Insang merupakan alat respirasi ikan seperti paru – paru pada manusia atau hewan darat lainnya. Luas permukaan epitel insang hampir setara dengan luas total permukaan kulit. Bahkan pada sebagian besar spesies ikan luas permukaan epitel insang ini jauh melebihi kulit. Fungsi lain dari insang yaitu mengatur homeostatis ikan. Lapisan epitel insang yang tipis dan berhungan langsung dengan lingkungan luar menyebabkan insang berpeluang besar terinfeksi penyakit. Insang juga berfungsi sebagai pengatur pertukaran garam dan air, pengeluaran limbah – limbah yang mengandung nitrogen. Kerusakan struktur yang ringan sekalipun dapat sangat mengganggu pengaturan osmose dan kesulitan pernafasan (Nabib dan Pasaribu, 1989).

Insang yang terdiri dari dua rangkaian yang tersusun atas empat lengkungan tulang rawan dan tulang keras (holobrankhia) yang menyusun sisi faring. Masing – masing holobrankhia yang menonjol dari pangkal posterior lengkung insang. Hemibrankhia terdiri dari dua baris filamen tipis panjang yang disebut lamela primer. Lamela primer permukaannya mengalami perluasan oleh adanya lamela sekunder yang merupakan lipatan semilunar yang menutupi permukaan dorsal dan ventral. Insang juga dilengkapi dengan lapisan sel – sel penghasil mukus dan sel – sel yang mengekresi amonia dan kelebihan garam. Pada bagian tepi tengah anterior dilengkapi struktur (gill rakers) yang berperan menyaring partikel – partikel pakan (Roberts, 2001).

Insang ikan rentan terhadap parasite, bakteri, fungi, serta sensitive terhadap perubahan fisik dan kimiawi terhadap air. Menurut Robert (2001), ada hubungan yang erat antara perubahan – perubahan morfologi insang. Morfologi insang dapat menjadi sebuah indicator yang baik terhadap kualitas air dan kondisi kesehatan umum ikan yang dibudidayakan. Menurut Wijayanti (2004) dalam Destiany (2007), pengertian histopatologi adalah ilmu yang mempelajari perubahan struktur dan fungsi di dalam jaringan dan organ tubuh yang menyebabkan atau disebabkan oleh penyakit yang diproses secara histologi.

Insang sangat berperan dalam meyelenggarakan homeostasis lingkungan bagi ikan. Lapis epitelnya tipis untuk memudahkan pertukaran gas, namun hal ini pun menjadikan insang sang rawan terhadap infeksi dan hama – hama penyakit. Selain fungsinya dalam pertukaran gas, insangpun berfungsi sebagai pengatur pertukaran garam dan air, pengeluaran limbah – limbah yang mengandung nitrogen (Pazra, 2008).

Insang merupakan komponen utama sistem respirasi ikan. Beberapa perubahan histopatologi pada insang yang umum terjadi antara lain : perubahan regresif, anomali sirkulasi, dan perubahan progresif. Banyak agen patologis menyebabkan edema, vakuolasi, nekrosa lamela sekunder, dan sekresi mukus berlebihan sampai kematian sel mukus. Umumnya edema akan disertai radang yang dapat diketahui dari infiltrasi sel – sel radang sebagai reaksi pertahanan (Takashima dan Hibiya, 1995).

Contoh kerusakan insang yaitu hiperplasia. Menurut Roberts (2001), hiperplasia bisa terjadi pada lamella primer dan sekunder. Pada lamella primer, hiperplasia disebabkan oleh pembelahan sel-sel clorid secara berlebihan sedangkan pada lamella sekunder, terjadi akibat pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol. Awal mula munculnya hiperplasia, ditandai dengan munculnya edema pada insang ikan, yaitu pembengkakan sel atau sel epitel yang

mengalami penambahan ukuran atau volume suatu bagian untuk peningkatan jumlah sel. Kerusakan lebih lanjut dari edema dan hiperplasia adalah fusi. Fusi merupakan peleburan beberapa lamella sekunder menjadi satu bagian yang jika fusi ini menjadi parah akan mengalami peningkatan kerusakan yang disebut dengan kerusakan struktur lamella yang merupakan tingkat kerusakan parah.

2.3 Logam Berat Pb

2.3.1 Karakteristik Logam Berat Pb

Logam Pb termasuk ke dalam kelompok logam-logam golongan IV-A dengan nomor atom 82 dan bobot 207,2. Penyebaran Pb di bumi sangat sedikit yaitu 0,0002 % dari seluruh lapisan bumi. Logam Pb terdapat di perairan baik secara alamiah ataupun sebagai dampak dari aktifitas manusia. Logam ini masuk ke perairan melalui pengkristalan Pb di udara dengan bantuan air hujan. Di samping itu, proses korosifikasi dari batuan mineral akibat hampasan gelombang dan angin, juga merupakan salah satu jalur sumber Pb yang akan masuk ke dalam perairan (Palar, 2002).

Timbal (Pb) merupakan salah satu pencemar yang dipermasalahkan karena bersifat sangat toksik dan tergolong sebagai bahan buangan beracun dan berbahaya (Purnomo dan Muchnyidin, 2007). Selain itu, Pb dapat digunakan sebagai zat tambahan bahan bakar dan pigmen timbal dalam cat yang merupakan penyebab utama peningkatan kadar Pb di lingkungan (Darmono, 1995).

Menurut Fergusson (1990), apabila logam berat Pb masuk ke dalam tubuh manusia maka logam berat tersebut akan diakumulasi dalam jaringan tubuh dan tidak bisa diekskresikan lagi keluar tubuh. Pada kadar yang sudah tinggi di tubuh manusia akan menyebabkan dampak negatif yang serius, diantaranya:

- Menghambat aktifitas enzim, sehingga proses metabolisme terganggu
- Menyebabkan abnormalitas kromosom (gen)
- Menghambat pertumbuhan janin
- Menurunkan fertilitas wanita
- Menghambat pembentukan sperma pada pria (spermatogenesis)
- Mengurangi konduksi syaraf tepi
- Menghambat pembentukan hemaglobin
- Menyebabkan kerusakan ginjal
- Menyebabkan kekurangan darah
- Menyebabkan gangguan emosional dan tingkah laku

Timbal merupakan salah satu logam berat yang dapat menurunkan kualitas air. Dalam kadar yang tinggi logam tersebut dapat mengganggu sistem saraf, organ dan sistem organ. Konsentrasi Pb yang mencapai 188 mg/l, dapat membunuh ikan. Sedangkan krustase setelah 245 jam akan mengalami kematian, apabila pada badan air konsentrasi Pb adalah 2,75 - 49 mg/l (Palar, 2002).

2.3.2 Pencemaran Logam Berat Pb pada Perairan Mangrove

Kawasan pantai merupakan ekosistem yang rentan terhadap pencemaran, karena sebagai tempat pertemuan antara ekosistem darat dan laut. Pantai merupakan tempat penampungan senyawa beracun yang dihasilkan oleh aktivitas daratan (Widianarko, 2002). Logam berat dari hasil buangan industri pada akhirnya akan mengendap pada berbagai macam komponen ekosistem seperti air, sedimen dan bahan terlarut air dan biota. Pada umumnya timbunan logam-logam berat yang sangat besar pada lingkungan laut terdapat pada sedimen (Ahsanullah *et al.*, 1984).

Perairan yang mengandung logam berat Pb dalam jangka waktu yang lama akan mengakibatkan akumulasi dan menurunkan daya dukung perairan. Akumulasi logam Pb yang berkelanjutan akan mengakibatkan terganggunya dan rusaknya ekosistem perairan dan lingkungan sekitarnya (Supriyaningrum, 2006 dalam Makmur, 2013).

Logam berat yang dilimpahkan ke perairan, baik di sungai ataupun laut akan dipindahkan dari badan airnya melalui beberapa proses yaitu : pengendapan, adsorpsi dan absorpsi oleh organisme perairan. Logam berat mempunyai sifat yang mudah mengikat bahan organik dan mengendap di dasar perairan dan bersatu dengan sedimen sehingga kadar logam berat dalam sedimen lebih tinggi dibandingkan dalam air (Harahap, 2001).

Beberapa material yang terkonsentrasi di udara dan permukaan air mengalami oksidasi, radiasi ultraviolet, evaporasi dan polymerisasi. Jika tidak mengalami proses pelarutan, material ini akan saling berikatan dan bertambah berat sehingga tenggelam dan menyatu dalam sedimen. Logam berat yang diadsorpsi oleh partikel tersuspensi akan menuju dasar perairan, menyebabkan kandungan logam di air menjadi lebih rendah. Hal ini tidak menguntungkan bagi organisme yang hidup di dasar seperti *oyster* dan kepiting sebagai *filter feeder*, partikel sedimen ini akan masuk ke dalam sistem pencernaannya (Williams, 1979 dalam Erlangga, 2007).

Berdasarkan peraturan pemerintah MENKLH (2004) kandungan logam berat yang boleh masuk ke perairan laut mempunyai batasan, yaitu baku mutu logam berat Pb pada air laut untuk biota laut tidak boleh melebihi 0,008 mg/l.

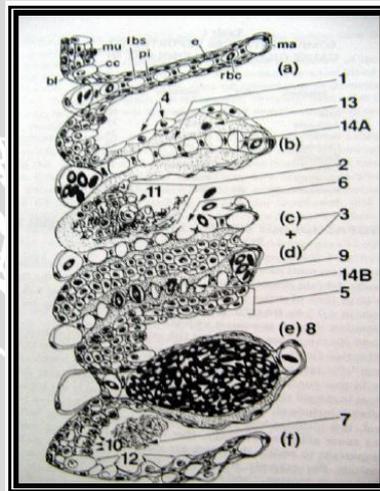
2.3.3 Mekanisme Pencemaran Logam Berat Pb pada Insang Rajungan

Biota air yang hidup dalam perairan tercemar logam berat, seperti mengakumulasi logam berat tersebut dalam jaringan dalam tubuhnya. Makin tinggi kandungan logam berat dalam perairanakan semakin tinggi pula kandungan logam berat yang terakumulasi dalam tubuh hewan air tersebut. Adapun pencemaran logam berat masuk ke dalam jaringan tubuh makhluk hidup melalui beberapa jalan, yaitu saluran pernapasan, pencernaan dan penetrasi melalui kulit (Zonggonao, 2005). Pencemaran logam berat di kawasan pantai dapat mengancam keamanan bahan pangan laut, menyebabkan racun dan kepunahan (Laws, 1981).

Logam berat timbal berbahaya karena bersifat biomagnifikasi, yaitu dapat terakumulasi dan tinggal di jaringan tubuh organisme dalam jangka waktu yang lama sebagai racun yang terakumulasi. Logam-logam yang dapat menyebabkan keracunan biasanya terkait dengan protein sebagai metalotionin (Darmono, 1995).

Bahan Pencemar (racun) masuk ke tubuh organisme atau ikan melalui proses absorpsi. Absorpsi merupakan proses perpindahan racun dari tempat pemejanan atau tempat absorpsinya ke dalam sirkulasi darah. Absorpsi, distribusi dan ekskresi bahan pencemar tidak dapat terjadi tanpa transpor melintasi membran. Proses transportasi dapat berlangsung dengan 2 cara : transpor pasif (yaitu melalui proses difusi) dan transpor aktif (yaitu dengan sistem transpor khusus, dalam hal ini zat lazimnya terikat pada molekul pengemban). Bahan pencemar dapat masuk ke dalam tubuh ikan melalui tiga cara yaitu melalui rantai makanan, insang dan difusi permukaan kulit (Hutagalung, 1991).

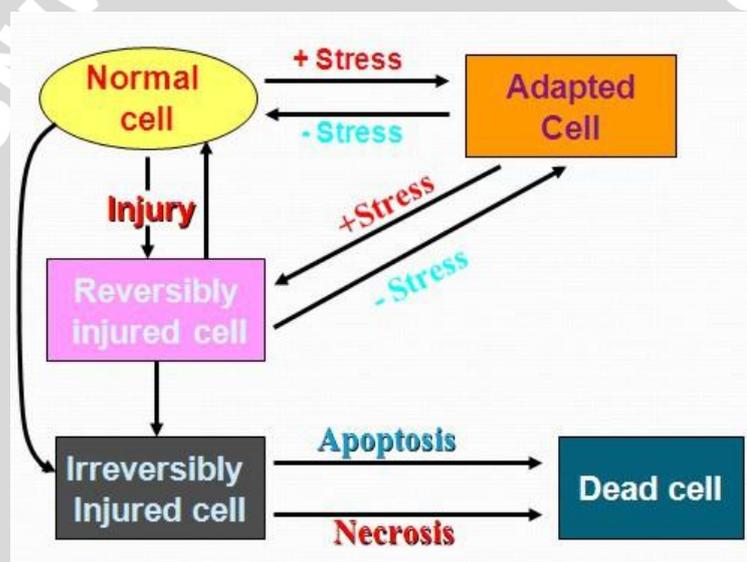
Toksisitas logam-logam berat yang melukai insang dan struktur jaringan luar lainnya, dapat menimbulkan kematian terhadap ikan yang disebabkan oleh proses anoxemia, yaitu terhambatnya fungsi pernapasan yakni sirkulasi dan ekskresi dari insang. Unsur-unsur logam berat yang mempunyai pengaruh terhadap insang adalah timah, seng, besi, tembaga, kadmium dan merkuri. Percobaan yang dilakukan terhadap ikan *Carasius auratus* menunjukkan bahwa urutan penyerapan logam berat oleh chemoreceptor (*taste bund*) dari ikan adalah merkuri, tembaga, seng, dan timah (Widodo,1980 dalam Erlangga, 2007). Perubahan yang terjadi pada filamen insang dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 3. Insang yang terkena polutan. (a-f) lamella, (1) epithelial lifting (2) nekrosis (3) lamella fusion (4) hypertrophy (5) hyperplasia (6) epithelial rupture (7) mucus secretion (8) lamella aneurism (9) vascular congestion (10) mucus cell proliferation (11) Chloride cell damage early (12) chloride cell proliferation (13) leucocyte infiltration of epithelium (14A) lamella blood sinus dilates (14B) Lamella sinus constricts. (Heath, 1987 dalam Erlangga, 2007).

Penyerapan logam berat oleh kepiting akan berpengaruh ada proses metabolisme enzim dan osmoregulasi. Selain itu jika logam berat terus-menerus masuk pada tubuh biota yang terakumulasi ke dalam jaringan tubuhnya akan mengakibatkan kerusakan sel dan kondisi stres (Zonggonao, 2005).

Kondisi stres sering dilakukan oleh gangguan dan perubahan fungsi sel di berbagai tingkat dengan situasi yang dihasilkan terkait dengan peningkatan protein stres (Currie et al., 1999). Pada tingkat sel, yang deplesi berat ATP adalah stres proteotoxic dan sel. Faktor merusak yang menyebabkan disfungsi, destabilisasi dan agregasi dari banyak protein seluler (Kabakov et al., 2002). Sebuah peningkatan spesies reaktif oleh polutan menyebabkan transien penurunan ATP seluler dapat menyebabkan peningkatan produksi HSP70 yang pada gilirannya dapat memberikan resistensi dan toleransi terhadap kondisi stres (Wang et al., 1996).



Gambar 4. Skematik Kerusakan Sel Akibat Adanya Suatu Stressor Lingkungan (Ayuning, 2014).

Pada gambar 4 dijelaskan bahwa stressor dapat mengakibatkan homeostatis sel terganggu. Dimana sebuah sel yang masih normal (*normal cell* dan *adapted cell*) apabila terdapat suatu stressor yang dapat mengakibatkan organisme mengalami stres sel akan berusaha beradaptasi, namun jika mengalami stres atau beban stres itu ditambah lagi maka sel mengalami kerusakan refersible. Saat keadaan stres mulai menghilang maka sel dapat kembali beradaptasi (*adapted cell*) atau langsung menjadi normal kembali.

Demikian juga pada sel yang normal pada saat mendapat suatu rangsangan seperti luka maka sel mengalami kerusakan ke arah irrefersibel (tidak dapat pulih kembali). Apabila suatu sel mengalami rangsangan yang terlalu besar dan lama maka sel tidak dapat lagi kembali ke kondisi awal dan menjadi bersifat irrefersibel. Demikian pula sel yang normal jika mendapat rangsangan terlalu besar maka sel bisa langsung bersifat irrefersibel. Hanya ada satu pilihan bagi sel irrefersibel, yaitu kematian sel (Ayuning, 2014).

2.4 Heat Shock Protein

2.4.1 Pengertian dan Fungsi Heat Shock Protein (HSP)

HSP merupakan molekul chaperon intraseluler superfamili multigenik yang hadir di semua kompartemen subseluler yang berbeda dari semua jenis sel baik organisme prokariot maupun organisme eukariot (Robert, 2003). Secara alami sel dapat merespon kehadiran suatu stressor (Iwama *et al.*, 2003). Tingkat toksisitas yang dihadirkan dari zat beracun adalah dosis independen pada kondisi lingkungan seperti suhu, pH, kadar oksigen, dan keberadaan molekul residu (Capkin *et al.*, 2006; Singh dan Mishra, 2009; Gulfer *et al.*, 2009). Polutan dapat menghasilkan perubahan metabolik pada tingkat seluler dengan cara mempengaruhi sistem enzim (Feldhaus *et al.*, 2008).

Pada suatu kondisi temperatur yang tinggi atau adanya bahan kimia tertentu, bentuk struktural protein dapat menjadi labil dan bahkan mungkin akan terbuka rantai-rantai polipeptida dalam sintesis protein sehingga mengakibatkan hilangnya fungsi dari protein tersebut. Protein merupakan polimer linier yang disintesis oleh ribosom dari asam – asam amino membentuk rantai – rantai polipeptida. Sel dapat menanggapi ancaman adanya perubahan lingkungan tersebut dengan memproduksi peningkatan jumlah protein pelindung khusus (Walter dan Buchner, 2002).

Dalam keadaan stabil atau tanpa tekanan apapun, protein stress memiliki fungsi konstitutif yang penting dalam metabolisme protein dalam tubuh organisme (Wepener *et al.*, 2005). Tingkatan stress baik yang rendah sampai menengah memicu pembentukan suatu kelas molekul *chaperon* (protein pengarah protein) yang disebut heat shock protein (HSP). HSP ini berfungsi untuk melindungi sel, jaringan dan keseluruhan organisme dari stress yang lebih kuat (Krebs dan Bettencourt, 1999). HSP adalah protein yang sangat terpelihara dan terdapat di seluruh sel, berperan penting dalam peningkatan perlindungan pada sel selama kondisi stress.

Peran protein heat shock yaitu menjaga hubungan fungsional antara respon stress seluler, respon stress pada organisme dan proses fisiologis pada tingkat yang lebih tinggi dari organisasi biologis. Protein heat shock secara kolektif hanya merupakan salah satu dari mekanisme seluler yang menggunakan hewan uji dalam menghadapi toleransi stress dan protein ini memiliki efek pleiotropik yang berinteraksi dengan beberapa system dengan cara yang beragam. Dengan demikian respon stress seluler memiliki dampak dan dipengaruhi oleh berbagai proses di semua tingkat organisme biologis. Pendekatan genomik secara fungsional dan evolusi akan menjadi penting untuk memahami mekanisme pengaturan yang kompleks dan terpadu akibat perubahan lingkungan alami hidupnya dengan menggunakan hewan uji (Basu *et al.*, 2002).

Protein heat shock (HSP) merupakan komponen penting dalam fisiologis seluler yang ditandai dengan kehadirannya di intraseluler (yaitu di sitoplasma, mitokondria, kloroplas, retikulum endoplasma). Keluarga protein stress 70-kDa (HSP70) sebagian besar ditemukan dalam sel dalam bentuk konstitutif 73-kDa (HSC70) dan bentuk inducible 72-kDa (HSP70) (Feder dan Hofmann, 1999). Keluarga utama HSP tersebut adalah HSP90 (85-90 kDa), HSP70 (68-73 kDa), dan *low-molecular-mass* HSP (16-24 kDa) yang memiliki peranan yang berbeda

dalam intraseluler yaitu HSP90 berperan aktif dalam mendukung berbagai komponen reseptor sitoskeleton, enzim dan hormone steroid; HSP70 berperan dalam membantu proses pelipatan rantai polipeptida yang baru disintesis dalam peran sebagai *chaperon* molekuler; dan *low-molecular-mass* memiliki fungsi berbeda dan mungkin juga berfungsi sebagai *chaperon* molekuler yaitu mencegah penggabungan protein yang tidak dapat diperbaiki (Iwama, 2008).

2.4.2 Heat Shock Protein 70 (HSP70)

HSP70 adalah HSP utama yang paling tinggi dijumpai pada organisme eukariotik dan prokariotik, keberadaannya sangat terpelihara dan esensial bagi kehidupan (Ang *et al.*, 1991 dalam Nadeau *et al.*, 2001). HSP70 merupakan molekul *chaperon* intraseluler yang ditemukan di dalam sitosol, mitokondria, retikulum endoplasma, dan nukleus eukariot (Sanders, 1994). Namun dalam kondisi tertentu HSP70 dapat dilepaskan ke ekstraseluler dari sel tumor dalam suatu kompleks dengan polipeptida intraseluler yang dapat memicu komponen sistem imun untuk menjalankan imunitas antitumor (Theriault *et al.*, 2006).

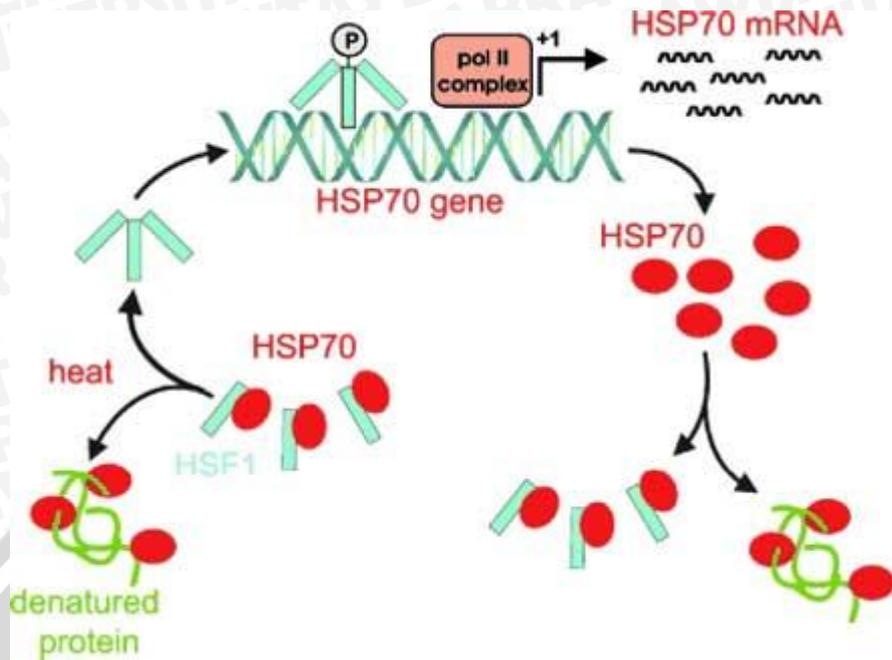
Keluarga HSP70 merupakan protein stress utama yang diekspresikan sebagai respon terhadap stress lingkungan. Protein stress ini dapat bermanfaat sebagai biomarker (*biological respon marker*) yang berguna dalam penerapan biomonitoring (*biological monitoring*) di lingkungan perairan (Lewis *et al.*, 1999 dalam Nadeau *et al.*, 2001). HSP70 merupakan indikator yang sangat sensitif untuk mendeteksi kondisi stress yang diakibatkan oleh adanya suatu stresor lingkungan termasuk keberadaan logam berat (Sanders, 1993 dalam Haap Kohler, 2009). Pengembangan biomarker sensitif dapat mendeteksi secara dini perubahan dalam jalur pengaturan seluler yang dipicu oleh kontaminan. Hal ini penting untuk menilai secara akurat pengaruh polutan terhadap kesehatan organisme akuatik (Sanders, 1994; Feder dan Hoffman, 1999).

2.4.3 Sintesis HSP70 Pada Insang Rajungan (*Potunus pelagicus*)

Heat shock protein (HSP) pertama kali ditemukan pada hewan invertebrata yaitu lalat buah (*Drosophila busckii*) (Ritossa, 1962 dalam Monari *et al.*, 2011). Sebagai molekul *chaperon*, HSP70 berperan membantu pelipatan rantai polipeptida yang baru disintesis serta melakukan perbaikan dan mendegradasi protein yang berubah bentuk atau sifatnya (Basu *et al.*, 2002). HSP tertentu berperan baik dalam sistem imun bawaan dan sistem imun adaptif. HSP tertentu memiliki kemampuan untuk memodulasi sistem imun bawaan yang tidak tergantung pada peptida pendamping serta sebagai aktivator kuat dalam sistem imun bawaan (Robert, 2003).

Terdapat suatu model Proteotoxicity yaitu protein yang didenaturasi (Morimoto *et al.*, 1996 dalam Iwama *et al.*, 1998) menerangkan bahwa kondisi stress dapat merusak bentuk asli protein dalam sel dan melibatkan HSP70 sebagai sensor utama dan sebagai mediator dari peristiwa penting yang mengarah pada produksi HSP70 itu sendiri. Pengaruh dari stresor mengakibatkan kegagalan dalam pelipatan pendamping lainnya terkarantina dalam membantu proses atau kerusakan sel (Iwama, 1998).

Selama di bawah tekanan stres, protein HSP terlibat dalam pelipatan polipeptida proses translokasi protein dan denaturasi protein serta berperan dalam meminimalisasi terbentuknya agregasi protein (Lopez-Legentil *et al.*, 2008). HSP dikenal sebagai protein indikator stres karena ekspresi transkripsi dan translasinya diinduksi oleh responnya terhadap stres yang disebabkan oleh perubahan suhu (Koziol *et al.*, 1996; Lopez-Legentil *et al.*, 2008), dan logam berat misalnya Pb, Zn, Cd, Cu (Cebrian *et al.*, 2006; Cebrian *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2006).



Gambar 5. Mekanisme pembentukan protein stress HSP70 (Yunus, 2013).

Prinsip Heat Shock Protein (HSP) yaitu memastikan protein yang ada di dalam tubuh berada dalam bentuk yang semestinya dan dalam tempat yang seharusnya. Protein tersebut sudah ada di dalam tubuh. Protein dalam tubuh ada dua jenis kondisi yaitu yang aktif dan inaktif. Kondisi protein inaktif akan bekerja pada kondisi tertentu sebagai respon atas perubahan lingkungannya, dalam penelitian ini yaitu HSP70. Pengaruh logam berat akan mengakibatkan timbulnya kondisi panas karena terdapat signal transduser di dalam sel yang mengakibatkan denaturasi protein. Ketika protein terdenaturasi rantai asam nukleatnya terpisah. Reaksi panas tersebut di direspon oleh HSR (Heat Shock Respon) yang melibatkan HSF (Heat Shock Transcription Factor). HSR akan mengkode DNA dan ditranskripsi oleh HSF menjadi RNA. Kemudian diterjemahkan dalam bentuk mRNA pada proses translasi untuk menjadi protein fungsional yaitu ekspresi HSP70.

Pembentukan protein secara alami sama dengan ekspresi genetik. Kode genetik yang dibawa DNA ditranskripsi menjadi RNA, yang berperan sebagai cetakan bagi translasi yang dilakukan ribosom. Sampai tahap ini, protein masih setengah jadi, hanya tersusun dari asam amino proteinogenik. Melalui mekanisme pascatranslasi, terbentuklah protein yang memiliki fungsi penuh secara biologi. Sebenarnya, jumlah protein yang aktif hanya sekitar 20% dari keseluruhan jenis protein yang bisa dihasilkan dalam tubuh. Sebagian besar protein justru berada dalam kondisi inaktif, yang hanya diproduksi pada kondisi tertentu sebagai respon atas perubahan lingkungannya (Yunus, 2013).

Secara molekuler protein HSP dapat mengatur respon seluler baik secara primer maupun secara sekunder. Pada kondisi alami tanpa tekanan stres sel akan mempertahankan dirinya dalam merespon kondisi lingkungan di sekitarnya (Iwama *et al.*, 2003). Namun pada saat sel merespon tekanan stress terhadap lingkungan, maka sel akan membentuk suatu kelas *chaperon* (protein pengarah protein) secara molekuler yang disebut dengan *heat shock protein* (HSP). HSP ini akan terinduksi di dalam sel untuk melindungi kerusakan sel, jaringan, dan keseluruhan organ yang lenih kuat akibat adanya tekanan stress lingkungan (Krebs dan Bettencourt, 1999).

Gen HSP70 tidak memiliki intron, sehingga gen HSP70 mudah mengalami transkripsi menjadi mRNA-HSP70. Kemudian mRNA-HSP70 langsung ditranslasi dengan cepat membentuk HSP70 yang baru. Maka pada saat organisme mengalami stress lingkungan, memicu proses transkripsi gen HSP70 menjadi mRNA-HSP70. Kemudian mRNA-HSP70 keluar dari inti sel menuju ribosom untuk melakukan proses translasi dan kemudian mensintesis protein HSP70 untuk mengikat *unfolded protein* (Ait-Aissa *et al.*, 1999 dalam Basson, 2006). Gen HSP akan aktif setelah mendapat sinyal dari luar sel yaitu adanya keberadaan radikal bebas, sebagai system pertahanan tubuh organisme

yang tidak sesuai akan lingkungannya. HSP70 akan terekspresikan tergantung dari fungsi proteksinya akibat kerusakan dan berat ringannya kerusakan sel (Yudiarto, 2007).

2.5 Analisis *Western Blot*

Western Blot pertama kali dibuat oleh W. Neal Burnette dan dinamai *western blot* sebagai olok-olokan terhadap teknik southern blot yang pertama kali ditemukan. *Western blot* merupakan teknik untuk mendeteksi protein spesifik pada sampel jaringan yang homogenat ataupun dari suatu ekstraksi berdasarkan kemampuan protein tersebut berikatan dengan antibodi. Teknik ini menggunakan gel elektroforesis untuk memisahkan protein berdasarkan panjang polipeptida atau berdasarkan struktur 3D-nya. Protein tersebut kemudian ditransfer ke sebuah membran, biasanya nitroselulosa atau PVDF, dimana mereka kemudian akan dilacak dengan menggunakan antibodi yang spesifik kepada protein target (Wane, 2014).

Elektroforesis merupakan suatu proses bergeraknya molekul yang bermuatan di dalam suatu medan listrik dimana molekul yang bergerak tergantung pada muatan yang dimiliki, bentuk dan ukurannya. Prinsip kerja elektroforesis adalah memisahkan molekul-molekul bermuatan listrik berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan muatan listriknya. Khusus untuk DNA, pemisahan tidak didasarkan atas perbedaan muatan listriknya, tetapi menurut ukuran dan konformasi atau struktur fisik molekulnya. Gel yang biasa digunakan adalah agarosa dan poliakrilamid. Gel agarosa digunakan untuk memisahkan sampel DNA dengan ukuran dari beberapa ratus hingga 20.000 pasang basa (pb), sedangkan gel poliakrilamid digunakan untuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil. Molekul DNA bermuatan negatif sehingga di dalam medan listrik akan bermigrasi melalui matriks gel menuju kutub positif

(anode). Makin besar ukuran molekulnya, makin rendah laju migrasinya. Jika hubungan antara ukuran molekul dan laju migrasi 10^2 dipetakan dalam suatu grafik logaritmik, maka akan diperoleh kurva linier. Sehingga elektroforesis ini dapat digunakan untuk separasi makromolekul, seperti asam nukleat dan protein (Karima, 2013).

Protein merupakan molekul penyusun tubuh yang terbesar setelah air. Hal ini mengindikasikan pentingnya protein dalam menopang seluruh proses kehidupan dalam tubuh. Pada kenyataannya, kode genetik yang tersimpan dalam rantai DNA digunakan untuk membuat protein, kapan, dimana dan seberapa banyak. Didalam tubuh, protein berfungsi sebagai penyimpan dan pengantar, seperti hemoglobin yang memberikan warna merah pada sel darah merah dan mengikat oksigen dan membawanya ke bagian tubuh yang memerlukannya. Selain itu juga menjadi penyusun sel dalam tubuh seperti, keratin di rambut yang banyak mengandung asam amino *cysteine* sehingga menyebabkan bau yang khas bila rambut terbakar karena banyaknya kandungan atom sulfur di dalamnya (Burmester dan Pezutto, 2003).

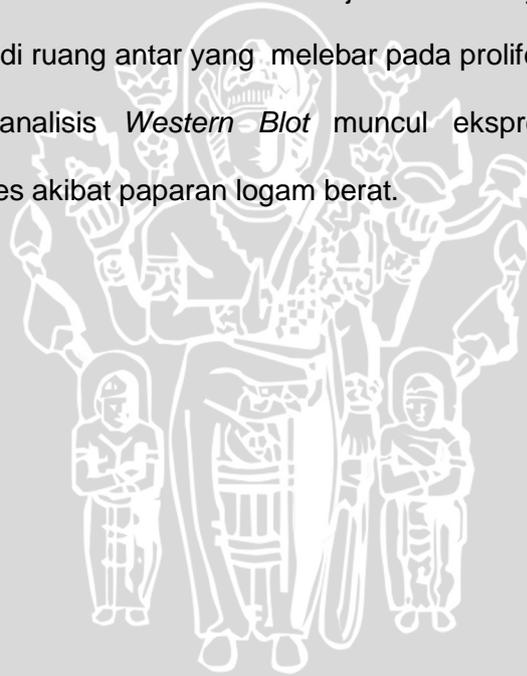
Western blotting adalah teknik yang didasarkan pada elektroforesis dan serologi. Jumlah protein yang sangat kecil dapat dideteksi dengan cara ini. Pada teknik western blot, sampel protein dielektroforesis pada gel SDS-*polyacrilamide* (Dijkstra dan de Jager, 1998 dalam Sembiring, 2013). Pemisahan protein berdasarkan pada besar bobot molekulnya terjadi akibat gaya listrik yang mengalir dalam bufer transfer. Makin besar molekul, mobilitasnya makin lambat dan posisinya dalam gel terletak makin lebih dekat ke sumur (*well*) sampel. Hasil elektroforesis kemudian ditransblot ke membran nitroselulosa dan diperlakukan dengan antibodi yang spesifik. Bila reaksinya bersifat positif, maka fragmen yang berupa pitapita dari sampel protein yang terdeteksi atau terikat oleh antibodi spesifik tersebut tampak berwarna merah-kecoklatan pada membran

nitroselulosa (Wahyuni, 2005). Gel yang telah ditransblot masih dapat diwarnai, karena tidak semua protein dipindahkan ke membran. Gel berwarna kuning-kecoklatan dengan pita-pita protein berwarna coklat gelap bila gel diwarnai dengan AgNO₃, atau gel berwarna kebiruan dengan pita-pita protein berwarna biru bila gel diwarnai dengan *Commasie blue* (Rantam, 2003).

2.6 Roadmap Hasil Penelitian Mengenai Pencemaran Logam Berat Pb (Timbal) di Pantai Utara Pasuruan dan Ekspresi HSP70 Akibat Terpapar Logam Berat dengan Analisis Western Blot

Terdapat beberapa penelitian sebelumnya menyatakan bahwa pada kawasan mangrove pantai utara Pasuruan terjadi pencemaran logam berat khususnya Pb, hal ini akan berpengaruh pada terganggunya kelangsungan hidup dan disfungsi organ biota yang menempati kawasan mangrove tersebut seperti kepiting bakau. Sehingga populasi rajungan yang mendiami kawasan tersebut terancam menurun. Seperti pada penelitian Megawati (2014), bahwa hasil analisis kandungan logam berat Pb di air pada ketiga stasiun penelitian di pantai Mlaten menunjukkan nilai yang telah melampaui baku mutu yang dikeluarkan oleh Kementerian Negara Lingkungan Hidup no. 51 tahun 2004 sebesar 0,008 ppm. Kandungan logam berat Pb pada air di stasiun 1 yaitu rata-rata 0,124, stasiun 2 rata-rata sebesar 0,113 ppm dan pada stasiun 3 rata-rata sebesar 0,142 ppm. Sedangkan pada sedimen di stasiun 1 rata-rata sebesar 3,54 ppm, pada stasiun 2 rata-rata sebesar 4,50 ppm dan pada stasiun 3 rata-rata sebesar 3,10 ppm. Hasil analisis logam berat Pb yang tinggi di daerah Mlaten dikarenakan kawasan ini berdekatan dengan daerah penangkapan ikan yang ada masukan dari limbah domestik dan limbah bahan bakar kapal nelayan yang bertumpah di laut atau hasil dari buangan bahan bakarnya.

Kandungan logam berat yang tinggi pada sedimen akan mengganggu habitat dan kelangsungan hidup rajungan. Organ yang berhubungan langsung terhadap pengaruh pencemar pada lingkungan habitat rajungan adalah insang. Insang yang terpapar polutan akan merespon kandungan pencemar tersebut dan mengakibatkan kondisi stres pada rajungan. Salah satu respon stres akibat paparan tersebut yaitu munculnya ekspresi *HSP70* yang tinggi. Seperti pada penelitian Rajeshkumar (2013), pada ikan di perairan payau di pulau Kattuppalli India yang tercemar logam berat (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd) mengakibatkan kondisi jaringan insang mengalami perubahan seperti pembengkakan dan pembesaran lamella primer dan sekunder berisi lendir dalam jumlah besar yang mengandung butiran elektron padat di ruang antar yang melebar pada proliferasi sel epitel dan klorida serta pada analisis *Western Blot* muncul ekspresi *HSP70* yang merupakan respon stres akibat paparan logam berat.



3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

Materi dalam Penelitian ini adalah ekspresi HSP70 pada jaringan insang rajungan (*Portunus pelagicus*) yang terkena paparan Logam berat, Pd melalui analisis *Western Blot*. Penelitian ini dilakukan sebagai bentuk respon atau biomarker terhadap kondisi pada kawasan mangrove di Pantai Utara Pasuruan yaitu pantai Kedawang, Mlaten dan Penunggul, serta sampel air dari perairan di ketiga lokasi yang meliputi parameter kualitas air pendukung yaitu suhu, pH, salinitas, oksigen terlarut (DO) dan total padatan tersuspensi (TSS).

3.2 Alat dan Bahan

Beberapa alat dan bahan sangat penting untuk menunjang keberhasilan dalam pelaksanaan penelitian. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode ini digunakan untuk menggambarkan semua data atau keadaan subjek/objek penelitian (seseorang, lembaga, masyarakat dan lain-lain) yang kemudian diolah, dianalisis dan dibandingkan berdasarkan kenyataan yang sedang berlangsung pada saat ini (Widi, 2010). Pelaksanaan metode deskriptif tidak hanya terbatas hanya sampai pada pengumpulan dan penyusunan data, tetapi meliputi analisa dan interpretasi tentang arti data itu dan selanjutnya untuk memberikan solusi permasalahan. Analisa deskriptif bertujuan untuk memberikan deskripsi mengenai subyek penelitian berdasarkan data dari variabel yang diperoleh dari kelompok subjek yang diteliti (Azwar, 2007).

Teknik pengumpulan data dilakukan observasi langsung, yaitu dengan melakukan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap gejala/fenomena yang diselidiki tanpa mengajukan pertanyaan (Marzuki, 1983). Teknik pengambilan data yang digunakan dalam penelitian ini mencakup 2 macam data, yaitu data primer dan data sekunder.

A. Data Primer

Surakhmad (1998), data primer adalah data yang langsung dan segera diperoleh dari sumber data oleh penyelidik untuk tujuan yang khusus. Data primer diperoleh dari sumbernya, diamati dan dicatat untuk pertama kalinya. Data tersebut akan menjadi data sekunder jika dipergunakan oleh orang lain yang tidak berhubungan dengan penelitian yang bersangkutan. Marzuki (1983), metode yang dapat digunakan dalam pengumpulan data primer mencakup 3 macam, yaitu:

1. Metode Survey

Informasi diperoleh melalui permintaan keterangan-keterangan kepada pihak yang memberikan keterangan atau jawaban (responden). Metode ini bergantung pada kerja sama dan kecakapan responden sebagai faktor yang dapat mempengaruhi proses survey, sehingga kemungkinan terjadi kesalahan sangat besar. Tetapi sering kali opini yang muncul mungkin sangat penting dalam pemecahan masalah.

2. Metode Observasi

Metode observasi dilakukan dengan melakukan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap gejala/fenomena yang diselidiki. Catatan yang dikumpulkan lebih teliti, tetapi terbatas pada gejala sejenis. Seringkali metode ini menggunakan bantuan alat-alat pemotret, alat perekam suara, pencatat kecepatan dan sebagainya.

3. Metode Eksperimen

Diperlukan untuk menguji kesimpulan-kesimpulan yang diperoleh dari penelitian dengan metode survey dan observasi. Berdasarkan hasil kesimpulan sementara atau usul pemecahan masalah, dilakukan percobaan-percobaan apakah memberikan jawaban seperti apa yang dikemukakan pada metode survey. Pada metode ini, peneliti dapat mengatur atau memberikan perlakuan tertentu pada suatu variabel.

B. Data Sekunder

Data sekunder adalah data yang bukan diusahakan sendiri pengumpulannya oleh peneliti atau berasal dari tangan kedua, ketiga dan seterusnya. Misalnya dari Biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Widi (2010), mengatakan pengumpulan data sekunder dapat dibagi menjadi beberapa kategori, antara lain: (1) publikasi lembaga pemerintahan atau non pemerintahan seperti: data sensus, data statistik, survey pekerja, laporan kesehatan, informasi ekonomi, informasi demografi. (2) penelitian terdahulu (3) laporan atau catatan pribadi (4) media massa. Permasalahan dalam menggunakan data sekunder adalah ketersediaan data tersebut, format serta kualitas data. Yang harus diperhatikan sebelum menggunakan data sekunder adalah kebenaran data dan valid tidaknya suatu data jangan sampai peneliti terjebak pada opini pribadi atau bias dari data sekunder yang didapatkan. Data sekunder dalam penelitian ini didapatkan dari jurnal, majalah, internet, buku-buku serta instansi pemerintahan yang terkait guna menunjang keberhasilan penelitian.

3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Sampel Rajungan (*Portunus pelagicus*) pada penelitian ini diambil menggunakan perangkap bubu di sekitar kawasan mangrove di ketiga lokasi pengambilan sampel. Pengambilan Rajungan (*Portunus pelagicus*) menggunakan perangkap bubu untuk menghindari kerusakan organ insang yang akan diteliti. Pengambilan sampel dilakukan secara acak pada masing-masing lokasi. Masing-masing lokasi akan dipilih dua individu yang akan diukur ekspresi HSP70 dengan ketentuan rajungan yang sudah dewasa dan mempunyai umur yang sama dapat dilihat pada berat serta panjang yang sama agar seragam.

Organ insang yang ingin diamati ekspresi HSP70 nya dibedah secepatnya untuk menghindari kematian rajungan sesaat setelah ditangkap. Organ yang diambil yaitu insang sebagai alat pernafasan. Menurut Rajeshkumar (2013), setelah biota dibedah dan didapatkan insangnya lalu dicuci dengan air suling, ditimbang dan dikemas dalam kantong plastik atau toples dan disimpan pada suhu 20°C sebelum dianalisis. Sampel air sebagai parameter pendukung diambil pada 3 lokasi di kawasan mangrove. Parameter kualitas air yang diambil yaitu suhu, pH, salinitas, oksigen terlarut dan TSS.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Preparasi Protein (Isolasi Protein)

Menurut Fatchiyah *et al.*, (2011), isolasi protein dilakukan dengan cara sebagai berikut :

- insang rajungan yang telah diambil ditimbang sebanyak 0,5 gram
- dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dengan tujuan untuk membersihkan darah yang masih tersisa
- sampel insang tersebut digerus sampai halus (tetapi jangan terlalu lama) di dalam mortal yang sudah didinginkan di dalam lemari es.

- ditambahkan buffer ekstrak sebanyak 1 mL ke dalam mortal dan diratakan
- dibuang homogenat (hasil homogenasi, yaitu berupa larutan keruh yang atau bagian sel yang tidak hancur) ke dalam tabung eppendorf atau tabung sentrifuge
- disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4⁰C selama 20 menit
- dibuang pelet yang mengendap pada dasar tabung sentrifuge
- dipisahkan supernatant ke dalam 2 tabung. Tabung pertama diisi 20 μ L yang nantinya digunakan untuk elektroforesis dan sisanya untuk mengukur kadar protein dengan metode breadford. Hasil isolasi protein ini nantinya akan dilanjutkan dengan proses SDS-PAGE dan analisis Western Blot.

3.5.2 Elektroforesis Protein dengan Metode SDS-PAGE

Analisis SDS-PAGE merupakan prosedur dasar dalam banyak aplikasi analisis protein. Pada western blotting, SDS-PAGE merupakan tahap awal untuk separasi protein sebelum protein ditransfer pada membran PVDF. Pada prosedur purifikasi protein, SDS-PAGE dipakai pada salah satu prosedur untuk menilai tingkat kemurnian protein. Jadi dengan menggunakan metode ini diharapkan hasil yang diperoleh dari SDS-PAGE adalah protein target yang dapat digunakan untuk menginduksi rajungan dalam penelitian yang akan dilanjutkan.

Fatchiyah, *et al.* (2011), menyatakan prosedur Elektroforesis protein dengan SDS-Page adalah sebagai berikut:

A. Menyiapkan sampel

- ditambahkan sampel bufer ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung Eppendorf.
- dipanaskan sampel pada suhu 100⁰C selama 5 menit.

- Setelah dingin, disimpan pada suhu 20°C bila sampel tidak langsung dipakai.

B. Pembuatan Media/gel elektroforesis SDS-PAGE

Adapun langkah-langkah dalam pembuatan media/gel untuk elektroforesis SDS adalah sebagai berikut:

- disusun plate pembentuk gel.
- dibuat separating gel 12,5%. Dengan cara:
 1. disiapkan tabung polipropilen 50ml.
 2. dimasukkan 3,125 ml stok akrilamida dalam tabung.
 3. dimasukkan 2,75 ml 1M Tris pH 8,8. Tabung di tutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
 4. dimasukkan aquabides 1,505 ml. Tabung ditutup, lalu tabung digoyang secara perlahan.
 5. dimasukkan 75 µl SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
 6. dimasukkan 75 µl APS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
 7. dimasukkan 6,25 µl TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.
- Segera dituang larutan kedalam plate pembentuk gel menggunakan mikropipet 1 ml (dijaga jangan sampai terbentuk gelembung udara) sampai batas yang terdapat pada plate.
- Secara perlahan, ditambahkan aquades di atas larutan gel dalam plate agar permukaan gel tidak bergelombang.

- dibiarkan gel memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel yang terbentuk). Setelah itu dibuang air yang menutup separating gel.
- Sesudah separating gel memadat, disiapkan stacking gel 3%. Dengan cara:
 1. disiapkan tabung polipropilen 50ml.
 2. dimasukkan 0,45 ml stok akrilamida dalam tabung.
 3. dimasukkan 0,38 ml 1M Tris pH 6,8. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 4. dimasukkan aquabides 2,11 ml. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 5. dimasukkan 30 μ l SDS 10%. Tabung ditutup, lalu digoyang-goyang secara perlahan
 6. dimasukkan 5 μ l TEMED. Tabung ditutup, lalu digoyang secara perlahan.

C. Running Elektroforesis *Sodium Dodesil Poliakrilamid* (SDS-PAGE)

Tahapan proses SDS-PAGE ini, diantaranya:

- dimasukkan plate yang sudah berisi gel ke dalam chamber elektroforesis.
- dituang running buffer sampai bagian atas dan bawah gel terendam.
- Bila terbentuk gelembung udara pada dasar gel atau diantara sumur sampel, maka gelembung tersebut harus dihilangkan.
- dimasukkan sampel sebanyak 10-20 μ l (yang kandungan proteinnya minimal 0,1 g dan maksimal 20-40 g) secara hati-hati ke dalam dasar sumur gel menggunakan Syringe Hamilton.

- dibilas syringe sampai 3x dengan air atau dengan running buffer sebelum dipakai untuk memasukkan sampel yang berbeda pada sumur gel berikutnya.

D. Running Sampel

- Tahap awal untuk memulai running, dihubungkan perangkat elektroforesis dengan sumber listrik.
- dilakukan running pada arus konstan 20 mA selama kurang lebih 40-50 menit atau sampai tracking dye mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel.
- Setelah selesai, dituang running buffer dan diambil gel dari plate.

E. Pewarnaan Commasie Brilliant Blue (SDS-PAGE)

- Tahap ini diperlukan larutan staining untuk mewarnai protein pada gel dan larutan destaining untuk menghilangkan warna pada gel dan memperjelas pita protein yang terbentuk.

Tabel 3. Komposisi larutan Staining dan Destaining

| Larutan staining 1 liter | | Larutan destaining 1 liter | |
|--------------------------|--------|----------------------------|--------|
| Coomassie Blue R-250 | 1,0 g | Metanol | 100 ml |
| Metanol | 450 ml | Asam asetat glasial | 100 ml |
| Aquades | 450 ml | | |
| Asam asetat glasial | 100 ml | | |

- direndam gel dalam 20 ml staining solution sambil digoyang selama kurang lebih 15 menit. Setelah itu, dituang kembali larutan staining pada wadahnya.
- dicuci dengan air beberapa kali. Setelah itu, direndam gel dalam larutan 50 ml destaining solution sambil digoyang selama kurang lebih 30 menit atau sampai pita protein terlihat jelas.

3.5.3 Pengukuran Berat Molekul Protein sampel

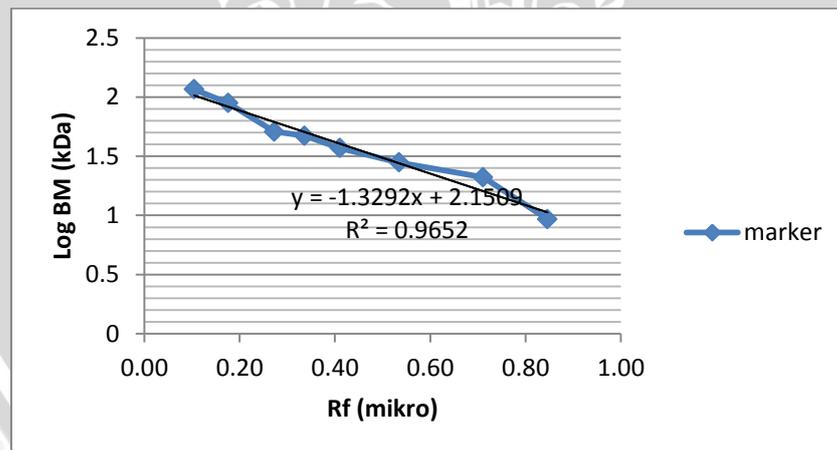
- diambil setiap sampel protein dan diamati terlebih dahulu berapa jumlah pita protein yang terlihat, kemudian ditentukan nilai R_f masing-masing pita protein dari setiap sampel
- Dari setiap nilai R_f yang diperoleh, dihitung berat molekulnya dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

- dicatat hasil yang di peroleh dalam tabel.

3.5.4 Pembuatan Kurva Standart Berat Molekul

Selanjutnya membuat kurva standart berat molekul, dimana nilai R_f ditempatkan pada sumbu Y dan berat molekul yang biasanya dinyatakan sebagai fungsi dar log berat molekul ditempatkan sebagai sumbu X. Kemudian grafik yang didapatkan berupa grafik linear dengan persamaan garis :



Gambar 6. Persamaan Garis Kurva Kalibrasi Berat Molekul

3.5.5 Analisis Reaksi Antigen dengan Metode *Western Blotting*

Analisis *Western blotting* merupakan analisis standart dalam aplikasi biologi molekuler. *Western blotting* merupakan prosedur standar untuk menilai keberhasilan prosedur manipulasi gen atau rekayasa genetika. Keberhasilan rekayasa genetika dinilai dari kemampuan gen mengekspresikan protein target. Teknik yang digunakan untuk tujuan tersebut adalah *Western Blotting*, karena selain dapat menilai protein target yang terekspresi, sekaligus dapat memperkirakan berat molekulnya. Dengan demikian, menjamin ketepatan karakterisasi protein target yang diinginkan (Fatchiyah, 2011).

Menurut Fatchiyah et. al. (2011), tahapan analisis *western blotting* yaitu sebagai berikut :

- direndam gel hasil elektroforesis dan kertas saring Whatman dalam PBST (PBS yang mengandung 0,05% Tween-20)
- direndam membran PVDF dalam methanol, kemudian direndam dalam buffer transfer
- Ketiga komponen tersebut disusun mulai dari bawah ke atas secara berturut – turut mulai kertas saring, membrane PVDF, gel, dan kertas saring pada wet transblot (Biocraft)
- diisikan buffer blotting pada chamber, kemudian dilakukan transfer pada 20 V selama 15 jam
- Untuk mengetahui apakah protein pada gel sudah tertransfer ke membrane PVDF, maka membrane diwarnai dengan Ponceau selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquades. Protein dikatakan sudah tertransfer bila terdapat gambaran pola pita protein pada membrane sesudah membrane dibilas
- direndam membrane PVDF dalam bloto 5% (5% susu skim pada PBST) selama 60 menit sambil diagitasi, kemudian dalam PBST

- Membran yang berisi sumur nomor 1-6 diinkubasi dalam antibodi primer yaitu anti-rabbit HSP70 Polyclonal (1:200), sedangkan membrane yang berisi sumur nomor 8-13 diinkubasi dalam larutan bloto, masing – masing selama semalam dalam lemari pendingin, kemudian dicuci dengan TBS
- direndam membrane dalam antibodi sekunder (*goat anti rabbit IgG-AP: Sc-2057* dengan perbandingan 1:200 dalam TBS) selama 60 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dalam PBST
- direndam membrane dengan 1 mL larutan substrat Western Blue sampai pita protein berwarna biru tua terlihat. Ini menandakan adanya protein target dalam sampel yang terkait dengan antibodi primer
- dicuci membrane dengan aquades
- dibandingkan pola pita protein pada control positif dengan control negative. Sanpel dikatakan positif mengekspresikan Fas reseptor bila pita protein 70 kDa hanya terdapat pada control positif.

3.5.6 Parameter Pendukung Kualitas Air

A. Parameter Fisika Air

Parameter fisika yang diukur dalam penelitian ini terdiri dari :

1. Suhu

Menurut SNI (1990), prosedur pengukuran suhu menggunakan Termometer Hg adalah sebagai berikut:

- Memasukkan thermometer Hg ke dalam perairan dengan membelakangi matahari, dan ditunggu beberapa saat sampai air raksa dalam thermometer berhenti pada skala tertentu
- Mencatat dalam skala °C
- Membaca skala pada saat thermometer masih di dalam air, dan jangan sampai tangan menyentuh bagian air raksa thermometer

2. Salinitas

Menurut SNI (1990), prosedur pengukuran salinitas dengan menggunakan Refraktometer adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan refraktometer
- Membuka penutup kaca prisma dan mengkalibrasi dengan aquadest
- Membersihkan dengan tissue secara searah
- Meneteskan 1-2 tetes air yang akan diukur salinitasnya
- Menutup kembali dengan hati-hati agar tidak terjadi gelembung udara dipermukaan kaca prisma
- Mengarahkan ke sumber cahaya
- Melihat nilai salinitasnya dari air yang diukur melalui kaca prisma

B. Parameter Kimia Air

Parameter fisika pendukung kualitas air yang diukur dalam penelitian ini terdiri dari :

1. pH (Derajat Keasaman)

Menurut Hariyadi *et al.*, (1992) bahwa derajat keasaman (pH) perairan dapat diukur dengan menggunakan pH paper. Pengukuran pH dengan menggunakan pH paper meliputi:

- Mencilupkan pH paper ke dalam perairan.
- Mendinginkan selama kurang lebih 2 menit.
- Mengangkat dan mengibaskan sampai setengah kering.
- Mencocokkan dengan skala 1-14 yang tertera pada kotak pH.
- Mencatat hasil pengukurannya.

2. Oksigen Terlarut (DO)

Menurut Ayunda (2011), Dissolved Oxygen merupakan banyaknya oksigen terlarut dalam suatu perairan. Oksigen terlarut merupakan suatu faktor yang sangat penting bagi ekosistem perairan. Adapun cara untuk mengukur kadar DO yaitu sebagai berikut:

- diukur dan dicatat volume botol DO yang akan digunakan
- dimasukkan botol DO ke dalam air yang akan diukur oksigennya secara perlahan-lahan dengan posisi miring dan diusahakan jangan sampai terjadi gelembung udara.
- Kemudian dibuka botol yang berisi sampel dan ditambahkan 2 ml MnSO_4 dan 2 ml $\text{NaOH} + \text{KI}$ lalu dibolak-balik sampai terjadi endapan kecoklatan. dibiarkan selama 30 menit.
- dibuang filtrat (air bening di atas endapan) dengan hati-hati, kemudian endapan yang tersisa diberi 1-2 ml H_2SO_4 pekat dan dikocok sampai endapan larut.
- diberi 3-4 tetes amylum, dititrasi dengan Na-thiosulfat ($\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,025 N sampai jernih atau tidak berwarna untuk pertama kali.
- dicatat ml Na-thiosulfat yang terpakai (ml titran).
- dihitung kadar DO dengan rumus:

$$\text{DO (mg/L)} = \frac{v (\text{titran}) \times N (\text{titran}) \times 8 \times 1000}{V \text{ botol DO} - 4}$$

3. TSS (*Total Suspended Solid*)

TSS menunjukkan besarnya padatan tersuspensi di dalam air atau limbah. Metode yang digunakan adalah metode Gravimetri. Adapun prosedur pengukuran TSS mengacu pada Interuksi Kerja Pengukuran Kualitas Air di Laboratorium Jasa Tirta 1:

- Disiapkan alat dan contoh uji air
- Dicuci kertas saring dan cawan
- Dimasukkan kertas saring dan cawan untuk TSS dalam oven 103-105°C selama \pm 1 jam, kemudian dipindahkan dalam muffle 550-552°C selama \pm 15 menit.
- Didinginkan dan disimpan dalam desikator selama belum digunakan.
- Ditimbang dengan neraca analitik sesegera mungkin sebelum digunakan.
- Dikocok contoh uji air dan saring 100 ml contoh uji air dengan kertas saring yang telah diketahui berat tetapnya.
- Diletakkan kertas saring diatas cawan TSS yang telah diketahui berat tetapnya.
- Dimasukkan cawan ke dalam oven 103-105°C minimal 1 jam.
- Didinginkan cawan dalam desikator hingga suhu ruang.
- Ditimbang menggunakan timbangan analitik dan ulangi hingga diperoleh berat tetap.
- Dihitung konsentrasi TSS dengan rumus:
$$\text{TSS (Mg/l)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{Vol. air sampel(ml)}}$$

A: Berat kertas saring berisi residu tersuspensi (mg)
B: Berat kertas saring kosong (mg)

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Keadaan Umum Lokasi Pengambilan Sampel Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Penelitian ini dilaksanakan pada tiga pantai yang berbeda untuk pengambilan sampel rajungan yang akan digunakan untuk melihat perbandingan ekspresi HSP70 sesuai dengan kondisi masing – masing lokasi. Lokasi tersebut berada di kawasan mangrove pantai utara Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan. Letak geografis Desa Nguling, adalah $7^{\circ}13'57.15''$ - $7^{\circ}14'24.79''$ LS dan $113^{\circ}32'27.21''$ - $113^{\circ}33'04.93''$ BT, dimana batas sebelah utara adalah Selat Madura, sebelah barat Desa Kapasan, sebelah selatan Desa Randuati, dan sebelah Timur berbatasan dengan Kabupaten Probolinggo yang dipisahkan oleh sungai Lawean. Pengambilan sampel dibagi menjadi tiga titik antara lain Pantai Kedawang, Pantai Mlaten, dan Pantai Penunggul. Ketiga pantai tersebut memiliki keadaan yang berbeda bila dilihat dari aktivitas manusia yang ada di sekitar pantai tersebut.

4.1.1 Lokasi dan Kondisi Mangrove

a. Pantai Kedawang

Pengambilan sampel yang pertama terletak di Pantai Kedawang, Desa Kedawang, Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan. Secara Geografis terletak pada koordinat $7^{\circ} 41' 52''$ - $7^{\circ} 41' 55''$ LS dan $113^{\circ} 4' 56''$ - $113^{\circ} 5' 57''$ BT. Kawasan mangrove di Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan Jawa Timur merupakan kawasan mangrove yang mulai diperhatikan dengan dilakukannya reboisasi hutan mangrove untuk menanggulangi adanya abrasi pantai yang telah terjadi dan meningkatkan ketahanan ekonomi masyarakat disekitar. Sekitar hutan mangrove Desa Kedawang terdapat areal pertambakan yang kini sudah tidak di pergunakan dan sebagian areal bekas

pertambahan tersebut digunakan sebagai tempat pembibitan mangrove dan kawasan mangrove tersebut dekat dengan pemukiman. Kondisi mangrove yang berada di dekat pemukiman sedikit mengalami kerusakan dikarenakan banyaknya aktivitas manusia seperti pembuangan sampah dan tempat bersandar kapal. Kondisi ini dapat mempengaruhi biota yang berada di kawasan tersebut khususnya rajungan (*Portunus pelagicus*). Kondisi mangrove pada pantai ini dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Kondisi vegetasi mangrove Pantai Kedawang Kecamatan Nguling. Titik pengambilan sampel ditunjukkan oleh panah merah. Dokumentasi tanggal 1 Maret 2015.

b. Pantai Mlaten

Pengambilan sampel yang kedua terletak di Pantai Mlaten, Desa Mlaten, Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan. Pada Pantai Mlaten memiliki kawasan mangrove yang terletak di Desa Mlaten Penelitian ini dilakukan di Kawasan Mangrove Desa Mlaten Kecamatan Nguling, Pasuruan, Jawa Timur. Secara geografis Desa Mlaten terletak pada koordinat $7^{\circ}41'52.9'' - 7^{\circ}41'55.9''$ LS dan $113^{\circ}4'55.6'' - 113^{\circ}5'57.9''$ BT. Batas wilayah dari Desa Mlaten ini adalah sebelah utara berbatasan dengan Selat Madura, sebelah selatan berbatasan dengan Desa Nguling Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan, sebelah barat berbatasan dengan Desa Mlaten Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan, sebelah timur berbatasan dengan Sungai Lawean Desa Tambakrejo, Kecamatan Tongas, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur. Kawasan mangrove di Pantai

Mlaten juga merupakan kawasan konservasi yang lebih diperhatikan. Kawasan ini mengalami kerusakan yang harus lebih diperhatikan karena lokasi ini merupakan tempat pembuangan sampah oleh masyarakat sekitar. Kondisi yang demikian dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas biota yang tinggal di kawasan tersebut. Salah satu biota yang sangat berpengaruh yaitu rajungan (*Portunus pelagicus*). Kondisi kesehatan rajungan di daerah ini mengalami penurunan kesehatan dan populasi yaitu ditandai dengan terjadi beberapa gangguan pada organ pernapasan yaitu insang yang diakibatkan oleh adanya limbah pada lokasi tersebut. Kondisi mangrove pada pantai ini dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Kondisi vegetasi mangrove Pantai Mlaten Kecamatan Nguling. Titik pengambilan sampel ditunjukkan oleh panah merah. Dokumentasi tanggal 1 Maret 2015.

c. Pantai Penunggul

Pengambilan sampel yang ketiga terletak di pantai Penunggul, Desa Penunggul, Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan. Pantai Penunggul memiliki kawasan mangrove yang terletak di Desa Penunggul yang memiliki luas 57 Ha, yang meliputi Tanah Ladang seluas 16 Ha, Tanah Persawahan seluas 17 Ha, Tanah Pemukiman seluas 18 Ha, dan Tanah Hutan Bakau Milik Negara seluas 6 Ha. Secara geografis Desa Penunggul terletak pada koordinat $113^{\circ} 05' 56.68' \text{ BT} - 7^{\circ} 42' 09.60' \text{ LS}$. Wilayah Desa Penunggul terbagi menjadi 2 (dua)

dusun antara lain Dusun Pesisir dan Dusun Sawahan. Memiliki vegetasi mangrove seluas 150 Ha sebagai hasil dari upaya penghijauan yang dilakukan oleh masyarakat yang dipelopori oleh Bapak Mukarim. Wilayah pesisir Desa Penunggul sebelumnya merupakan areal pertambakan hasil konversi kawasan mangrove dan jarang sekali ditumbuhi tanaman, bahkan Desa Penunggul ini dulunya terancam abrasi. Desa Penunggul adalah salah satu yang terletak di Kecamatan Nguling, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur, yang memiliki batas wilayah administratif desa sebagai berikut yaitu sebelah Utara berbatasan dengan Selat Madura, sebelah Selatan berbatasan dengan Desa Nguling Kabupaten Pasuruan, sebelah Timur berbatasan dengan Desa Tambakrejo Kabupaten Probolinggo, dan sebelah Barat berbatasan dengan Desa Mlaten Kabupaten Pasuruan. Kawasan hutan mangrove di pantai ini merupakan kawasan konservasi dan sudah menjadi kawasan hutan lindung yang dipenuhi pohon bakau ini mulai dikembangkan untuk digunakan sebagai objek wisata alternative yang menarik bagi wisatawan dengan nuansa yang berbeda. Habitat berbagai biota juga sering ditemui di kawasan ini. Salah satunya yaitu rajungan (*Portunus pelagicus*). Kawasan ini sedikit berbeda dengan lainnya, hasil tangkapan sampel lebih banyak didapat dikarenakan kondisi mangrove yang masih baik dan sehat. Kondisi mangrove pada pantai ini dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Kondisi vegetasi mangrove Pantai Penunggul Kecamatan Nguling. Titik pengambilan sampel ditunjukkan oleh panah merah. Dokumentasi tanggal 1 Maret 2015

4.2 Kadar Logam Berat Pb pada Perairan, Sedimen, dan Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*) di Pantai Utara Pasuruan

Kadar logam berat Pb pada perairan dan sedimen di lokasi penelitian yaitu di pantai Kedawang, Mlaten, dan Penunggul menunjukkan hasil yang berbeda – beda, hal ini dikarenakan adanya perbedaan karakteristik maupun sumber bahan pencemar di setiap lokasi pengamatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil analisis logam berat Pb di sedimen lebih besar dari pada di insang dan di perairan.

Nilai rata – rata kadar logam berat Pb pada perairan, sedimen, dan insang rajungan menunjukkan hasil yang berbeda dari masing – masing lokasi penelitian. Berdasarkan tabel di bawah ini menunjukkan bahwa pada Pantai Mlaten memiliki rata – rata tertinggi pada ketiga sampel dibandingkan dengan pantai lainnya. Hasil logam berat Pb pada perairan, sedimen, dan insang di ketiga lokasi penelitian menunjukkan hasil yang berbeda – beda disajikan pada tabel 4 dan gambar 10 serta 11.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Logam Berat Pb.

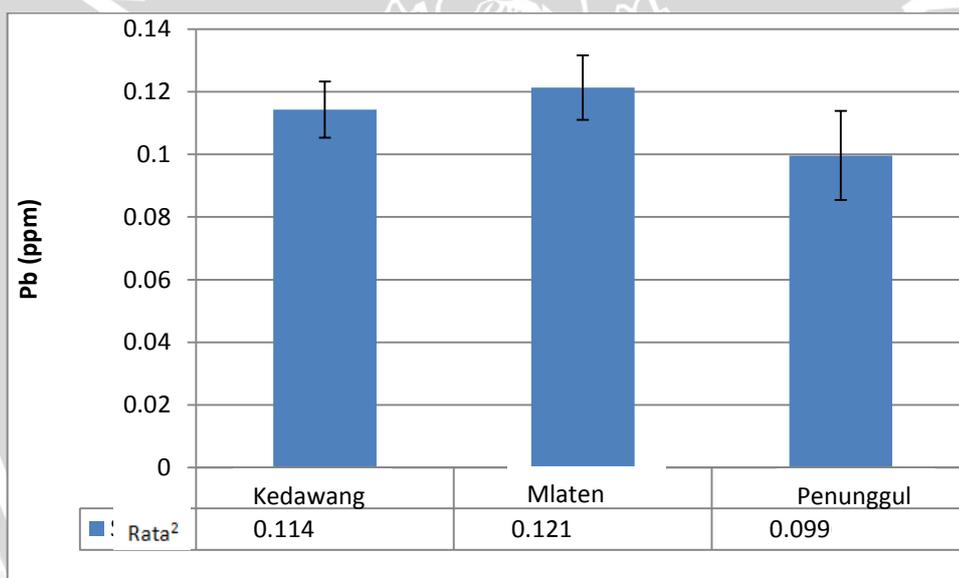
| No. | Sampel | Lokasi | Hasil | Rata-rata | Standar Deviasi | Satuan |
|-----|-----------|----------|---------|-----------|-----------------|--------|
| 1 | Air | Kedawang | 0,120* | 0,126 | 0,005 | Ppm |
| | | | 0,104** | | | |
| | | | 0,119** | | | |
| | | Mlaten | 0,124* | 0,140 | 0,014 | Ppm |
| | | | 0,110** | | | |
| | | | 0,130** | | | |
| | Penunggul | 0,116* | 0,10 | 0,009 | Ppm | |
| | | 0,093** | | | | |
| | | 0,090** | | | | |
| 2 | Sedimen | Kedawang | 3,72* | 3,147 | 0,49 | Ppm |
| | | | 2,61** | | | |
| | | | 2,40** | | | |
| | | Mlaten | 3,87* | 3,713 | 0,14 | Ppm |
| | | | 2,70** | | | |
| | | | 3,05** | | | |
| | Penunggul | 3,613* | 3,264 | 0,30 | Ppm | |
| | | 2,44** | | | | |
| | | 3,30** | | | | |
| 3 | Insang | Kedawang | 0,124* | 0,101 | 0,019 | Ppm |
| | | | 0,088** | | | |
| | | | 0,092** | | | |
| | | Mlaten | 0,165* | 0,121 | 0,038 | Ppm |
| | | | 0,105** | | | |
| | | | 0,094** | | | |
| | Penunggul | 0,103* | 0,088 | 0,088 | Ppm | |
| | | 0,086** | | | | |
| | | 0,077** | | | | |

Keterangan:

- *) Hasil pengukuran logam berat Pb dilakukan di laboratorium Kimia FMIPA UB dengan menggunakan metode AAS
- ***) Hasil pengukuran logam berat Pb dilakukan di laboratorium Jasa Tirta I Malang dengan menggunakan metode AAS

4.2.1 Kadar Logam Berat Pb pada Perairan dan Sedimen

Rata – rata kadar logam berat Pb pada perairan pantai kedawang sebesar 0,114 ppm; pada pantai Mlaten sebesar 0,121 ppm; dan pada pantai Kedawang sebesar 0,099 ppm. Gambar 9 menunjukkan bahwa nilai logam berat tertinggi terdapat pada pantai Mlaten. Banyaknya aktivitas manusia yang merusak lingkungan pantai tersebut, seperti tempat pembuangan limbah rumah tangga, pembuangan limbah pengapasan ikan, serta aktivitas kapal motor nelayan yang melintas maupun bersandar untuk pengisian bahan bakar, pergantian oli, pengecatan kapal, sehingga banyak menghasilkan logam berat Pb yang berbahaya bagi biota perairan.



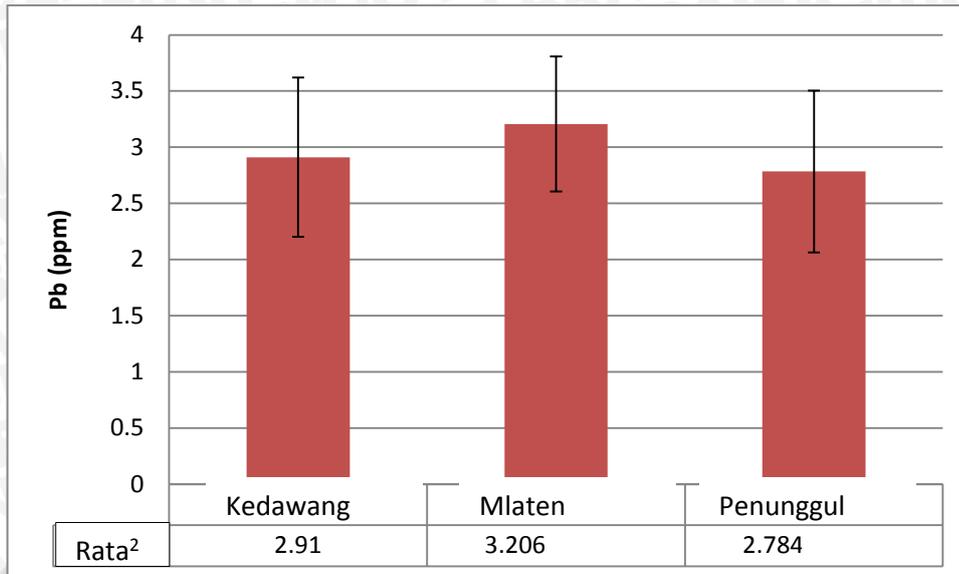
Gambar 10. Kadar logam berat Pb pada perairan lokasi penelitian

Menurut Murtini dan Peranginangin (2006) bahwa proses masuknya timbal (Pb) ke dalam perairan yaitu melalui pengendapan dan jatuhnya debu yang mengandung Pb dari hasil pembakaran bensin, erosi dan limbah industri. Siaka (2008) menambahkan, umumnya cat anti korosi pada kapal motor mengandung timbal (Pb). Selain itu, Pb dapat digunakan sebagai zat tambahan bahan bakar dan pigmen timbal dalam cat yang merupakan penyebab utama peningkatan

kadar Pb di lingkungan (Darmono, 1995 dalam Erlangga, 2007). Secara keseluruhan, rata – rata kadar logam berat Pb pada perairan pantai Utara Pasuruan di tiga lokasi berkisar antara 0,099 – 0,121 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kadar logam berat Pb di perairan pantai utara Pasuruan melampaui ambang batas normal yang telah ditetapkan oleh Kepmen LH No. 51 Tahun 2004, yaitu kadar logam berat Pb yang diperbolehkan untuk kehidupan biota laut, yaitu sebesar 0,008 ppm.

Sedangkan hasil analisis kandungan Pb pada sedimen memperoleh hasil yang lebih tinggi dibandingkan pada perairan. Kandungan kadar Pb pada sedimen dapat dilihat pada gambar 11.

Rata – rata kadar logam berat Pb pada sedimen di ketiga lokasi berbeda-beda. Pada pantai Kedawang menunjukkan hasil sebesar 2,91 ppm; pada pantai Mlaten sebesar 3,20 ppm; dan pada pantai Penunggul sebesar 2,78 ppm. Nilai rata – rata kadar logam berat Pb tertinggi yaitu pada pantai Mlaten sebesar 3,20 ppm, hal ini dikarenakan pantai Mlaten merupakan tempat pembuangan berbagai limbah rumah tangga, aktivitas kapal motor, dan kegiatan perikanan yang cukup padat. Hasil buangan limbah tersebut akan terakumulasi di sedimen dan tidak dapat terurai, sehingga akan mengganggu habitat biota di lingkungan tersebut, salah satunya yaitu rajungan.



Gambar 11. Kadar logam berat Pb pada sedimen di lokasi penelitian

Kandungan logam berat Pb pada sedimen lebih tinggi dari pada perairan. Hal ini sesuai dengan pendapat Makmur (2013), menyatakan bahwa kondisi nilai kadar logam berat Pb di dalam sedimen nilainya jauh lebih besar dibandingkan dengan yang terdapat pada kolom perairan. Hal ini diduga karena adanya laju proses pengendapan atau sedimentasi yang dialami oleh logam berat. Dalam hal ini logam berat yang terdapat pada kolom air akan mengalami proses penggabungan dengan senyawa – senyawa lain, baik yang berupa bahan organik maupun bahan anorganik, sehingga berat jenisnya menjadi lebih besar yang akan mempengaruhi laju proses pengndapan atau sedimentasi. Hal ini menunjukkan bahwa sedimen merupakan tempat proses akumulasi logam berat di sekitar perairan laut. Pernyataan ini diperkuat oleh Harahap (1991), menyatakan bahwa logam berat bersifat mengendap dalam perairan. Logam berat mempunyai sifat mengendap di dasar perairan dan bersatu dengan sedimen, maka kadar logam berat dalam sedimen umumnya lebih tinggi dibandingkan dengan kolom perairan.

Penyebab lain tingginya konsentrasi Timbal (Pb) pada sedimen yaitu karena tipe sedimen pada titik pengambilan sampel terdiri dari lumpur. Hal ini sesuai dengan pernyataan Korzeniewski dan Neugebauer (1991), menyatakan bahwa tipe sedimen dapat mempengaruhi kandungan logam berat, sesuai kisaran yang dibuatnya yaitu kandungan logam berat dalam sedimen lumpur > lumpur berpasir > berpasir.

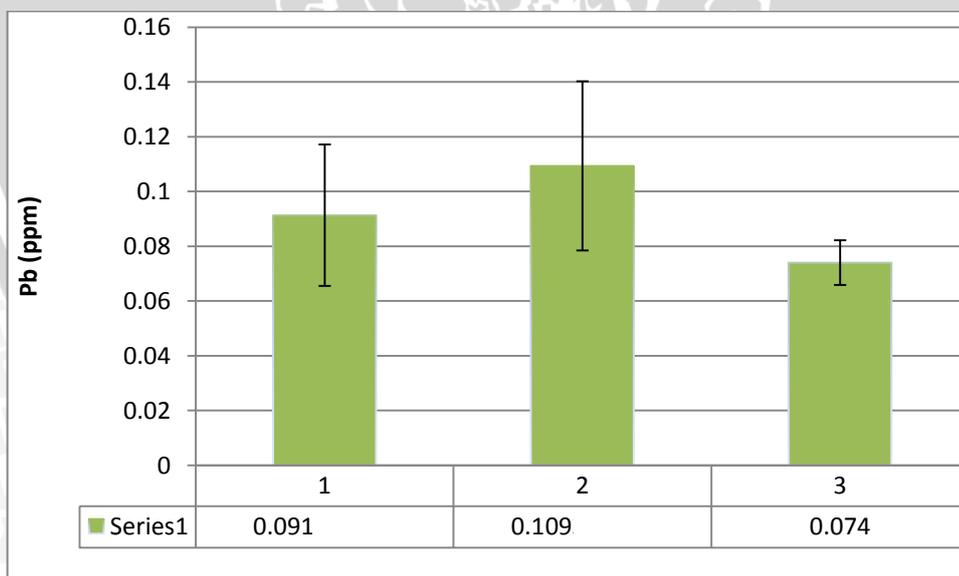
Berdasarkan hasil analisis kandungan logam berat Timbal (Pb) pada perairan dan sedimen, menunjukkan bahwa keduanya memiliki hubungan yang positif yaitu jika kandungan Pb pada perairan meningkat maka kandungan Pb pada sedimen juga meningkat. Hal ini terjadi karena beberapa faktor kualitas perairan yang mempengaruhi kandungan Pb tersebut. Salah satunya yaitu berdasarkan nilai salinitas. Bewers et al. (1990), menyatakan bahwa kandungan konsentrasi logam berat dengan salinitas, hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pada salinitas rendah, konsentrasi logam berat tinggi. Apabila konsentrasi logam berat dalam air rendah maka salinitas tinggi. Hal ini ditegaskan oleh Soemodiharjo *et al.* (1987), yang mengemukakan bahwa suhu, salinitas, pH mempengaruhi kandungan logam berat pada suatu perairan dan sedimen.

Logam berat dari buangan industri pada akhirnya akan mengendap pada berbagai macam ekosistem seperti air dan sedimen. Perairan yang mengandung logam berat Pb dalam jangka waktu yang lama akan mengakibatkan akumulasi dan penurunan kualitas air. Akumulasi logam berat Pb yang berkelanjutan akan mengakibatkan terganggunya dan rusaknya ekosistem perairan. Kondisi seperti ini tentu saja dapat mempengaruhi sedimen di perairan tersebut. Pada umumnya timbunan logam berat yang sangat besar pada lingkungan laut terdapat pada sedimen. Kondisi seperti ini membuktikan bahwa kandungan Pb pada perairan memiliki hubungan yang sangat erat dengan kandungan Pb pada sedimen. Febrizal (1995), menyatakan bahwa dalam air laut dan sedimen dapat

disimpulkan bahwa hubungan kandungan Timbal (Pb) antara air laut dan sedimen menunjukkan hubungan yang positif yaitu apabila konsentrasi Timbal (Pb) dalam air laut meningkat maka konsentrasi logam Pb dalam sedimen juga meningkat.

4.2.2 Kadar Logam Berat Pb pada Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*)

Perairan yang mengandung logam berat Pb dalam jangka waktu yang lama akan mengakibatkan akumulasi dan menurunkan daya dukung perairan. Akumulasi logam Pb yang berkelanjutan akan mengakibatkan terganggunya dan rusaknya ekosistem perairan dan lingkungan sekitarnya (Supriyaningrum, 2006 dalam Makmur, 2013). Penyerapan logam oleh *crustacea* akan diakumulasi pada jaringan tubuhnya terutama pada hepatopankreas dan insang (Bambang *et al.*, 1995). Berdasarkan hasil penelitian, hasil dari pengukuran kadar Pb dalam insang rajungan (*Portunus pelagicus*) menunjukkan hasil yang berbeda – beda. Kadar logam berat Pb pada insang rajungan dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Kadar Logam Berat Pb pada Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*) di setiap lokasi penelitian

Kadar logam berat Pb pada insang rajungan (*Portunus pelagicus*) pada lokasi penelitian yaitu nilai rata – rata pada pantai Kedawang sebesar 0,091 ppm, pada pantai Mlaten sebesar 0,103 ppm, dan pada pantai Penunggul sebesar 0,074 ppm. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa kadar logam berat Pb yang terkandung di pantai Mlaten lebih tinggi daripada pantai Kedawang dan pantai Penunggul. Hal tersebut dikarenakan pada pantai Mlaten banyak sekali aktivitas masyarakat yang mencemari lingkungan tersebut, salah satunya yaitu aktivitas kapal motor nelayan yang melintas maupun bersandar untuk pengisian bahan bakar dan pergantian oli sehingga dapat menghasilkan limbah logam berat berbahaya yang mencemari perairan dan terakumulasi pada organ insang rajungan.

Logam berat tersebut dapat menghambat enzim yang mengandung ikatan S dalam tubuh rajungan, termasuk metabolisme perantara yang mana dapat menyebabkan stres pada pernapasan rajungan (Kahn *et al.*, 2007). Secara keseluruhan, kadar logam berat Pb yang terkandung dalam insang rajungan di ketiga lokasi menunjukkan bahwa kadar logam berat yang terkandung dalam masing-masing insang rajungan masih di bawah ambang batas yang telah ditetapkan. Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) Tahun 2009, batas maksimum Pb yang terkandung dalam kekerangan (bivalvia) tidak boleh lebih dari 0,5 ppm.

Berdasarkan analisis kandungan logam berat Pb pada perairan, sedimen, dan insang Rajungan menunjukkan hubungan yang positif yaitu apabila konsentrasi Timbal (Pb) pada perairan dan sedimen meningkat, maka konsentrasi logam Pb pada insang rajungan juga akan meningkat. Hal ini disebabkan karena jika kondisi perairan dan sedimen sudah tercemar oleh logam berat Pb maka insang rajungan juga ikut tercemar. Logam berat yang masuk ke system perairan akan dipindahkan dari badan airnya melalui tiga proses yaitu

pengendapan, adsorbs, dan absorbs oleh organisme – organisme perairan. Pada saat buangan limbah industry masuk ke dalam suatu perairan maka akan terjadi proses pengendapan dalam sedimen. Hal ini menyebabkan konsentrasi bahan pencemar dalam sedimen meningkat. Logam berat yang masuk ke dalam lingkungan perairan akan mengalami peendapan, pengenceran, dan disperse kemudian diserap oleh organisme yang hidup di perairan tersebut. Zonggonao (2005), menyatakan bahwa biota air yang hidup dalam perairan tercemar logam berat, seperti mengakumulasi logam berat tersebut dalam jaringan tubuhnya. Makin tinggi kandungan logam berat dalam perairan akan semakin tinggi pula kandungan logam berat yang terakumulasi dalam tubuh hewan tersebut. Peningkatan kandungan logam berat dalam perairan dapat menyebabkan peningkatan kandungan logam berat yang terakumulasi dalam tubuh organisme laut (Sanusi *et al.*, 1984).

4.3 Kadar Protein Organ Insang Rajungan

Dalam penelitian ini dilakukan perhitungan konsentrasi protein total sampel insang rajungan menggunakan nanodrop spektrofotometer. Hasil dari isolasi protein total insang rajungan pada ketiga lokasi yaitu pada pantai Kedawang sebesar 2,97 mg/ml, pada pantai Penunggul sebesar 2,43 mg/ml, dan pada pantai Penunggul sebesar 6,81 mg/ml. Hasil protein total terbesar yaitu pada insang rajungan di pantai Penunggul, hal ini dikarenakan lokasi penelitian ini masih baik dan jauh dari bahan pencemar yang masuk ke dalam kawasan mangrove sehingga protein yang diperoleh masih tinggi.

Berdasarkan hasil perhitungan nilai protein total tersebut, maka dapat dilakukan perhitungan protein yang akan dibutuhkan untuk elektroforesis. Cara perhitungannya yaitu dari hasil protein total seluruh sampel, dipilih nilai yang terkecil untuk dijadikan sebagai patokan perhitungan. Nilai terkecil tersebut

mewakili jumlah seluruh protein dan ekstrak buffer yang akan dielektroforesis. Hasil perhitungan protein yang dibutuhkan untuk analisis elektroforesis dapat dilihat pada lampiran 5 .

4.4 Profil Protein Organ Insang Rajungan (*Portunus pelagicus*) Menggunakan Metode SDS-PAGE dan Deteksi HSP70 Menggunakan Metode Western Blot

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan profil protein menggunakan SDS-PAGE. SDS-PAGE merupakan tahapan untuk menganalisa protein. Organ target yang digunakan pada penelitian ini yaitu insang rajungan, di mana insang merupakan organ eksternal dari tubuh yang berhubungan langsung dengan lingkungan hidup rajungan. Insang rajungan yang diamati berjumlah 3 buah yang berasal dari tempat yang berbeda – beda.

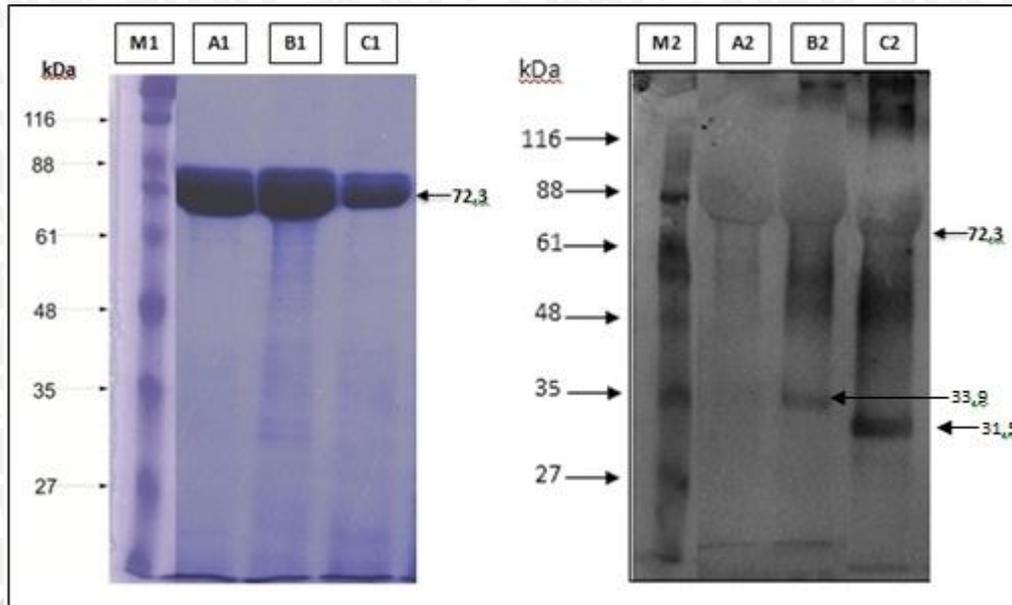
Analisis profil protein pada insang rajungan dimulai dari pengambilan sampel organ target yang kemudian dipotong halus dan dihaluskan menggunakan mortal dan alu dengan penambahan tris HCL kurang dari ml. Hasil dari gerusan insang tersebut kemudian dibuat gel – gel running yang telah diberi perlakuan pewarnaan (*staining*) dengan *Cromassive Brilliant Blue* (CBB) yang berfungsi untuk memberi warna pita protein sehingga dapat diamatai. Selanjutnya dilakukan proses pencucian (*destaining*), tujuannya adalah untuk memudahkan pewarna yang digunakan pada gel sehingga dapat dibaca dengan jelas. Hasil SDS-PAGE kemudian discan menggunakan GelDock. Dari hasil SDS-PAGE protein insang rajungan menggunakan pewarnaan Hasil *Cromassive Brilliant Blue* (CBB), terdapat 6 pita protein pada marker yang dimulai dari 27 kDa, 35 kDa, 48 kDa, 61 kDa, 88 kDa, samapi 116 kDa.

Setelah menghitung nilai BM pada hasil elektroforesis insang rajungan maka dapat dideteksi adanya protein HSP70 pada insang rajungan di ketiga lokasi penelitian. Dalam mendeteksi adanya protein HSP70 pada insang raungan

dapat dilakukan dengan metode *Western Blot*. Pengujian ini bertujuan untuk memperkuat hasil elektroforesis SDS-PAGE yang bersifat kuantitatif. Metode western blotting merupakan suatu metode semi-kuantitatif untuk mendeteksi ekspresi protein tertentu dalam jaringan. Hasil western blotting hanya memberikan representative secara umum dari perubahan HSP yang terjadi dalam organisme atau jaringan dalam menanggapi paparan stressor (Herrickson, 2010; Faught, 2013).

Western blot merupakan teknik untuk mendeteksi protein spesifik pada sampel jaringan yang homogenat ataupun dari suatu ekstraksi berdasarkan kemampuan protein tersebut berikatan dengan antibodi. Teknik ini menggunakan gel elektroforesis untuk memisahkan protein berdasarkan panjang polipeptida atau berdasarkan struktur 3D-nya. Protein tersebut kemudian ditransfer ke sebuah membran, biasanya nitroselulosa atau PVDF, dimana mereka kemudian akan dilacak dengan menggunakan antibodi yang spesifik kepada protein target (Wane, 2014). Dalam penelitian ini menggunakan menggunakan 2 jenis antibodi yaitu antibodi primer dan antibodi sekunder. Antibodi primer (tidak berlabel) berfungsi untuk mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan, antibody primer yang digunakan yaitu Rabbit anti-hsp70 poliklonal sedangkan antibody sekunder berfungsi untuk berikatan dengan antibody primer dengan menggunakan Goat anti Rabbit IgG-AP : SC-2057. Pengikatan antibodi ini berikatan dengan protein spesifik yang menggunakan marker berupa senyawa logam berat. Marker ini biasanya dilekatkan pada antibody dan dapat langsung divisualisasi atau dengan reaksi untuk identifikasi marker.

Pita protein marker, hasil elektroforesis SDS-PAGE, dan hasil WB HSP70 di ketiga lokasi tertera pada gambar 13.



Gambar 13. Profil protein insang rajungan dengan elektroforesis SDS-PAGE (kiri) dan hasil analisis HSP70 dengan metode Western Blot.

Keterangan : M1 = Marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder*

A1 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Kedawang

B1 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Mlaten

C1 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Penunggul

M2 = Marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder*

A2 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Kedawang

B2 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Mlaten

C2 = hasil elektroforesis insang rajungan pantai Penunggul

Perhitungan BM pada pita marker digunakan untuk mencari persamaan dalam menghitung BM yang muncul pada pita profil protein insang rajungan lainnya. Marker yang digunakan dalam penelitian ini adalah Marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder* yang merupakan marker untuk menghitung spesifikasi BM protein. Tujuan dari perhitungan marker adalah mencari konversi untuk memudahkan dalam perhitungan hasil SDS-PAGE sampel insang rajungan. Data perhitungan BM pita protein Marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein molekul standar Marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder*

| MARKER | | | | |
|-------------|-------------|--------|--------|--------------------|
| Marker (BM) | Log BM (Y) | A (mm) | B (mm) | R _f (X) |
| 116 | 2.064457989 | 9 | 63 | 0.142857143 |
| 88 | 1.944482672 | 13 | 63 | 0.206349206 |
| 61 | 1.785329835 | 21 | 63 | 0.333333333 |
| 48 | 1.681241237 | 29 | 63 | 0.46031746 |
| 35 | 1.544068044 | 39 | 63 | 0.619047619 |
| 27 | 1.431363764 | 48 | 63 | 0.761904762 |

Keterangan:

Marker (BM): protein standar dengan berat molekul yang berbeda,

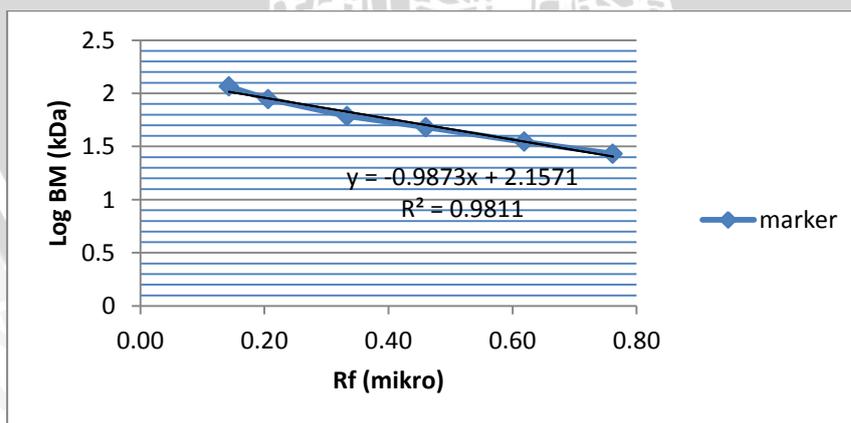
Log BM (Y) : log berat molekul sebagai sumbu y,

A (mm) : jarak pergerakan pita protein dari tempat awal satuan mm,

B (mm) : jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal satuan mm

R_f (X) : mobilitas rate sebagai nilai x.

Setelah didapatkan hasil perhitungan BM pada pita protein marker insang rajungan maka selanjutnya adalah menghitung persamaan linier dari hasil di atas dengan menggunakan Microsoft excel. Hasil dari perhitungan grafik linier dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 14. Grafik linear pita protein marker insang rajungan

Berdasarkan gambar 14 didapatkan hasil persamaan linear pada pita protein marker insang rajungan yaitu $y = -0,9873x + 2,171$ dengan $R^2 = 0,9811$.

Persamaan tersebut kemudian dapat ditentukan BM pada pita protein insang rajungan di masing – masing lokasi pengamatan. Nilai BM yang dihitung diperoleh dari persamaan linear dengan memasukkan nilai Rf sebagai nilai (x) dan memangkatkan 10.

Hasil perhitungan BM pada marker *Spectra™ Multicolor, Broad Range Protein Ladder* di atas kemudian ditentukan nilai BM pada pita protein insang rajungan dengan rumus yang telah ditentukan.

Berikut data perhitungan BM pita protein insang rajungan pada ketiga lokasi penelitian dapat dilihat pada tabel 6 .

Tabel 6. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Insang Rajungan pada ketiga lokasi penelitian

| Profil pita protein pada insang rajungan di ketiga lokasi | | | | | |
|---|--------|--------|-------------|-------------------------|-------------|
| Lokasi | A (mm) | B (mm) | Rf (X) | $y = -0,9873x + 2,1571$ | BM |
| Pantai Kedawangng | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |
| Pantai Mlaten | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |
| Pantai Penunggul | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |

Setelah menghitung nilai BM pada profil protein insang rajungan di ketiga lokasi penelitian didapatkan hasil pita protein yang sama, yaitu sebesar 72,3 kDa. Dari hasil tersebut diduga hasil elektroforesis merupakan golongan dari keluarga HSP yaitu HSP70 (72,3 kDa). Lodish (2001) menjelaskan bahwa spesifikasi protein yang terekspresi tergantung pada besarnya energi dalam bentuk ATP yang terjadi saat proses translasi, di dalam proses terbentuknya koding protein yang akan mengekspresikan asam – asam amino. Semua senyawa radikal bebas dapat menyebabkan perubahan konformasi protein yang bertanggung jawab dalam pembentukan dan pemeliharaan DNA (Elena *et al.*, 2009). Ion radikal bebas yang aktif mampu menghasilkan modifikasi senyawa kimia dalam tubuh serta memicu kerusakan komponen sel yaitu protein, lemak,

karbohidrat dan asam nukleotida. Perubahan kualitas ataupun kuantitas protein memiliki nilai besar dalam pendugaan diagnose ataupun observasi efek suatu perubahan lingkungan.

Peningkatan total kandungan beberapa protein (konsentrasi dan jumlah pita protein) dan juga penurunan beberapa protein yang lain pada organisme diakibatkan adanya suatu perlakuan atau kondisi lingkungan yang berubah (Ti- Da *et al.*, 2006). Sandra dan Meutia (2007), menjelaskan bahwa jumlah pita protein menunjukkan adanya respon organisme terhadap perubahan lingkungan serta hilangnya pita protein menandakan terjadinya degradasi protein akibat penurunan kualitas lingkungan.

Berdasarkan hasil elektroforesis insang rajungan maka dapat dideteksi adanya protein HSP70 di ketiga lokasi penelitian. Dalam mendeteksi adanya protein HSP70 pada insang rajungan dapat dilakukan dengan metode *Western Blot*. Pengujian ini bertujuan untuk memperkuat hasil elektroforesis SDS-PAGE yang bersifat kuantitatif.

Pada penelitian ini profil standar yang muncul pada elektroforesis SDS-PAGE memiliki spesifikasi berat molekul 72,3 kDa. Dari hasil tersebut dapat dideteksi adanya protein HSP70 di ketiga lokasi penelitian dengan menggunakan metode *Western Blot*. Pengujian ini bertujuan untuk memperkuat hasil elektroforesis SDS-PAGE yang bersifat kuantitatif. Pita protein yang muncul dihitung bobot molekulnya (BM) melalui regresi-korelasi yang dibandingkan dengan marker. Data perhitungan BM pita protein insang rajungan pada ketiga lokasi penelitian dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein Insang Rajungan pada ketiga lokasi penelitian

| Hasil analisis WB pita protein pada insang rajungan di ketiga lokasi | | | | | |
|--|--------|--------|-------------|-------------------------|-------------|
| Lokasi | A (mm) | B (mm) | Rf (X) | $y = -0,9873x + 2,1571$ | BM |
| Pantai Kedawang | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |
| Pantai Mlaten | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |
| | 40 | 63 | 0.634920635 | 1.530242857 | 33.90336905 |
| Pantai Penunggul | 19 | 63 | 0.301587302 | 1.859342857 | 72.33406251 |
| | 42 | 63 | 0.666666667 | 1.4989 | 31.5427824 |

Setelah menghitung nilai BM pada hasil analisis WB profil protein insang rajungan pada ketiga lokasi didapatkan hasil yaitu pada pantai Kedawang BM sebesar 72,3 kDa; pada pantai Mlaten BM sebesar 72,3 kDa dan 33,9 kDa; sedangkan pada pantai Penunggul BM sebesar 72,3 kDa dan 31,5 kDa. Berdasarkan hasil uji tersebut masing – masing memberikan informasi tentang ekspresi HSP70 pada insang. Hasil konfirmasi ini dimaksudkan untuk memastikan identifikasi protein HSP70 yang dikenali oleh antibody primer Rabbit anti-hsp70 poliklonal. Berdasarkan hasil konfirmasi tersebut diperoleh protein HSP70 spesifik pada insang rajungan sebesar 70,3 kDa.

Iwama (2008) mengatakan bahwa keluarga protein stress 70-kDa (HSP70) sebagian besar ditemukan dalam sel sebagai bentuk konstitutif 73-kDa. Keluarga HSP70 berkisar antara 68-73 kDa. HSP70 ini berperan aktif dalam membantu proses pelipatan rantai polipeptida yang baru disintesis dalam peran sebagai *chaperon* molekuler. Secara umum, HSP terdiri atas 5 famili yang ditemukan dalam eukariot, 4 di antaranya dikelompokkan berdasarkan berat molekulnya, yaitu HSP90, HSP70, HSP58-60, dan HSP 20-30. HSP ke lima dikenal sebagai *ubiquitin*. HSP merupakan komponen sel yang esensial karena terlibat dalam formasi kompleks protein *transient*. Diduga, HSP juga berperan dalam siklus sel dan perkembangannya (Koziol *et al.*, 1996).

Selain HSP70, ditemukan pula keluarga HSP lain pada pantai Mlaten dan pantai Penunggul yaitu sebesar 33,8 kDa dan 31,5 kDa. Kedua nilai tersebut termasuk dalam keluarga HSP27 (17-35 kDa). HSP27 ini memiliki fungsi berbeda dengan HSP70 yaitu berfungsi sebagai *chaperon* molekuler yaitu mencegah penggabungan protein yang tidak dapat diperbaiki dan berfungsi juga sebagai hormone pertumbuhan (Iwama, 2008).

Sokolova (2005) menyatakan pada hemosit terdapat mitokondria yang merupakan kunci intraselular untuk terjadinya kontaminasi logam berat karena sifatnya yang permeabel dan sangat sensitif. Mitokondria yang mengakumulasi logam berat mengakibatkan terganggunya keseimbangan energi dan mempercepat kematian sel. Murtini *et al.*, (2008) menjelaskan, masukan logam berat kedalam tubuh secara aktif melalui rantai makanan dan pasif melalui laju pertukaran ion logam dengan lingkungannya sangat mudah, terutama ion logam yang berikatan dengan metalloprotein karena ikatan logam ini sangat labil. Palar (2012), menambahkan mekanisme kerja reaksi logam terhadap protein, pada umumnya menyerang ikatan sulfida. Penyerangan terhadap ikatan sulfida yang selalu ada pada molekul protein itu akan menimbulkan kerusakan dari struktur protein. Disamping itu logam berat mempunyai kemampuan untuk menggantikan keberadaan logam - logam lain yang terdapat dalam protein-logam (metalloprotein).

Menurut Choi *et al.*, (2008), organisme yang mengakumulasi logam berat dapat merubah dan mendegradasi proses dari aktivasi enzim, sehingga terjadi kerusakan sel, dan mengakibatkan kematian sel. Kemampuan organisme melawan racun dan stres melalui mekanisme fisiologis untuk pertahanan homeostasisnya, dengan melibatkan ekspresi *Heat shock protein* (Hsp) yang merupakan protein untuk melawan stres. Hsp adalah suatu protein yang dihasilkan karena adanya *Heat shock response* (HSR). Hsr adalah suatu respon

berbasis genetik baik yang bersifat *physiological* maupun yang berasal dari lingkungan untuk menginduksi gen-gen yang mengkode *molecular chaperone*, protease dan protein-protein lain yang penting dalam mekanisme pertahanan dan pemulihan luka pada sel-sel yang berhubungan dengan terjadinya *misfolded protein*. Klasifikasi Hsp yakni subkelas Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 dan *small heat shock protein* (sHsp). Angka yang mengikuti kata Hsp menunjukkan berat molekul dari Hsp. Angka 100 menunjukkan berat molekul dari Hsp yaitu 100kDa. sHsp adalah sub-kelas dari Hsp yang mempunyai karakter massa molekular monomer yang rendah (9-40 kDa) (Widjaja *et al.*,2009). Prinsip kisaran Hsp pada berat molekul yakni antara 15-110 kDa dan dikelompokkan berdasarkan ukuran dan fungsinya (Tsan dan Baochong, 2004). Ekspresi Hsp dapat diinduksi oleh berbagai macam stress diantaranya kenaikan temperatur, logam-logam berat, infeksi dan gangguan radikal bebas. HSR (*Heat Shock Response*) adalah reaksi sel dan organisme terhadap adanya benda asing dan kenaikan suhu (*heat shock* atau *heat stress*). *Heat stress* dapat mengakibatkan kerusakan dan kematian sel, sedangkan dosis subletal dari *heat stress* akan memicu reaksi seluler yang disebut *heat shock response*.

Prinsip Heat Shock Protein (HSP) yaitu memastikan protein yang ada di dalam tubuh berada dalam bentuk yang semestinya dan dalam tempat yang seharusnya. Protein tersebut sudah ada di dalam tubuh. Protein dalam tubuh ada dua jenis kondisi yaitu yang aktif dan inaktif. Kondisi protein inaktif akan bekerja pada kondisi tertentu sebagai respon atas perubahan lingkungannya, dalam penelitian ini yaitu HSP70. Pengaruh logam berat akan mengakibatkan timbulnya kondisi panas karena terdapat signal transduser di dalam sel yang mengakibatkan denaturasi protein. Ketika protein terdenaturasi rantai asam nukleatnya terpisah. Reaksi panas tersebut di direspon oleh HSR (*Heat Shock Respon*) yang melibatkan HSF (*Heat Shock Transcription Factor*). HSR akan

mengkode DNA dan ditranskripsi oleh HSF menjadi RNA. Kemudian diterjemahkan dalam bentuk mRNA pada proses translasi untuk menjadi protein fungsional yaitu ekspresi HSP70. Induksi HSP tersebut dipicu oleh stressor seluler yang disebabkan oleh peningkatan suhu, stress oksidatif, defisiensi nutrisi, radiasi ultraviolet, paparan bahan kimia dan inveksi virus (Welch, 1993 dalam Pockley, 2001).

Secara molekuler protein HSP dapat mengatur respon seluler baik secara primer maupun sekunder. Pada kondisi alami tanpa tekanan stress sel akan mempertahankan dirinya dalam merespon kondisi lingkungan di sekitarnya (Iwama *et al.*, 2003). Namun pada saat sel merespon tekanan stress terhadap lingkungan, maka sel akan membentuk suatu kelas *chaperon* (protein pengarah protein). Secara molekuler yang disebut *heat shock protein* (HSP). HSP ini akan terinduksi di dalam sel untuk melindungi kerusakan sel, jaringan dan keseluruhan organ yang lebih kuat akibat adanya tekanan stress lingkungan (Krebs dan Bettencourt, 1999).

HSP70 mengikat protein target untuk mengatur pelipatan, pengangkutan, dan perbaikan protein (Molinea *et al.*, 2000 dalam Basson, 2006). Keunggulan HSP70 sebagai biomarker adalah karena HSP70 merupakan indikator sensitif kondisi stress yang diakibatkan oleh stresor lingkungan, di mana stress akibat penanganan dan sampling tidak dapat memicu peringatan HSP70 pada ikan (Mbizi, 2003; Zarate dan Bradley 2003 dalam Iwama dkk, 2004).

4.5 Data Kualitas Air

Air sebagai media media hidup rajungan baik secara internal maupun eksternal. Sebagai media internal, air berfungsi sebagai bahan baku reaksi, mengangkut bahan makanan untuk diedarkan keseluruh tubuh, mengangkut sisa sisa metabolisme dan sebagai pengatur penyeimbang tubuh. Sementara sebagai

media eksternal air berfungsi sebagai habitat. Oleh karenanya peran air bagi biota sangat penting agar biota terhindar dari stress, tidak mudah terserang penyakit dan dapat tumbuh dengan baik (Kordi dan Andi, 2007). Pada pengukuran parameter kualitas air yang dilakukan di 3 lokasi penelitian yaitu pantai Kedawang, pantai Mlaten, dan pantai Penunggul disajikan pada tabel 8.

Tabel 8. Data Hasil Pengukuran Kualitas Air

| No. | Parameter | Lokasi | Hasil | Rata-rata | Standar Deviasi | Satuan |
|-----|-----------|-----------|-------|-----------|-----------------|--------|
| 1 | Suhu | Kedawang | 29 | 31,67 | 2,517 | °C |
| | | | 34 | | | |
| | | | 32 | | | |
| | | Mlaten | 28 | 31,33 | 3,055 | °C |
| | | | 34 | | | |
| | | | 32 | | | |
| | | Penunggul | 31 | 29,67 | 1,155 | °C |
| | | | 29 | | | |
| | | | 29 | | | |
| 2 | pH | Kedawang | 9 | 8,33 | 0,577 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 8 | | | |
| | | Mlaten | 8 | 8,33 | 0,577 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 9 | | | |
| | | Penunggul | 8 | 8 | 0 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 8 | | | |
| 3 | Salinitas | Kedawang | 25 | 25,33 | 0,577 | ppt |
| | | | 26 | | | |
| | | | 25 | | | |
| | | Mlaten | 10 | 11,67 | 2,887 | ppt |
| | | | 10 | | | |
| | | | 15 | | | |
| | | Penunggul | 25 | 25 | 1 | ppt |
| | | | 26 | | | |
| | | | 24 | | | |
| 4 | DO | Kedawang | 5,33 | 5,177 | 0,157 | ppm |
| | | | 5 | | | |
| | | | 5,23 | | | |
| | | Mlaten | 3,5 | 4,2 | 0,755 | ppm |
| | | | 4,1 | | | |
| | | | 5 | | | |
| | | Penunggul | 5 | 5 | 0,329 | ppm |
| | | | 5,23 | | | |
| | | | 5,65 | | | |

| No. | Parameter | Lokasi | Hasil | Rata-rata | Standar Deviasi | Satuan |
|-----|-----------|-----------|-------|-----------|-----------------|--------|
| 5 | TSS | Kedawang | 77,8 | 57,1 | 17,95 | ppm |
| | | | 45,8 | | | |
| | | | 47,7 | | | |
| | | Mlaten | 44,6 | 44,23 | 9,75 | ppm |
| | | | 34,4 | | | |
| | | | 53,8 | | | |
| | | Penunggul | 38,5 | 41,37 | 4,28 | ppm |
| | | | 39,3 | | | |
| | | | 46,3 | | | |

A. Parameter Fisika Air

1. Suhu

Suhu tergolong dalam parameter fisika yang mempengaruhi kehidupan organisme dan kualitas perairan. Tingginya suhu perairan berhubungan dengan besarnya intensitas cahaya yang masuk ke dalam badan air. Semakin banyak sinar matahari yang masuk ke dalam badan air, akan menyebabkan tingginya suhu pada perairan. Sebaliknya jika peningkatan kedalaman dalam perairan terjadi, maka akan menyebabkan rendahnya suhu perairan (Nurhaidah, 2013). Secara umum, laju pertumbuhan akan meningkat seiring kenaikan suhu, tetapi kenaikan suhu yang terlalu ekstrim akan menyebabkan kematian.

Pada penelitian ini didapatkan rata – rata hasil pengukuran suhu di tiga lokasi yaitu pada pantai Kedawang sebesar 31,67°C, pada pantai Mlaten sebesar 31,33°C, dan pada pantai Penunggul sebesar 29,67°C. Perbedaan suhu pada masing – masing tempat tidak terlalu drastis. Hal ini disebabkan pada saat pengambilan sampel dilakukan pada siang hari dan dilakukan pada daerah yang lebih terbuka atau tidak terlindungi oleh pohon – pohon mangrove, sehingga menyebabkan perairan masih terasa panas dan banyak menyerap sinar matahari. Berdasarkan hasil pengukuran suhu tersebut menunjukkan bahwa nilai suhu melebihi batas yang dibutuhkan oleh kepiting rajungan. Hal ini sesuai pernyataan dari Galil (2006), menyatakan bahwa kisaran temperature yang dibutuhkan rajungan (*Portunus pelagicus*) yaitu 15 °C hingga 25°C.

Hamer *et al.*(2004), menyatakan bahwa variasi musiman suhu air dapat mengubah respon panas-shock. Memang, diketahui bahwa fluktuasi alami dalam suhu lingkungan dan beberapa lainnya parameter fisik dan kimia dapat menyebabkan induksi beberapa tanggapan stres seluler. Oleh karena itu penekanan HSP70 di insang kerang di musim panas (suhu di atas 25 °C) disebabkan oleh penghambatan sintesis protein karena berkurangnya ruang untuk pertumbuhan dan kerusakan pada mekanisme adaptasi suhu.

Selain berpengaruh langsung terhadap organisme, suhu juga berpengaruh terhadap kadar logam berat di perairan. Apriadi (2005) menyebutkan bahwa peningkatan suhu dapat menyebabkan penurunan daya larut oksigen terlarut dan juga akan menaikkan daya racun bahan-bahan tertentu khususnya logam berat. Suhu air terutama di lapisan permukaan ditentukan oleh pemanasan matahari yang intensitasnya berubah terhadap waktu, oleh karena itu suhu air laut akan seirama dengan perubahan intensitas penyinaran matahari. Menurut Waldichuk (1974) dalam Hutagalung (1984), kenaikan suhu perairan akan menyebabkan tingkat bio-akumulasi semakin besar.

2. Salinitas

Salinitas menggambarkan padatan total di dalam air setelah semua karsinogen dikonversikan menjadi oksidasi, bromida yang telah dikonversikan menjadi iodide dan digantikan dengan klorida dan semua bahan organik yang telah dioksidasi. Salinitas dinyatakan dalam satuan g/kg atau promil (‰) (Kordi, 2009). Salinitas berperan sangat penting dalam pemeliharaan larva krustasea seperti zoea rajungan. Perubahan salinitas akan mempengaruhi sifat fungsional dan struktur tubuh organisme. Hal yang sama juga akan mengubah konsentrasi cairan tubuhnya sesuai dengan lingkungannya dengan kombinasi proses osmosis dan difusi, sehingga akan mempengaruhi proses molting.

Pada ketiga lokasi pengambilan sampel diperoleh hasil rata-rata salinitasnya yaitu 11‰ hingga 25‰. Pantai Mlaten diperoleh nilai rata – rata salinitas terendah yaitu 11,67‰ hal ini dikarenakan pada pantai Mlaten terdapat muara sungai (daerah estuary) dimana pertemuan antara air laut dan air tawar sehingga mengakibatkan salinitas lebih rendah daripada daerah lain. Sedangkan pada pantai Kedawang dan Penunggul diperoleh hasil pengukuran salinitas yang sama yaitu 25‰. Menurut Susanto (2007), rajungan umumnya hanya hidup di laut dengan salinitas sekitar 32-34 ppt, hasil yang didapat lebih rendah daripada kisaran salinitas yang umumnya dibutuhkan rajungan, hal ini dapat terjadi karena selain lokasi pengambilan sampel yang dekat dengan daerah estuary, banyak buangan dari limbah-limbah rumah tangga mau limbah domestic yang mencemari kawasan mangrove sebagai habitat dari rajungan (*Portunus pelagicus*).

Heat shock protein telah digunakan secara luas sebagai indikator tekanan lingkungan secara umum karena keberadaannya dapat dipicu oleh beberapa tekanan lingkungan seperti peningkatan suhu perairan, logam berat, cemaran B3 dan perubahan salinitas yang drastis (Yaqin, 2006). Menurut Madeira *et al*, (2014) pada penelitian HSP70 Kepiting *P. marmoratus* akan menunjukkan pola ekspresi berbeda antara kelompok Suhu (T) dan termal ditambah hyposaline menekankan kelompok (T + hypos). Namun, bila terkena T + hypos stres, tidak ada peningkatan yang signifikan. Penelitian telah menunjukkan bahwa stres hyposmotic (konsentrasi cairan tubuh yang lebih rendah) menyiratkan peningkatan volume sel dan turgor karena masuknya air. Ini mungkin memiliki beberapa efek seperti kerusakan protein, penghambatan glikolisis, oksidasi glisin, hidrolisis asam amino dan penurunan dalam terjemahan mRNA tentang enzim yang terlibat dalam glukoneogenesis, yang mempengaruhi tingkat metabolisme.

Selain berpengaruh terhadap biota perairan, salinitas juga berpengaruh terhadap logam berat di suatu perairan. Bewers et al. (1990), menyatakan bahwa hubungan konsentrasi logam berat dengan salinitas, hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pada salinitas rendah, konsentrasi logam berat tinggi. Apabila konsentrasi logam berat dalam air rendah maka salinitas tinggi.

B. Parameter Kimia Air

1. pH

Derajat keasaman atau pH air menunjukkan aktivitas ion hidrogen dalam larutan tersebut dan dinyatakan sebagai konsentrasi ion hidrogen (dalam mol per liter). pH air mempengaruhi tingkat kesuburan perairan karena mempengaruhi kehidupan jasad renik. Perairan dengan pH rendah akan menyebabkan kelarutan oksigen juga ikut rendah yang akan mengakibatkan aktivitas pernafasan akan naik dan akan menyebabkan nafsu makan pada ikan akan berkurang (Kordi dan Andi, 2007).

Menurut Ali (2005), yang menyatakan bahwa pH suatu perairan merupakan salah satu parameter yang penting dalam pemantauan kualitas perairan. Organisme perairan memiliki kemampuan yang berbeda dalam mentoleransi pH perairan. Kematian lebih sering diakibatkan oleh pH yang rendah daripada disebabkan pH yang tinggi. Batas toleransi organisme perairan terhadap pH bervariasi dan dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain suhu, oksigen terlarut, alkalinitas, adanya berbagai anion dan kation serta jenis stadia organisme. Setiap perairan mempunyai pH yang tidak sama tergantung pada lingkungan perairannya dan setiap organisme mempunyai batas toleransi terhadap pH yang berbeda. pH air berpengaruh terhadap proses penguraian bahan makanan, jenis dan susunan zat dalam lingkungan perairan dan ketersediaan unsur hara.

Pada tiga lokasi pengambilan sampel, diperoleh nilai rata – rata pH yaitu pada pantai Kedawang sebesar 8,33; pada pantai Mlaten sebesar 8,33; dan pada pantai Penunggul sebesar 8. Menurut Zaidin *et.al* (2013), kisaran pH untuk pertumbuhan rajungan yang baik yaitu mendekati pH netral yaitu 7 hingga 8. Menurut pendapat dari Darmono (2001) pH, suhu, dan salinitas menyebabkan ukuran fisik dari tubuh kepiting ditiap lokasi berbeda-beda, selain itu kemungkinan besar juga disebabkan oleh pencemaran lingkungan.

Hammer *et al.*, (2012) dalam Madeira *et al.*, (2014) telah menunjukkan bahwa ketika kepiting terkena air diasamkan, mereka mengalami perubahan metabolik profil terutama karena penurunan tingkat osmolit intraseluler. Menurut Madeira *et al.*, (2014) Hasil yang serupa dengan yang diamati dalam stres hyperosmotic dan dengan demikian menunjukkan gangguan dalam intraseluler regulasi osmotik. Dalam invertebrata laut, sistem asam-basa homeostasis tergantung pada satu set protein membran. Hal ini menunjukkan bahwa paparan pH rendah sangat menuntut sel harus memprioritaskan antara protein atau enzim lain, transporter ion dan faktor-faktor transkripsi, tergantung pada stres. Dengan demikian, sel dapat terutama menyimpang sumber daya terhadap produksi transporter ion dan juga antioksidan menurunkan energi yang tersedia untuk menginduksi respon HSP70 yang cepat dan kuat.

Nilai pH pada perairan pantai Kedawang, Mlaten dan Penunggul tergolong basa atau sesuai dengan pH alami air laut. Hutagalung (1984) menyatakan bahwa kesadahan yang tinggi dapat mengurangi toksisitas logam berat, karena dengan kesadahan yang tinggi logam berat dalam air akan membentuk senyawa kompleks yang mengendap dalam perairan.

2. Oksigen Terlarut / *Disolved Oxygen* (DO)

Kadar oksigen terlarut berfluktuasi secara harian dan musiman, tergantung pada pencampuran dan pergerakan massa air, aktivitas fotosintesis dan respirasi yang masuk kedalam badan air (Effendi, 2003). Kordi dan Andi (2007), menyatakan bahwa oksigen sebagai faktor pembatas. Jika ketersediaan oksigen dalam perairan tidak mencukupi maka akan mempengaruhi aktivitas dalam perairan tersebut. Oksigen digunakan oleh biota perairan sebagai bahan bakar atau sebagai suplai makanan yang menyebabkan ikan mampu berenang dengan baik, menunjang pertumbuhan dan aktivitas lainnya.

Hasil pengukuran *Disolved Oxygen* (DO), selama penelitian menunjukkan bahwa nilai rata – rata pada kawasan mangrove Pantai Kedawang sebesar 5,177 mg/l dan Pantai Penunggul sebesar 5 mg/l. Sedangkan hasil pengukuran DO terendah terdapat di Pantai Mlaten yaitu sebesar 4,2 mg/l. Hal ini dikarenakan pada kawasan mangrove Pantai Mlaten kerapatan mangrovenya lebih tinggi sehingga mempengaruhi bahan organik. Proses dekomposisi bahan organik yang cukup besar pada habitat mangrove sehingga dibutuhkan oksigen terlarut yang cukup besar. Menurut pendapat Adi (2011), oksigen terlarut didalam air antara 4-6 ppm dianggap paling ideal untuk tumbuh dan berkembang larva kepiting. Sedangkan menurut Boyd (1990), oksigen terlarut sangat esensial dibutuhkan oleh rajungan untuk respirasi yang selanjutnya dimanfaatkan untuk kegiatan metabolisme. Oleh sebab itu, kandungan oksigen terlarut harus selalu dipertahankan dalam kondisi optimum. Secara umum, apabila kandungan oksigen terlarut rendah (<3 ppm) akan menyebabkan nafsu makan dan tingkat pemanfaatan rendah. Untuk budidaya kepiting bakau agar pertumbuhannya baik, maka kandungan oksigen sebaiknya lebih besar dari 3 ppm.

Selain berpengaruh terhadap biota perairan, oksigen terlarut juga berpengaruh terhadap toksisitas suatu logam berat di perairan. Menurut Effendi (2003), dengan meningkatnya kadar oksigen terlarut dan kesadahan akan mengurangi toksisitas timbal (Pb) terhadap organisme akuatik.

3. Total Suspended Solid (TSS)

Hasil penelitian didapatkan nilai rata – rata padatan tersuspensi (TSS/Total Suspended Solid) pada ketiga lokasi yaitu pada pantai Kedawang sebesar 57,1 ppm, pada pantai Mlaten sebesar 44,23 ppm, dan pada pantai Penunggul sebesar 41,37 ppm. Menurut Kepmen LH No. 51 Tahun 2004 nilai-nilai tersebut masih dalam kisaran baik untuk kehidupan biota pantai, karena batas baku mutu TSS untuk kehidupan biota laut sebesar 80mg/L. Sumber TSS dari ketiga lokasi umumnya hampir sama yaitu berasal dari limbah domestik, rumah tangga, perikanan dan substrat lumpur serta tanah liat.

Zat padat tersuspensi (*Total Suspended Solid*) adalah semua zat padat (pasir, lumpur, dan tanah liat) atau partikel-partikel yang tersuspensi dalam air dan dapat berupa komponen hidup (biotik) seperti fitoplankton, zooplankton, bakteri, fungi, ataupun komponen mati (abiotik) seperti detritus dan partikel-partikel anorganik (Tarigan dan Edward, 2003). Hasil padatan tersuspensi akan mempengaruhi kehidupan biota perairan seperti yang diungkapkan Alabaster dan Lloyd (1982) padatan tersuspensi bisa bersifat toksik bila dioksidasi berlebihan oleh organisme sehingga dapat menurunkan konsentrasi oksigen terlarut sampai dapat menyebabkan kematian pada ikan atau biota perairan.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai pengaruh logam berat Pb terhadap ekspresi HSP70 pada insang rajungan (*Portunus pelagicus*) dapat disimpulkan bahwa pada deteksi HSP70 menggunakan metode *western blot* menunjukkan nilai pita protein sebesar 72,3 kDa. Nilai pita protein tersebut termasuk dalam keluarga HSP70 yaitu berkisar antara 68-73 kDa. Hal ini membuktikan bahwa terjadi ekspresi *Heat Shock Protein* (HSP70) pada insang rajungan (*Portunus pelagicus*) dari perairan yang mengandung logam berat Pb di ketiga lokasi penelitian.

5.2 Saran

Saran yang dapat saya sampaikan pada penelitian ini yaitu sebaiknya untuk penelitian tentang ekspresi HSP70 dilakukan penelitian laboratorium agar lebih mudah untuk menentukan penyebab spesifik terekspresinya protein tersebut. Selain itu sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi HSP70 yang disebabkan oleh polutan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhityo, Argo. 2013. **Kandungan Logam Berat Pb Pada Akar Dan Batang Mangrove (*Sonneratia caseolaris*) di Kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya dan di Desa Kedawang, Pasuruan Jawa Timur**. Skripsi. FPIK Universitas Brawijaya Malang.
- Ahsanullah, M., M.C Mobley and D.S. Negilski. 1984. **Accumulation of Cadmium from Contaminated Water and Sediment by the Shrimp (*Calianassa australiensis*)**. Marine Biology b8:191-197.
- Ali, M. SH & Norma-Rashid Y. 2005. **Size class distribution and behavior budgets of sympatric mudskippers utilising mangrove microhabitats in Morib**. In:
- Ayunda, R. 2011. **Struktur Komunitas Gastropoda Pada Ekosistem Mangrove Di Gugus Pulau Pari Kepulauan Seribu**. Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Program Biologi. Depok.
- Baedowi, Mahluki. 2013. **Kandungan Logam Berat Pb Pada Akar dan Batang Pada Tanaman Mangrove *Avicennia alba* Di Kawasan Mangrove Desa Gunung Anyar Surabaya dan Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Kabupaten Pasuruan**. Skripsi. FPIK Universitas Brawijaya Malang.
- Basson, R. 2006. **HEAT SHOCK PROTEIN 70 and cortisol as biomarkers for Cadmium, Chromium and nickel contamination in oreochromis mossambicus**. Disertasi dipublikasi. Faculty of science. University of johannesburg. South africa. [http://etd.uj.ac.za/pdf.tanggal 24 Mei 2015](http://etd.uj.ac.za/pdf.tanggal%2024%20Mei%202015)
- Basu N., Todgham A. E., Ackeman P. A., Bibeau M. R., Nakano K., Sculte P. M., Iwama G. K. 2002. **Heat Shock Protein Genes and Their Functional Significance In Fish**. Gene 295 (2002): 173-183
- Bewers, J.M., R.A. Duce, T.D. Jickleis, P.S. Lies, J.M. Miller, A.L. Windom, and R. Wollast. 1990. **Land to Ocean Transport of Contamination : Comparisson of River and Atmospheric Fluxes**. UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 114, 2 : 417-446
- Cahyadi, H., E. Tyasrini., J. Lucianus. 2004. **Peranan Heat Shock Protein Pada Patogenesis Penyakit Infeksi dan Penyakit Autoinum**. JKM. Vol 3 (2)
- Canbek, M., TemirAli, D., Mustafa, U., Gokhan, B., Ozgur, E., Naime, A., 2007. **Preliminary assesment of heavy metals in water and some cyprinidae species from the Porsukriver**. Tur. J. Appl. Biol. Sci. 1(3),91-95.
- Darmono.1990. **Uptake Of Cadmium And Nickel In Banana Prawns *Pennaes merguensis* De Man**. Bull. Environm. Contamin. Toxicol. 45 (3): 320-328.

- Darmono. 1995. **Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup**. Universitas Indonesia. Pp. 139
- Destiany, Maulida. 2007. **Pengaruh pemberian merkuri klorida Terhadap struktur mikroanatomi hati Ikan mas**. *Skripsi*. Universitas Negeri Semarang.
- Dewi, Ariyanti Suhita. 2010. **Respon Stres Pada Spons dan Potensi Aplikasinya Sebagai Biomonitoring Polutan Pada ekosistem Terumbu Karang**. *Squalen* Vol. 5 No.3.
- Edward dan Abdul, R. 2003. **Pemantauan sifat fisik dan kimia air laut di perairan teluk tapak tuan, Kabupaten Aceh Selatan dalam Kaitannya dengan Kepentingan Perikanan**. Seminar Nasional Indonesia. Sekolah Tinggi Perikanan, Jakarta
- Effendi, H. 2003. **Telaah Kualitas Air**. Kanisius. Yogyakarta.
- Erlangga. 2007. **Efek Pencemaran Perairan Sungai Kampar di Provinsi Riau Terhadap Ikan Baung (*Hemibagrus nemurus*)**. *Tesis*. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Evans, D.H., 1987. **The Fish Gill Site Of Action And Model For Toxic Effects Of Environmental Pollutants**. *Environ. Health Prospect.* 71,47
- Evans, T.G., 2010. **Co-Ordination Of Osmotic Stress Responses Through Osmosensing And Signal Transduction Events In Fishes**. *J. Fish Biol.* 76, 1903-1925.
- Fatchiyah; Estri L. Arumingtyas; Sri Widyarti dan Sri Rahayu. 2011. **Biologi Molekular**. Erlangga: Jakarta
- Febrizal. 1995. **Kandungan Logam Berat (Cd, Pb, dan Zn) pada Loka (*Geliona coaxans*) di Perairan Sungai Pakning Kabupaten Bengkalis Riau**. *Skripsi*. FPIK. Universitas Riau, Pekanbaru. 59 hal (tidak diterbitkan)
- Feder, M. E. dan G. E. Hoffman. 1999. Heat Shock Proteins, Molecular, Chaperones, and The Stress Response. **Evolutionary and Ecological Physiology**. *Annu. Rev. Physiol.* 61.243-282. 0066-4278/99/0315-0243\$08.00
- Fergusson, J. E. 1990. **The Heavy Element: Chemistry, Environmental Impact and Health Effect**. Pergamon Press inc. England.
- Fernandes, C., Fontainhas, A., Monteiro, S.M., Salgado, A., 2007. **Changes in plasma electrolytes and gill histopathology in wild *Liza saliens* from the Esmoriz- Paramos coastal lagoon**. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 79, 301-305.
- Fujaya, Yushinta. 2004. **Fisiologi Ikan, Dasar Pengembangan Teknologi Perikanan**. Rineka Cipta. Yogyakarta

- Galil, Bella S. 2006. ***Portunus pelagicus*** Delivering Alien Invasive Species Inventories For Europe. Europe
- Haap T dan Kohler H. R. 2009. **Cadmium Tolerance In seven *Daphnia magna* Clones Is Associated With Reduced HSP70 Baseline Levels and Induction.** *Aquatic Toxicology* 94 (2009) 131-137
- Harahap, S. 2001. **Tingkat Pencemaran Air Kali Cakung Ditinjau dari sifat Fisika-Kimia Khususnya Logam Berat dan Keanekaragaman Jenis Hewan Benthos Makro.** Bidang Studi Ilmu Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan. Tesis Progam PascaSarjana. IPB. Bogor. 57 hal.
- Hariyadi, S., Suryadiputra dan B. Widigdo. 1992. **Limnologi Metode Kualitas Air.** Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hutagalung, H.P. 1991. **Pencemaran Laut Oleh Logam Berat.** Dalam Status Pencemaran Laut di Indonesia dan Teknik Pemantauannya. P30-LIPI. Jakarta. Hal 45-59.
- Iwama, G. K., Thomas, P., Vijayan, M. M., Forsyth, R., 1998. **Stress protein expression in fish.** *Fish Biol.* Fish. 8,35–56.
- Iwama, G. K. 2008. **Stress in Fish.** Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Nova Scotia
- Irawan B. 2005. **Kondisi Vegetasi Mangrove di Banda Aceh, Aceh Besar dan Meulaboh Propinsi NAD Pasca Tsunami. Laporan Peninjauan Wilayah Pesisir Propinsi NAD Pasca Tsunami,** Kementrian Lingkungan Hidup-GTZ.
- Juwana, Sri. 1997. **Tinjauan Tentang Perkembangan Penelitian Budidaya Rajungan (*Portunus pelagicus*).** *Oseana* XXII (4) : 1-12.
- Juwana, Sri., Aznam Aziz., dan Ruyitno. 2009. **Evaluasi Potensi Ekonomis Pemacuan Stok Rajungan di Perairan Teluk Klabat, Pulau Bangka.** ISSN 0125-9830 35(2):107-128.
- Karima, Is. 2013. **Injeksi Serum, Koleksi Antiserum, Dan Pengujian Spesifitas Reaksi Antigen Antibodi Dengan Western Blotting.** Laporan Praktikum Imunologi. Jurusan Biologi. FMIPA Universitas Brawijaya Malang.
- KMNLH, 2004. **Keputusan Kantor Menteri Negara Kependudukan dan Lingkungan Hidup No. 51 Tahun 2004. Tentang baku mutu air laut.** Kantor Menteri Negara Lingkungan Hidup. Jakarta.
- Kordi. K. M. Ghufran, H., dan A.B. Tancung. 2007. **Pengelolaan Kualitas Air Dalam Budidaya Perairan.** Rineka Cipta. Jakarta
- Kordi, K.M.G.H 2009. **Budidaya Perairan,** Buku ke-2. PT. Citra Aditya Bakti. Bandung

- Korzeniewski, K. and E. Newgebeur. 1991. **Heavy Metals Contamination in The Polish Zone of Southern Baltic**. *Merine Pollution Bulletin*. 23 : 687-689
- Koziol, C., Wagner-Hulsman, C., Mikoc, A., Gamulin, V., Kruse, M., Pancer, Z., Schacke, H., and Muller, W.E.G. 1996. **Cloning of a heat-inducible biomarker, the cDNA encoding the 70 kDa heat shock protein , from the marine sponge *Geodia cydonium*: response to natural stresors**. *Marine Ecology Progress Series* 136: 153–161.
- Krebs, R. A. dan B. R. Bettencourt. 1999. **Evolution of Thermotolerance and Variation in the Heat Shock Protein, HSP70**. *Amer. Zool.* 39: 910-919
- Laws, E.A. 1981. **Aquatic Pollution**. Environmental Science and Technology.
- Lestyningrum, Rona Aji. 2013. **Kandungan Logam Berat Pb dan Gambaran Histology Pada Jaringan Akar dan Buah Avicennia Alba Di Kawasan Mangrove Gunung Anyar Surabaya Dan Desa Kedawang Kab. Pasuruan**. Skripsi. FPIK Universitas Brawijaya Malang.
- Lopez-Legentil, S., Song, B., McMurray, S.E., and Pawlik, J.R. 2008. **Bleaching and stres in coral reef ecosystems: HSP70 expression by the giant barrel sponge *Xestospongia muta***. *Molecular Ecology* 17: 1840–1849.
- Madeira, Diana., Luis Narciso., Mario Sousa diniz dan Catarina Vinagre. 2014. **Synergy Of Environmental Variables Alters The Thermal Window And Heat Shock Response: An Experimental Test With The Crab *Pachygrapsus marmoratus***. *Marine Environmental Research* 98 (2014) 21e28
- Makmur, Resky., Emiyarti., L.O Alirman Afu. 2013. **Kadar Logam Berat Timbal (Pb) pada Sedimen di Kawasan Mangrove Perairan Teluk Kendari**. *Jurnal Mina Laut Indonesia*. Vol. 02 (47-58). ISSN : 2303-3959
- Marzuki. 1983. Metodologi Riset. Fakultas Ekonomi. Ull Yogyakarta.
- Megawati, Sherly. 2014. **Kandungan Logam Berat Pb Pada Akar dan Daun Mangrove (*Rhizopora Mucronata*. Lam) Di Kawasan Mangrove Desa Mlaten, Kab. Pasuruan Jawa Timur**. Skripsi. FPIK Universitas Brawijaya Malang.
- M.K. Pazir, M. Afsharnasab, N. Niamaymandi, H. Khadem, E. Akbarpour and A.A. Zendebudi, 2012. **Histopathological Observation of White Spot Syndrome Virus and Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Shrimp Farms, *Litopenaeus vannamei*, in Busheih Province, Iran**. *Asian Journal of Animal Sciences*, 6: 209-219.
- Mulyanto. 2008. Metode Sampling. **Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya**. Malang
- Moosa, MK. 1980. **Beberapa Catatan Mengenai Rajungan dari Teluk Jakarta dan Pulau-Pulau Seribu**. Sumberdaya Hayati Bahari, Rangkuman Beberapa Hasil Penelitian Pelita II. LON-LIPI, Jakarta. Hal 57-79.

- Nadeau, D., S. Corneau., I. Plante., G. Morrow dan R. M. Tanguay. 2001. **Evaluation for HSP70 as Biomarkers of Effect of Pollutants on The Earthworm *Lumbricus terrestris*. Cell&Chaperons** 6(2): 153-163. Article no. csac. 2001.278
- Nair, K.K.,Kiremidjian,H.,Law,K.H., 2006. **Time series based damage detection and localization algorithm with application to the ASCE benchmark structure.** J. SoundVib. 291,349–368.
- Nabib, R dan F.H. Pasaribu. 1989. **Patologi dan Penyakit Ikan** Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. IPB. Bogor. 158 hal
- Nontji, A. 1986. **Laut Nusantara.** Djambatan, Jakarta. 105 hlm.
- Nyabakken, J.W. 1986. **Biologi Laut: Suatu Pendekatan Biologi.** Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Padmini, E., B. Vijaya Geetha., M. Usha Rani. 2009. **Pollution Induced Nitritive Stress And Heat Shock Protein 70 Overexpression in Fish Liver Mitochondria.** Science of The Total Environment 407 (2009) 1307-1317.
- Palar, Heryando. 2002. **Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat.** Rineka Cipta: Jakarta
- Pazra, Debby Fadhilah. 2008. **Gambaran Histopatologi Insang, Otot dan Usus Pada Ikan Lele (*Clarias sp*) Asal dari Daerah Bogor.** Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor
- Pockley, A.G.2001. **Heat shock protein in health and disease. Therapeutic targets or therapeutic agents.**
- Purnomo, T., Muchyiddin. 2007. **Analisa Kandungan Timbal (Pb) pada Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) di Tambak Kecamatan Gresik.** Neptunus. Vol 14. No 1:69-77
- Rajeshkumar, Sivakumar., Jayaprakash Mini., and Natesan Munuswamy. 2013. **Effects of Heavy metals on Antioxidants and expression of HSP70 in Different Tissues of Milk Fish (*Chanos chanos*) in Kattuppalli Island, Chennai, India.** Ecotoxicology and Environmental Safety 98 (2013) 8–18.
- Rantam, F.A. 2003. **Metode Immunologi.** Cetakan Pertama. Surabaya. Airlangga University Press.
- Roberts, R J. 2001. **Fish Pathology.** Third Edition. W.B.Saunders, London, Edinburgh, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto. 472 hal.
- Robert, J. 2003. **Evolution of Heat Shock Protein and Immunity. Developmental and Comparative Immunology.** 27 (2003). 449-464. Doi:10.1016/S0145-305X(02)00160-X
- Rosdiana, N Dan S.W.A. Jusman. **Heat shock protein dan efek proteksinya terhadap miokardium.** Bagian biokimia FK UI. [http://www.pus-2.htm.tanggal 24 Mei 2015](http://www.pus-2.htm.tanggal%2024%20Mei%202015)

- Saanin, H. 1984. **Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan 1**. Penerbit Binacipta.Bogor. 1 hal
- Salsabela, Linda Silvira. 2013. **Logam Berat Pb Pada Akar dan Daun Mangrove *Avicennia alba* Di Gunung Anyar Surabaya dan Desa Kedawang, Pasuruan Jawa Timur**. Skripsi. FPIK Universitas Brawijaya Malang.
- Sanders, B. 1994. **Stress Proteins as Molecular Chaperones : Implication for Toxicology**. Enviromental Health Perspectives 102: 6-7
- Sankar,T. V., Zynudheen, A. A., Anandan, R., Viswanathannair, P. G., 2006. **Distribution of organochlorine pesticide sand heavy metal residues in fish and shellfish from Calicutregion, Kerala, India**. Chemosphere 65,583–590.
- Sanusi, H.S., H.P. Hutagalung dan H. Razak. 1984. **Hubungan Antar Umur, Kadar Air Raksa (Hg) dan Kadmium (Cd) yang Terakumulasi oleh Kerang Hijau (*Mystylus viridis* L.) yang Dibudidayakan di Perairan Teluk Jakarta**. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor. 70 hal (tidak diterbitkan)
- Sembiring, S. B. M., Agus Priyono., Jhon H. H dan Tony Setiadharna. 2013 **Determinasi Jenis Kelamin Pada Ikan kerapu Sunu (*Plectropomus leopardus*) dengan Uji Serologi**. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Budidaya Laut. Buleleng Bali.
- Sherman, M. Y., Goldberg, A. L., 2001. **Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neuro degenerative diseases**. Neuron 29,15–32.
- Sivaperumal., P., Sankar, T. V., Viswanathan Nair, P. G., 2007. **Heavy Metal Concentrations In Fish, Shell Fish And Fish Products From Internal Market Sofindiavis-A-Vis International Standards**. Food Chem.102,612–620.
- SNI, 1990. **Metode Pengukuran Kualitas Air**. Dinas Pekerjaan Umum. Jakarta
- Soegianto, Agoes., Nia Adiani Primarasti dan Dwi Winarni. 2004. **Pengaruh Pemberian Kadmium Terhadap Tingkat Kelangsungan Hidup dan Kerusakan Struktur Insang dan hepatopankreas pada Udang ronggeng (*Macrobrachium sintangense* (de man))**. Berk. Penel. Hayati: 10 (59–66), 2004
- Soemodihardjo, S., S. Birowo dan K. Romimohtarto. 1987. **Teluk Ambon II**. Balai Penelitian Sumberdaya Laut. PPPO – LIPI Ambon. 125 hal.
- Surakhmad, W. 1998 **.Pengantar Penelitian Ilmiah**. Penerbit Tarsito : Bandung.
- Susanto, Bambang. 2007. **Pertumbuhan, Sintasan dan Keragaan Zoea Sampai Megalopa Rajungan (*Portunus Pelagicus*) Melalui Penurunan Salinitas**. Jurnal Perikanan IX (1): 154-160.

- Takashima, F dan Hibiya T. 1995. **An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features**. Edisi II. Kodansha Ltd, Tokyo. 195 hal.
- Tarigan, M.S., dan Edward. 2003. **Kandungan Total Zat Padat Tersuspensi (*Total Suspended Solid*) di Perairan Raha, Sulawesi Tenggara**. *Jurnal Sains*, 7 (3): 109-119
- The'riault, J.R., H. Adachi dan S.K. Calderwood. 2006. **Role of Scavenger Receptors in The Binding and Internalization of Heat Shock Protein 70**. *The Journal of Immunology*. 177: 8604-8611
- Wahyuni, W. 2005. **Dasar-Dasar Virologi Tumbuhan**. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wane, 2014. **Metode Penelitian Dengan Cara Blot : Western Blot, Eastern Blot, Northern Blot dan Southern Blot**. <http://Catatanwane.blogspot.com/2014/metode-penelitian-dengan-cara-blot.html>
- Waters, E. R., Garrett, J. L., Elizabeth, V. 1996. **Evolution, Structure and Function of the Small Heat Shock Protein in Plants**. *Journal of Experimental Botany*. Vol 47 (296) : 325-338
- Wepener, V., J.H.J. Van Vuren., F.P. Chatiza., Z. Mbizi., L. Slabbert dan B.Masola. 2005. **Active Biomonitoring in Freshwater. Enviroments : Early Warning Signals from Biomarkers in Assesing Biological Effect of Diffuse Sources of Pollutants**. *Physics and Chemistry of The Earth* 30 : 751-761
- Widayati, Dyah Eka., Aunurrohim., Nurlita Abdulgani. 2011. **Studi Insang Ikan Mujair (*Oreochromis mossambicus*) Pada Konsentrasi Sublethal Air Lumpur Sidoarjo**. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Widianarko, B. 1997. **Urban Ecotoxicology: Spatial And Temporal Heterogeneity of Pollution**. Faculty of Biology. Phd. Thesis. Vu Amsterdam
- Widianarko, B. 2002. **Peran Toksikologi Lingkungan Dalam Pemecahan Masalah Pangan Dan Lingkungan**. Unika University Press. Semarang.
- Zonggonao, O. A., 2005. **Evaluasi Konsentrasi Cd, Cu, Dan Fe Pada Daging, Insang Dan Hepatopankreas Dalam Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) Dari Demak, Semarang dan Kendal**. SKRIPSI. Jurusan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Katolik Soegijapranata.

Lampiran 1

Tabel 1. Hasil- hasil penelitian tentang pencemaran logam berat Pb (Timbal) di lokasi Kawasan Mangrove Pasuruan

| No. | Jenis Logam Berat | Lokasi | Hasil | Sumber |
|-----|--|---|--|----------------|
| 1. | Kandungan logam berat Pb pada akar dan batang mangrove <i>Sonneratia casseolaris</i> | Kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya dan Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Pasuruan | <ul style="list-style-type: none"> - Kadar Pb air di kawasan mangrove Wonorejo berkisar 0,087 - 0,116 ppm - Kadar Pb air di kawasan mangrove Kedawang berkisar 0,115 – 0,156 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Wonorejo berkisar 3,85 – 13,14 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Kedawang 2,3 – 5,44 ppm | Adhityo (2013) |
| 2. | Kandungan logam berat (Pb) pada akar dan batang mangrove <i>Avicennia alba</i> | Kawasan Mangrove Wonorejo, Surabaya dan Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Pasuruan | <ul style="list-style-type: none"> - Kadar Pb air di kawasan mangrove Gunung Anyar sebesar 0,325 ppm - Kadar Pb air di kawasan mangrove Kedawang sebesar 0,145 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Gunung Anyar sebesar 12,015 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Kedawang sebesar 2,91 ppm - Kadar Pb di kawasan mangrove Gunung Anyar pada akar <i>A. alba</i> sebesar 4,6 ppm - Kadar Pb di kawasan mangrove Kedawang pada akar <i>A. alba</i> sebesar 2,86 ppm - Kadar Pb di kawasan mangrove Gunung Anyar pada batang <i>A. alba</i> sebesar 1,365 ppm - Kadar Pb di kawasan mangrove Kedawang pada batang <i>A. alba</i> sebesar 0,72 ppm | Baedowi (2013) |

| No. | Jenis Logam Berat | Lokasi | Hasil | Sumber |
|-----|---|---|--|----------------------|
| 3. | Kandungan logam berat (Pb) dan gambaran histologi pada akar dan buah mangrove <i>Avicennia alba</i> | Kawasan Mangrove Gunung Anyar, Surabaya dan Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Pasuruan | <ul style="list-style-type: none"> - Kadar Pb air di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 0,28 – 0,37 ppm - Kadar Pb air di kawasan mangrove Kedawang berkisar 0,12 – 0,17 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 10,72 – 12,04 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Kedawang berkisar 2,08 – 3,73 ppm - Kadar Pb pada akar <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 3,74 – 5,45 ppm - Kadar Pb pada akar <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 1,85 – 3,29 ppm - Kadar Pb pada buah <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 0,34 – 0,55 ppm - Kadar Pb pada buah <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 0,16 – 0,34 ppm | Lestyaningrum (2013) |
| 4. | Kandungan logam berat (Pb) pada akar dan daun mangrove <i>Avicennia alba</i> | Kawasan Mangrove Gunung Anyar, Surabaya dan Desa Kedawang, Kecamatan Nguling Pasuruan | <ul style="list-style-type: none"> - Kadar Pb air di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 0,28 – 0,37 ppm - Kadar Pb air di kawasan mangrove Kedawang berkisar 0,12 – 0,17 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 10,72 – 12,04 ppm - Kadar Pb sedimen di kawasan mangrove Kedawang berkisar 2,08 – 3,73 ppm - Kadar Pb pada akar nafas <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 2,02 – 3,09 ppm | Salsabela (2013) |

| | | |
|--|--|--|
| | | - Kadar Pb pada akar nafas <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Kedawang berkisar 1,06 – 2,22 ppm |
|--|--|--|

| No. | Jenis Logam Berat | Lokasi | Hasil | Sumber |
|-----|-------------------|--------|--|--------|
| | | | <ul style="list-style-type: none"> - Kadar Pb pada ujung <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 1,72 – 2,35 ppm - Kadar Pb pada ujung <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Kedawang berkisar 0,78 – 1,62 ppm - Kadar Pb pada akar total <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Gunung Anyar berkisar 3,74 – 5,44 ppm - Kadar Pb pada akar total <i>A.alba</i> di kawasan mangrove Kedawang berkisar 0,78 – 1,62 ppm - Kadar Pb di Gunung Anyar pada daun tua <i>A.alba</i> 0,71 – 0,98 ppm - Kadar Pb di Gunung Anyar pada daun sedang <i>A.alba</i> 0,49 -0,79 ppm - Kadar Pb di Gunung Anyar pada daun muda <i>A.alba</i> 0,31 -0,59 ppm - Kadar Pb di Kedawang pada daun tua <i>A.alba</i> 0,28 – 0,50 ppm - Kadar Pb di Kedawang pada daun sedang <i>A.alba</i> 0,15 – 0,28 ppm - Kadar Pb di Kedawang pada daun muda <i>A.alba</i> 0, 09 – 0, 22 ppm | |

| | | | | |
|----|--|--|---|-----------------|
| 5. | Kandungan logam berat (Pb) pada akar dan daun mangrove <i>Rhizophora macronata</i> | Desa Mlaten, Kecamatan Nguling, Pasuruan | <ul style="list-style-type: none"> - Kandungan logam berat Pb pada air di stasiun 1 rata-rata 0,124 ppm - Kandungan logam berat Pb pada air di stasiun 2 rata-rata 0,113 ppm - Kandungan logam berat Pb pada air di stasiun 3 rata-rata 0,142 ppm - Kandungan logam berat Pb pada sedimen di stasiun 1 rata-rata 3,54 ppm - Kandungan logam berat Pb pada sedimen di stasiun 2 rata-rata 4,50 ppm - Kandungan logam berat Pb pada sedimen di stasiun 3 rata-rata 3,10 ppm - Kandungan logam berat Pb pada akar di stasiun 1 rata-rata 2,24 ppm - Kandungan logam berat Pb pada akar di stasiun 2 rata-rata 3,54 ppm - Kandungan logam berat Pb pada akar di stasiun 3 rata-rata 2,11 ppm - Kandungan logam berat Pb pada daun di stasiun 1 rata-rata 0,45 ppm - Kandungan logam berat Pb pada daun di stasiun 2 rata-rata 0,62 ppm - Kandungan logam berat Pb pada daun di stasiun 3 rata-rata 0,28 ppm | Megawati (2014) |
|----|--|--|---|-----------------|

Tabel 2. Hasil- hasil penelitian tentang *Heat Shock Protein (HSP70)*

| No. | Spesies | Perlakuan | Organ | Hasil | Sumber |
|-----|---------------------------------------|--|--------|--|--------------------|
| 1. | <i>Mugil cephalus</i> | Pada perairan yang terpapar logam berat dan polutan organik | Hati | <ul style="list-style-type: none"> - Pada lokasi yang tidak tercemar (Kovalam) menunjukkan bahwa ekspresi HSP70 menunjukkan defensif atau bertahan terhadap stres - Pada lokasi yang tercemar (Ennore) terjadi peningkatan stres nitratif, penghambatan mitokondria kompleks pernafasan, penurunan ATP / ADP rasio dan perubahan dalam tingkat antioksidan mengakibatkan meningkatkannya ekspresi mtHSP70 secara signifikan (30% lebih tinggi) | Padmini (2009) |
| 2. | <i>Sponges</i> | Pada perairan laut yang terkena polutan logam berat dan limbah kimiawi | | <ul style="list-style-type: none"> - Deteksi stres lingkungan pada tingkat molekuler dilakukan dengan mengamati ekspresi protein indikator stres yaitu <i>Heat Shock Protein (HSP) 70</i> sebagai <i>biomarker</i> pada spons. - Dalam tekanan stres, protein HSP terlibat dalam pelipatan polipeptida proses translokasi protein dan denaturasi protein serta berperan dalam meminimalisasi terbentuknya agregasi protein | Dewi (2010) |
| 3. | Ikan Bandeng (<i>Chanos chanos</i>) | Ikan pada perairan payau di Pulau Kaattuppalli, India yang tercemar logam berat (Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Cd) | Insang | <ul style="list-style-type: none"> - Pada lokasi penelitian yang kurang tercemar menunjukkan ekspresi HSP70 yang rendah dan kondisi lamella primer dan sekunder terlihat normal serta banyak filamen serta lendir yang dihasilkan banyak mengandung vakuola - Pada lokasi penelitian yang tercemar muncul ekspresi HSP70 yang tinggi dan kondisi lamella primer dan sekunder terlihat rusak ruang interlamela terbukti diisi | Rajeshkumar (2013) |

| | | | | |
|--|--|-------------|---|---|
| | | | <p>dengan busa jaringan dan juga membentuk selubung atas lamellae di bagian distal dari lamellae sekunder yang mengarah ke lokal hyperplasia. Beragam perubahan seperti pembengkakan dan pembesaran lamella primer dan sekunder berisi lendir dalam jumlah besar yang mengandung butiran elektron padat di ruang antar yang melebar pada proliferasi sel epitel dan klorida</p> | |
| | | <p>Hati</p> | | <ul style="list-style-type: none"> - Pada lokasi penelitian yang kurang tercemar terjadi adanya Ekspresi HSP70 yang rendah dan morfologi organel terlihat secara umum meliputi aspek inti, butiran lipid yang normal dan endoplamic retikulum yang kasar - Terjadi ekspresi HSP70 yang tinggi pada lokasi yang tercemar dan menurunnya lipid besar yang muncul dengan penurunan organel seluler dan hepaticyete yang meningkat dan sejumlah krista besar (jenis mitokondria yang tersebar dalam sitoplasma) |

Lampiran 2. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian

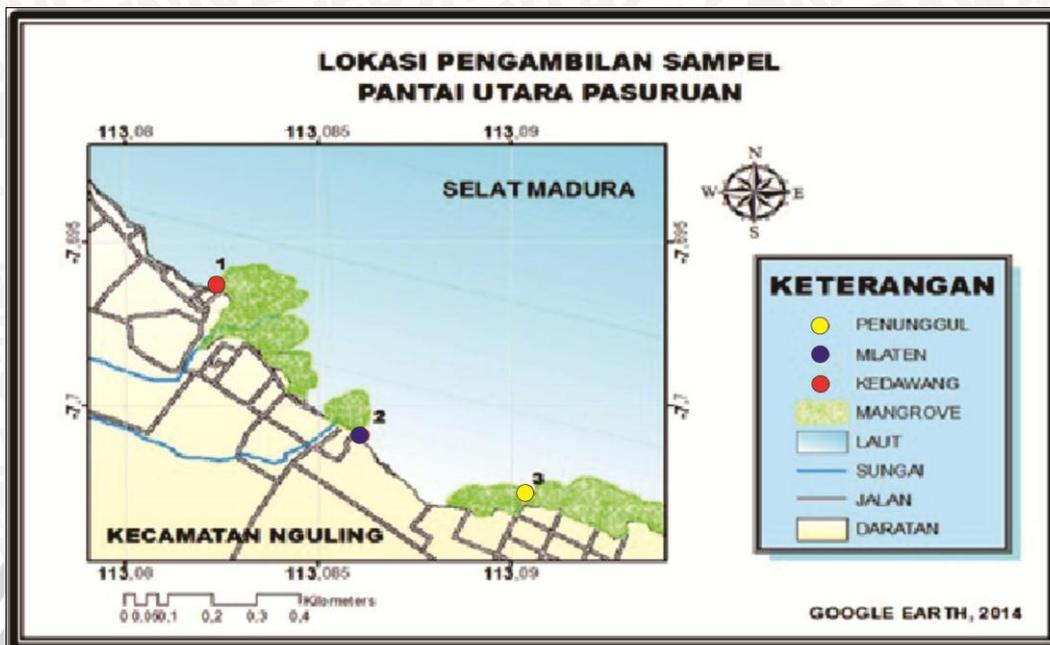
A. Alat

| No | Nama Alat | Fungsi Alat |
|----|----------------------|--|
| 1 | Termometer Hg | Untuk mengukur suhu perairan |
| 2 | DO meter | Untuk mengukur oksigen terlarut dalam perairan |
| 3 | Botol DO | Untuk mengambil sampel air yang akan diukur DO-nya |
| 4 | Tabung Reaksi | Sebagai wadah untuk memudahkan mengukur DO dengan DO-meter |
| 5 | Refraktometer | Untuk mengukur konsentrasi salinitas perairan |
| 6 | Pipet tetes | Untuk mengambil sampel air yang akan diukur |
| 7 | Kertas pH | Untuk mengukur tingkat derajat keasaman dari warna yang terlihat |
| 8 | Botol air mineral | Sebagai wadah air sampel TSS |
| 9 | Beaker glass | Wadah untuk menghomogenkan bahan |
| 10 | Gelas ukur | Untuk mengukur bahan dengan tepat |
| 11 | Oven | Untuk mengeringkan Kertas saring |
| 12 | Muffel | Pengkondisian kertas saring 550-552 °C |
| 13 | Sectio set | Sebagai alat untuk membedah keping rajungan |
| 14 | Penjepit | Alat bantu untuk memegang keping yang akan di bedah |
| 15 | Pisau | Untuk memotong bagian tubuh keping |
| 16 | Botol film | Sebagai tempat untuk meletakkan organ yang telah di bedah |
| 17 | Nampan | Sebagai wadah alat dan bahan |
| 18 | Timbangan Digital | Untuk menimbang berat organ yang di butuhkan |
| 19 | Mortal dan alu | Membantu menghancurkan organ untuk mendapat supernatannya |
| 20 | Wadah es | Sebagai alas meletakkan mortal |
| 21 | Eppendof | Sebagai tempat meletakkan supernatan |
| 22 | Vortex | Sebagai alat bantu menghomogenkan larutan |
| 23 | Pinset | Mempermudah mengambil/mencuci organ |
| 24 | Cawan Petri | Sebagai wadah saat organ dicuci dengan PBS |
| 25 | Gelas ukur | Untuk mengukur larutan yang di butuhkan |
| 26 | Tabung reaksi | Wadah mencampurkan larutan yang di butuhkan |
| 27 | Mikro pipet | Alat untuk mengambil larutan skala kecil |
| 28 | Magnetik stirrer | Untuk mengaduk larutan dengan efisien agar cepat homogen |
| 29 | Nano Drop | Alat untuk melihat konsentrasi protein organ |
| 30 | Chamber | Sebagai tempat yang digunakan saat SDS-Page |
| 31 | Scanner dan Komputer | Untuk memperoleh hasil dalam bentuk gambar |

B. Bahan

| NO | Nama Bahan | Fungsi Bahan |
|----|--|---|
| 1 | Tissue | Membersihkan alat yang telah digunakan |
| 2 | Aquadest | Mengkalibrasi alat yang digunakan |
| 3 | Kertas Label | Memberi tanda tiap lokasi penelitian |
| 4 | Kertas Whatmann | Sebagai penyaring bahan organik yang akan di oven |
| 5 | Air | Untuk mencuci keping serta alat yang digunakan |
| 6 | Es | Untuk menjaga kondisi organ agar tetap segar |
| 7 | Keping Rajungan | Sebagai objek yang diambil insangnya |
| 8 | Insang Rajungan | Sebagai sampel yang akan di Isolasi proteinnya |
| 9 | PBS 7,4--1 liter (NaCl pH 8 gr; Na ₂ HPO ₄ 1,44gr; KH ₂ PO ₄ 0,24 gr; KCL 0,2 gr; Aquades 1 liter | Sebagai pembersih organ yang akan di isolasi proteinnya |
| 10 | Aluminium Foil | Sebagai wadah penimbangan bahan larutan yang di butuhkan |
| 11 | Buffer Ekstrak (3,941 gr Tris HCl pH 8; 1,8612 gr | Sebagai larutan penyangga saat isolasi protein dan blanko |
| 12 | Supernatant | Sebagai objek yang diukur konsentasi proteinnya |
| 13 | Stacking gel 5% (Akrilamida 30%; Tris HCl 1.5 M pH6.8; dH ₂ O; Sodium Dodecyl Sulfate 10%; Tetra ethylene diamine; Ammonium Persulfat 10% | Sebagai bahan membuat gel pada proses SDS-Page |
| 14 | Marker | Sebagai acuan untuk mengetahui ukuran BM |
| 15 | Running buffer | Memisahkan protein dengan bantuan arus listrik |
| 16 | Anti-rabbit | Sebagai antibodi sekunder |
| 17 | Larutan transfer ben | Larutan untuk membantu mentransfer protein ke membrane |
| 18 | Larutan TBS | Larutan yang digunakan dalam proses WB untuk mencairkan gel agar bisa di berikan antibodi |
| 19 | PBS | Untuk mencuci gel selama WB berlangsung |

Lampiran 3. Denah Lokasi Pengambilan Sampel



Gambar 1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel (Dok. Google Earth)



Gambar 2. Zoom Out Peta Lokasi Pengambilan Sampel (Dok. Google Earth)

Lampiran 4. Data Hasil Pengukuran Logam Berat (Pb) dan Analisa Kualitas Air

A. Tabel hasil pengukuran logam berat (Pb)

| No. | Sampel | Lokasi | Hasil | Rata-rata | Standar Deviasi | Satuan |
|-----|---------|-----------|----------------------|-----------|-----------------|--------|
| 1 | Air | Kedawang | 0,120 | 0,126 | 0,005 | ppm |
| | | | 0,130 ^(a) | | | |
| | | | 0,129 ^(b) | | | |
| | | Mlaten | 0,124 | 0,140 | 0,014 | ppm |
| | | | 0,150 ^(c) | | | |
| | | | 0,145 ^(c) | | | |
| | | Penunggul | 0,116 | 0,10 | 0,009 | ppm |
| | | | 0,113 ^(c) | | | |
| | | | 0,130 ^(c) | | | |
| 2 | Sedimen | Kedawang | 3,72 | 3,147 | 0,49 | ppm |
| | | | 2,81 ^(a) | | | |
| | | | 2,91 ^(b) | | | |
| | | Mlaten | 3,87 | 3,713 | 0,14 | Ppm |
| | | | 3,67 ^(c) | | | |
| | | | 3,60 ^(c) | | | |
| | | Penunggul | 3,613 | 3,264 | 0,30 | ppm |
| | | | 3,1 ^(c) | | | |
| | | | 3,08 ^(c) | | | |
| 3 | Insang | Kedawang | 0,124 | - | - | ppm |
| | | Mlaten | 0,165 | - | - | ppm |
| | | Penunggul | 0,103 | - | - | ppm |

Keterangan:

- Data sekunder diambil dari hasil penelitian skripsi sebelumnya yaitu Salsabela, (2013).
- Data sekunder diambil dari hasil penelitian skripsi sebelumnya yaitu Baedowi, (2013).
- Data sekunder diambil dari hasil penelitian skripsi sebelumnya yaitu Megawati, (2013).

Syarat penggunaan data sekunder harus pada lokasi dan metode yang sama.

B. Tabel hasil analisa kualitas air

| No. | Parameter | Lokasi | Hasil | Rata-rata | Standar Deviasi | Satuan |
|-----|-----------|-----------|-------|-----------|-----------------|--------|
| 1 | Suhu | Kedawang | 29 | 31,67 | 2,517 | °C |
| | | | 34 | | | |
| | | | 32 | | | |
| | | Mlaten | 28 | 31,33 | 3,055 | °C |
| | | | 34 | | | |
| | | | 32 | | | |
| | | Penunggul | 31 | 29,67 | 1,155 | °C |
| | | | 29 | | | |
| | | | 29 | | | |
| 2 | pH | Kedawang | 9 | 8,33 | 0,577 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 8 | | | |
| | | Mlaten | 8 | 8,33 | 0,577 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 9 | | | |
| | | Penunggul | 8 | 8 | 0 | - |
| | | | 8 | | | |
| | | | 8 | | | |
| 3 | Salinitas | Kedawang | 25 | 25,33 | 0,577 | ppt |
| | | | 26 | | | |
| | | | 25 | | | |
| | | Mlaten | 10 | 11,67 | 2,887 | ppt |
| | | | 10 | | | |
| | | | 15 | | | |
| | | Penunggul | 25 | 25 | 1 | ppt |
| | | | 26 | | | |
| | | | 24 | | | |
| 4 | DO | Kedawang | 5,33 | 5,177 | 0,157 | ppm |
| | | | 5 | | | |
| | | | 5,23 | | | |
| | | Mlaten | 3,5 | 4,2 | 0,755 | ppm |
| | | | 4,1 | | | |
| | | | 5 | | | |
| | | Penunggul | 5 | 5 | 0,329 | ppm |
| | | | 5,23 | | | |
| | | | 5,65 | | | |
| 5 | TSS | Kedawang | 77,8 | 57,1 | 17,95 | ppm |
| | | | 45,8 | | | |
| | | | 47,7 | | | |
| | | Mlaten | 44,6 | 44,23 | 9,75 | ppm |
| | | | 34,4 | | | |
| | | | 53,8 | | | |
| | | Penunggul | 38,5 | 41,37 | 4,28 | ppm |
| | | | 39,3 | | | |
| | | | 46,3 | | | |

Lampiran 5. Perhitungan Protein untuk Elektroforesis

1. KB 1: $7,06 \times = 2,19 \times 25 \mu\text{l}$

$$x = 54,75 / 7,06$$

$$x = 7,75$$

Protein yang dibutuhkan $7,75 \mu\text{l}$

Buffer yang dibutuhkan $25 \mu\text{l} - 7,75 = 17,25 \mu\text{l}$

2. KB 1: $2,37 \times = 2,19 \times 25 \mu\text{l}$

$$x = 54,75 / 2,37$$

$$x = 23,10$$

Protein yang dibutuhkan $23,10 \mu\text{l}$

Buffer yang dibutuhkan $25 \mu\text{l} - 23,10 = 1,90 \mu\text{l}$

3. KB 1: $2,19 \times = 2,19 \times 25 \mu\text{l}$

$$x = 54,75 / 2,19$$

$$x = 25$$

Protein yang dibutuhkan $25 \mu\text{l}$

*Setiap sumuran gel elektroforesis diisi sampel sebanyak $25 \mu\text{l}$.



Lampiran 6. Dokumentasi selama proses penelitian.



Pengukuran salinitas



Pembuatan larutan



Penggunaan alat tangkap bubu



Hasil tangkapan rajungan



Menimbang insang rajungan



Supernatan hasil isolasi



Sentrifugasi sampel isolasi insang keping bakau



Pengukuran kadar protein dengan *nanodrop*



Pipeting Sampel



Proses Elektroforesis



Proses Staning



Transfer membran PVDF



Antibodi primer (Rabbit anti-HSP70)