

**EKSPRESI METALLOTHIONEIN (MT) TERHADAP LOGAM BERAT Pb  
(TIMBAL) PADA KUPANG (*Corbula faba*) DENGAN METODE  
IMUNOHISTOKIMIA (IHK)**

**LAPORAN SKRIPSI  
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

Oleh :  
**FATHIN ADILLA**  
**NIM. 125080101111034**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**EKSPRESI METALLOTHIONEIN (MT) TERHADAP LOGAM BERAT Pb  
(TIMBAL) PADA KUPANG (*Corbula faba*) DENGAN METODE  
IMUNOHISTOKIMIA (IHK)**

**LAPORAN SKRIPSI  
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
Di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**FATHIN ADILLA  
NIM. 125080101111034**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

LEMBAR PENGESAHAN

EKSPRESI METALLOTHIONEIN (MT) TERHADAP LOGAM BERAT Pb  
(TIMBAL) PADA KUPANG (*Corbula faba*) DENGAN METODE  
IMUNOHISTOKIMIA (IHK)

Oleh:

FATHIN ADILLA

NIM. 125080101111034

Telah dipertahankan di depan penguji

Pada tanggal 22 Juli 2016

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

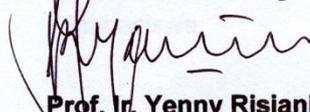


Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS

NIP. 19570704 198403 2 001

Tanggal: 04 AUG 2016

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I

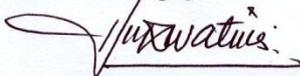


Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D

NIP. 19610523 198703 2 003

Tanggal: 04 AUG 2016

Dosen Penguji II

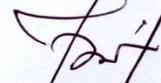


Ir. Herwati Umi S., MS

NIP. 19520402 198003 2 001

Tanggal: 04 AUG 2016

Dosen Pembimbing II



Dr. Yuni Kilawati, S.Pi., M.Si

NIP. 19730702 200501 2 001

Tanggal: 04 AUG 2016

Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal: 04 AUG 2016



## 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.

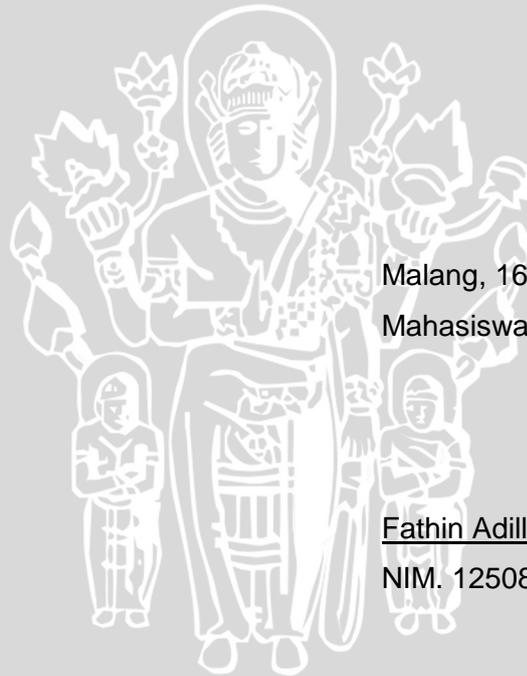
Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia

Malang, 16 Februari 2016

Mahasiswa

Fathin Adilla

NIM. 125080101111034



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah berperan serta dalam membantu kelancaran hingga penulisan laporan skripsi ini dapat terselesaikan.

Terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada :

1. Do'a serta dorongan semangat dari ibuku tersayang Titik Urifah, kakakku tercinta Fariska Hurun In yang terus memberi semangat, do'a dari Mak (Samiani) dan Bapak (Kasturi), Tante Wahyu Dafik Diana dan Tante Erva Handayani, adek-adekku Nadia Kusuma Suryanti dan Deandra Suryanto Putri serta Om Zurnalis S.E.
2. Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D dan Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si atas kesediaan waktunya untuk membimbing penulis hingga terselesaikan laporan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Ir. Endang Yuli H., MS dan Ir. Herwati Umi S., MS selaku dosen penguji
4. Bapak Ir.Mulyanto, M.Si selaku ketua program studi MSP.
5. Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS selaku ketua jurusan MSP.
6. Prof.Dr.Ir Diana Arfiati, MS selaku dekan fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan.
7. Sahabatku 7 ikan: Fiing Resti S.P (Unni), Duwi Widayati (Duwi), Tsalitsatus Faiz F. (Icha), Diklawati Jatayu (Dikla), Suci Purwati A. (Icus) dan Putri Ramadani (Putri), serta Satrio Sandy P. (Rio) Dan Novian Ade S (Novian).  
Tim Kupang Lovers: Lovi Ega A., Dewi Arista Anom Sari dan Ika windy Kusuma W. Teman-teman saya di Program Studi MSP'12 yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu dan program studi lain atas bantuannya selama

ini. Serta semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah berperan dalam terselesaikannya laporan ini.

Malang, 16 Februari 2016

Penulis



## RINGKASAN

**FATHIN ADILLA.** Ekspresi Metallothionein (MT) terhadap Logam Berat Pb (Timbal) pada Kupang (*Corbula faba*) dengan Metode Imunohistokimia (IHK) (dibawah bimbingan **Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D dan Dr. Yuni Kilawati, S.Pi, M.Si**)

---

Analisis logam atau kandungan senyawa kimia tertentu yang terdapat dalam hewan kupang dapat dijadikan sebagai biomonitoring terhadap pencemaran logam berat, yang salah satunya yakni logam berat Pb. Kupang (*Corbula faba*) dapat dijadikan agen biomonitoring karena mempunyai sifat *filter feeder* non selektif sehingga kandungan logam berat yang relatif tinggi dapat ditemukan dalam tubuhnya karena adanya proses akumulasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ekspresi Metallothionein (MT) terhadap logam berat Pb (Timbal) pada kupang dengan metode Imunohistokimia (IHK). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari-Maret 2016 di tiga muara sungai yakni muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan.

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tubuh dari kupang. Penelitian ini menggunakan metode survei dengan penjelasan deskriptif melalui penentuan 3 muara sungai yaitu pada stasiun penelitian 1 di muara sungai Ketingan, Sidoarjo, stasiun penelitian 2 di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan stasiun penelitian 3 di muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, dengan pengulangan sampel sebanyak 3 kali pada tiap stasiun. Setelah pengambilan dari lokasi sampling, kupang dibuka, dianalisis kadar logam berat Pb pada air, kupang dan sedimen menggunakan metode AAS serta analisis densitas dan intensitas metallothionein menggunakan teknik Imunohistokimia dan dilakukan pengamatan kualitas air yang terdiri dari suhu, derajat kesamaan (pH), salinitas dan oksigen terlarut (DO).

Rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb di air terdapat pada stasiun 2 yaitu di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan yakni sebesar 0,1081 ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di stasiun 3 yaitu di muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan yakni sebesar 0,1042 ppm. Untuk sedimen rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb di sedimen terdapat pada stasiun 1 yaitu di muara sungai Ketingan, Sidoarjo yakni sebesar 0,1887 ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di stasiun 2 yaitu di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan yakni sebesar 0,1141 ppm. Sedangkan untuk hasil logam berat pada tubuh kupang rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb kupang terdapat pada stasiun 1 yaitu di muara sungai Ketingan, Sidoarjo yakni sebesar 0,2216 ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di stasiun 2 yaitu di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan yakni sebesar 0,1 ppm.

Hasil penelitian, ditemukan bahwa nilai densitas metallothionein pada Kupang. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa nilai densitas metallothionein pada stasiun 1 berkisar antara  $22,37 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  –  $24,89 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-

rata yaitu sebesar  $23,57 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$ . Pada stasiun 2 nilai densitas metallothionein berkisar antara  $19,12 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2 - 25,35 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-rata yaitu sebesar  $21,70 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$ . Pada stasiun 3 nilai densitas metallothionein berkisar antara  $19,08 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2 - 25,03 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-rata yaitu sebesar  $22,11 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$ . Hasil rata-rata densitas metallothionein sesuai dengan respon kupang terhadap penyerapan logam berat menunjukkan kadar logam berat dalam tubuh kupang pada stasiun 1 lebih tinggi jika dibandingkan dengan stasiun 2 dan stasiun 3. Intensitas metallothionein yang ditemukan tertinggi pada stasiun 1 merupakan daerah selain sebagai tempat penangkapan kupang juga merupakan daerah pembuangan limbah- limbah dari pabrik di Sidoarjo sedangkan intensitas metallothionein terendah pada stasiun 2 yang hanya digunakan sebagai daerah penangkapan kupang saja di wilayah Kraton, Pasuruan. Intensitas Metallothionein pada stasiun 1 berkisar antara 29732 pixel – 31880 pixel, stasiun 2 berkisar antara pixel 24432 pixel – 30074 pixel dan pada stasiun 3 berkisar antara 26293 pixel – 29639 pixel.. Intensitas warna metallothionein pada setiap stasiun berbeda-beda tergantung pada tingkat penyerapan logam berat oleh tubuh kupang. Hasil analisis kualitas air pada 3 muara sungai masih berada dalam kisaran yang baik untuk kehidupan biota air seperti kupang yaitu suhu didapatkan kisaran nilai  $28^{\circ}\text{C} - 30^{\circ}\text{C}$ , nilai pH berkisar antara 8-9, nilai salinitas berkisar antara 20-26 ppt, namun untuk nilai DO sangat rendah yakni hanya berkisar antara 0,4-1,5 mg/L

Hasil analisis regresi linear sederhana antara hubungan logam berat Pb pada tubuh kupang dengan densitas metallothionein didapatkan hasil koefisien korelasi menunjukkan Hasil analisis regresi densitas metallothionein dengan logam berat Pb menunjukkan nilai  $R^2$  sebesar 0,734, dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,857. Dilihat dari nilai koefisien korelasi ( $r$ ), maka dapat dikatakan bahwa secara statistik tingkat hubungan densitas metallothionein dengan kadar logam berat Pb pada tubuh kupang tergolong sangat kuat yaitu sebesar 0,857. Hasil intensitas metallothionein menunjukkan nilai  $R^2$  sebesar 0,809, dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,89. Selain itu, dengan uji BNT 5% didapatkan bahwa nilai densitas dan intensitas rata-rata metallothionein di muara sungai Ketingan dianggap tidak berbeda nyata dengan muara sungai Bangil dan muara sungai Kraton karena nilai signifikannya pada uji ANOVA  $>0,05$ .

Berdasarkan hasil penelitian di tiga daerah muara sungai di atas, kadar logam berat Pb memiliki korelasi yang sangat kuat terhadap Metallothionein. Oleh karena itu, disarankan untuk menggunakan Metallothionein dalam kupang sebagai biomarker terhadap pencemaran logam berat Pb. Selain itu, walaupun nilai logam berat Pb di kupang dan sedimen masih di bawah ambang batas yang telah ditetapkan namun hasil analisis logam berat di air sangat tinggi, sehingga perlu dilakukan pengawasan lebih lanjut dan pengendalian terhadap pencemaran logam berat di perairan muara sungai tersebut.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis berhasil menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Ekspresi Metallothionein (MT) terhadap Logam Berat Pb (Timbal) pada Kupang (*Corbula faba*) dengan Metode Imunohistokimia (IHK)”. Tujuan dibuatnya Laporan Skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Laporan Skripsi ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi gambaran umum ekspresi Metallothionein (MT) pada Kupang (*Corbula faba*) dan juga kandungan logam berat Pb pada tubuh Kupang (*Corbula faba*), air dan sedimen. Diharapkan Laporan Skripsi ini dapat memberikan informasi kepada kita semua.

Penulis menyadari bahwa Laporan Skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak yang bersifat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, 16 Februari 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN .....	vii
KATA PENGANTAR.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Kegunaan.....	5
1.5 Waktu dan Tempat.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Kupang.....	7
2.1.1 Klasifikasi Kupang.....	8
2.1.2 Siklus Hidup Kupang.....	8
2.1.3 Anatomi Kupang .....	9
2.1.4 Habitat Kupang .....	10
2.2 Logam Berat Pb (Timbal) .....	11
2.3 Metallothionein .....	13
2.4 Mekanisme Penyerapan Logam Berat oleh Kupang.....	15
2.5 Pengikatan Logam Berat oleh Metallothionein (MT) .....	16
2.6 Pengamatan Metallothionein dengan Metode IHK (Imunohistokimia).....	17
2.7 Kondisi Fisika dan Kimia Perairan .....	18
2.7.1 Suhu .....	19
2.7.2 pH .....	20
2.7.3 Salinitas .....	20
2.7.4 Oksigen Terlarut (DO/Dissolved Oxygen) .....	21
2.8 Sedimen.....	22
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	24
3.1 Materi Penelitian .....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.3 Metode Penelitian.....	24

3.4 Penentuan Stasiun .....	26
3.5 Prosedur Penelitian .....	26
3.5.1 Pengambilan Sampel .....	26
3.5.2 Preparasi Sampel .....	26
3.5.3 Pembuatan Irisan Jaringan .....	27
3.5.4 Pewarnaan Imunohistokimia .....	29
3.5.5 Scan dengan Mikroskop Dot slide .....	30
3.6 Perhitungan Metallothionein .....	31
3.7 Analisis Data .....	32
3.8 Analisis Kualitas Air Pendukung .....	33
3.9 Analisis Logam Berat. ....	35
4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	37
4.1 Keadaan Umum Lokasi Peneltian .....	37
4.2 Deskripsi Lokasi Penelitian.....	39
4.2.1 Muara Sungai Ketingan di Daerah Sidoarjo .....	39
4.2.2 Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan .....	40
4.2.3 Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.....	41
4.3 Hasil Analisis Logam Berat Pb .....	42
4.3.1 Hasil Analisis Logam Berat Pb di Air .....	42
4.3.2 Hasil Analisis Logam Berat Pb di Sedimen .....	44
4.3.3 Hasil Analisis Logam Berat di Tubuh Kupang.....	46
4.4 Ekspresi Metallothionein pada Tubuh Kupang dengan Metode Imunohistokimia.....	47
4.5 Hasil Analisis Densitas dan Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang .....	52
4.5.1 Hasil Analisis Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang .....	52
4.5.2 Hasil Analisis Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang.....	55
4.6 Analisis Hubungan Logam Berat Pb pada Tubuh Kupang dengan Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang. ....	59
4.7 Analisis Hubungan Logam Berat Pb pada Tubuh Kupang dengan Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang. ....	61
4.8 Analisis Parameter Kualitas Air.....	62
4.8.1 Suhu .....	62
4.8.2 Derajat Keasaman (pH) .....	63
4.8.3 Salinitas .....	64
4.8.4 Oksigen Terlarut ( <i>Dissolved Oxygen/DO</i> ) .....	65
5. KESIMPULAN DAN SARAN .....	67
5.1. Kesimpulan .....	67
5.2 Saran .....	68
DAFTAR PUSTAKA.....	69
LAMPIRAN .....	76

DAFTAR TABEL

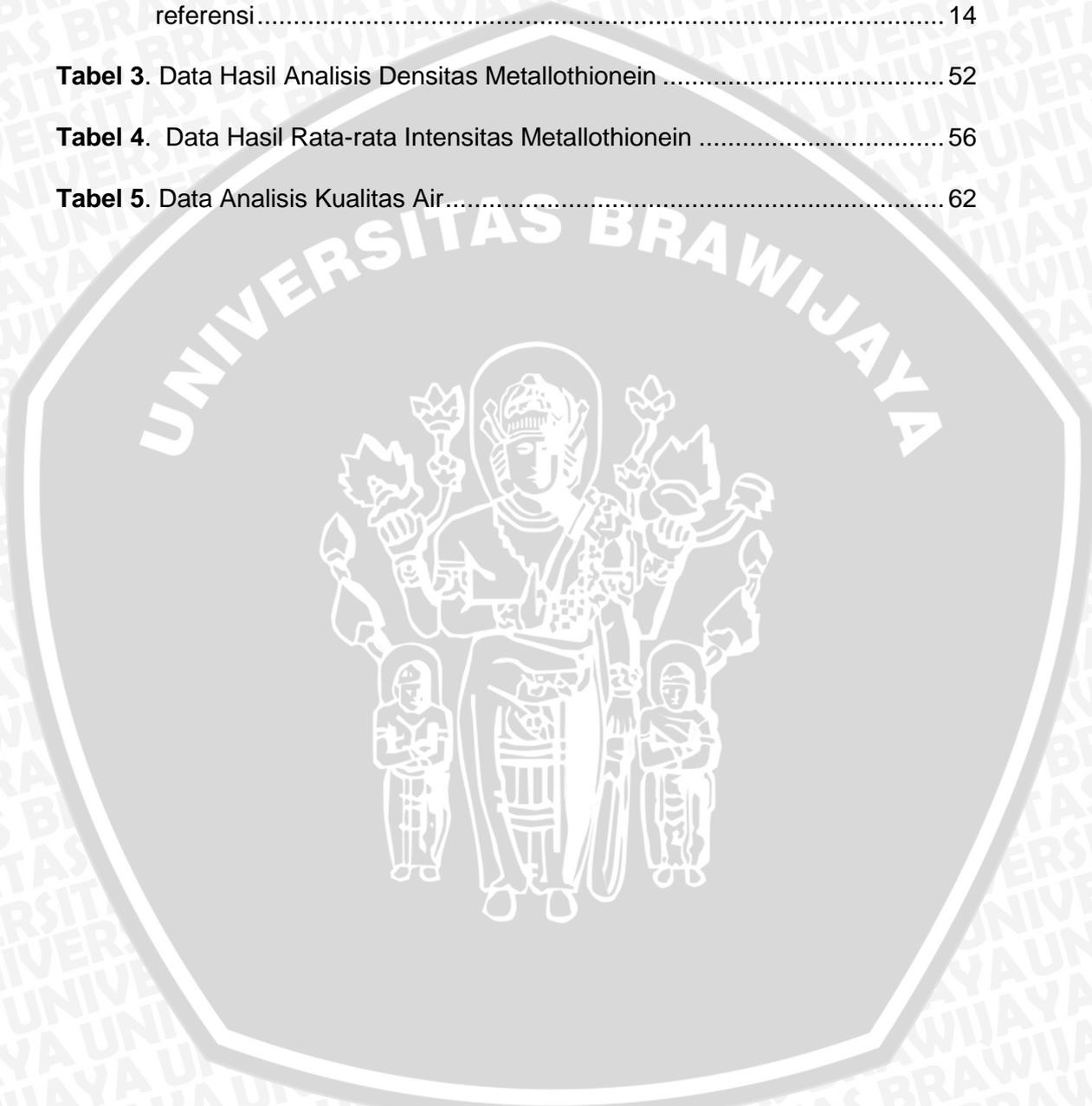
**Tabel 1.** Kandungan Gizi Daging Kupang Putih (Corbula faba) ..... 8

**Tabel 2.** Hubungan antara logam berat dan MT yang diambil dari berbagai referensi..... 14

**Tabel 3.** Data Hasil Analisis Densitas Metallothionein ..... 52

**Tabel 4.** Data Hasil Rata-rata Intensitas Metallothionein ..... 56

**Tabel 5.** Data Analisis Kualitas Air..... 62



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1.</b> Bagan Alur Perumusan Masalah .....	4
<b>Gambar 2.</b> Corbula faba .....	8
<b>Gambar 3.</b> Muara Sungai Ketingan di Daerah Sidoarjo .....	40
<b>Gambar 4.</b> Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan .....	41
<b>Gambar 5.</b> Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.....	42
<b>Gambar 6.</b> Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Air.....	43
<b>Gambar 7.</b> Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Sedimen.....	44
<b>Gambar 8.</b> Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Kupang.....	46
<b>Gambar 9.</b> Ekspresi Metallothionein (A) Positif Kuat, (B) Positif Sedang, (C).....	48
<b>Gambar 10.</b> Ekspresi Metallothionein (A) Muara Sungai Ketingan, Sidoarjo (B) Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan, dan (C) Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.....	49
<b>Gambar 11.</b> Rata-rata Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang dengan Uji Anova dengan Uji Lanjutan Uji Tukey.....	53
<b>Gambar 12.</b> Intensitas Metallothionein (A) Muara Sungai Ketingan, Sidoarjo (B) Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan, dan (C) Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.....	55
<b>Gambar 13.</b> Rata-rata Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang dengan Uji Anova dengan Uji Lanjutan Uji Tukey.....	58
<b>Gambar 14.</b> Grafik Hubungan Densitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb di tiga muara sungai. ....	59
<b>Gambar 15.</b> Grafik hubungan Intensitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb di tiga muara sungai .....	61

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Alat dan Bahan Penelitian .....	76
<b>Lampiran 2.</b> Peta Lokasi Penelitian .....	78
<b>Lampiran 3.</b> Data Logam Berat pada Air, Sedimen dan Tubuh Kupang .....	79
<b>Lampiran 4.</b> Jumlah dan Densitas Metallothionein .....	81
<b>Lampiran 5.</b> Data Intensitas Metallothionein pada Masing-masing Stasiun .....	82
<b>Lampiran 6.</b> Gambar Densitas dan Intensitas Metallothionein pada tiap Stasiun .....	83
<b>Lampiran 7.</b> Data Pengukuran Kualitas Air .....	86
<b>Lampiran 8.</b> Hasil Regresi Densitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb pada Kupang Menggunakan SPSS. ....	87
<b>Lampiran 9.</b> Hasil Regresi Intensitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb pada Kupang Menggunakan SPSS. ....	88
<b>Lampiran 10.</b> Hasil Uji BNT 5% Densitas Metallothionein dengan Menggunakan SPSS.....	89
<b>Lampiran 11.</b> Hasil Uji BNT 5% Intensitas Metallothionein dengan Menggunakan SPSS.....	91
<b>Lampiran 12.</b> Dokumentasi Kegiatan Penelitian .....	93

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pencemaran pada kawasan pesisir pantai dapat terjadi baik secara alami maupun yang disebabkan oleh aktivitas manusia seperti eksplorasi, eksplotasi, industri, pertanian, maupun perhubungan. Erosi pada daerah pesisir, deposit mineral, kebakaran hutan, dan aktivitas vulkanik merupakan penyebab alami hadirnya bahan pencemar lingkungan (Chandra, 1988). Menurut Rompas (1990), bahwa beberapa substansi yang masuk ke dalam lingkungan perairan dapat berpengaruh negatif terhadap faktor biotik ekosistem yaitu perubahan struktur komunitas, kematian massal, resistensi terhadap substansi kimia oleh organisme serta perubahan kualitas produktivitas perairan tersebut.

Cemaran menurut Saeni (1989) adalah zat yang mempunyai pengaruh menurunkan kualitas lingkungan atau menurunkan nilai lingkungan itu. Sedangkan kontaminan adalah zat yang menyebabkan perubahan dari susunan normal dari suatu lingkungan. Kontaminan tidak digolongkan sebagai cemaran bila tidak menimbulkan penurunan kualitas lingkungan. Pencemaran adalah peristiwa adanya penambahan bermacam-macam bahan sebagai hasil dari aktivitas manusia ke dalam lingkungan yang biasanya memberikan pengaruh berbahaya terhadap lingkungan itu. Salah satu cemaran yang biasanya masuk ke perairan yaitu logam berat.

Logam berat sendiri adalah unsur logam yang mempunyai massa jenis lebih besar dari  $5 \text{ g/cm}^3$ , antara lain Cd, Hg, Pb, Zn, dan Ni. Logam berat Cd, Pb, dan Hg dinamakan sebagai logam non esensial dan pada tingkat tertentu menjadi beracun bagi makhluk hidup (Subowo *et al.*, 1999). Timbal (Pb) merupakan salah satu logam berat yang sangat berbahaya bagi makhluk hidup karena bersifat karsinogenik. Menurut Palar (1994), Pb dapat mencemari udara ,



air, tanah, tumbuhan, hewan bahkan manusia. Logam Pb terdapat di perairan baik secara alamiah maupun sebagai dampak dari tindakan manusia. Logam ini masuk ke perairan melalui pengkristalan Pb di udara dengan bantuan air hujan. Selain itu, proses korofikasi dari batuan mineral juga merupakan salah satu jalur masuknya sumber Pb ke perairan. Untuk mengetahui berapa kandungan logam berat yang telah mencemari perairan pantai dapat dilakukan dengan melihat kandungan Metallothionenin (MT) yang ada pada tubuh organisme yang hidup di perairan tersebut, salah satunya yaitu kupang.

Kupang putih (*Corbula faba* Hinds) merupakan salah satu jenis bahan makanan yang banyak dikonsumsi masyarakat yang berasal dari binatang yang hidup di laut. Cara hidup kupang bergerombol di dasar laut yang bercampur dengan lumpur dan pasir (Karimah *et al.*, 2002). Seperti yang diketahui laut merupakan tempat bermuaranya sungai yang nantinya akan menjadi tempat berkumpulnya zat-zat pencemar yang sebagian besar berasal dari limbah hasil pabrik ataupun rumah tangga yang dibawa oleh aliran sungai. Menurut BSN (Badan Standarisasi Nasional) (2009), batas maksimum kandungan logam berat Pb dalam kekerangan (bivalve), moluska dan teripang yang boleh dikonsumsi adalah 1,5 mg/kg. Berdasarkan penelitian sebelumnya, kupang banyak mengandung logam berat Pb (timbal). Penelitian Karimah (2002) menemukan bahwa logam berat timbal (Pb) yang terdapat dalam daging kupang yang diperoleh di wilayah Kraton (Pasuruan) adalah 2,950 ppm. Rata-rata logam berat Pb dalam kupang awung (*Mytilus viridis*) yang berasal dari pantai Kenjeran adalah 1,813 ppm (Bajuri, 2003). Kadar timbal kupang merah dari wilayah Balongdowo, Sidoarjo adalah 4,014 ppm (Irawan, 2012). Batas maksimum cemaran logam berat dalam makanan menggunakan satuan *part per million* (ppm atau mg/kg) yang dihitung terhadap produk siap konsumsi. Cemaran

logam berat yang dibatasi kandungannya meliputi: arsen, kadmium, merkuri, timah, dan timbal.

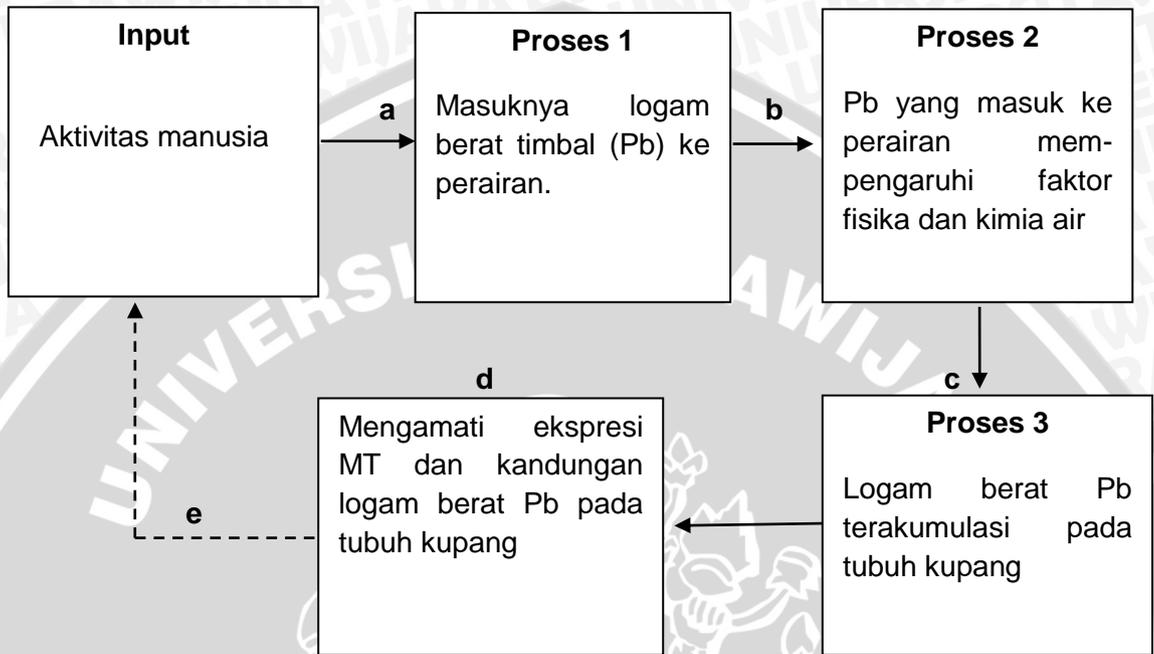
MT merupakan protein dengan berat molekul rendah dan memiliki sifat utama kandungan protein 26-33%, asam amino *cysteine* (Cys) namun tidak mengandung asam amino aromatik atau *histidin* (Frankenne *et al*, 1980). Metallothionein juga digunakan sebagai indikator pencemaran karena kepekaan dan keakuratannya. Hal ini didasarkan bahwa dimana logam-logam dapat tersekap di dalam jaringan tubuh organisme yang dimungkinkan karena adanya protein tersebut. Metallothionein merupakan protein pengikat logam (*metal binding protein*) yang berfungsi dan berperan dalam proses pengikatan ataupun penyekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Anwari, 2009).

Untuk mengetahui ekspresi dari MT pada kupang dapat dilakukan dengan menggunakan metode Imunohistokimia (IHK). Menurut Ramos dan Vara (2005), Imunohistokimia merupakan suatu proses yang digunakan untuk mendeteksi antigen seperti protein, karbohidrat dan lain sebagainya pada sel dari jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antibodi yang berikatan dengan antigen pada jaringan. Oleh karena itu kupang yang habitat hidupnya tercemar logam berat dapat dijadikan sebagai indikator seberapa besar perairan tersebut telah tercemar logam berat Pb.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu logam berat Pb yang masuk ke perairan yang berada di tiga daerah yaitu muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan di daerah Kraton di Pasuruan, akibat dari aktivitas manusia seperti limbah pabrik dan aktivitas perikanan tangkap dapat mempengaruhi kualitas air pada perairan yang menyebabkan penurunan kualitas air, juga timbal (Pb) terakumulasi dan mengendap pada sedimen tempat hidup

dari kupang. Logam berat sendiri dapat mempengaruhi kandungan Metallothionein pada tubuh organisme yakni protein untuk mengikat logam. Adapun perumusan masalah pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Bagan Alur Perumusan Masalah

Keterangan:

- a. Aktivitas manusia seperti perikanan tangkap dan limbah pabrik dapat mempengaruhi kandungan logam berat seperti Pb yang masuk ke perairan dapat menyebabkan perubahan kualitas air.
- b. Masuknya Pb berpengaruh terhadap sifat fisika dan kimia air dan terakumulasi tubuh kupang
- c. Kandungan logam berat Pb yang masuk dan terakumulasi pada tubuh kupang.
- d. Pb yang masuk ke dalam tubuh kupang menyebabkan ekspresi Metallothionein (MT) pada tubuh organisme, yang berfungsi sebagai protein pengikat logam berat.

- e. Menganalisis kandungan Metallothionein yang terdapat pada tubuh kupang sebagai biomarker pencemaran logam berat Pb, diharapkan dapat dijadikan sebagai sumber informasi dalam upaya pengelolaan wilayah muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan Keraton di Pasuruan .

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar logam Pb pada kupang dengan metode Imunohistokimia (IHK) di tiga daerah muara sungai yaitu muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan di daerah Kraton di Pasuruan serta jumlah dari densitas dan intensitas metallothionein. Selain itu juga untuk mengetahui hubungan densitas dan intensitas kadar metallothionein (MT) pada tubuh kupang.

### **1.4 Kegunaan**

Kegunaan dari penelitian ini adalah memberikan informasi terkait ekspresi Metallothionein (MT) terhadap logam berat Pb pada kupang dengan metode Imunohistokimia (IHK) di tiga daerah yaitu muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan di daerah Kraton di Pasuruan, yang nantinya dapat digunakan sebagai bahan acuan untuk pengelolaan dan pemanfaatan perairan di tiga muara sungai tersebut, serta dapat mengendalikan aktivitas di sekitarnya dan juga sebagai bahan rujukan bagi ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang biomarker lingkungan dengan mengetahui kadar metallothionein pada tubuh kupang.

### **1.5 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - April 2016 di tiga daerah yaitu muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan

di daerah Kraton di Pasuruan. Analisis kandungan Metallothionein pada *Corbula faba* dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi (PA ) dan Fisiologi Anatomi (FAAL) Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, analisis kandungan logam berat Pb pada air, kupang dan sedimen dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kupang

Kupang tergolong jenis kekerangan (*bivalvia shell*) yang termasuk dalam kelas kelas *Pelecypoda* (berkaki kapak), bercangkang belah, dengan insang yang berlapis-lapis seperti jala. Kupang hidup secara bergerombol di dasar perairan khususnya di daerah muara sungai berlumpur yang relatif dekat dengan daratan pantai dan dipengaruhi oleh gerakan pasang-surut air laut (Subani *et al.* 1983). Ada dua jenis kupang yang biasa ditangkap oleh penangkap kupang yaitu kupang putih atau kupang beras (*Corbula faba*) dan kupang merah (*Musculita senhausia*). Kupang putih atau kupang beras yang bercangkang lebih keras hidup bebas di bagian bawah dasar perairan, sedangkan kupang merah yang ukurannya relatif lebih besar dari kupang putih dengan kulit lebih tipis hidup melekat di permukaan dasar perairan bersama bysusnya (Purwati, 2004).

Menurut Subani *et al.* (1983), kupang putih mempunyai kelebihan jika dibandingkan dengan kupang merah yaitu daya tahan hidupnya lebih panjang yaitu sekitar 24 jam, lebih cepat menyesuaikan diri pada udara bebas, sedikit bergerak dan jika mati kulitnya tidak membuka sehingga tidak begitu menimbulkan bau. Kupang putih sebagai salah satu sumber protein hewani mengandung protein yang cukup tinggi, dalam rangka menunjang peningkatan gizi masyarakat dari protein hewani, Kupang putih dapat digunakan sebagai salah satu alternatif sumber protein. Adapun kandungan gizi dari berat basah daging kupang putih dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

**Tabel 1.** Kandungan Gizi Daging Kupang Putih

Kandungan Gizi	Kupang Putih (%)
Air	72,96
Protein	9,054
Lemak	1,50
Abu	3,80

Sumber: Baswardono (1983).

### 2.1.1 Klasifikasi Kupang

Klasifikasi *Corbula faba* menurut Prayitno dan Susanto (2001), adalah sebagai berikut :

Filum	: Molusca
Kelas	: Bivalvia
Ordo	: Myoida
Famili	: Corbulidae
Genus	: Corbula
Spesies	: <i>Corbula faba</i> Hinds



**Gambar 2.** *Corbula faba*

### 2.1.2 Siklus Hidup Kupang

Kupang putih termasuk dalam golongan bivalvia yang hidupnya menetap di sedimen. Kupang bereproduksi dengan cara fertilisasi eksternal dimana pada kupang betina setiap bereproduksi mengeluarkan 137.000 sel telur di kolam air untuk dibuahi oleh sel sperma. Sel telur yang telah dibuahi biasanya akan

mengalami fase *planktonik* atau fase dimana larva kupang akan hidup melayang-layang selama 14-55 hari hingga akan memasuki fase perkembangan embrio dari larva itu sendiri. Ketika larva mengalami fase perkembangan maka akan menempel pada suatu substrat dimana larva tersebut akan berkembang menjadi kupang muda. Fase ini biasanya berlangsung selama 55 hari. Kupang biasanya melakukan masa reproduksinya pada bulan September-November atau saat musim panas. Kupang dewasa yang siap melakukan reproduksi biasanya berumur sekitar 9 bulan. Kupang memiliki masa hidup yang relatif pendek sekitar 2 tahun (Galil, 2006).

### 2.1.3 Anatomi Kupang

Kupang putih merupakan salah satu jenis kerang yang masuk dalam phylum molusca. Jenis kupang ini berbentuk cembung lateral dan mempunyai cangkang dengan dua belahan serta engsel dorsal yang menutup seluruh tubuh. Kupang memiliki bentuk kaki seperti kaki kapak sehingga disebut pelecypoda. Perbedaan kupang putih adalah tidak mempunyai bysus, yaitu alat yang berfungsi untuk menempel pada substrat, memiliki siphon dengan bentuk tampak jelas, cangkang menutup dengan tepi agak terbuka dan bentuknya agak lonjong (Subani *et al.*, 1983).

Menurut Ilyas (1972), kupang merah (*Musculita senhausian*) disebut kupang jawa, kupang tawon, atau kupang kawung, yang mempunyai bentuk agak memanjang, bercangkang atau mempunyai kulit tembus cahaya, berukuran panjang antara 11-18 mm atau lebar antara 5-8,8 mm. Sedangkan kupang putih (*Corbula faba*) sering disebut dengan kupang beras, bentuknya agak lonjong, bercangkang keras, mengandung zat kapur, dengan ukuran panjang antara 4-10 mm dan lebar 8-17 mm.

Menurut Kasmu'in (2002), kupang ini berwarna putih, terkadang kehitam-hitaman. Berbentuk agak bulat seperti kerang, tapi kulitnya halus. Kehidupan kupang jenis putih juga bergerombol tapi tidak berakar dan dalam jumlah banyak tampak seperti beras (namun agak lebih besar). Daging kupang putih dipergunakan untuk pakan udang windu, terkadang juga untuk kupang lontong dan lauk pauk.

#### 2.1.4 Habitat Kupang

Kupang putih merupakan salah satu jenis dari suku meso-desmatidae dan habitat hidupnya di ekosistem perairan laut atau estuari. Tempat-tempat tersebut umumnya berlumpur dan ombaknya kecil, tetapi terdapat cukup arus sehingga menunjang kelangsungan hidup kupang. Kedalaman air di daerah tersebut pada waktu pasang naik berkisar 1–1,5 m. Kupang putih memiliki panjang kulit 10–15 mm dan lebarnya 5–8 mm dengan warna kulit putih buram. Warna kulit kupang semakin buram dan terdapat belang hitam ketika umur kupang semakin tua (Prayitno dan Susanto, 2001).

Kupang biru-hitam banyak di dapat di pantai lautan Indo-Pasifik. Spesies yang dibudidayakan ini hidup dipertengahan daerah pasang pantai yang berbatu karang dan dalam estuari, melekat pada karang, reef, badan kapal, dan dianggap sebagai hewan yang jahat karena mengambil tempat tiram, larvanya sendiri suka tinggal di bagian bawah zona intertidal atau lebih dalam lagi, yang rindang dan tempat menempelnya tidak kuat. Kupang ini adalah filter feeder, makan bakteri, algae bersel satu dan bahan sisa. Siklus hidup serupa tiram-tiram ovipar (*Saccostrea* dan *Crassostrea*), bertelur bila temperatur lingkungan antara 12,5 – 19 °C, dan dapat mencapai dewasa setelah 15–18 bulan. Kecepatan tumbuh akan turun bila temperatur kurang dari 120 °C, atau jika terlalu padat populasinya, dan bila kekurangan makanan (Brotomidjoyo *et al.*, 1995).

Kupang putih hidup secara menyebar dan menancap pada lumpur sedalam lebih kurang 5 mm, dengan posisi menancap tegak pada bagian ujung cangkangnya yang berbentuk oval. Bila air surut dan suhu lingkungan menjadi dingin, kupang putih menancap lebih dalam pada lumpur, begitupula sebaliknya. Kupang putih lebih cepat menyesuaikan diri dengan lingkungan sekitarnya dibandingkan dengan kupang merah. Daya tahan hidup kupang putih di udara bebas lebih kurang 24 jam. Jika mati, cangkang kupang putih tidak membuka sehingga tidak menimbulkan bau (Subani *et al.*, 1983).

## 2.2 Logam Berat Pb (Timbal)

Tingginya kandungan logam berat di suatu perairan dapat menyebabkan kontaminasi, akumulasi bahkan pencemaran terhadap lingkungan seperti biota, sedimen, air dan sebagainya (Frank, 1995). Berdasarkan kegunaannya, logam berat dapat dibedakan atas dua golongan, yaitu (Laws, 1981):

- Golongan yang dalam konsentrasi tertentu berfungsi sebagai mikronutrien yang bermanfaat bagi kehidupan organisme perairan, seperti Zn, Fe, Cu, Co.
- Golongan yang sama sekali belum diketahui manfaatnya bagi organisme perairan, seperti Hg, Cd, dan Pb.

Hutagalung (1984) juga menyatakan senyawa logam berat banyak digunakan untuk kegiatan industri sebagai bahan baku, katalisator, biosida maupun sebagai additive. Limbah yang mengandung logam berat ini akan terbawa oleh sungai dan karenanya limbah industri merupakan sumber dari bahan pencemar dari logam berat yang berpotensi menyebabkan pencemaran laut.

Menurut Ardyanto (2005) timbal atau yang dikenal sehari-hari dengan timah hitam dan dalam bahasa ilmiahnya dikenal dengan kata plumbum, dengan lambang Pb. Logam ini termasuk kedalam kelompok logam-logam golongan IV-A

pada tabel periodik unsur kimia. Mempunyai nomor atom (NA) 82 dengan bobot atau berat (BA) 207,2. Pb adalah suatu logam berat berwarna kelabu kebiruan dan lunak dengan titik leleh  $327^{\circ}\text{C}$  dan titik didih  $1.620^{\circ}\text{C}$ . Pada suhu  $550-600^{\circ}\text{C}$  Pb akan menguap dan berikatan dengan oksigen di udara membentuk timbal oksida ( $\text{PbO}_2$ ). Bentuk oksidasi yang paling umum adalah timbal (II) ( $\text{PbO}$ ). Walaupun bersifat lunak dan lentur. Pb sangat rapuh dan mudah mengkerut pada pendinginan, sulit larut dalam air dingin, air panas dan dapat larut dalam asam nitrat, asam asetat dan asam sulfat pekat. Menurut Lu (1995), timbal banyak digunakan dalam industri misalnya sebagai zat tambahan bahan bakar, pigmen timbal dalam cat yang merupakan penyebab utama peningkatan kadar Pb di lingkungan.

Timbal (Pb) dan persenyawaannya dapat berada dalam badan perairan secara alamiah, Pb masuk ke badan air perairan melalui pengkristalan Pb di udara dengan bantuan air hujan. Disamping itu, proses korifikasi dari batuan mineral akibat hempasan gelombang dan angin juga merupakan salah satu jalur sumber Pb yang masuk ke dalam badan perairan. Pb yang masuk dalam badan perairan sebagai dampak dari aktivitas manusia ada bermacam-macam bentuk. Diantaranya adalah limbah industri, air buangan dari pertambangan bijih timah hitam dan buangan sisa industri baterai. Buangan-buangan tersebut akan jatuh pada jalur-jalur perairan seperti anak-anak sungai yang kemudian terakumulasi di lautan (Palar, 1994).

Toksisitas timbal terhadap organisme akuatik berkurang dengan meningkatnya kesadahan dan kadar oksigen terlarut. Toksisitas timbal sendiri lebih rendah daripada kadmium (Cd), merkuri (Hg), dan tembaga (Cu) akan tetapi lebih toksik daripada kromium (Cr), mangan (Mn), barium (Ba), zinc (Zn), dan besi (Fe) (Effendi, 2000).

### 2.3 Metallothionein

Metallothionein (MT) merupakan protein massa molekul rendah (6/7 kDa, 57/75 asam amino), sistein yang tinggi protein (18/20 sistein per molekul) aromatik amino asam rendah, kandungan ini dibedakan oleh konten yang sangat tinggi dari  $d^{10}$  ion logam ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  dan  $Cu^+$ ) membentuk karakteristik logam atau tiolat cluster melalui belerang atom dari semua kelompok sistein yang menyusun protein. MT adalah protein sitosol yang ditemukan pada beberapa organisme prokariotik dan eukariotik termasuk vertebrata, invertebrata tumbuhan (Simes *et al.*, 2003). Menurut Desouky (2012), bahwa Metallothionein (MT) merupakan peptida dengan berat molekul yang rendah dengan konten sistein tinggi. Metallothionein yang berada pada invertebrata air memainkan peran penting dalam detoksifikasi logam dan sering disebut sebagai biomarker yang berguna untuk logam beracun.

Metallothionein memiliki berat molekul rendah, mempunyai kandungan protein dan polipeptida yang kehadirannya dipengaruhi oleh induksi logam dan berpartisipasi dalam metabolisme dan detoksifikasi logam. Meskipun banyak penelitian yang menyatakan bukti konkrit namun terdapat beberapa penelitian yang membuktikan bahwa Metallothionein berperan dalam mengatur atau mengendalikan ketersediaan logam intraseluler Cu, Zn dan Cd. MT mampu mengendalikan pengambilan Cu dan Zn dengan bantuan molekul reseptor yang sesuai antara lain adanya metalloenzyme. Sehingga pengaturan pengambilan logam tersebut sangat spesifik. Metallothionein mengikat logam esensial maupun non esensial, sehingga dapat diyakini Metallothionein berperan dalam perlindungan organisme dalam toksisitas logam. Protein ini mengikat logam beracun seperti Cd, dimana ZnMT berfungsi sebagai reseptor Cd sedangkan dalam kasus metalloprotein, Zn berfungsi sebagai mekanisme untuk memulihkan struktur fungsional (Roesijadi, 1994).

Metallothioneins (MTs) telah banyak dipertimbangkan untuk digunakan sebagai biomarker tertentu karena potensi MT mencerminkan keberadaan logam berat polusi dan induksi dari MT meningkat setelah paparan logam berat dalam organisme (Wu *et al*, 2005). Prosedur pengukuran tingkat pencemaran di perairan, khususnya untuk perairan Indonesia telah banyak dibuat, namun sedikit saja yang dapat dikategorikan sebagai prosedur yang peka, akurat dan dapat diandalkan. Apalagi pencemaran yang dimaksud adalah pencemaran yang disebabkan oleh logam berat yang berdampak luas sampai pada manusia. Salah satu alternatif prosedur pengukuran yang masuk dalam kategori peka, akurat dan dapat diandalkan serta dapat diaplikasikan di perairan Indonesia adalah pengukuran dengan menggunakan indikator metallothionein (Lasut, 2002). Menurut Le *et al.* (2016), beberapa studi terdahulu menjelaskan bahwa konsentrasi MT telah berhubungan baik dengan konsentrasi total atau sitosol dari logam dalam jaringan lunak keseluruhan atau jaringan yang lebih spesifik ini menunjukkan hasil yang berbeda pada hubungan antara logam dan MT. Berikut data yang menunjukkan beberapa hubungan antara logam berat dengan metallothionein pada spesies yang berbeda, logam berat yang berbeda serta bagian tubuh yang diteliti, yang menunjukkan adanya kandungan dari protein metallothionein. Data dapat dilihat pada Tabel 2 berikut:

**Tabel 2.** Hubungan antara logam berat dan MT yang diambil dari berbagai referensi

No	Spesies	Logam Berat	Tempat penelitian	Paparan konsentrasi	Paparan waktu	Bagian tubuh yang diteliti	Hubungan antara logam berat dan MT	Referensi
1	<i>Pyganodon Grandis</i>	Cd	Studi lapang	0-13 nM	-	Sitosol insang	Ada	Wang <i>et al.</i> (1999)
2	<i>Mytilus etilus</i>	Cd, Cu, Zn	Studi lapang	-	8 bulan	Insang	Tidak ada	Geffard <i>et al.</i> (2005)
3	<i>Lasmigona costata</i>	Cr, Pb Zn	Studi lapang	-	-	Insang	Ada	Gillis <i>et al.</i> (2014)
4	<i>Dreissena</i>	Pb	Studi	5, 50,	1-10	Seluruh	Ada	Frank <i>et al.</i>

	<i>polymorpha</i>		Lab.	500µg/L	minggu	jaringan lunak		(2008)
5	<i>Mytilus Galloprovin – cialis</i>	Cu, Zn	Studi lapang	-	1 bulan	Seluruh jaringan lunak	Ada	Peric <i>et al.</i> (2012)
6	<i>Ruditapes decussate</i>	Cd	Studi Lab.	400 µg/L	40 hari	Seluruh jaringan lunak	Ada	Bebianno <i>et al.</i> (1993)
7	<i>Mytilus Galloprovin – cialis</i>	Cd, Pb	Studi lapang	Cd: 2,5 µg/L	-	Kelenjar pencernaan	Tidak ada	Scudiero <i>et al.</i> (2014)

## 2.4 Mekanisme Penyerapan Logam Berat oleh Kupang

Beberapa logam berat dalam ekosistem air dapat terakumulasi dalam kupang, tiram, udang, udang laut dan ikan. Kepekaan terhadap kadmium dapat sangat bervariasi antara organisme air. Organisme air asin diketahui lebih resisten terhadap keracunan kadmium daripada organisme air tawar. Menurut Darmono (1995), Logam berat bisa menjadi bahaya disebabkan sistem bioakumulasi. Bioakumulasi adalah peningkatan konsentrasi zat kimia dalam tubuh makhluk hidup dalam waktu ke waktu, dibandingkan dengan konsentrasi zat kimia yang terdapat di lingkungan.

Logam berat yang masuk ke badan perairan dari berbagai macam kegiatan baik secara langsung menggunakan logam berat tersebut dalam kegiatannya maupun merupakan hasil sampingan dari aktivitas tersebut sangat berbeda-beda. Bahan pencemar seperti logam berat masuk ke dalam tubuh biota melalui insang, mulut dan kulit kemudian diserap melalui saluran pencernaan. Logam yang ada pada tubuh biota akan tertimbun di dalam jaringannya terutama hati dan ginjal. Peningkatan kadar logam berat dalam air laut dan diikuti peningkatan kadar logam berat dalam biota laut melalui rantai makanan akan menimbulkan keracunan akut dan kronik, bahkan bersifat karsinogenik pada manusia yang mengkonsumsi hasil laut (Keman, 1998). Biasanya kerusakan jaringan oleh logam terdapat pada beberapa lokasi baik tempat masuknya maupun tempat penimbunannya. Akibat yang ditimbulkan dari toksisitas logam ini

dapat berupa kerusakan fisik (erosi, degenerasi, nekrosis) dan dapat berupa gangguan fisiologis (gangguan fungsi enzim dan gangguan metabolisme) (Fitriyah, 2007).

Logam yang tidak esensial bereaksi pada tingkat yang bermacam-macam dan cenderung berkumpul di dalam tubuh, karenanya, perolehan logam dalam konsentrasi yang sangat rendah sekalipun tetapi secara terus menerus akan menyebabkan pengaruh penurunan kesehatan yang dapat mengakibatkan penyakit kronis (Cakrawala, 2005).

## 2.5 Pengikatan Logam Berat oleh Metallothionein (MT)

Metallothionein (MT) merupakan polipeptida yang memiliki banyak ikatan *cystein* (*cys*) yang disandikan oleh gen, mempunyai berat molekul rendah, dan berfungsi sebagai peptida pengikat logam (*metal binding peptides*). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino *Cys* maka protein ini mengandung kelompok thiol (sulfidril, -SH) dalam jumlah yang besar; kelompok thiol ini mengikat logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, merkuri, tembaga, dan kadmium (Zattha, 2008).

Soemirat (2005) dan Katzung (2007), menyatakan bahwa pengikatan logam berat yang membentuk Metallothionein diyakini sebagai mekanisme untuk pertahanan dan perlindungan yang mencegah logam tersebut mempengaruhi protein-protein lain yang penting dalam proses metabolisme tubuh. Dengan kata lain logam-logam berat tersebut dapat menginduksi sintesis Metallothionein. Metallothionein mampu mengikat logam berat dan dapat digunakan sebagai penanda adanya pajanan logam berat yang berpotensi racun.

Adanya metallothionein-Cd, metallothionein-Pb dan metallothionein-Hg tersebut terjadi karena metallothionein terbentuk dari thionein yang merupakan protein pengikat logam (*metal binding protein*) yang berperan dalam proses

pengikatan atau penyekapan logam berat Cd, Pb dan Hg di dalam jaringan hati ikan. Setelah logam Cd, Pb dan Hg terikat oleh protein (thionein), maka logam tersebut akan menginduksi sintesis/terbentuknya metallothionein-Cd, metallothionein-Pb dan metallothionein-Hg (Binz, 2000).

## 2.6 Pengamatan Metallothionein dengan Metode IHK (Imunohistokimia)

Imunohistokimia merupakan suatu proses yang digunakan untuk mendeteksi antigen seperti protein, karbohidrat dan lain sebagainya pada sel dari jaringan dengan menggunakan prinsip reaksi antibodi yang berikatan dengan antigen pada jaringan. Asal mula nama imunohistokimia sendiri berasal dari kata “*immune*” yang mengandung makna bahwa prinsip dasar dalam proses ini adalah penggunaan antibodi dan kata “*histo*” yang menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Imunohistokimia merupakan metode yang sering digunakan untuk mengukur dan mengidentifikasi karakteristik dari kejadian seluler seperti proses proliferasi sel dan apoptosis sel. Imunohistokimia juga sering dipakai dalam penelitian dasar untuk mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein yang terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh (Ramos dan Vara, 2005).

Imunohistokimia merupakan suatu cara yang digunakan untuk mengetahui kadar antibodi atau antigen atau derajat imunitas dalam sediaan jaringan. Pewarnaan sediaan jaringan mengakibatkan ikatan antibodi pada antigen dipermukaan atau didalam sel yang selanjutnya dapat dideteksi dengan cara dilabel dengan enzim, *isotop*, *fluoropore*, atau *colloidal gel*. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop cahaya, untuk divisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering

digunakan adalah dengan konjugasi antibodi dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga bisa digunakan *fluoropore* seperti *fluorosein* atau *rhodamin*. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop electron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003).

Metode Imunohistokimia juga digunakan untuk mendeteksi atau mengukur kandungan Metallothionein yang diukur dengan memeriksa intensitas warna yang dihasilkan. Intensitas yang dihasilkan akibat reaksi ini dibagi menjadi tiga kelas, yang reaksi positif kuat ditunjukkan dengan warna coklat gelap sampai coklat kehitaman (+ + +), positif sedang yang ditunjukkan oleh warna dari coklat gelap ke terang coklat (+ +), dan positif lemah yang ditunjukkan oleh coklat kemerahan (+) (Irvan, 2007).

## 2.7 Kondisi Fisika dan Kimia Perairan

Logam berat biasanya ditemukan sangat sedikit dalam air secara alamiah, yaitu kurang dari 1 µg/l. Bila terjadi erosi alamiah, konsentrasi logam tersebut dapat meningkat. Beberapa macam logam biasanya lebih dominan daripada logam lainnya dan dalam air biasanya tergantung pada asal sumber air (air tanah dan air sungai). Disamping itu jenis air (air tawar, air payau dan air laut) juga mempengaruhi kandungan logam di dalamnya (Darmono, 2001). Kadar ini dapat meningkat jika terjadi peningkatan limbah yang mengandung logam berat masuk ke dalam laut. Limbah ini dapat berasal dari aktivitas manusia di laut yang berasal dari pembuangan sampah kapal-kapal, penambangan logam di laut dan lain-lain dan yang berasal dari darat seperti limbah perkotaan, pertambangan, pertanian dan perindustrian.

Darmono (1995) mengatakan bahwa kandungan logam dalam air dapat berubah bergantung pada lingkungan dan iklim. Pada musim hujan, kandungan

logam akan lebih kecil karena proses pelarutan sedangkan pada musim kemarau kandungan logam akan lebih tinggi karena logam menjadi terkonsentrasi. Semua logam berat dapat menimbulkan pengaruh yang negatif terhadap organisme air pada batas konsentrasi tertentu. Pengaruh tersebut dipengaruhi oleh jenis logam, spesies hewan, daya permeabilitas organisme, dan mekanisme detoksikasi. Selain itu, faktor lingkungan perairan seperti pH, kesadahan, suhu dan salinitas juga mempengaruhi toksisitas logam berat.

### 2.7.1 Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor yang sangat penting dalam mengatur proses kehidupan dan penyebaran organisme. Suhu air laut di suatu perairan dipengaruhi oleh kondisi atmosfer, dan intensitas penyinaran matahari yang masuk ke laut (Officer, 1976). Selain itu, suhu air laut juga dipengaruhi oleh faktor geografis dan dinamika arus (Sijabat, 1974). Kenaikan suhu dapat menurunkan kelarutan oksigen dan meningkatkan toksisitas polutan (Mulyanto, 1992). Metabolisme yang optimum bagi sebagian besar makhluk hidup membutuhkan kisaran suhu yang relatif sempit antara pengaruh suhu secara langsung terhadap plankton adalah meningkatkan reaksi kimia sehingga laju fotosintesis meningkat seiring dengan kenaikan suhu (dari 10 °C – 20 °C). Pengaruh suhu tidak langsung adalah berkurangnya kelimpahan plankton akibat suhu semakin menurun dan kerapatan air semakin meningkat seiring bertambahnya kedalaman perairan (Raymont, 1980).

Menurut Ilahude & Liasaputra (1980), suhu di permukaan laut yang normal berkisar antara 25,6-32,3 °C dan antara 20-30 °C, sama halnya dengan Mulyanto (1992) yang menyebutkan bahwa suhu yang baik untuk kehidupan ikan di daerah tropis berkisar antara 25-32 °C. Menurut Subani *et al.* (1983), suhu yang baik untuk pertumbuhan kupang pada saat air surut suhu rata-rata adalah

28,57 °C, sedangkan pada saat air pasang (mulai pasang) suhu rata-ratanya adalah 28,70 °C.

### 2.7.2 pH

Tingginya curah hujan membuat konsentrasi logam berat dalam air menurun. Kinghorn *et al.* (2007), menyebutkan bahwa pada musim hujan, kandungan logam berat dalam air cenderung lebih kecil karena pelarutan, sedangkan pada musim kemarau cenderung lebih tinggi karena logam menjadi terkonsentrasi. Sehingga logam berat umumnya lebih berbahaya.

Pada umumnya air laut mempunyai nilai pH lebih besar dari 7 yang cenderung bersifat basa, namun dalam kondisi tertentu nilainya dapat menjadi lebih rendah dari 7 sehingga menjadi bersifat asam. Derajat keasaman suatu perairan merupakan salah satu parameter kimia yang cukup penting dalam memantau kestabilan perairan. Perubahan nilai pH suatu perairan terhadap organisme akuatik mempunyai batasan tertentu dengan nilai pH yang bervariasi, tergantung pada suhu air laut, konsentrasi oksigen terlarut dan adanya anion dan kation (Prescod, 1978). Pada umumnya, nilai pH dalam suatu perairan berkisar antara 4–9, sedangkan di daerah bakau, nilai pH dapat menjadi lebih rendah disebabkan kandungan bahan organik yang tinggi.

Semakin tinggi pH (basa) maka penurunan kandungan logam dalam air semakin besar (Asri *et al.*, 2010). Pada perairan estuaria kandungan logam berat lebih tinggi dibandingkan pada perairan pesisir disekitarnya, hal ini disebabkan oleh kelarutan logam berat lebih tinggi pada pH rendah (Chester, 1990). Oleh karena itu perairan dengan pH yang terlalu tinggi atau rendah akan mempengaruhi ketahanan hidup organisme yang hidup didalamnya.

### 2.7.3 Salinitas

Untuk daerah pesisir salinitas berkisar antara 32-34 ‰ (Romimohtarto dan Thayib, 1982), sedangkan untuk laut terbuka umumnya salinitas berkisar

antara 33-37 ppt dengan rata-rata 35 ‰ . Salinitas ini juga masih baik untuk kehidupan organisme laut, khususnya ikan. Menurut Effendi (2003), kadar salinitas di daerah pantai biasanya berkisar antara 34-37‰ dengan rerata sebesar 35‰.

Salinitas perairan estuaria dipengaruhi oleh adanya perubahan-perubahan proses fisika dalam perairan seperti penguapan, pengembunan, kandungan air yang berubah, perubahan unsur-unsur pembentuk garam. Unsur-unsur yang bisa berubah dalam air antara lain fosfat dan nitrat karena hal ini erat kaitannya dengan aktifitas biologi, sehingga perubahan salinitas akan mempengaruhi kandungan nitrat dan fosfat (Siagian, 2000).

Wilayah perairan estuaria daerah tropis dikenal tinggi produktivitasnya karena mempunyai kandungan zat hara yang tinggi dalam air pori. Karena terletak di daerah tropis, maka hampir sepanjang tahun perairan Indonesia mempunyai suhu permukaan yang tinggi, berkisar antara 26–30 °C. Sifat ini umumnya berasosiasi dengan air yang berkadar garam atau bersalinitas rendah, yaitu ±27,33 ppm di lapisan permukaan (Patriquin, 1992).

#### **2.7.4 Oksigen Terlarut (DO/Dissolved Oxygen)**

Kondisi oksigen terlarut di perairan dipengaruhi antara lain oleh suhu, salinitas, pergerakan massa air, tekanan atmosfer, konsentrasi fitoplankton dan tingkat saturasi oksigen sekelilingnya serta adanya pengadukan massa air oleh angin. Menurunnya kadar oksigen terlarut antara lain disebabkan pelepasan oksigen ke udara, aliran air tanah ke dalam perairan, adanya zat besi, reduksi yang disebabkan oleh desakan gas lainnya dalam air, respirasi biota dan dekomposisi bahan organik ( Nybakken, 1998).

Kadar oksigen yang terlarut di dalam massa air nilainya adalah relatif, biasanya berkisar antara 6-14 ppm (Connel and Gregory, 1995). Pada umumnya kandungan oksigen sebesar 5 ppm dengan suhu air berkisar antara 20-30 °C

relatif masih baik untuk kehidupan ikan-ikan, bahkan apabila dalam perairan tidak terdapat senyawa-senyawa yang bersifat toksik (tidak tercemar) kandungan oksigen sebesar 2 ppm sudah cukup untuk mendukung kehidupan organisme perairan (Rifa'i dan Pertagunawan, 1983). Menurut Sutamihardja (1987), kadar oksigen di perairan laut yang tercemar ringan di lapisan permukaan adalah 5 ppm.

## 2.8 Sedimen

Sedimentasi adalah pengendapan butiran sedimen dari kolom air ke dasar perairan. Di perairan proses ini meliputi pelepasan (*detachment*) dalam bentuk tersuspensi (*suspension*), melompat (*saltation*), berputar (*rolling*), dan menggelinding (*sliding*). Menurut Rifardi (2008) ukuran butir sedimen dapat menjelaskan hal-hal berikut: 1). menggambarkan daerah asal sedimen, 2). perbedaan jenis partikel sedimen, 3). ketahanan partikel dari bermacam-macam komposisi terhadap proses weathering, erosi, abrasi dan transportasi, serta 4). jenis proses yang berperan dalam transportasi dan deposisi sedimen.

Menurut asalnya sedimen dibagi menjadi tiga macam yaitu; 1). sedimen lithogenous ialah sedimen yang berasal dari sisa pengikisan batu-batuan di darat, 2). sedimen biogenous sedimen yang berasal dari sisa rangka organisme hidup yang juga akan membentuk endapan-endapan halus yang dinamakan ooze yang jauh mengendap dari pantai ke arah laut dan 3). sedimen hydrogenous yakni sedimen yang dibentuk dari hasil reaksi kimia dari air laut (Hutabarat dan Evan, 1986).

Logam berat yang masuk ke dalam lingkungan perairan akan mengalami pengendapan, kemudian diserap oleh organisme yang hidup di perairan tersebut. Logam berat memiliki sifat yang mudah mengikat bahan organik dan mengendap di dasar perairan dan bersatu dengan sedimen sehingga kadar logam berat

repository.ub.ac.id

dalam sedimen lebih tinggi dibandingkan dalam air. Mengendapnya logam berat bersama dengan padatan tersuspensi akan mempengaruhi kualitas sedimen di dasar perairan dan juga perairan sekitarnya. Menurut Rochyatun *et al.* (2003), pencemaran yang dihasilkan dari logam berat sangat berbahaya karena bersifat toksik, logam berat juga akan terakumulasi dalam sedimen dan biota.



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

Materi dalam penelitian ini adalah ekspresi Metallothionein terhadap logam berat Pb pada kupang dengan membandingkan tiga muara sungai yakni daerah muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton di Pasuruan. Selain itu dilakukan juga pengukuran Pb pada air dan sedimen, serta parameter kualitas air pendukung yang ada disekitar kupang yaitu parameter fisika seperti suhu dan parameter kimia seperti salinitas, derajat keasaman (pH), oksigen terlarut (*Dissolved Oxygen/DO*).

#### 3.2 Alat dan Bahan

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 survei yang dijelaskan secara deskriptif dengan menggambarkan keadaan lokasi penelitian secara nyata sesuai dengan yang ada di lapang dan dibuktikan melalui analisa data. Menurut Sasmaya (2011), metode survei deskriptif merupakan metode untuk memperoleh data yang ada saat penelitian dilakukan dan bertujuan untuk menjelaskan pembahasan dari permasalahan dalam penelitian.

Dalam penelitian pengambilan data sangat diperlukan data adalah informasi atau keterangan mengenai suatu hal yang berkaitan dengan tujuan penelitian ini. Data yang diambil dalam penelitian ini meliputi data primer dan data sekunder.

#### a) Data Primer

Data primer didefinisikan sebagai data yang pengumpulannya dilakukan dengan cara wawancara., observasi dan partisipasi aktif langsung di lapangan oleh sumber aslinya tanpa melalui perantara serta mengamati dan mencatat untuk pertama kalinya (Marzuki, 1983). Data primer yang diambil dalam penelitian ini meliputi densitas dan intensitas kadar metallothionein pada tubuh kupang, kandungan logam berat Pb pada air, sedimen dan tubuh kupang. Pada kualitas perairan yang diukur meliputi suhu, pH, salinitas dan Oksigen Terlarut (DO).

#### b) Data Sekunder

Data sekunder adalah data yang bukan diusahakan sendiri pengumpulannya oleh peneliti, misalnya dari biro statistik, majalah, keterangan-keterangan atau publikasi lainnya (Marzuki, 1983). Data sekunder dapat diperoleh dari laporan, jurnal, majalah, laporan PKL/Skripsi, situs internet serta kepustakaan yang menunjang dari penelitian ini.

Perhitungan densitas dan intensitas dilakukan dengan menggunakan ImageJ, dimana untuk perhitungannya dapat dilihat sebagai berikut:

1. Data densitas didapatkan dari setiap stasiun pengamatan dimana dari setiap stasiun diambil 3 kali pengulangan, sehingga data yang didapatkan sebanyak 9 data dan dihitung standar deviasinya.
2. Data intensitas didapatkan dari setiap stasiun pengamatan dimana dari setiap stasiun diambil 3 kali pengulangan, pada setiap pengulangan densitas dihitung sebanyak 10 kali, kemudian setiap sampel stasiun diambil rata-rata. Rata-rata dari setiap stasiun dijumlah kemudian dirata-rata lagi, terakhir didapatkan 9 rata-rata dan dihitung standar deviasinya.

### 3.4 Penentuan Stasiun

Penentuan stasiun sampel penelitian dilakukan di tiga daerah muara sungai dan di dua kota yang berbeda yaitu dua muara sungai yang berada di daerah Pasuruan dan satu muara sungai di daerah Sidoarjo. Dari 3 tempat tersebut, masing-masing stasiun ditentukan 1 titik dengan 3 pengulangan dimana setiap masing-masing 1 pengulangan terdapat 2 kupang. Pengambilan sampel tersebut dilakukan bersamaan sehingga, jumlah sampel yang diamati ada 9 sampel. Sedangkan parameter air pendukung yang diukur antara lain suhu, pH, salinitas, oksigen terlarut dan juga sedimen.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Prosedur pengambilan sampel pada penelitian skripsi ini dilakukan 1 kali sampling menggunakan metode random sampling dengan penentuan titik samplingnya pada satu titik muara disetiap muara. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 stasiun yang telah ditentukan. Pengamatan dilakukan sebanyak 3 kali dalam setiap 1 stasiun agar data yang didapat lebih akurat dan dapat mewakili semua *Corbula faba* yang terdapat di tiap-tiap stasiun yang telah ditentukan.

#### 3.5.2 Preparasi Sampel

Metode preparasi sampel yang dilakukan selama proses penelitian skripsi ini yaitu dengan langkah - langkah sebagai berikut:

- Mengambil *Corbula faba* pada stasiun yang telah ditentukan.
- *Corbula faba* yang telah diambil langsung dibersihkan dengan air yang mengalir hingga bersih dari lumpur.
- *Corbula faba* yang telah dibersihkan dimasukkan kedalam wadah kantong plastik ukuran 1 kg.

- Kantong plastik yang telah berisi *Corbula faba* kemudian diberi label dan keterangan untuk menandai biota agar tidak tertukar.
- Di dalam box diberi es batu dalam kemasan agar biota tidak mati saat di perjalanan.

### 3.5.3 Pembuatan Irisan Jaringan

Menurut Farabi (2012), pembedahan dan pengawetan *Corbula faba* dapat dilakukan dengan cara:

#### 1. Pembedahan dan Pengawetan Tubuh *Corbula faba*

- a. Membuka cangkang *Corbula faba* dengan menggunakan “betel” tipis
- b. Organ dalam *Corbula faba* dibedah dengan menggunakan sectio set
- c. Kemudian tubuh *Corbula faba* diambil
- d. Badan atau tubuh dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah diisi dengan larutan formalin 10%.

#### 2. Pengamatan Histopatologi

Pengamatan Histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Menurut Muntiha (2001), prosedur histopatologi antara lain:

##### a. Organ difiksasi dengan formalin 10%

##### b. Pemotongan jaringan Makros

1. Mengambil organ yang telah difiksasi.
2. Jaringan dipotong dengan ketebalan 2 - 3 mm
3. Jaringan disusun ke dalam *tissue cassette* sesuai dengan kode.
4. Memasukkan *tissue cassette* ke dalam keranjang khusus.

##### c. Proses Dehidrasi

1. Keranjang dimasukkan ke dalam *tissue tex processor* untuk diproses secara otomatis.

2. Jaringan mengalami proses dehidrasi bertahap dengan putaran waktu : alkohol 70% (2 jam), alkohol 80% (2 jam), alkohol 90% (2 jam), alkohol absolut (2 jam), alkohol absolut (2 jam), xylol (2 jam), xylol (2 jam).

**d. Proses Vakum**

1. Meletakkan keranjang di dalam mesin vakum untuk penghilangan udara dari jaringan dengan temperatur (50-60°C) selama 30 menit.
2. Keranjang diambil dan dikeluarkan *tissue cassette*.

**e. Pengeblokan**

1. Menghangatkan parafin cair, pinset dan cetakan.
2. Parafin cair dituangkan ke dalam cetakan.
3. Jaringan dari *Tissue Tex Prosesor* dimasukkan kedalam cetakan yang telah diisi parafin cair, tekan jaringan agar semakin menempel di dasar cetakan.
4. Tutup cetakan diambil, letakkan di atasnya dan di tekan. Pasang etiket di pinggir.
5. Biarkan sampai membeku.
6. Setelah beku, keluarkan dari cetakan. Rapiakan sisi-sisi blok. Ganti etiket dengan yang permanen.
7. Sebelum dipotong, parafin blok didinginkan dengan es batu sampai  $\pm 30$  menit.

**f. Pemotongan dengan Mikrotom**

1. Blok di jepit pada mikrotom
2. Blok paraffin dipotong dengan pisau mikrotom. Kemiringan:  $\pm 30^\circ$ . Tebal  $\pm 3-5$  mikron.
3. Hasil pemotongan (berupa pita/irisan tipis yang saling bersambung) dimasukkan ke dalam *waterbath* yang diisi air yang sudah dihangatkan  $40^\circ\text{C}$  -  $50^\circ\text{C}$ . Kemudian diambil dengan kaca objek (meletakkan potongan di *waterbath* tidak boleh terbalik).

4. Menyusun dalam *object glass box*.
5. Memasukkan ke dalam inkubator bersuhu 60°C.
6. Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
7. Rehidrasi preparat dengan menggunakan atanol 100%, 95% dan 70%. Masing-masing selama 2 menit, 2 menit, dan 1 menit. Blok di jepit pada mikrotom

#### 3.5.4 Pewarnaan Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan dengan menggunakan sampel bagian tubuh *Corbula faba* dilakukan di Laboratorium FAAL Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, yaitu sebagai berikut:

1. Masing-masing sample ditetesi PBS (Phosphate Buffer Saline) sebanyak 3 kali setiap 5 menit. PBS berfungsi dalam menstabilkan pH jaringan.
2. Menetesi 3 EDTA (*ethylene diamine tetra acetic acid*) dan dibiarkan selama 10 menit. Berfungsi sebagai fiksasi jaringan.
3. Menetesi Na-sitrat dan dibiarkan selama 10 menit.
4. Membilas dengan PBS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
5. Menetesi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% dan dibiarkan selama 30 menit.
6. Membilas dengan PBS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
7. Menginkubasi serum 1% di PBS dan ditunggu selama 30 menit.
8. Menetesi antibodi primer Anti MT T dan menginkubasi di kulkas selama 1 malam.
9. Membilas dengan PBS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
10. Menetesi 2<sup>nd</sup>AB in PBS dengan perbandingan 1:200 dan dibiarkan selama 60 menit.
11. Membilas dengan PBS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.

12. Menetesi Antibodi Sekunder yaitu Anti-Rabbit hingga terendam dan dibiarkan selama 60 menit.
13. Membilas PBS sebanyak 2 kali setiap 5 menit.
14. Mencuci aquades dan dibiarkan selama 5 menit.
15. Menetesi DAB (Dimetil Amino Benzaldehid) dengan perbandingan 1:45 hingga berwarna coklat.
16. Membilas dengan  $D_2H_2O$ .
17. Menetesi dengan haematoxylin selama 10 menit.
18. Membilas dengan  $D_2H_2O$ .
19. Membilas dengan air kran.
20. Memberi *cover glass*.

### 3.5.5 Scan dengan Mikroskop Dot slide

Pada pengamatan mikroskop, digunakan mikroskop dot slide dengan tipe BX51 dan kamera XC10.

- a. Fungsi Scan:
  1. Nyalakan seluruh power, mikroskop, CPU, layar monitor dan power server.
  2. Tunggu sampai proses loading selesai.
  3. Setelah komputer siap, klik 2 kali Dot Slide.
  4. Untuk proses scan diprogram dot slide ada lima pilihan kotak yang terdiri dua baris atas dan bawah.
  5. Kotak atas digunakan untuk single scan (satu slide).
  6. Kotak bawah digunakan untuk multiscan (lebih dari satu slide).
  7. Salah satu kotak pilihan di klik sesuai dengan kebutuhan.
  8. Klik manual load tataan slide mikroskop akan lebih menonjol ke depan.
  9. Letakkan slide pada papan slide dengan benar dan klik OK.
  10. Klik next.

11. Pilih perbesaran yang akan discan sesuai dengan kebutuhan.
  12. Klik scan now untuk memulai proses scan.
  13. Ditunggu proses scan sampai selesai.
  14. Setelah selesai, klik file -save as- di pojok kiri atas dan di masukkan folder dan diberi nama file sesuai dengan keinginan.
- b. Fungsi Foto
1. Pilih menu live.
  2. Atur menggunakan jointstik sesuai gambar objek yang dimaksud.
  3. Atur focus di jointstik, setelah focus sempurna sesuai dengan yang dimaksud kemudian klik Snapshot.
  4. Klik file-save as- di pojok kiri atas dan di masukkan folder dan diberi nama file sesuai dengan keinginan.

### 3.6 Perhitungan Metallothionein

#### a. Analisis Densitas Metallothionein

Prosedur analisis densitas Metallothionein dapat dilakukan dengan menggunakan software ImageJ. Prosedur penggunaan ImageJ adalah sebagai berikut:

1. Buka Mozilla Firefox/Google Chrome atau browser lainnya
2. Mengaktifkan software ITCN 1.6 jar, ITCN (Image-based Tool for Counting Nuclei) adalah bagian dari plugins imageJ yang berfungsi untuk jumlah sel dari gambar.

[http://biodev.ece.ucsb.edu/projects/bioimage/downloader/download/category/7/file/34/ICTN\\_1\\_6.jar](http://biodev.ece.ucsb.edu/projects/bioimage/downloader/download/category/7/file/34/ICTN_1_6.jar)

3. Plugin ITCN di program files > imageJ > plugins > paste
4. Buka imageJ
5. Pilih file > open > pilih gambar yang akan di analisis

6. Klik edit > invert, untuk mengetahui bagian yang akan dihitung
7. Klik image > type > 8 bit, untuk mengubah gambar menjadi grayscale
8. Klik Plugins > ITCN > count
9. Result, didapatkan hasil jumlah MT pada gambar

#### b. Analisis Intensitas Metallothionein

Prosedur analisis intensitas metallothionein dapat dilakukan dengan menggunakan software ImageJ dengan prosedur sebagai berikut :

1. Buka imageJ
2. Pilih file > open > pilih gambar yang akan di analisis
3. Klik analyze > set measurement > centang Area, Mean Gray Value, Integrated Density, Stdev dan Display label, Redirect to gambar yang akan dianalisis > OK
4. Klik "OVAL", elliptical or brush selections
5. Arahkan ke gambar, untuk menyamakan lingkaran di gambar yang lain perhatikan navigation bar, catat weight dan height dengan nilai yang sama pada tiap lingkaran pada gambar.
6. Tekan M pada keyboard untuk mengetahui hasil ukuran warna.

#### 3.7 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan analisa regresi kolerasi dengan model regresi linier sederhana dan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada software SPSS versi 16.0. Analisa regresi merupakan alat analisa yang mampu menjelaskan pola hubungan antara dua variabel atau lebih yang terdiri atas variabel dependen (Y) dan variabel independen (X), sedangkan koefisien korelasi menunjukkan arah hubungan antara variabel X dan Y. Menurut Sujianto (2009), menyatakan bahwa regresi sederhana seringkali digunakan untuk mengatasi

permasalahan analisis regresi yang melibatkan hubungan dari variabel terikat dengan variabel bebas. Model regresi ini digunakan untuk mengetahui hubungan densitas dan intensitas Metallothionein yang merupakan variabel terikat (Y) pada tubuh *Corbula faba* terhadap kadar logam berat Pb yang merupakan variabel bebas (X). Persamaan model regresi linier sederhana menurut Walpole (1995) yaitu:

$$Y = a + bX$$

Keterangan :

- Y : Variabel terikat (kadar densitas dan intensitas metallothionein pada tubuh *Corbula faba*.)
- a : Intersep atau perpotongan dengan sumbu tegak (y)
- b : Kemiringan atau gradien variabel bebas
- X : variabel bebas (kadar logam berat Pb pada tubuh *Corbula faba*)

### 3.8 Analisis Kualitas Air Pendukung

Parameter analisa kualitas air pendukung dalam penelitian ini antara lain suhu, pH, salinitas dan oksigen terlarut muara sungai Ketingan di Sidoarjo dan muara sungai di daerah Bangil dan di daerah Kraton di Pasuruan. Tujuan analisa kualitas ini untuk mendukung, menunjang serta untuk mengetahui kondisi lingkungan perairan tempat hidup *Corbula faba*.

#### a) Suhu

Pengukuran suhu diukur dengan menggunakan Termometer Hg. Menurut Subarijanti (1990), prosedur pengukuran suhu adalah sebagai berikut:

- Termometer Hg dimasukkan ke dalam perairan, dan ditunggu beberapa saat sampai air raksa dalam termometer berhenti pada skala tertentu
- Mencatat dalam skala °C
- Membaca skala pada saat termometer yang masih ada dalam air, dan diusahakan bagaian tubuh kita jangan sampai menyentuh bagian air raksa thermometer agar tidak mempengaruhi nilai dari suhu tersebut.

**b) Derajat Keasaman (pH)**

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH. Menurut Suprpto (2011), adapun prosedur pengukuran pH adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan pH paper
- Memasukkan pH paper ke dalam sampel air sekitar 3 menit, dan tunggu sampai pH paper tersebut kering
- Kemudian dicocokkan perubahan warna pH paper dengan kotak standar.

**c) Salinitas**

Menurut Hariyadi *et al*, (1992), pengukuran salinitas dengan menggunakan alat yaitu refraktometer. Pengukuran salinitas dilakukan dengan cara :

- 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 pengintai.

**d) Oksigen Terlarut (*Dissolved Oxygen / DO*)**

Prosedur pengukuran DO dengan menggunakan DO meter tipe LUTRON DO-5510 adalah sebagai berikut :

- Menghubungkan "probe" dengan alat LUTRON DO-5510
- Masukkan "probe" ke dalam wadah yang berisi aquades
- Tekan tombol "POWER" sampai muncul %
- Arahkan tombol dari "O<sub>2</sub>" menuju "mg/L"
- Kemudian masukkan "probe" ke dalam perairan

- Tunggu sampai angka yang menunjukkan nilai DO stabil dan tidak berubah-ubah. Jika masih belum stabil dapat ditekan “ZERO”
- Hasil pengukuran DO (mg/L) dan suhu ( $^{\circ}\text{C}$ ) akan muncul pada layar
- Cuci alat menggunakan aquades.

### 3.9 Analisis Logam Berat.

Berikut merupakan metode analisis kandungan logam berat Pb pada air, kupang dan sedimen yang dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang dengan metode AAS (*Atomic Absorbstion Spectrophotometry*) adalah sebagai berikut :

- Masing-masing sampel padat ditimbang  $\pm 15$  gr dengan timbangan Sartorius untuk mendapatkan berat basah.
- Mengoven sampel padat pada suhu  $\pm 200^{\circ}\text{C}$  selama 3-5 jam sampai mendapat berat konstan.
- Menimbang berat konstan dengan timbangan Sartorius sebagai berat kering.
- Memasukkan sampel yang sudah kering ke dalam *beaker glass* 100 ml.
- Menambahkan  $\text{HNO}_3$  2 M hingga 50 ml.
- Memanaskan diatas *hot plate* di dalam kamar asam sampai  $\pm 3$  ml.
- Menyaring dengan kertas saring ke dalam labu ukur 50 ml.
- Mengulang proses penyaringan sampai tanda batas labu ukur dengan terlebih dahulu menambahkan 15 ml aquades ke dalam *beaker glass*.  
Tempat sampel.
- Menganalisis sampel dengan menggunakan mesin *Atomic Absorbstion Spectrophotometer* (AAS) pada panjang gelombang 283,3 nm.
- Menyiapkan larutan standar.

- Menganalisis larutan standar dengan mesin AAS dan mencatat nilai absorbannya kemudian membuat kurva kalibrasinya. Larutan standar ini berfungsi untuk membantu nilai konsentrasi logam Pb pada sampel, karena prinsip kerja mesin AAS hanya menentukan nilai absorbansi dengan sampel.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Keadaan Umum Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di tiga daerah muara sungai yang berbeda, yakni muara sungai Ketingan di Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton di Pasuruan. Lokasi penelitian pertama berada di muara sungai Ketingan, Sidoarjo. Menurut Bagian Telekomunikasi dan Informatika Kabupaten Sidoarjo (2015), Kabupaten Sidoarjo sebagai salah satu penyangga Ibukota Propinsi Jawa Timur merupakan daerah yang mengalami perkembangan pesat. Keberhasilan ini dicapai karena berbagai potensi yang ada di wilayahnya seperti industri dan perdagangan, pariwisata, serta usaha kecil dan menengah dapat dikemas dengan baik dan terarah. Kabupaten Sidoarjo terletak antara 112 5' dan 112 9' Bujur Timur dan antara 7 3' dan 7 5' Lintang Selatan. Topografi kabupaten dataran delta dengan ketinggian antar 0 s/d 25 m, ketinggian 0-3m dengan luas 19.006 Ha, meliputi 29,99%, merupakan daerah pertambakan yang berada di wilayah bagian timur. Wilayah bagian tengah yang berair tawar dengan ketinggian 3-10 meter dari permukaan laut merupakan daerah pemukiman, perdagangan dan pemerintahan, meliputi 40,81 %. Wilayah bagian barat dengan ketinggian 10-25 meter dari permukaan laut merupakan daerah pertanian yang meliputi 29,20%. Hidrogeologinya yakni daerah air tanah, payau, dan air asin mencapai luas 16.312.69 Ha. Kedalaman air tanah rata-rata 0-5 m dari permukaan tanah. Kabupaten Sidoarjo terletak diantara dua aliran sungai yaitu Kali Surabaya dan Kali Porong yang merupakan cabang dari Kali Brantas yang berhulu di kabupaten Malang. Beriklim tropis dengan dua musim, musim kemarau pada bulan Juni sampai Bulan Oktober dan musim hujan pada bulan Nopember sampai bulan Mei. Batas-batas wilayahnya sebagai berikut :

- Sebelah Utara : Kota Surabaya dan Kabupaten Gresik

- Sebelah Timur : Selat Madura
- Sebelah Selatan : Kabupaten Pasuruan, Kabupaten Mojokerto
- Sebelah Barat : Kabupaten Mojokerto

Pada tanggal 29 Mei 2006 terjadi semburan lumpur panas oleh PT Lapindo Brantas yang terjadi di dekat sumur eksplorasi Banjarpanji-1 di Desa Renokenongo, Kecamatan Porong, Kabupaten Sidoarjo, Jawa Timur menyebabkan kerusakan lingkungan yang hingga kini belum dapat diatasi dan dampaknya semakin meluas, salah satu yang menerima dampaknya secara tak langsung dari semburan lumpur panas ini adalah penurunan ekosistem estuari (muara sungai) yang di daerah tersebut. Meluapnya lumpur panas yang secara terus menerus dan hingga kini belum berhenti bahkan semakin bertambahnya lubang pusat semburan menyebabkan tanggul semakin dangkal sehingga tidak mungkin mampu terus menahan aliran lumpur yang semakin mengendap, maka luapan lumpur panas tersebut di pompa dan dialirkan menuju Sungai porong.

Lokasi penelitian kedua dan ketiga berada di muara sungai di daerah Bangil dan daerah Kraton, Pasuruan. Menurut Dinas Kominfo Kab. Pasuruan (2015), letak geografis wilayah Daerah tingkat II kabupaten Pasuruan berada pada posisi yang sangat strategis yaitu jalur regional juga jalur utama perekonomian Surabaya - Malang dan Surabaya – Banyuwangi. Hal tersebut menguntungkan dalam pengembangan ekonomi dan membuka peluang investasi di kabupaten Pasuruan. Kabupaten mempunyai luas wilayah 147.401,50 Ha (3,13 % luas Propinsi Jawa Timur) terdiri dari 24 Kecamatan, 24 Kelurahan, 341 Desa dan 1.694 Pedukuhan. Letak geografi Kabupaten Pasuruan antara 112 0 33' 55" hingga 113 30' 37" Bujur Timur dan 70 32' 34" hingga 80 30' 20" Lintang Selatan Wilayah daratannya dibagi menjadi 3 bagian yang salah satunya daerah pantai dengan ketinggian antara 2-8 m dpl, daerah ini membentang di bagian utara meliputi Kecamatan Nguling, Lekok, Rejoso, Kraton dan Bangil, untuk

sungai yang bermuara ke Kecamatan Bangil terdapat 2 sungai yaitu sungai Masangan di Desa Raci dan sungai Larangan di Desa Kalianyar, sedangkan sungai yang bermuara ke Kecamatan Kraton yaitu sungai Welang yang berada di Desa Pulokerto. Batas-batas wilayahnya sebagai berikut :

- Sebelah Utara : Kabupaten Sidoarjo dan Selat Madura
- Sebelah Timur : Kabupaten Probolinggo
- Sebelah Selatan : Kabupaten Malang
- Sebelah Barat : Kabupaten Mojokerto

#### 4.2 Deskripsi Lokasi Penelitian

Pada penelitian ini terdapat 3 stasiun penelitian yang diteliti, dimana pada setiap stasiun diambil 3 titik/plot dan jarak tiap plot yaitu 200 m dari setiap titik. Berikut merupakan deskripsi dari 3 stasiun penelitian:

##### 4.2.1 Muara Sungai Ketingan di Daerah Sidoarjo

Pada stasiun pengamatan 1, pengambilan sampel dilakukan di sungai Ketingan, kecamatan Candi Kabupaten Sidoarjo yang langsung bermuara menuju muara sungai Porong. Merupakan daerah yang sering didatangi oleh nelayan untuk mencari kupang (*Corbula faba*). Penentuan stasiun pengamatan 1 tersebut dipilih karena di sekitar daerah tersebut terdapat beberapa yang membuang limbah langsung ke sungai. Selain itu menurut Pahlevi dan Wiweka (2010), sumber material sedimen di pesisir disebabkan karena pesisir Sidoarjo-Pasuruan banyak terdapat muara sungai yang memiliki debit sungai relatif tinggi (500-1100 m<sup>3</sup>/detik). Ditambah sejak tahun 2006 terjadi limpahan sedimen yang berasal dari bencana lumpur lapindo yang dialirkan ke selat Madura melalui Kali Porong. Hal ini bisa dilihat perbedaan antara citra akuisisi sebelum terjadinya bencana lumpur lapindo, konsentrasi sedimen suspensi Kali Porong dan Kali Ketingan berada pada kelas sedang yaitu antara 50 – 100 mg/l. Pada citra akuisisi setelah bencana lumpur lapindo berada dalam kelas 100 – 150 mg/l.

Luapan lapindo sendiri juga mengandung logam berat yang salah satu diantaranya yakni timbal. Muara sungai Ketingan merupakan daerah yang berbatasan langsung dengan Selat Madura, dimana Selat Madura merupakan tempat untuk mengalirkan luapan lumpur Lapindo menuju ke laut sehingga secara tidak langsung muara Sungai Ketingan menerima dampak dari pembuangan luapan lumpur Lapindo. Lokasi stasiun pengamatan 1 muara sungai Ketingan, Sidoarjo dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Muara Sungai Ketingan di Daerah Sidoarjo

#### **4.2.2 Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan**

Pada stasiun pengamatan 2, pengambilan sampel dilakukan di muara sungai daerah kecamatan Bangil, Pasuruan. Muara ini merupakan daerah tempat nelayan mencari kupang (*Corbula faba*). Muara sungai Bangil masih mendapat pengaruh dari aliran lumpur lapindo yang dialirkan ke muara sungai Porong. Selain itu di wilayah Bangil sendiri banyak terdapat tambak-tambak serta usaha budidaya perikanan yang membuang limbahnya langsung ke perairan sungai tanpa proses pengolahan terlebih dahulu dan juga adanya masukan dari limbah domestik ke perairan tersebut. Lokasi stasiun pengamatan 2 di daerah Bangil, Pasuruan dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan

#### **4.2.3 Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan**

Pada stasiun pengamatan 3, pengambilan sampel dilakukan di muara sungai di daerah kecamatan Kraton, Pasuruan. Daerah Kraton juga merupakan daerah yang sangat terkenal dengan nelayan kupang, sehingga daerah ini merupakan daerah yang juga sering oleh nelayan untuk menangkap kupang. Penentuan stasiun pengamatan 3 tersebut dipilih karena daerah Pasuruan banyak terdapat pabrik-pabrik yang membuang limbah ke sungai tanpa diolah terlebih dahulu. Selain itu aktivitas penangkapan dengan kapal bermotor juga menambah masukan timbal di perairan karena menggunakan bahan bakar solar dan juga adanya kebocoran bahan bakar kapal yang turut juga menyumbang kandungan Pb di perairan ini. Selain itu, berbeda dengan stasiun pengamatan 2 yang langsung berbatasan dengan muara sungai Porong, muara sungai Kraton sendiri berada agak jauh dari muara sungai Porong sehingga tidak terlalu mendapat pengaruh dari luapan lumpur lapindo.

Lokasi stasiun pengamatan 3 muara sungai di daerah kecamatan Kraton, Pasuruan dapat dilihat pada Gambar 5.



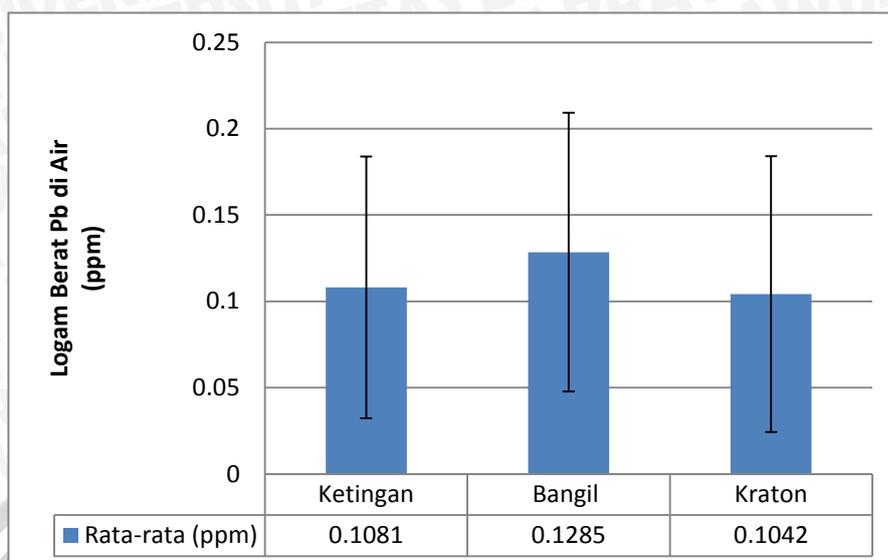
**Gambar 5.** Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan

### **4.3 Hasil Analisis Logam Berat Pb**

#### **4.3.1 Hasil Analisis Logam Berat Pb di Air**

Pengambilan sampel logam berat pada air dilakukan pada 3 stasiun penelitian, stasiun 1 merupakan muara sungai Ketingan di daerah Sidoarjo, stasiun 2 merupakan muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan stasiun 3 merupakan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan. Analisis logam berat Pb dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Malang. Berdasarkan hasil analisis logam berat pada perairan di tiga muara sungai, diketahui bahwa logam berat Pb dengan konsentrasi bervariasi pada tiap stasiun penelitian. Untuk lebih jelasnya hasil pengukuran kandungan logam berat di tiga muara sungai yakni daerah muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, dapat dilihat pada Lampiran 3.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai logam berat Pb di air memiliki rentang nilai yang cukup berbeda pada setiap titik di tiap stasiun. Perbandingan nilai Pb pada 3 stasiun yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 6 berikut:



**Gambar 6.** Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Air

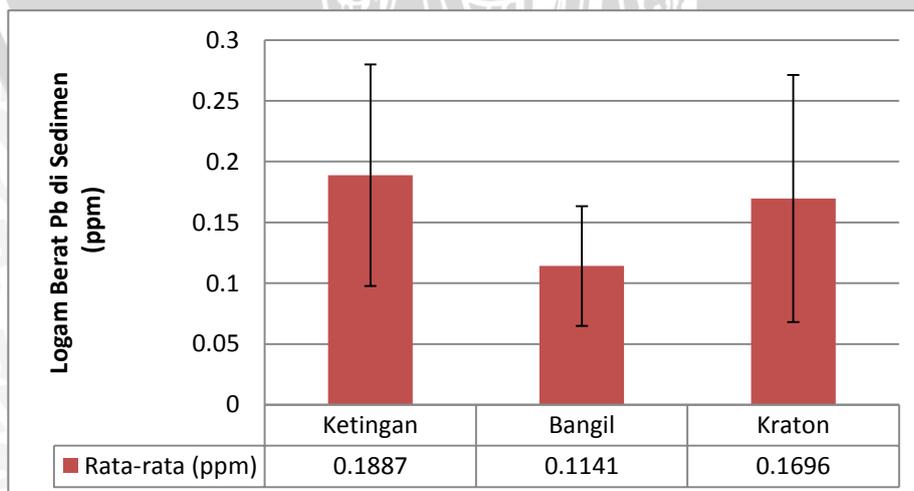
Dari tiga stasiun pengamatan, diketahui bahwa kadar logam berat Pb cukup tinggi disetiap stasiunnya. Pada muara sungai Ketingan di Sidoarjo nilai logam berat Pb berkisar antara 0,0245-1,1723 ppm, muara sungai di daerah Bangil di Pasuruan berkisar antara 0,0794-0,2216 ppm dan muara sungai di daerah Kraton di Pasuruan berkisar antara 0,0221-0,1815 ppm. Rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb di air terdapat di muara sungai di daerah Bangil yakni sebesar  $0,0,1285 \pm 0,0806$  ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di muara sungai di daerah Kraton yakni sebesar  $0,1042 \pm 0,0798$  ppm dan untuk muara sungai Ketingan nilai rata-rata yaitu  $0,1081 \pm 0,0757$  ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kadar logam berat Pb di tiga muara sungai tersebut kurang baik digunakan untuk kehidupan organisme dan juga berada di atas ambang batas yang telah ditetapkan oleh Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001 yaitu sebesar 0,03 mg/l. Begitu pula jika dibandingkan dengan Kepmen LH No. 51 Tahun 2004 tentang baku mutu air laut untuk biota laut, nilai ambang batas Pb untuk kepentingan biota laut tidak boleh lebih dari 0,008 mg/l. Logam berat secara alami memiliki konsentrasi yang rendah pada perairan (Hutagalung,

1984). Pada konsentrasi tertentu logam berat akan bersifat toksik dan berbahaya bagi kehidupan organisme perairan.

Tingginya nilai logam berat Pb di lokasi muara sungai Ketingan, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton disebabkan oleh aktivitas manusia seperti pembuangan limbah pabrik, aktivitas perikanan dan adanya aliran lumpur lapindo yang dibuang ke laut. Menurut Murtini dan Peranginangin (2006), mengatakan bahwa logam timbal (Pb) yang masuk ke dalam perairan melalui pengendapan dan jatuhnya debu yang mengandung Pb dari hasil pembakaran bensin, erosi dan limbah industri. Merchand *et al.* (2011), menambahkan bahwa sumber timbal (Pb) bisa berasal dari kendaraan yang menggunakan bahan bakar bertimbal dan juga dari biji logam hasil pertambangan, peleburan, pabrik pembuatan timbal atau recycling industri, debu, tanah, cat, mainan, perhiasan, air minum, permen, keramik, obat tradisional dan komestik.

#### 4.3.2 Hasil Analisis Logam Berat Pb di Sedimen

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kandungan Pb pada sedimen memiliki rentang nilai yang cukup berbeda di tiap stasiun di setiap stasiun yang dapat dilihat pada Gambar 7 berikut:



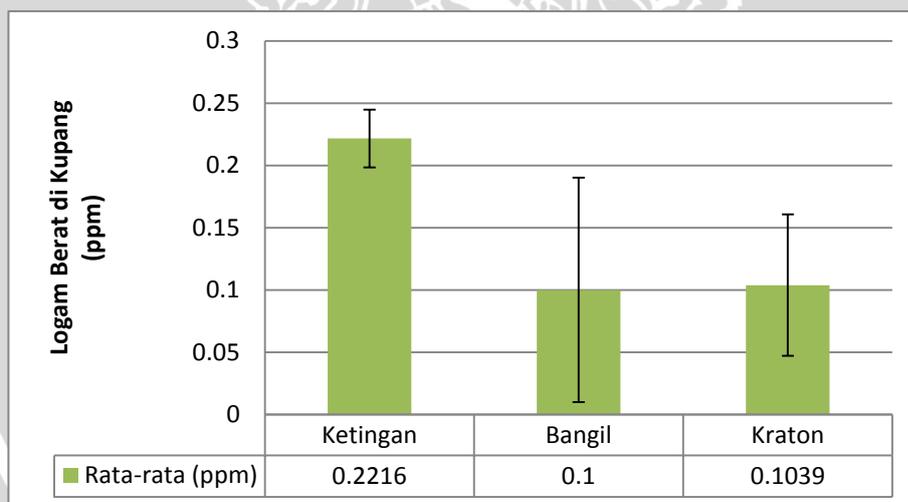
**Gambar 7.** Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Sedimen

Dari tiga stasiun pengamatan, diketahui bahwa kadar logam berat Pb tidak terlalu tinggi di setiap stasiunnya. Pada muara sungai Ketingan di Sidoarjo nilai logam berat Pb berkisar antara 0,0966– 0,2789 ppm, muara sungai di daerah Bangil di Pasuruan berkisar antara 0,084 – 0,1711 ppm dan muara sungai daerah Kraton di Pasuruan berkisar antara 0,0542 – 0,2457 ppm. Rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb di sedimen terdapat di muara sungai Ketingan, Sidoarjo yakni sebesar  $0,1887 \pm 0,0911$  ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di muara sungai daerah Bangil, Pasuruan yakni sebesar  $0,1141 \pm 0,0493$  ppm dan untuk muara sungai Kraton nilai rata-rata yaitu  $0,1696 \pm 0,10163$  ppm. Data diatas menunjukkan bahwa kadar logam berat Pb di tiga muara sungai tersebut masih baik digunakan untuk kehidupan organisme dan juga berada di bawah ambang batas yang telah ditetapkan oleh *Dutch Quality Standards for Metal in Sediment* (IADC/CEDA, 1997) yaitu  $< 85$  ppm. Menurut Novianto *et al.* (2012) rendahnya nilai logam berat Pb di sedimen dikarenakan sedimen mudah tersuspensi karena pergerakan massa air yang akan melarutkan kembali logam yang dikandungnya dalam air. selain itu, penelitian ini dilakukan pada saat musim hujan, sehingga debit air yang masuk ke perairan menjadi meningkat. Sanusi (1986) juga menyatakan bahwa konsentrasi logam berat cenderung menurun pada lokasi yang jauh dari daratan. Logam berat yang ada dalam badan perairan akan mengalami proses pengendapan dan terakumulasi dalam sedimen, kemudian terakumulasi dalam tubuh biota laut yang ada dalam perairan (termasuk kerang yang bersifat sessil dan sebagai bioindikator) baik melalui insang maupun melalui rantai makanan dan akhirnya akan sampai pada manusia. Fenomena ini dikenal sebagai bioakumulasi atau biomagnifikasi (Dahuri, 1996).

Tinggi rendahnya konsentrasi logam berat disebabkan oleh jumlah masukan limbah logam berat ke perairan. Semakin besar limbah yang masuk ke dalam suatu perairan, semakin besar konsentrasi logam berat di perairan. Selain itu musim juga turut berpengaruh terhadap konsentrasi, dimanapada musim penghujan konsentrasi logam berat cenderung lebih rendah karena terencerkan oleh air hujan. Logam berat yang masuk perairan akan mengalami pengendapan, pengenceran dan dispersi, kemudian diserap oleh organisme yang hidup di perairan. Pengendapan logam berat terjadi karena adanya anion karbonat, hidroksil dan klorida (Hutagalung, 1984).

#### 4.3.3 Hasil Analisis Logam Berat di Tubuh Kupang

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kandungan Pb pada tubuh Kupang (*Corbula faba*) di setiap stasiun dapat dilihat pada Gambar 8 berikut:



**Gambar 8.** Grafik Rata-rata Kadar Logam Berat Pb di Kupang

Dari tiga stasiun pengamatan, diketahui bahwa kadar logam berat Pb pada tubuh kupang cukup berbeda disetiap stasiunnya. Pada muara sungai Ketingan di Sidoarjo nilai rata-rata logam berat Pb berkisar antara 0,1952 – 0,2388 ppm, muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan berkisar antara 0,0072 – 0,1872 ppm dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan berkisar antara

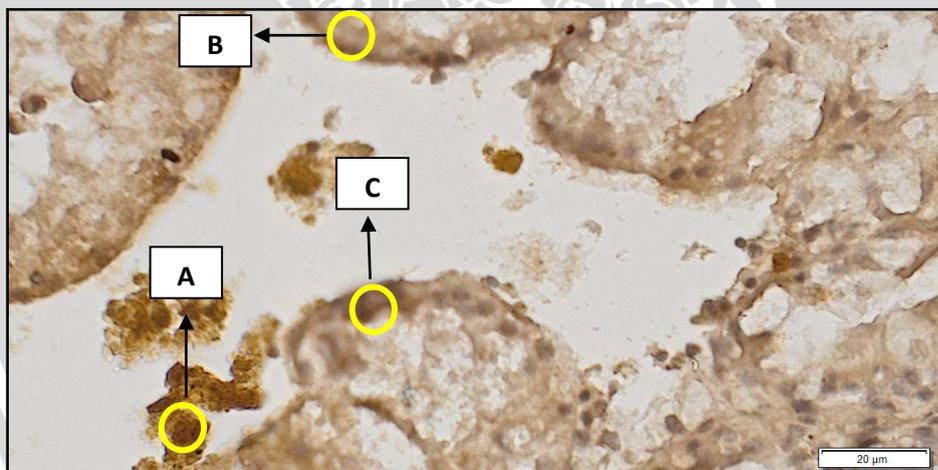
0,0462– 0,1597 ppm. Rata-rata nilai tertinggi logam berat Pb kupang terdapat di muara sungai Ketingan, Sidoarjo yakni sebesar  $0,2216 \pm 0,0232$  ppm, sedangkan untuk rata-rata terendah berada di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan yakni  $0,1 \pm 0,0901$  ppm dan untuk muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan nilai rata-rata yaitu sebesar  $0,1039 \pm 0,0567$  ppm. Data di atas menunjukkan bahwa nilai logam berat Pb di tiga muara sungai tersebut pada tubuh kupang tidak terlalu tinggi dan masih berada di bawah ambang batas baku mutu yang menurut Badan Standarisasi Nasional (2009) yakni untuk kekerangan (bivalve), moluska dan teripang yakni  $< 1,5$  mg/kg.

Logam berat yang masuk kedalam perairan dapat terakumulasi dalam tubuh organisme. Fitriyah (2007) menjelaskan bahwa logam berat yang berada dalam tubuh kerang selain berasal dari air laut juga berasal dari makanan yang selanjutnya mengalami biomagnifikasi. Selain itu bivalvia juga merupakan hewan *filter feeder* sehingga memungkinkan akumulasi logam berat Pb pada tubuh Kupang (*Corbula faba*). Menurut Brotomidjoyo *et al.* (1995), kupang adalah filter feeder, makan bakteri, algae bersel satu dan bahan sisa lainnya

#### **4.4 Ekspresi Metallothionein pada Tubuh Kupang dengan Metode Imunohistokimia**

Metallothionein juga digunakan sebagai indikator pencemaran karena kepekaan dan keakuratannya. Hal ini didasarkan bahwa dimana logam-logam dapat tersekap di dalam jaringan tubuh organisme yang dimungkinkan karena adanya protein tersebut. Metallothionein merupakan protein pengikat logam (*metal binding protein*) yang berfungsi dan berperan dalam proses pengikatan ataupun penyekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Anwari, 2009). Ekspresi metallothionein pada tubuh kupang menggunakan teknik imunohistokimia yang diambil dari tiga stasiun yang berbeda didapatkan hasil

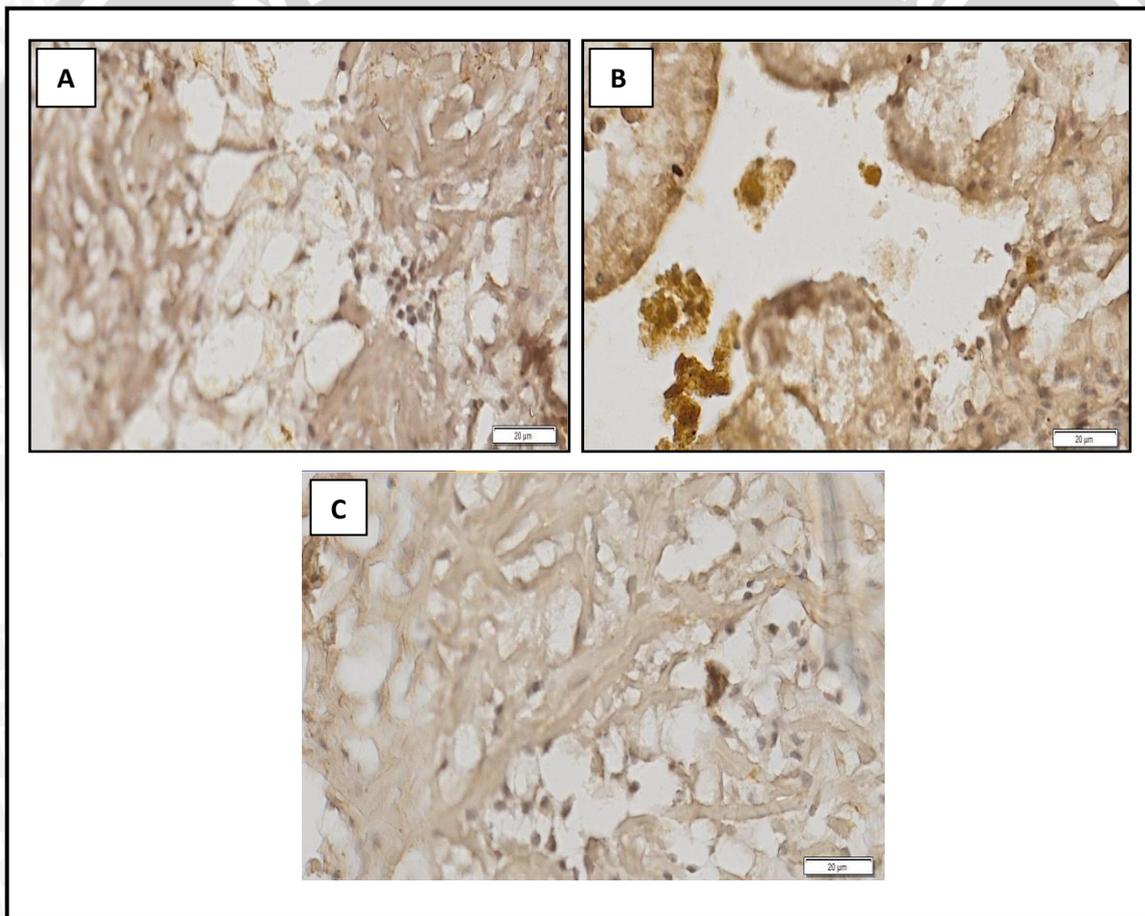
bahwa metallothionein tereksresi pada gambar berupa blok-blok yang berwarna coklat. Hal ini sesuai dengan pendapat Irvan (2007), bahwa dalam metode imunohistokimia digunakan juga untuk mendeteksi atau mengukur kandungan metallothionein yang diukur dengan memeriksa intensitas warna yang dihasilkan. Intensitas yang dihasilkan akibat reaksi ini dibagi menjadi tiga kelas, yang reaksi positif kuat ditunjukkan dengan warna coklat gelap sampai coklat kehitaman (+ + +), positif sedang yang ditunjukkan oleh warna dari coklat gelap ke terang coklat (+ +), dan positif lemah yang ditunjukkan oleh coklat kemerahan (+). Semakin banyaknya jumlah blok dan semakin meratanya warna coklat maka semakin banyak pula ekspresi metallothionein yang ditunjukkan. Untuk lebih jelasnya gambar ekspresi metallothionein dengan teknik imunohistokimia dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Ekspresi Metallothionein (A) Positif Kuat, (B) Positif Sedang, (C) Positif Lemah

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa sama halnya dengan kandungan logam berat, metallothionein terlihat muncul dan berwarna coklat tua hingga coklat kehitaman pada jaringan di tubuh kupang, untuk mengikat logam berat Pb yang masuk pada saat kupang menyaring makanan. Antibodi primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibodi anti Metallothionein yaitu untuk mengikat antigen jaringan, setelah itu diikat lagi dengan antibodi sekunder

yaitu Anti-Rabbit. Baik pada stasiun 1 yaitu muara sungai Ketingan di Sidoarjo, stasiun 2 yaitu muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan stasiun 3 di muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, hampir di keseluruhan stasiun menunjukkan adanya kandungan metallothionein. Menurut Saeni (2003) bahwasannya kerang adalah salah satu biota laut yang paling efisien mengakumulasi logam berat. Hal ini disebabkan, kerang hidup di lapisan sedimen dasar perairan, bergerak sangat lambat, dan makanannya berupa detritus di dasar perairan, sehingga peluang masuk logam berat ke dalam tubuh sangat besar. Ekspresi metallothionein pada masing-masing stasiun dapat dilihat pada Gambar 10.



**Gambar 10.** Ekspresi Metallothionein (A) Muara Sungai Ketingan, Sidoarjo (B) Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan, dan (C) Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.

Proses terbentuknya warna coklat dijelaskan oleh Ramos dan Vara (2005), bahwa prinsip pewarnaan imunohistokimia metode peroksidase, yaitu

antigen yang ada pada jaringan diikat dengan antibodi primer yang spesifik. Lalu antibodi primer yang terikat antigen kemudian diikat pula dengan antibodi sekunder (anti antibodi primer) yang telah dilabel enzim peroksidase. Penambahan substrat yang berisi kromogen dan  $H_2O_2$  akan memunculkan endapan berwarna coklat dan  $H_2O$ . Endapan coklat merupakan hasil penguraian substrat (kromogen dan  $H_2O$ ) oleh enzim peroksidase. Warna coklat yang muncul menandakan reaksi positif (+), yang artinya di dalam jaringan terdapat antigen. Apabila di jaringan tersebut tidak terdapat antigen, maka tidak akan muncul warna coklat.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Irvan (2007), dijelaskan bahwa enzim antioksidan Cu,Zn-SOD di jaringan hati dikenali sebagai antigen oleh antibodi primer (antibody monoklonal terhadap Cu,Zn-SOD). Pengikatan antigen dilakukan oleh antibody primer. Selanjutnya, antibody primer akan berikatan dengan antibodi sekunder yang telah dikonjugasikan dengan peroksidase (DEPS) sehingga keberadaan peroksidase ini melambangkan adanya kompleks antigen-antibodi. Peroksidase berfungsi mengkatalis reaksi antara kromogen (diamino benzidine atau DAB) dan hydrogen peroksidase ( $H_2O_2$ ), sehingga terbentuk endapan berwarna coklat yang menunjukkan keberadaan SOD. Semakin tua intensitas warna coklatnya berarti semakin banyak kandungan SOD-nya.

Imunohistokimia merupakan suatu cara yang digunakan untuk mengetahui kadar antibodi atau antigen atau derajat imunitas dalam sediaan jaringan. Pewarnaan sediaan jaringan mengakibatkan ikatan antibodi pada antigen dipermukaan atau didalam sel yang selanjutnya dapat dideteksi dengan cara dilabel dengan enzim, *isotop*, *fluoropore*, atau *colloidal gel*. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop

cahaya, untuk memvisualisasikan hasil interaksi antara antigen dan antibodi dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, dimana cara yang paling sering digunakan adalah dengan konjugasi antibodi dengan enzim seperti peroksidase. Selain itu juga bisa digunakan *fluoropore* seperti *fluorosein* atau *rhodamin*. Untuk mempelajari morfologi sel, sel dalam jaringan difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop electron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003). Larasati (2010) juga menjelaskan bahwa imunohistokimia merupakan suatu proses mengidentifikasi protein spesifik pada jaringan atau sel dengan menggunakan antibodi. Tempat pengikatan antara antibodi dengan protein spesifik diidentifikasi dengan marker yang biasanya diletakkan pada antibodi dan bisa divisualisasi secara langsung atau dengan reaksi untuk mengidentifikasi marker. Marker dapat berupa senyawa berwarna zat berflouresensi, logam berat, label radioaktif, atau enzim metode tidak langsung menggunakan dua macam antibody, yaitu antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer bertugas mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (first layer), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (second layer). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibody sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu. Penggunaan kromogen fluorescent dye seperti FITC, rodhamin dan Texas-red disebut metode immunoflourescence, sedangkan penggunaan kromogen enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase disebut metode immunoenzyme.



## 4.5 Hasil Analisis Densitas dan Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang

### 4.5.1 Hasil Analisis Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang

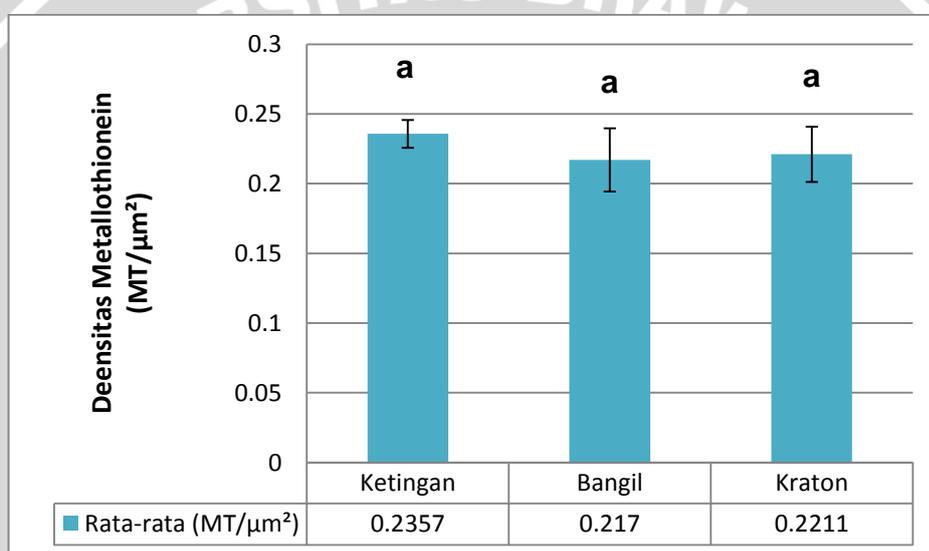
Densitas metallothionein merupakan kuantitas biofisik yang berhubungan langsung dengan penentuan jumlah metallothionein per luas lapang pandang. Hasil penghitungan jumlah metallothionein disajikan pada lampiran 4. Dari tersebut dapat diketahui bahwa kandungan logam berat pada kupang dan metallothionein yang juga tereksresi pada gambar, hasil penelitian menunjukkan bahwa densitas metallothionein tertinggi ditemukan pada muara sungai Ketingan, dimana muara sungai ini sendiri mendapat masukan limbah dari pabrik dan lumpur lapindo, sedangkan densitas metallothionein terendah pada muara sungai di daerah Bangil. Rata-rata densitas metallothionein dari ketiga stasiun, dimana masing-masing stasiun terdapat tiga titik/plot yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini.

**Tabel 3.** Data Hasil Analisis Densitas Metallothionein

Lapang Pandang	Densitas Metallothionein (MT/ $\mu\text{m}^2$ )								
	Stasiun								
	I (Ketingan)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.2468	0.2489	0.2392	0.2347	0.2535	0.1939	0.1908	0.2503	0.1968
2	0.2414	0.2329	0.2216	0.2158	0.2421	0.1967	0.2184	0.2435	0.2184
3	0.2270	0.2406	0.2237	0.2024	0.2233	0.1912	0.2116	0.2293	0.2316
<b>Rata-rata</b>	<b>0.2357</b>			<b>0.2170</b>			<b>0.2211</b>		
<b>Standar Deviasi</b>	<b>0.0099</b>			<b>0.0227</b>			<b>0.0198</b>		

Dari hasil penelitian, diketahui bahwa nilai densitas metallothionein pada muara sungai Ketingan, Sidoarjo berkisar antara  $22,37 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$  –  $24,89 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-rata yaitu sebesar  $23,57 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$ . Pada muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan nilai densitas metallothionein berkisar antara  $19,12 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$  –  $25,35 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-rata yaitu sebesar  $21,70 \times 10^{-2}$  MT/ $\mu\text{m}^2$ . Pada muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan

nilai densitas metallothionein berkisar antara  $19,08 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  –  $25,03 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$  dengan nilai rata-rata yaitu sebesar  $22,11 \times 10^{-2} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$ . Hasil densitas metallothionein sesuai dengan respon dari tubuh kupang terhadap penyerapan logam berat yang menunjukkan kadar logam berat dalam tubuh kupang, dimana pada muara sungai Ketingan nilai rata-rata metallothionein hampir seragam dan cukup tinggi jika dibandingkan dengan muara sungai di daerah Kraton dan muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan. Berikut merupakan grafik rata-rata intensitas metallothionein dapat dilihat pada Gambar 11.



**Gambar 11.** Rata-rata Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang dengan Uji Anova dengan Uji Lanjutan Uji Tukey

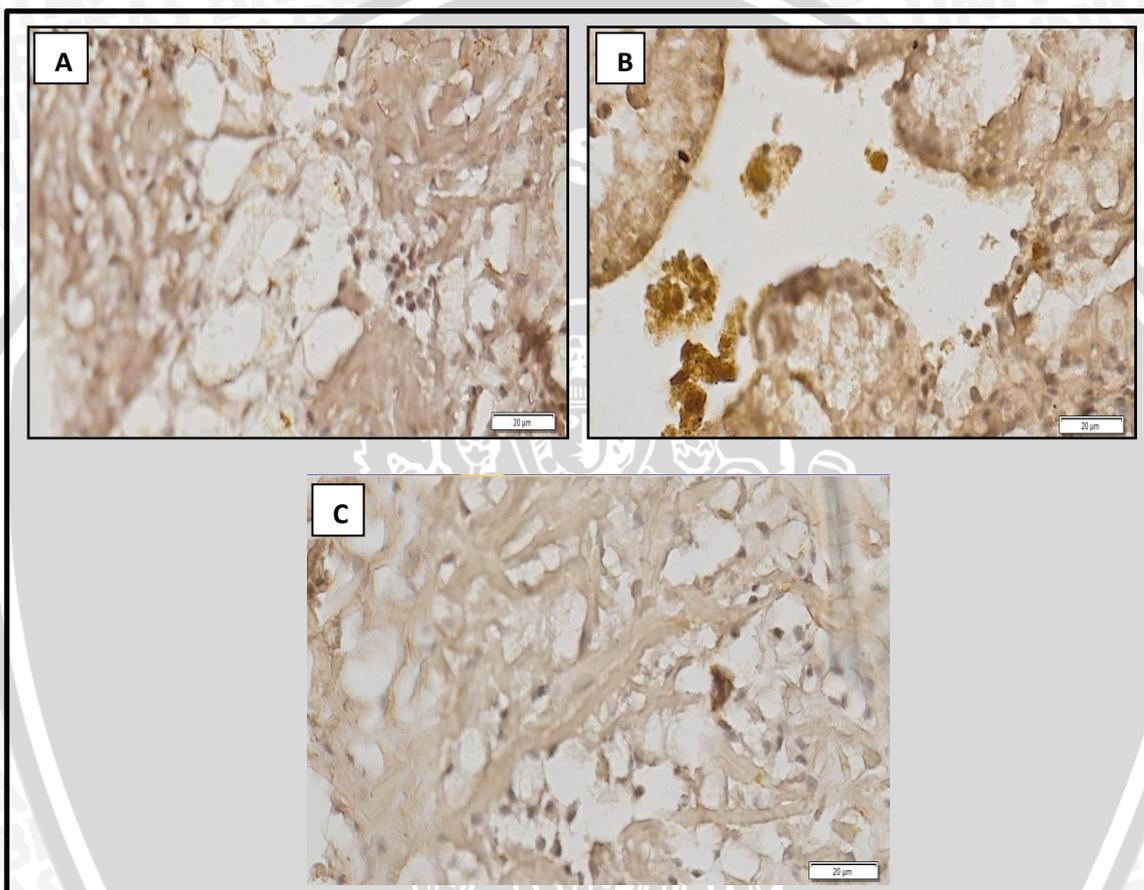
Dari nilai grafik di bawah dapat diketahui bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi logam berat yang terpapar dalam tubuh organisme maka semakin besar pula densitas dari metallothionein di dalam tubuh organisme tersebut, begitu juga sebaliknya. Menurut Hertika *et al.* (2014), kepadatan metallothionein adalah kuantitas biofisik yang memiliki hubungan langsung dengan penentuan nomor MT per lebar cakupan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa MT dinyatakan dengan munculnya blok coklat pada insang dan interior jaringan rongga kijing Taiwan. Kecerahan atau kegelapan blok coklat menunjukkan tingkat viskositas MT. Menurut Roesijadi (1994), menjelaskan tingkat serapan

yang lebih tinggi pada logam berat akan mencerminkan kepadatan lebih tinggi dan / atau aktivitas dari sistem dalam sel di hepatopankreas kerang. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan fakta bahwa pada insang kerang merupakan daerah utama penyerapan ion logam yang masuk melalui air yang ditandai dengan tingginya intensitas transport aktif dan pasif ion ion logam masuk ke jaringan. Tingkat ini berguna untuk mengukur kepadatan dan intensitas blok coklat. Penelitian menyimpulkan bahwa kepadatan MT dan intensitas kerang taiwan disajikan dalam rongga interior yang lebih tinggi dibandingkan dengan insang. Rata-rata kepadatan MT dan Intensitas meningkat dengan peningkatan dosis paparan. Kenaikan tertinggi ditemukan di  $PbNO_3$  dosis paparan 30 ppm, tetapi menurun pada dosis 40 ppm.

Selain itu, densitas metalothionein dianalisis dengan menggunakan uji Anova dengan uji lanjutan yaitu uji Tukey pada SPSS (Lampiran 10). Dari grafik di atas didapatkan kesimpulan bahwa densitas rata-rata metallothionein di muara sungai Ketingan, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton dianggap tidak berbeda nyata. Hal ini dikarenakan pada uji ANOVA didapatkan hasil bahwa nilai signifikannya  $>0,05$  yakni sebesar 0,425. Dimana diketahui bahwa nilai  $H_0$  diterima bila nilai signifikannya  $>0,05$  sedangkan nilai  $H_0$  ditolak bila nilai signifikannya  $<0,05$ .

#### 4.5.2 Hasil Analisis Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang

Intensitas metallothionein diketahui dengan menggunakan software ImageJ pada area 225 dengan lebar 15 dan tinggi 15. Hasil pengamatan intensitas metallothionein di tubuh kupang ditunjukkan pada Gambar 12 berikut ini:



**Gambar 12.** Intensitas Metallothionein (A) Muara Sungai Ketingan, Sidoarjo (B) Muara Sungai di Daerah Bangil, Pasuruan, dan (C) Muara Sungai di Daerah Kraton, Pasuruan.

Hasil perhitungan untuk mengetahui nilai intensitas metallothionein pada masing-masing stasiun yakni stasiun 1 di muara sungai Ketingan, stasiun 2 di muara sungai di daerah Bangil dan stasiun 3 di muara sungai di daerah Kraton disajikan pada lampiran 6. Sehingga didapatkan hasil rata-rata dari intensitas metallothionein pada masing-masing lapang pandang yang ditunjukkan pada Tabel 4 berikut ini:

**Tabel 4.** Data Hasil Rata-rata Intensitas Metallothionein

Lapang Pandang	Intensitas Metallothionein (Pixel)								
	Stasiun								
	I (Ketingan)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	29732	30440	29165	30017	26508	28912	26293	29143	28850
2	31689	30411	31880	29059	29091	30074	28492	29639	29302
3	30824	30256	29780	24432	24795	28332	27512	27825	27396
Rata-rata	30552,83			27913,33			28272,44		
Standar Deviasi	892,53			2144,31			1091,55		

Seperti halnya dengan hasil analisis dari densitas metallothionein pada tubuh kupang, hasil penelitian terhadap intensitas Metallothionein menunjukkan bahwa densitas dan intensitas metallothionein memiliki hubungan yang linear. Intensitas metallothionein yang ditemukan tertinggi pada stasiun 1 merupakan daerah selain sebagai tempat penangkapan kupang juga merupakan daerah pembuangan limbah dari berbagai pabrik di Sidoarjo dan juga adanya aliran lumpur Lapindo yang melewati muara sungai tersebut sedangkan intensitas metallothionein terendah pada stasiun 2 yang hanya digunakan sebagai daerah penangkapan kupang saja di wilayah Bangil, Pasuruan. Intensitas Metallothionein pada stasiun 1 berkisar antara 29732 pixel – 31880 pixel, stasiun 2 berkisar antara 24432 pixel – 30074 pixel dan pada stasiun 3 yakni di daerah Kraton berkisar antara 26293 pixel – 29639 pixel. Intensitas warna Metallothionein berbeda-beda pada setiap stasiun tergantung pada tingkat penyerapan logam berat oleh tubuh kupang.

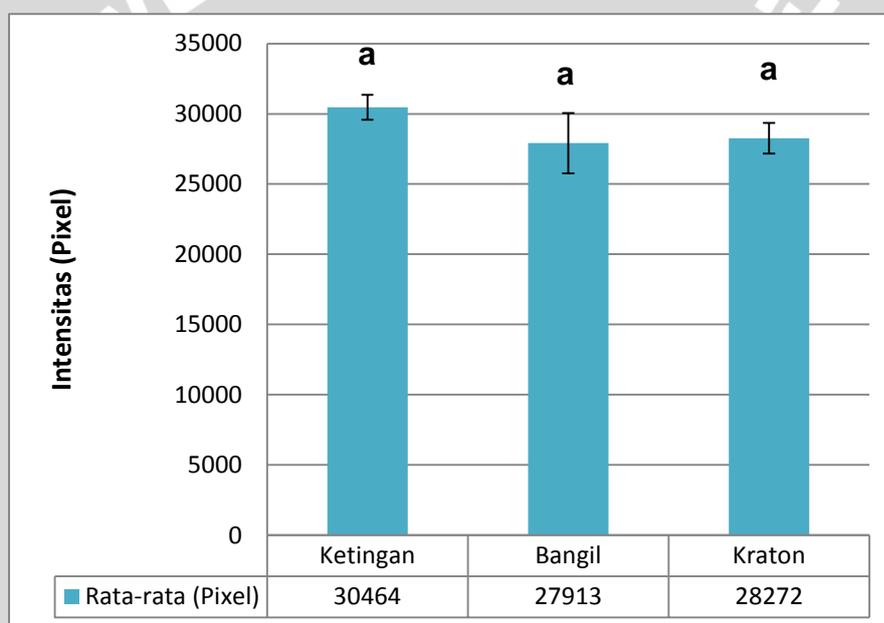
Dari grafik dibawah dapat dilihat bahwa kadar metallothionein pada tubuh kupang , rata-rata nilai intensitas tertinggi terdapat pada muara sungai Ketingan dimana rata-rata dari tiap plot perbedaanya tidak terlalu tinggi, sedangkan rata-rata nilai Intensitas terendah pada muara sungai di daerah Bangil dimana

terdapat nilai plot yang tinggi namun juga terdapat nilai plot rendah. Menurut Amiard *et al.* (2006) menyatakan bahwa beberapa dari peneliti menjelaskan, suatu organisme yang hidup pada daerah yang tercemar logam berat mempunyai konsentrasi metallothionein yang lebih tinggi. Ringwood *et al.* (2004), menjelaskan bahwa ada hubungan positif antara metallothionein dan polutan logam berat. Kontaminan logam berat dapat mengakibatkan kerusakan sistemik suatu organisme dan mengakibatkan kelebihan produksi metallothionein. Menurut Dewi (2012), berbagai jenis logam berat, seperti besi (Fe), Kadmium (Cd), Timbal (Pb), Nikel (Ni), Tembaga (Cu) dan Merkuri (Hg) ditemukan dalam kuantitas yang bervariasi pada semua jenis sampel air yang diambil, meskipun tidak semua keberadaan logam berat melebihi baku mutu. Namun demikian, keberadaan logam berat dikhawatirkan sewaktu-waktu dapat melebihi nilai baku mutu karena kontribusi limbah masyarakat dan industri yang dibuang setiap harinya relatif tinggi.

Dalam menyatakan nilai intensitas menggunakan satuan yaitu pixel, yang mana dijelaskan oleh Cragger *et al.* (2006), bahwa pixel merupakan dasar satuan komparasi analisis kuantitatif untuk ekspresi protein dalam penggunaan imunofluorescent untuk mengenali dan sebagai pembeda warna gelap untuk Metallothionein. Algoritma ini digunakan untuk mengukur ekspresi daripada marker yang penting melalui seluler dan subseluler. Informasi variabel melalui (AQUA score) yaitu dapat diketahui melalui intensitas pixel/pixel area dengan nilai yang disesuaikan pada kapasitas suatu gambar sehingga dasar dari rata-rata intensitas dapat diketahui melalui evaluasi dari semua jumlah pixel yang ada pada gambar.

Pixel adalah elemen terkecil dari sebuah gambar. Satu gambar dapat terdiri dari ribuan bahkan jutaan pixel. Satu pixel tidak mempunyai arti apa-apa karena itu hanyalah satu titik dengan warna tertentu. Satu pixel hanyalah sebuah

titik. Sebuah gambar adalah jutaan pixel. Bila terdapat sebuah gambar yang memiliki 3000 x 2000 pixel (3000 pixel kiri ke kanan, 2000 pixel atas kebawah), maka pada gambar tersebut terdapat total 3000 x 2000 = 6.000.000 pixel. Pada digital photography, terdapat dua sistem untuk menentukan warna apa pada pixel tertentu. Sistem tersebut adalah sistem CMYK yang berarti Cyan Magenta Yellow and Black, serta sistem RGB yang berarti Red Green Blue. CMYK banyak dipakai pada percetakan digital dan imaging. Sedangkan RGB adalah standart de facto pada digital photography dan internet (Krisnadi, 2012). Grafik rata-rata intensitas Metallothionein dapat dilihat pada Gambar 12.



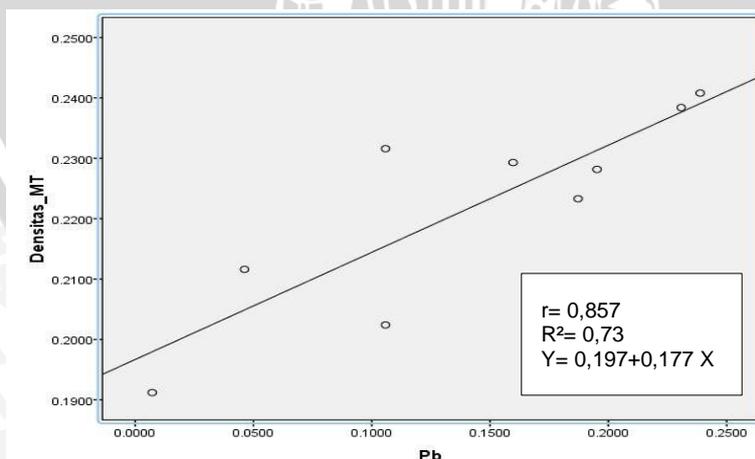
**Gambar 13.** Rata-rata Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang (*Corbula faba*) dengan Uji Anova dengan Uji Lanjutan Uji Tukey

Selain itu, intensitas metallothionein dianalisis juga dengan menggunakan uji Anova dengan uji lanjutan yaitu uji Tukey pada SPSS (Lampiran 11). Dari grafik di atas didapatkan intensitas rata-rata metallothionein di muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, dianggap tidak berbeda nyata. Hal ini dikarenakan pada uji ANOVA didapatkan hasil bahwa nilai signifikannya  $>0,05$  yakni sebesar 0,491 Dimana diketahui bahwa nilai  $H_0$  diterima bila nilai signifikannya  $>0,05$

sedangkan nilai  $H_0$  ditolak bila nilai signifikannya  $<0,05$ . Menurut Ringwood *et al.*, (2004), menjelaskan bahwa ada hubungan positif antara metallothionein dan polutan logam berat. Kontaminan logam berat dapat mengakibatkan kerusakan sistem suatu organisme dan mengakibatkan kelebihan produksi metallothionein. Kemudian dijelaskan oleh Regoli *et al.*, (2006), banyak spesies mensintesis metallothionein dan dapat dilakukan uji toksisitas logam melalui pengukuran metallothionein. Sebagaimana kita ketahui metallothionein merupakan protein pengikat logam berat yang berperan dalam proses pengikatan ataupun penyekapan logam berat di dalam jaringan setiap makhluk hidup.

#### 4.6 Analisis Hubungan Logam Berat Pb pada Tubuh Kupang dengan Densitas Metallothionein pada Tubuh Kupang.

Hasil analisis regresi linier sederhana menunjukkan besarnya kandungan logam berat Pb yang terpapar pada kupang mempengaruhi besarnya kandungan Metallothionein yang ada pada tubuh kupang. Densitas metallothionein akan terus meningkat sesuai dengan kenaikan konsentrasi logam berat pada tubuh kupang. Grafik hubungan antara logam berat Pb dan densitas Metallothionein pada tubuh kupang tersaji pada Gambar 14 .

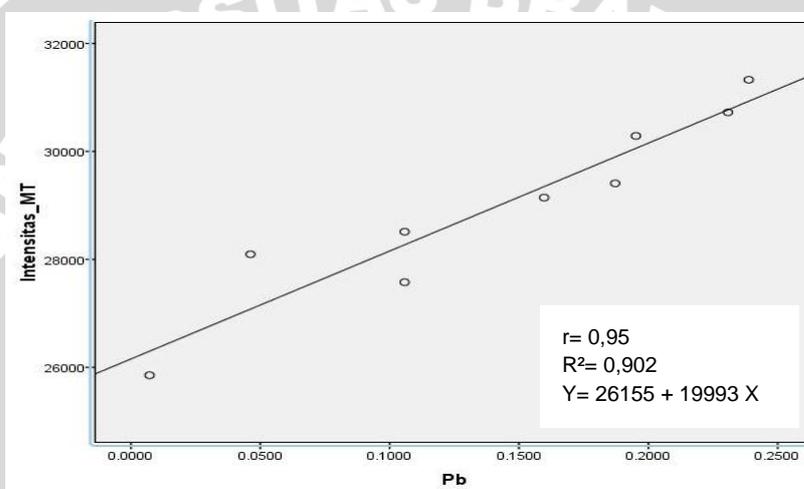


**Gambar 14.** Grafik Hubungan Densitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb di tiga muara sungai.

Hasil analisis regresi densitas metallothionein dengan logam berat Pb menunjukkan nilai koefisien determinasi pada tubuh kupang dinyatakan dengan  $R^2$  sebesar 0,85, dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,73, hal ini menunjukkan bahwa hubungan fungsional densitas metallothionein dengan logam berat Pb pada tubuh kupang sebesar 85,7 % dengan tingkat kesalahan sebesar 14,3 %. Dilihat dari nilai koefisien korelasi ( $r$ ), maka dapat dikatakan bahwa secara statistik tingkat hubungan densitas metallothionein dengan kadar logam berat Pb pada tubuh kupang tergolong sangat kuat yaitu sebesar 0,73. Menurut Sarwono (2006), bahwa tingkat korelasi tergolong sangat kuat apabila termasuk dalam interval nilai 0,75 – 0,99. Hasil analisis regresi linier sederhana di atas sekaligus menunjukkan bahwa densitas metallothionein dipengaruhi oleh kadar logam berat Pb sebesar 85,7 %. Hubungan regresi linier antara logam berat dan densitas metallothionein disajikan pada lampiran 8. Hasil penelitian Herista (2013), menunjukkan bahwa setelah dilakukan analisis regresi, logam berat Pb dengan MT yang terkandung pada tiram *Crasostrea cucullata* memiliki nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9433 dan hubungan fungsional sebesar 94,33 %, dimana kadar metallothionein akan meningkat sesuai dengan banyaknya logam berat yang masuk ke dalam tubuh organisme. Menurut Ross *et al.* (2002), dalam Amiard *et al.* (2006), hasil analisis regresi dapat menjelaskan adanya hubungan antara kadar logam berat yang terdapat pada bivalvia dengan kadar metallothionein. Umumnya kadar metallothionein akan terus meningkat sesuai dengan kenaikan kadar logam berat yang masuk ke dalam tubuh bivalvia tersebut. Beberapa peneliti menemukan bahwa organisme yang tinggal pada lingkungan tercemar akan memiliki kandungan metallothionein yang cenderung tinggi.

#### 4.7 Analisis Hubungan Logam Berat Pb pada Tubuh Kupang dengan Intensitas Metallothionein pada Tubuh Kupang.

Hasil analisis regresi linier sederhana menunjukkan besarnya kandungan logam berat Pb yang terpapar pada kupang mempengaruhi besarnya kandungan Metallothionein yang ada pada tubuh kupang. Intensitas metallothionein akan terus meningkat sesuai dengan kenaikan konsentrasi logam berat pada tubuh kupang. Grafik hubungan antara logam berat Pb dan Intensitas Metallothionein pada tubuh kupang tersaji pada Gambar 15.



**Gambar 15.** Grafik Hubungan Intensitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb di tiga Stasiun Pengamatan yaitu muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai Bangil, Pasuruan dan muara sungai Kraton, Pasuruan.

Hasil analisis regresi intensitas metallothionein dengan logam berat Pb menunjukkan nilai koefisien determinasi pada tubuh kupang dinyatakan dengan  $R^2$  sebesar 0,902 dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,95, hal ini menunjukkan bahwa hubungan fungsional intensitas metallothionein dengan logam berat Pb pada tubuh kupang sebesar 90,2 % dengan tingkat kesalahan sebesar 9,8 %. Dilihat dari nilai koefisien korelasi ( $r$ ), maka dapat dikatakan bahwa secara statistik tingkat hubungan intensitas metallothionein dengan kadar logam berat Pb pada tubuh kupang tergolong sangat kuat yaitu sebesar 0,95. Menurut Sarwono (2006), bahwa tingkat korelasi tergolong sangat kuat apabila termasuk dalam

interval nilai 0,75 – 0,99. Hasil analisis regresi linier sederhana di atas sekaligus menunjukkan bahwa intensitas metallothionein dipengaruhi oleh kadar logam berat Pb sebesar 86,4 %. Menurut Sarwono (2006), bahwa tingkat korelasi tergolong sangat kuat apabila termasuk dalam interval nilai 0,75 – 0,99. Kandungan intensitas metallothionein berkaitan dengan kadar logam berat Pb pada tubuh kupang, dimana semakin tinggi kandungan logam berat Pb pada kupang maka produksi metallothionein akan meningkat pula. Hubungan regresi linier antara logam berat dan intensitas metallothionein disajikan pada lampiran 9.

#### 4.8 Analisis Parameter Kualitas Air

Pada Penelitian ini dilakukan pengamatan parameter kualitas air yang berada di sekitar kupang, baik secara fisik maupun kimia yang mendukung kehidupan kupang di habitatnya yaitu suhu, keasaman (pH), salinitas dan oksigen terlarut (DO). Data kualitas air pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 6 berikut ini:

**Tabel 5.** Data Analisis Kualitas Air

Parameter Kualitas Air				
Stasiun	Suhu(°C)	Ph	DO (mg/L)	Salinitas (ppt)
1	29-30	8-9	0,4-1,5	21-25
2	28-30	8	1,1-1,4	25-26
3	29-31	8	1,2-1,5	20-25
<b>Standart Baku Mutu</b>	27-31**	7-8,5**	≥3**	27-33*

Ket : \* Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup No. 51 Tahun 2004  
 \*\* Effendi (2003)

##### 4.8.1 Suhu

Pengukuran suhu dilakukan di tiga sungai yang berbeda, yaitu muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan. Pengukuran dilakukan pada pagi hari mulai pukul 09.00-11.00 WIB dengan menggunakan *Thermometer Hg*. Berdasarkan hasil

pengukuran kualitas air tersebut diketahui nilai suhu pada masing-masing stasiun penelitian memiliki rentang yang tidak terlalu berbeda, adapun pada stasiun 1 nilai suhu berkisar antara 29-30 °C, pada stasiun 2 nilai suhu berkisar antara 28-30 °C, sedangkan pada stasiun 3 nilai suhu berkisar antara 29-31 °C. Menurut Harnah dan Nababan (2009), dalam ekologi bivalvia sangat dipengaruhi oleh suhu. Dimana suhu akan mempengaruhi laju metabolisme, seiring dengan peningkatan suhu maka laju metabolisme akan meningkat. Peraturan Kementerian Lingkungan Hidup No 51 tahun 2004, kisaran suhu yang aman untuk kehidupan biota laut berkisar antara 28°C-30°C. Peningkatan suhu sebesar 1°C akan meningkatkan konsumsi oksigen sekitar 10% (Effendi, 2003). Berdasarkan hasil di atas bahwa suhu di tiga muara sungai tersebut masih dalam kisaran yang baik untuk pertumbuhan kupang (*Corbula faba*).

Suhu juga mempengaruhi kadar logam berat di perairan, dimana Darmono (1995) menyatakan bahwa absorpsi logam berat oleh kerang paling efisien terjadi pada temperatur 30°C daripada 20°C pada logam Hg dan Cd, sedangkan logam Pb hanya sedikit naik. Selain itu, Apriadi *et al.* (2005) menyatakan 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.

#### **4.8.2 Derajat Keasaman (pH)**

Pengukuran pH dilakukan di tiga sungai yang berbeda, yaitu muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan. Pengukuran dilakukan pada pagi hari mulai pukul 09.00-11.00 WIB dengan menggunakan pH *paper*. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air tersebut diketahui nilai pH pada masing-masing stasiun

penelitian memiliki rentang yang tidak terlalu berbeda, adapun pada stasiun 1 nilai pH berkisar antara 8-9, pada stasiun 2 nilai pH berkisar 8, sedangkan pada stasiun 3 nilai pH berkisar 8. Menurut Susana (2009), menyatakan bahwa air laut umumnya memiliki nilai pH di atas 7 yang berarti bersifat basa. Sebagian besar biota akuatik sensitif terhadap perubahan nilai pH, nilai yang ideal untuk kehidupan antara 7-8,5.

Menurut Sarjono (2009), nilai pH memiliki hubungan yang erat dengan sifat kelarutan logam berat. Pada pH rendah, ion bebas logam berat dilepaskan ke dalam kolom air. Selain hal tersebut, pH juga mempengaruhi toksisitas suatu senyawa kimia. Secara umum logam berat akan meningkat toksisitasnya pada pH rendah, sedangkan pada pH tinggi logam berat akan mengalami pengendapan. Hutagalung (1984), menyatakan bahwa kesadahan yang tinggi logam berat dalam air akan membentuk senyawa kompleks yang mengendap dalam perairan. Namun sebaliknya, pada pH perairan yang rendah menyebabkan toksisitas logam berat semakin besar. Adanya masukan bahan organik yang tinggi ke perairan akan menurunkan pH yang disebabkan penguraian bahan organik tersebut menghasilkan  $\text{CO}_2$  (Sastrawijaya, 1991).

#### **4.8.3 Salinitas**

Pengukuran salinitas dilakukan di tiga sungai yang berbeda, yaitu muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan. Pengukuran dilakukan pada pagi hari mulai pukul 09.00-11.00 WIB dengan menggunakan refraktometer. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air tersebut diketahui nilai salinitas pada masing-masing stasiun penelitian memiliki kisaran nilai yang tidak terlalu berbeda, adapun pada stasiun 1 nilai salinitas berkisar antara 23-25 ppt, pada stasiun 2 nilai salinitas berkisar 25-26 ppt, sedangkan pada stasiun 3 nilai salinitas berkisar 20-25 ppt. Menurut Kepmen LH No. 51/2004, nilai salinitas yang baik untuk mendukung

kehidupan biota laut dalah  $\leq 34$ . Pada umumnya salinitas wilayah laut Indonesia berkisar antara 28-33‰ (Patty, 2013). Karena muara sungai masih banyak dipengaruhi oleh masuknya air tawar dari sungai sehingga nilai salinitasnya masih berkisar antara 20-26 ppt.

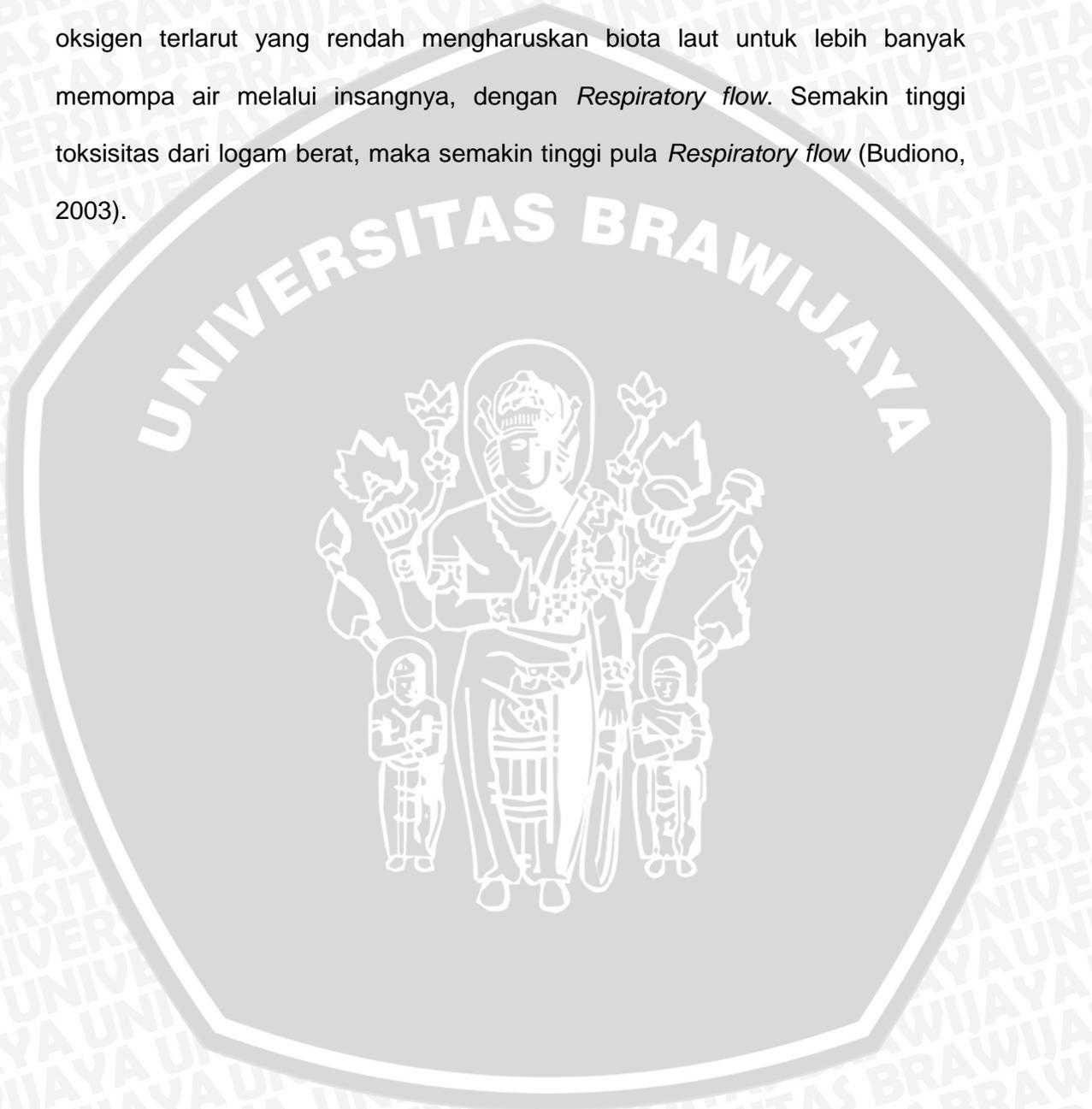
Selain berpengaruh pada biota perairan, salinitas juga mempengaruhi logam berat di suatu perairan. Mance (1987) dalam Wulandari *et al.* (2009) menyatakan bahwa salinitas yang tinggi menyebabkan peningkatan pembentukan ion klorida, yang berakibat pada penurunan konsentrasi ion logam berat pada perairan karena bereaksinya ion logam tersebut dengan ion klorida.

#### 4.8.4 Oksigen Terlarut (*Dissolved Oxygen/DO*)

Pengukuran Oksigen terlarut/ *Dissolved Oxygen*(DO) dilakukan di tiga sungai yang berbeda, yaitu muara sungai Ketingan, Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil dan muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan. Pengukuran dilakukan pada pagi hari mulai pukul 09.00-11.00 WIB dengan menggunakan DO meter tipe LUTRON DO-5510. Berdasarkan hasil pengukuran kualitas air tersebut diketahui nilai DO pada masing-masing stasiun penelitian memiliki rentang yang tidak terlalu berbeda, adapun pada stasiun 1 nilai DO berkisar antara 0,4-1,5 mg/L, pada stasiun 2 nilai DO berkisar 1,1-1,4 mg/L , sedangkan pada stasiun 3 nilai DO berkisar 1,2-1,5 mg/L. Dari hasil data di atas diketahui bahwa nilai oksigen terlarut (DO) sangat rendah, menurut Nurchayatun (2007) mengatakan ambang batas untuk oksigen terlarut minimum yaitu 3 mg/L.

Rendahnya nilai DO dikarenakan muara sungai merupakan tempat berkumpulnya bahan organik dan anorganik sehingga pada proses oksidasinya memerlukan oksigen terlarut yang cukup banyak. Menurut Effendi (2003), dekomposisi bahan organik dan oksidasi bahan anorganik dapat mengurangi kadar oksigen terlarut di perairan hingga mencapai nol (anaerob). Selain itu oksigen terlarut juga mempengaruhi tingkat logam berat di perairan. Rendahnya

nilai kandungan oksigen terlarut dapat menyebabkan tingkat toksisitas logam berat meningkat, sehingga daerah tersebut tidak menunjang untuk kehidupan biota perairan (Sarjono, 2009). Meningkatnya konsentrasi logam berat kandungan oksigen terlarut semakin menurun, hal ini disebabkan karena kadar oksigen terlarut yang rendah mengharuskan biota laut untuk lebih banyak memompa air melalui insangnya, dengan *Respiratory flow*. Semakin tinggi toksisitas dari logam berat, maka semakin tinggi pula *Respiratory flow* (Budiono, 2003).



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian di tiga muara sungai yakni pada lokasi penelitian 1 di muara sungai Ketingan, Sidoarjo, lokasi penelitian 2 di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan lokasi penelitian 3 di muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Hasil analisis logam berat Pb di tiga muara sungai berdasarkan Kepmen LH No. 51 Tahun 2004 menunjukkan bahwa kandungan logam berat Pb telah tercemar karena sudah melewati ambang batas normal yakni  $> 0,008$  mg/L.
- Hasil analisis logam berat Pb di tubuh kupang dan sedimen menunjukkan bahwa kandungan logam berat Pb masih berada di bawah ambang batas, untuk tubuh kupang menurut BSN Tahun 2009 bahwa ambang batas yang diperbolehkan untuk jenis bivalve/kerang-kerangan yakni  $< 1,5$  mg/kg, sehingga kupang masih layak dikonsumsi. Pada sedimen sendiri juga masih berada di bawah standar yakni menurut *Dutch Quality Standards for Metal in Sediment* (IADC/CEDA, 1997) yaitu  $< 85$  ppm.
- Pada analisis regresi linier sederhana menunjukkan besarnya peningkatan rata-rata densitas dan intensitas metallothionein sesuai dengan kenaikan konsentrasi logam berat pada kupang. Hubungan korelasi antara densitas metallothionein dengan kandungan logam berat pada kupang sangat kuat, karena koefisien korelasinya ( $r$ ) lebih dari 0,80. Begitu pula dengan intensitas metallothionein yang memiliki hubungan koefisien korelasinya korelasi ( $r$ ) dengan kandungan logam berat pada kupang yang lebih dari 0,80
- Hasil uji BNT 5% didapatkan bahwa densitas dan intensitas rata-rata metallothionein baik di muara sungai Ketingan di Sidoarjo, muara sungai di daerah Bangil di Pasuruan dan muara sungai di daerah Kraton di Pasuruan

tidak berbeda nyata karena nilai signifikannya pada ANOVA  $>0,005$ , sehingga nilai rata-rata densitas dan intensitas metallothioneinnya dianggap sama.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian skripsi di tiga muara sungai yakni pada lokasi penelitian 1 di muara sungai Ketingan, Sidoarjo, lokasi penelitian 2 di muara sungai di daerah Bangil, Pasuruan dan lokasi penelitian 3 di muara sungai di daerah Kraton, Pasuruan, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Hasil penelitian kadar logam berat Pb memiliki korelasi yang sangat kuat terhadap metallothionein. Oleh karena itu, disarankan untuk menggunakan metallothionein dalam kupang sebagai biomarker terhadap pencemaran logam berat Pb. Tidak hanya logam berat Pb namun mungkin dapat juga digunakan untuk menguji jenis logam berat yang lain seperti Hg, Cd, dll.
- Walaupun nilai logam berat Pb di kupang dan sedimen masih di bawah ambang batas yang telah ditetapkan namun hasil analisis logam berat di air sangat tinggi, sehingga perlu dilakukan pengawasan lebih lanjut dan pengendalian terhadap pencemaran logam berat di perairan muara sungai tersebut.
- Pada penelitian ini kurang spesifik menjelaskan organ tubuh mana dari kupang yang menunjukkan ekspresi dari MT, dikarenakan kecilnya ukuran tubuh kupang. Sehingga pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat menunjukkan secara spesifik organ yang diteliti.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amiard J C., C. Amiard-Triquet., S. Barka., J. Pellerin and P.S. Rainbowd. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*. 76: pp 160–202
- Anwari. 2009. Struktur dan Klasifikasi Metallothionein. [www.damandiri.or.id/file/yassieranwaripbbab2.pdf](http://www.damandiri.or.id/file/yassieranwaripbbab2.pdf). Diakses tanggal 15 Mei 2016 pukul 08.40 WIB.
- Apriadi, S.T., Y.I. Siregar dan Efriyeldi. 2014. Kandungan logam berat Pb, Cu, Zn pada daging dan cangkang kerang hijau (*Perna viridis*) di perairan Tanjung Balai Asahan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Riau. Pekanbaru.
- Ardyanto, D. 2005. Deteksi pencemaran timah hitam (Pb) dalam darah masyarakat yang terpajan timbal (Plumbum). *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. 2(1): 67-76. FKM. Universitas Airlangga.
- Asri, N.P., R. Abadi, A. Hasmawati, dan S.A. Mubarak. 2010. Penurunan kadar logam berat limbah cair industri emas (PT.X) di Surabaya. *J. Teknik Kimia Indonesia*, 9(2): 55-61.
- Bagian Telekomunikasi dan Informatika Kabupaten Sidoarjo. 2015. [http://www.sidoarjo.kab.go.id/index.php?p=layanan&p2=profil\\_kabupaten](http://www.sidoarjo.kab.go.id/index.php?p=layanan&p2=profil_kabupaten). Diakses pada tanggal 15 Mei 2016, pukul 08.35 WIB.
- Baswardono. 1983. Studi Pendahuluan Pengembangan Kupang sebagai Makanan Murah Bergizi. Jakarta: PN Bali Pustaka.
- Bebiano, M and Langston, W.J., 1993. Turnover rate of metallothionein and cadmium in *Mytilus edulis*. *Biometals* 6, 239e244.
- Binz, P.A and K"agi, J.H.R., 2000. *Metallothione: molecular evolution classification*. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkh"user Verlag, Basel, pp. 7–13.
- Brotomidjoyo, M. D. Tribawono dan E. Mulbyantoro. 1995. Pengantar Lingkungan Perairan dan Budidaya Air. Yogyakarta: Liberty.
- BSN. 2009. Batas maksimum cemaran timbal (Pb) dalam pangan. SNI: 7387
- \_\_\_\_\_. 2011. Penentuan kadar logam berat timbal (Pb) dan kadmium (Cd) pada produk perikanan. SNI: 2354
- Budiono, A. 2003. Pengaruh Pencemaran Merkuri Terhadap Biota Air. Makalah, IPB. [www.bgl.esdm.go.id/dm](http://www.bgl.esdm.go.id/dm). Diakses pada tanggal 15 maret 2016.
- Cakrawala. 2005. Bioindikator Pencemaran Bahan Kimia. 24 Februari
- Chandra, S. 1988. Heavy Metal Monitoring and Toxicity in India. *Manual on Aquatic Ecotoxicology*. H. de Krurjf., D. Dezwart, P. Viswanathan and P. Ray Eds. Allied Publishers. Ltd. New Delhi, India.

- Chester, R. 1990. Marine geochemistry. London: Unwin Hyman Ltd. 698p.
- Connel, D.W dan G. J Miller. 1995. Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran. Penerjemah: Yanti Koestoer. UIP. Jakarta.
- Dahuri, R. 1998. Pengaruh Pencemaran Limbah Industri Terhadap Potensi Sumber Daya Laut. Makalah pada Seminar Teknologi Pengelolaan Limbah Industri dan Pencemaran Laut. Agustus 1998. SPPT. Jakarta.
- Darmono. 2001. Lingkungan Hidup dan Pencemaran : Hubungan dengan Toksikologi Senyawa Logam. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- \_\_\_\_\_. 1995. Logam dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup. Penerbit UI Press. Jakarta.
- Desouky, Mahmoud.M.A. 2012. Metallothionein is up-regulated in molluscan responses to cadmium, but not aluminium, exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 65: 139-143.
- Dewi. 2012. LSI, GSI, EROD, dan Metallothionein sebagai Penanda Biologis Tingkat Molekuler Pencemaran Logam Berat Cd, Pb dan Hg yang Konsentrasinya di Perairan Masih Memenuhi Baku Mutu Air Kelas I Sebagai Alat Biomonitoring. (<http://www.eprints.undip.ac.id/.../ISI%3D>). Diakses tanggal 15 Mei 2016 pukul 13.48 WIB.
- Dinas Kominfo Kab. Pasuruan. 2015. <http://www.pasuruankab.go.id/pages-1-gambaran-umum.html>. Diakses pada tanggal 15 Mei 2016, pukul 08.35 WIB.
- Effendi, H. 2003. Telaah Kualitas Air Bagi Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan Perairan. Yogyakarta: Kanisius.
- \_\_\_\_\_. 2000. Telaah Kualitas Air. Bogor: IPB. Fakultas Perikanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fitriyah, K.R. 2007. Studi Pencemaran Logam Berat Kadmium (Cd), Merkuri (Hg) dan Timbal (Pb) pada Air Laut, Sedimen dan Kerang Bulu (*Anadara antiquata*) di Perairan Pantai Lekok Pasuruan. Laporan Skripsi. Jurusan Biologi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Frank, C. Lu. 1995. Toksikologi dasar asas, organ sasaran, dan penilaian resiko. Edisi II, Penerjemah Edi Nugroho, 358, UI-Press, Jakarta.
- Frank, S.N., Singer, C., Sures, B., 2008. Metallothionein (MT) response after chronic palladium exposure in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environ. Res.*108, 309e314.
- Frankenne, F., Noel-Lambot F, Disteche, A. 1980. Isolation and characterization of MT's from cadmium-loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol* 66C: 179-182.
- Galil, Bella. 2006. *Musculita senhousia*. Delivering Alien Invasive Species Intertories For Europe. Italy.

- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*. *Ecotoxicol. Environ. Safe* 61, 209e220.
- Hariyadi, S., Suryadiputra dan B. Widigdo. 1992. *Limnology Metode Kualitas Air*.
- Harnah, M.S., dan Nababan, B. 2009. Studi Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Anakan Kerang Mutiara (*Pinctada maxima*) pada Kedalaman Berbeda di Teluk Kapontori, Pulau Bulon. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 1 (2): pp 22-32.
- Herista, D.S. 2013. Analisis Kandungan Metallothionein pada Insang Tiram (*Crasostrea cuculata*) dari Perairan yang Mengandung Logam Berat Pb, Cd dan Hg di Pelabuhan Pantai Mayangan Probolinggo, Jawa Timur. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Hertika, A.M.S., Marsoedi., Diana. A., dan Soemarno. 2014. Density and Intensity of Metallothionein in Gill and Interior Cavity of Taiwan Mussels (*Anodonta woodiana*) after Exposure to Lead (Pb) at Sub-Chronic Level Using Immunohistochemical Technique. *Journal of Natural Science Research*. 4 (6).
- Hutabarat, S. dan S.M. Evans. 1986. *Pengantar Oseanografi*. Jakarta: Djambatan.
- Hutagalung, H.P. 1984. Logam Berat Dalam Lingkungan Laut. *Pewartar Oceana IX No. 1*: 12-19.
- IADC/CEDA. 1997. *Convention, Codes, and Conditions: Marine Disposal. Environmental Statement for Port of Southampton: Berth 201/202 Works* 95 hal.
- Ilahude, A.G dan Liasaputra. 1980. *Sebaran Normal Parameter Hidrologi di Teluk Jakarta*. hlm 1-48. LON-LIPI. Jakarta.
- Ilyas, S. 1972. *Pengantar Pengolahan Ikan*. Jakarta: Lembaga Teknologi Hasil Perikanan.
- Irawan, M. B. 2012. Studi formulasi pembuatan nugget kupang merah (*Musculitas senhausia*) kajian proporsi kupang merah dan tepung komposit (tepung mocaf: tapioka) terhadap sifat fisik dan organoleptik. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Irvan, M. 2007 Pengaruh pemberian isoflavin kedelai, mineral Zn dan vitamin e terhadap profil imunohistokimia antioksidan copper, *zinc-superoxide dismutase* (Cu,Zn-sod) pada jaringan hati tikus. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Karimah, A. 2002. Profil kandungan logam berat timbal (Pb) dalam cangkang kupang beras (*Tellina versicolor*). UNEJ. Jember.
- Kasmu'in. 2002. Mengenal Kupang, Permasalahan dan Prospek Bisnisnya. Seminar Sehari "Pengembangan Agribisnis Kupang Ditinjau Perspektif Sosial Ekonomi" Universitas Muhammadiyah Sidoarjo Pada Tanggal 9 September 2002. Sidoarjo: Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

- Katzung B.G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed (Internasional Ed), Boston, Ner York: Mc Graww Hill. P. 1-10.
- Keman, S. 1998. Pencemaran Lingkungan dan Deteksi Dininya. Seminar Sehari Tentang Efek Pencemaran Lingkungan Terhadap Kesehatan Sistim Reproduksi. Surabaya. FKM Unair.
- Kinghorn, A., P. Solomon, and H.M. Chan. 2007. Temporal and spatial trends of mercury in fish collected in the English-wabigoon river system in Ontario, Canada. *J. Science of Total Environment*. 372:615-623.
- KMNLH, 2004. Pedoman Penetapan Baku Mutu Lingkungan. Kantor Menteri Negara Kependudukan Lingkungan Hidup 2004. Keputusan Menteri Negara Kependudukan dan Lingkungan Hidup. Kep-51/MENEGLH/ 2004. Sekretariat Negara, Jakarta.
- Larasati. 2010. Prosedur tetap pengecatan Imunohistokimia p53. Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi. UGM
- Lasut, M.T. 2002. Metallothionein: suatu parameter kunci yang penting dalam penetapan baku mutu air laut (BMAL) Indonesia. *Jurnal Ekoto*. 2(1): 61-68.
- Laws, E.A. 1981. *Aquatic pollution*. John Willey and Sons. New York.
- Le, T.T.Yen., S. Zimmermann dan B. Sures. 2016. How does the metallothionein induction in bivalves meet the criteria for biomarkers of metal exposure?. *Environmental Pollution* 212. 257-268.
- Marzuki. 1983. *Metodologi Riset*. Bagian penerbit Fakultas Ekonomi Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.
- Mulyanto. 1992. *Lingkungan Hidup untuk Ikan*. Depdikbud: Jakarta.
- Murtini, J. T. dan R. Peranginangin. 2006. Kandungan Logam Berat pada Kerang Kepah (*Meritrix meritrix*) dan Air Laut di Perairan Banjarmasin. *Jurnal Perikanan*. 8 (2): pp 177 – 184.
- Novianto, Rio.T.W.D., F.Rachmadiarti dan Raharjo. 2012. Analisis Kadar Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada Udang Putih (*Penaeus marguiensis*) di Pantai Gesek Sedati Sidoarjo. *Lenterablo*. 1(2): 63-66
- Nurchayatun, Titik. 2007. Pengaruh Pemberian Merkuri Klorida Terhadap Struktur Mikroanatomi Insang Ikan Mas. Tugas Akhir. Tidak Diterbitkan. Semarang: Universitas Negeri Semarang
- Nybakken, J W. 1988. *Biologi Laut. Suatu Pendekatan Ekologis*. Jakarta: Gramedia.
- Pahlevi, A.M dan Wiweka. 2010. Analisa sedimentasi di muara kali porong akibat pembuangan lumpur lapindo menggunakan data citra satelit aster. *Jurnal Ilmiah Geomatika*.16(02): 23-42.
- Palar, H. 1994. *Pencemaran dan toksikologi logam berat*. Jakarta: Rineka Cipta.

- Patriquin, D. G. 1972. The origin of nitrogen and phosphorus for growth of marine angiospermae *Thlassia testudinum*. *Mar. Biol.*, 15:35 – 46. *Pertanian*. Deptan RI. Vol. 3 (3). Jakarta.
- Patty, S.I. 2013. Distribusi suhu, salinitas dan oksigen terlarut di Perairan Kema, Sulawesi Utara. *Jurnal Ilmiah Platax*. ISSN: 2302-3589. 1 (3).
- Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001. Pengelolaan Kualitas Air Dan Pengendalian Pencemaran Air Presiden Republik Indonesia. PP No. 8: 2001.
- Peric, L., Fafandel, M., Glad, M., Bihari, N., 2012. Heavy metals concentration and metallothionein content in resident and caged mussels *Mytilus galloprovincialis* from Rijeka bay, Croatia. *Fresen. Environ. Bull.* 21, 2785e2794.
- Prayitno dan Susanto T. 2001. Kupang dan makanan tradisional Sidoarjo. Surabaya: Trubus AgriSasana.
- Prescod, M.B. 1978. Environmental Indices Theory and Practice. Ann Arbour Science Inc. Michigan 59 pp.
- Purwati, S. 2001. Analisa protein dalam Kupang. *UNEJ*. Jember
- Ramos-Vara JA. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry, *Vet Pathol* 42: 405-426.
- Rantam, F.A. 2003. Metode Imunologi. Surabaya: Airlangga University Press.
- Raymont, J.E.G. 1980. Plankton and Productivity in the oceans (Second edition). Vol. 1: Phytoplankton. Pergamon Press., Oxford: 273-275 pp.
- Regoli, F., M. Nigro, A. Falleni, I. Del Barga, V. Scarcelli, P. Lucchesi and G. Frenzilli. 2006. Cellular Biomarkers For Monitoring Estuarine Environments: Transplanted Versus Native Mussels. *Aquatic Toxicology*. 77: 339–347.
- Rifa'i, R.S dan K. Pertagunawan. 1983. Biologi perikanan 1. Jakarta: CV. Kayago.143.
- Rifardi, 2008. Tekstur sedimen: sampling dan analisis. Pekanbaru: UNRI Press.
- Ringwood, H., J. Hogue, C. Keppler and M. Gielazyn. 2004. Linkages Between Cellular Biomarker Responses and Reproductive Success in Oysters – *Crasostrea virginica*. *Marine Environmental Res.*, 58: 151 – 155.
- Rochyatun, E., Edward & Rozak, A. 2003 . Kandungan logam berat Pb, Cd, Cu, Zn, Ni, Cr, Mn & Fe dalam air laut dan sedimen di perairan Kalimantan Timur . *Jurnal Oseanologi dan Limnologi*,
- Roesijadi, G. 1994. MT induction as a Measure of Response to Metal Exposure in Aquatic Animal. *Environ Health Perspect* 102(Suppl 12): 91-96.
- Romimohtarto, K dan Thayib, S.S. 1982. Kondisi lingkungan dan laut di Indonesia. LON-LIPI, Jakarta 246.

- Rompas, R.M. 1990. Telaah Tingkat Polutan Merkuri di Perairan Bolaang Mongondouw Akibat dari Kegiatan Penambangan Emas. Laporan Penelitian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. DEPTAN.
- Saeni, M.S. 1989. Kimia Lingkungan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Ditjen Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat. IPB Bogor.
- \_\_\_\_\_. 2003. Biologi Air Limbah. Program Pascasarjana IPB, Bogor.
- Sarjono, A. 2009. Analisis Kandungan Logam Berat Cd, Pb dan Hg pada Air dan Sedimen di Perairan Kamal Muara, Jakarta Utara. IPB. Bogor.
- Sarwono, J., 2006. Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif. Penerbit Rineka Cipta. Jakarta
- Sastrawijaya, A. Tresna. 1991. Pencemara lingkungan. Jakarta: Rineka Cipta.
- Scudiero, R., Creti, P., Trinchella, F., Esposito, M.G., 2014. Evaluation of cadmium, lead and metallothionein contents in the tissues of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Campania coast (Italy): levels and seasonal trends. C.R. Biol.337, 451e458.
- Siagian, M. 2000. Diktat Ekologi Perairan. Pekanbaru: Universitas Riau Press.
- Sijabat, M.M. 1974. Pengantar Oseanografi . Institut Pertanian Bogor.
- Simes, D.C., Maria, J.B J.G.M. 2003. Isolation and characterization of metallothionein from the calm Ruditapes decussates. Aquatic Toxicology. 63: 307-318.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Subani W. 1981. Perikanan Kupang. Warta Penelitian dan Pengembangan. Surabaya: Trubus Agriasasana.
- Subani., Suwiry W dan Suminarti. 1983. Penelitian lingkungan hidup perairan kupang, pemanfaatan hasil dan pelestarian sumbernya. Laporan Penelitian Perikanan Laut. Nomor 23 BPPL Departemen Pertanian. Jakarta.
- Subarijanti, H.U. 1990. Diktat kuliah Limnology. NUFFIC/ UNIBRAW/ LUW/ FISH. University Brawijaya Malang.
- Subowo, M., S. Widodo dan Asep Nugraha.1999. Status dan Penyebaran Pb, Cd, dan Pestisida pada Lahan Sawah Intensifikasi di Pinggir Jalan Raya. Prosiding. Bidang Kimia dan Bioteknologi Tanah, Puslittanak, Bogor.
- Sujianto, A.E. 2009. Aplikasi Statistik dengan SPSS 16.0. Jakarta : Prestasi Pustaka.
- Suprpto, 2011. Metode analisis parameter kualitas air untuk Budidaya Udang. shrimp Club Indonesia.

- Susana, T. 2009. Tingkat keasaman (pH) dan oksigen terlarut sebagai indikator kualitas perairan sekitar muara sungai Cisadane. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. ISSN: 1829-6572. 5(2): 33-39.
- Sutamihardja, R.T.M. 1987. Kualitas pencemaran lingkungan. Sekolah Pascasarjana. Jurusan Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan. IPB, Bogor: 72.
- Walpole, R.E. 1995. Pengantar Statistika. Jakarta. Penerbit: Gramedia Pustaka Utama.
- Wang, D., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Jolicoeur, P. 1999. Changes in subcellular metal partitioning in the gills of freshwater bivalves (*Pyganodon grandis*) living along an environmental cadmium gradient. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 774e784..
- Wu, Q., Zhang, Y., Xu, J., Shen, P. 2005. Regulation of hunger-driven behaviors by neural ribosomal S6 kinase in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(37): 13289--13294.
- Wulandari, S.W., B. Yulianto., G.W. Santosa dan K. Suwartimah. 2009. Kandungan logam berat Hg dan Cd dalam air, sedimen dan kerang darah (*Anadara granossa*) dengan menggunakan metode Analisis Pengaktifan Neutron (APN). *Ilmu Kelautan*. Vol. 14 (3): 170 -175.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian

PROSEDUR	ALAT	BAHAN
Pengukuran Kualitas Air - Suhu - Oksigen Terlarut - pH - Salinitas - Logam Berat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermometer Hg</li> <li>• DO meter LUTRON DO-5510</li> <li>• Kotak standart pH</li> <li>• Refraktometer</li> <li>• Lampu Elektroda Pb</li> <li>• Timbangan Sartorius</li> <li>• Oven</li> <li>• Hot Plate</li> <li>• Beaker Glass</li> <li>• Labu Ukur</li> <li>• AAS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Air sampel</li> <li>• pH paper</li> <li>• Tissue</li> <li>• <i>Corbula faba</i> (HNO<sub>3</sub>:HCl) 1:1 sebanyak ± 10-15 ml</li> <li>• Kertas saring</li> <li>• Aquades</li> <li>• Larutan standart</li> </ul>
Pengambilan tubuh Kupang	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sectio set</li> <li>• Cool box</li> <li>• Botol sampel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formalin 10%</li> <li>• Tubuh Kupang (<i>Corbula faba</i>)</li> </ul>
Prosedur Histopatologi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tissue cassette</li> <li>• Tissue Tex Processor</li> <li>• Microtome</li> <li>• Water bath</li> <li>• Pinset</li> <li>• Inkubator</li> <li>• Keranjang khusus</li> <li>• Pisau</li> <li>• Mesin vakum</li> <li>• Cetakan</li> <li>• Bunsen</li> <li>• Freezer</li> <li>• Objek glass</li> <li>• Objek glass box</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jaringan hewan yang telah difiksasi formalin 10%</li> <li>• Paraffin cair</li> <li>• Kertas label</li> <li>• Alkohol 90%, 80%, 70%</li> <li>• Alkohol absolut</li> <li>• Xylol</li> <li>• Spritus</li> </ul>
Pewarnaan Imunohistokimia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipet tetes</li> <li>• Lemari pendingin</li> <li>• Timer</li> <li>• Pipet volumetrik (micropipette)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sampel</li> <li>• PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)</li> <li>• 3 CDTA</li> <li>• Na-sitrat</li> <li>• H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%</li> <li>• Sitrat 1% in PBS</li> <li>• Antibodi metallothionein</li> <li>• 2<sup>nd</sup> AB in PBS (1:200)</li> <li>• Detection antibody</li> <li>• Aquadest</li> <li>• DAB (<i>diamino</i>)</li> </ul>

---

*Benzidine*(male fresh)  
(1:46)

- D<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O

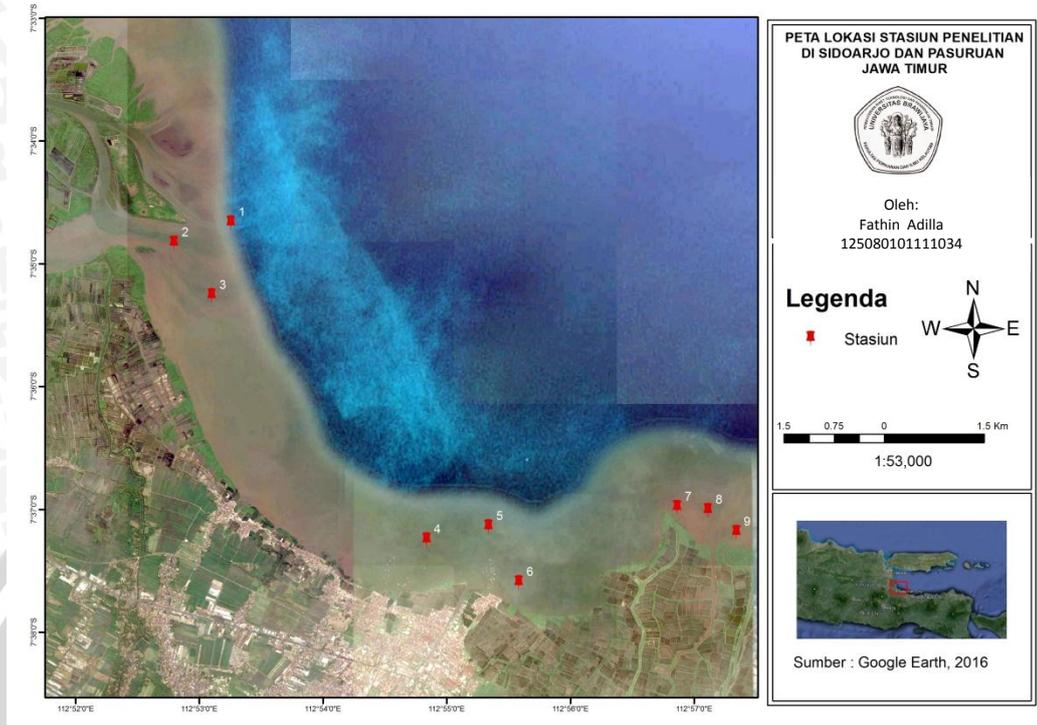
- Air kran

- Hematoxylin meyer

---



Lampiran 2. Peta Lokasi Penelitian



**Lampiran 3. Data Logam Berat pada Air, Sedimen dan Tubuh Kupang**

a. Logam Berat di Air

Stasiun	Ulangan	Logam Berat Pb (ppm)
Ketingan	1	0,0245
	2	0,1723
	3	0,1276
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1081</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0758</b>
Bangil	1	0,0845
	2	0,2216
	3	0,0794
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1285</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0798</b>
Kraton	1	0,1092
	2	0,1815
	3	0,0221
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1042</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0798</b>

b. Logam Berat di Kupang

Stasiun	Ulangan	Logam Berat Pb (ppm)
Ketingan	1	0,2308
	2	0,2388
	3	0,1952
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,2216</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0232</b>
Bangil	1	0,1058
	2	0,1872
	3	0,0072
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1000</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0901</b>
Kraton	1	0,0462
	2	0,1597
	3	0,1058
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1039</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0567</b>

### Lampiran 3. Lanjutan

#### c. Logam Berat di Sedimen

Stasiun	Ulangan	Logam Berat Pb (ppm)
Ketingan	1	0,0966
	2	0,1906
	3	0,2789
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1887</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0911</b>
Bangil	1	0,1711
	2	0,0874
	3	0,0840
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1141</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,0493</b>
Kraton	1	0,2457
	2	0,2090
	3	0,0542
	<b>Rata-rata</b>	<b>0,1696</b>
	<b>Standar Deviasi</b>	<b>0,1016</b>



#### Lampiran 4. Jumlah dan Densitas Metallothionein

##### a. Jumlah Metallothionein

Lapang Pandang	Intensitas Metallothionein (Pixel)								
	Stasiun								
	I (Ketingan)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	29732	30440	29165	30017	26508	28912	26293	29143	28850
2	31689	30411	31880	29059	29091	30074	28492	29639	29302
3	30824	30256	29780	24432	24795	28332	27512	27825	27396
<b>Rata-rata</b>	<b>30552,83</b>			<b>27913,33</b>			<b>28272,44</b>		
<b>Standar Deviasi</b>	<b>892,53</b>			<b>2144,31</b>			<b>1091,55</b>		

##### b. Densitas Metallothionein

Lapang Pandang	Densitas Metallothionein (MT/ $\mu\text{m}^2$ )								
	Stasiun								
	I (Ketingan)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.2468	0.2489	0.2392	0.2347	0.2535	0.1939	0.1908	0.2503	0.1968
2	0.2414	0.2329	0.2216	0.2158	0.2421	0.1967	0.2184	0.2435	0.2184
3	0.2270	0.2406	0.2237	0.2024	0.2233	0.1912	0.2116	0.2293	0.2316
<b>Rata-rata</b>	<b>0.2357</b>			<b>0.2170</b>			<b>0.2211</b>		
<b>Standar Deviasi</b>	<b>0.0099</b>			<b>0.0227</b>			<b>0.0198</b>		

$$\text{Rumus Densitas (MT}/\mu\text{m}^2) = \frac{\text{Jumlah Metallothionein}}{\text{Luas Bidang Pandang}}$$

Keterangan :

Panjang (p) = 500  $\mu\text{m}$

Lebar (l) = 260  $\mu\text{m}$

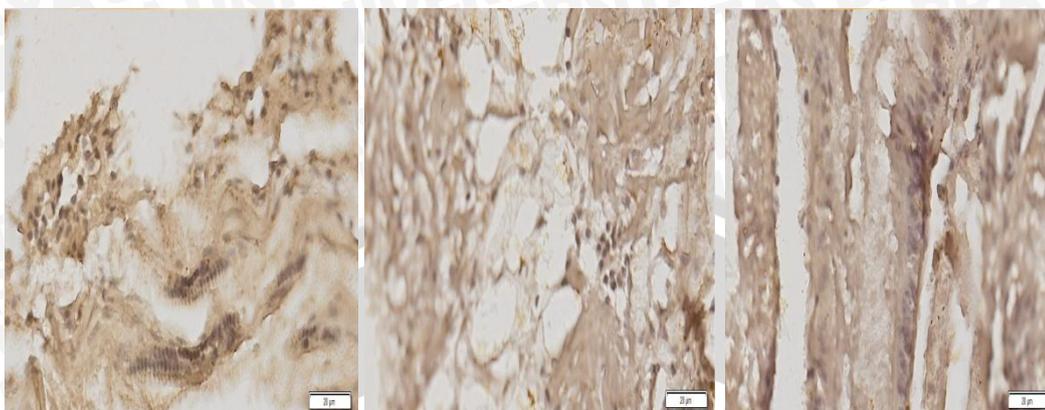
Luas (L) = 130000  $\mu\text{m}^2$

Lampiran 5. Data Intensitas Metallothionein pada Masing-masing Stasiun

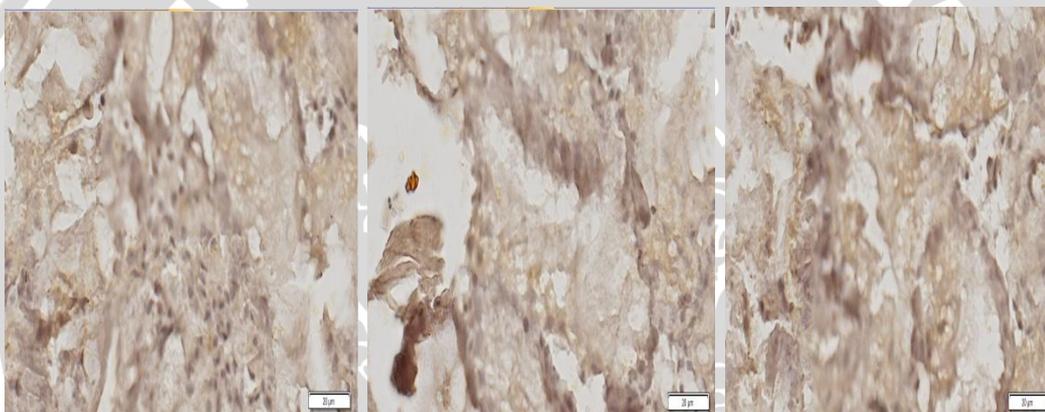
DATA INTENSITAS METALLOTHIONEIN (pixel)									
Ulangan	STASIUN								
	I (Sidoarjo)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	28029	29612	27576	30325	31003	28648	28531	29353	29361
	31644	31397	29928	31028	29705	27345	30319	29871	27036
	29505	29101	29916	30621	26268	29582	29427	30708	29411
	29863	32023	30418	39968	26419	30456	25974	27755	26883
	31363	29162	28433	26768	28388	31972	27200	28414	28709
	29043	30043	28335	28547	22672	27210	21940	26250	28886
	28579	30814	29395	28909	24899	30022	25909	28912	31461
	29552	31611	31524	28452	25656	29966	26011	30917	28209
	29028	31005	28353	25703	24564	25898	22172	29462	30353
	30722	29637	27779	30854	25512	28024	25454	29793	28197
<b>Rata-rata</b>	<b>29732.8</b>	<b>30440.5</b>	<b>29165.7</b>	<b>30117.5</b>	<b>26508.6</b>	<b>28912.3</b>	<b>26293.7</b>	<b>29143.5</b>	<b>28850.6</b>
2	32985	30089	30700	27581	30002	29274	29012	29400	29547
	29591	29502	31256	24957	31574	30890	29533	31556	31637
	33875	29414	29241	29156	31476	29333	30463	30921	29818
	31783	31328	32768	30395	26811	28662	26561	27165	30267
	32606	31743	29908	30618	28835	29063	28766	30705	29105
	31906	30096	33033	30344	30314	32219	26353	31278	27746
	32375	30123	34682	28469	28970	30834	26222	28787	27189
	32588	31790	32349	31726	27430	31697	27315	29530	28346
	32169	30215	32665	29836	28532	30244	29574	28781	30367
	27019	29816	32200	27513	26972	28528	31130	28271	29003
<b>Rata-rata</b>	<b>31689.7</b>	<b>30411.6</b>	<b>31880.2</b>	<b>29059.5</b>	<b>29091.6</b>	<b>30074.4</b>	<b>28492.9</b>	<b>29639.4</b>	<b>29302.5</b>
3	30767	29016	32398	27019	29702	24885	25194	28051	29582
	31827	29840	34303	24087	29993	29289	30313	27407	28923
	29923	29258	31607	22325	20956	25655	28600	29328	28971
	32257	31335	30786	28841	24193	27975	29429	28378	28470
	33547	31322	25836	20520	23481	29375	29659	30018	28288
	28543	30407	27663	23583	22122	27844	28817	31072	28623
	30543	29320	30452	23661	29751	29366	28150	29536	28909
	30060	29335	25902	24769	22005	27862	26763	27907	25627
	29316	30123	27640	24448	22870	30039	25585	24229	22906
	31460	32613	31217	25071	22878	31036	22614	22326	23664
<b>Rata-rata</b>	<b>30824.3</b>	<b>30256.9</b>	<b>29780.4</b>	<b>24432.4</b>	<b>24795.1</b>	<b>28332.6</b>	<b>27512.4</b>	<b>27825.2</b>	<b>27396.3</b>

Lampiran 6. Gambar Densitas dan Intensitas Metallothionein pada tiap Stasiun

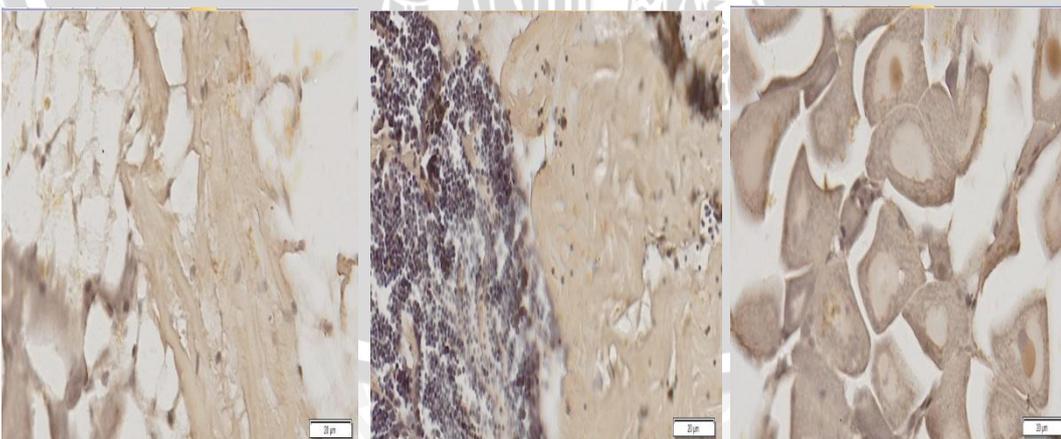
- Stasiun 1 Ulangan 1



- Stasiun 1 Ulangan 2

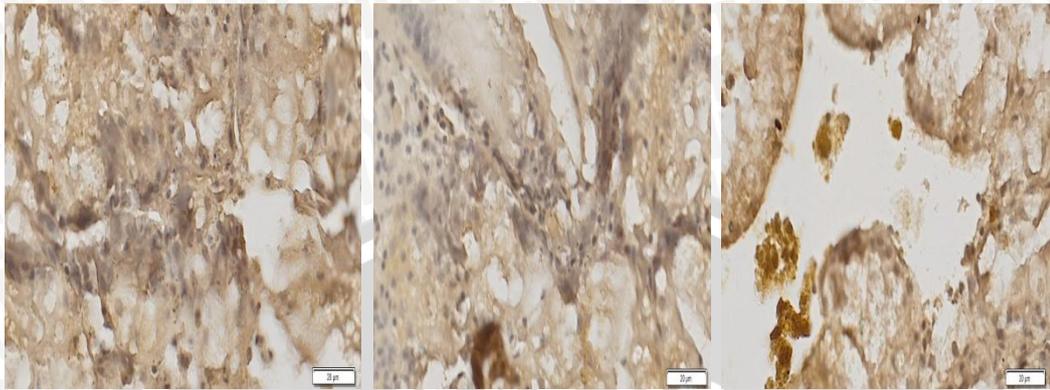


- Stasiun 1 Ulangan 3

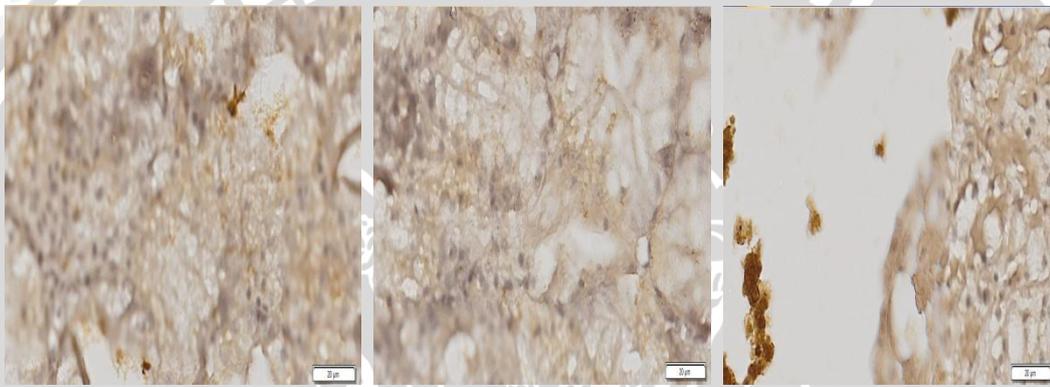


Lampiran 6. Lanjutan 1

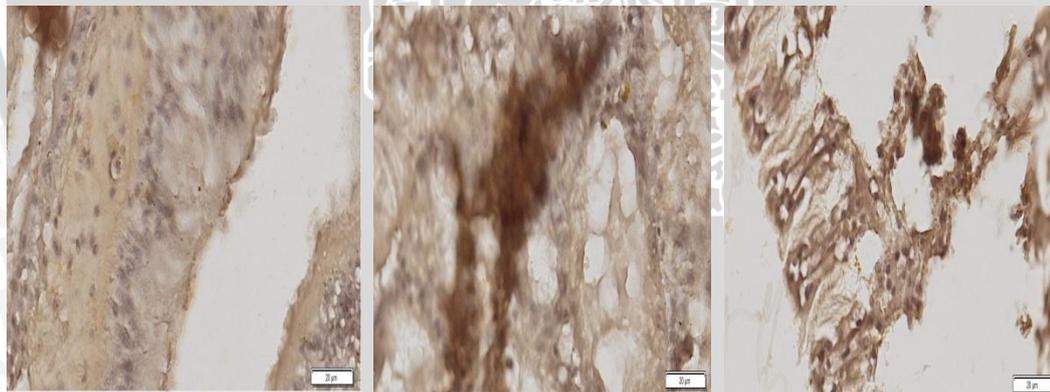
- Stasiun 2 Ulangan 1



- Stasiun 2 Ulangan 2



- Stasiun 2 Ulangan 3

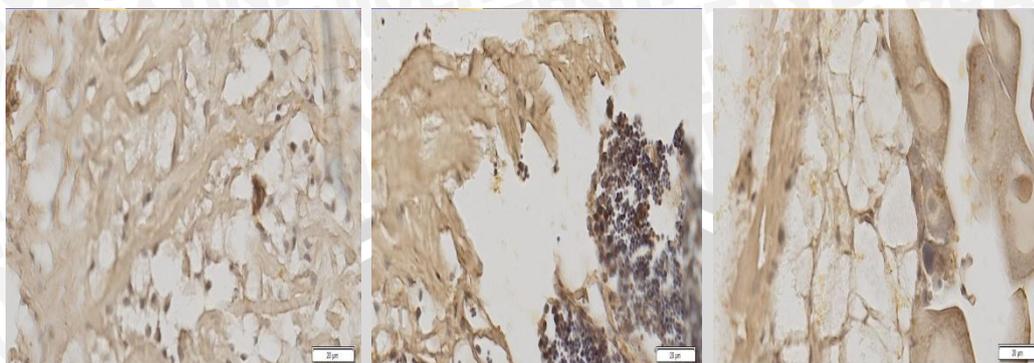


- Stasiun 3 Ulangan 1

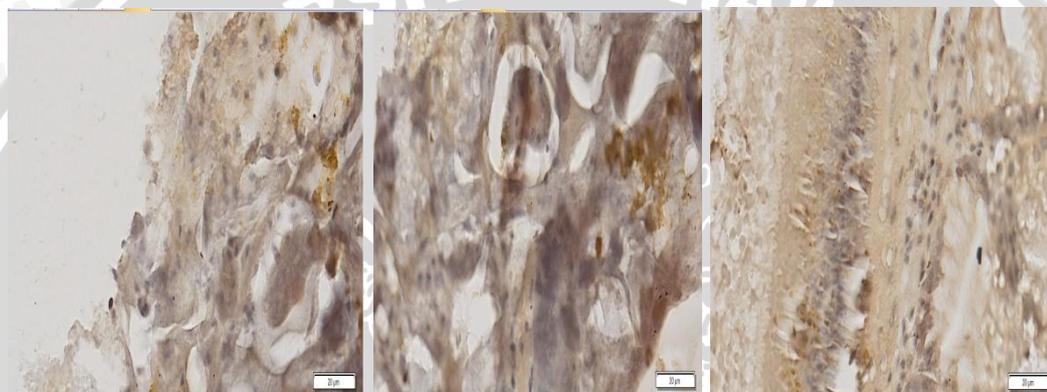


Lampiran 6. Lanjutan 2

- Stasiun 3 Ulangan 2



- Stasiun 3 Ulangan 3



## Lampiran 7. Data Pengukuran Kualitas Air

Parameter Kualitas Air	Stasiun Penelitian								
	I (Sidoarjo)			II (Bangil)			III (Kraton)		
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
Suhu (°C)	29	328	30	29	28	30	29	30	31
pH	9	9	8	8	8	8	8	8	8
Salinitas (ppt)	23	25	21	26	25	25	21	25	20
DO (mg/l)	0,4	1,5	1,4	1,2	1,5	1,3	1,4	1,2	1,1



**Lampiran 8.** Hasil Regresi Densitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb pada Kupang Menggunakan SPSS.

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Pb <sup>a</sup>		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Densitas\_MT

**Model Summary<sup>b</sup>**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.857 <sup>a</sup>	.734	.696	.00924

a. Predictors: (Constant), Pb

b. Dependent Variable: Densitas\_MT

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.002	1	.002	19.347	.003 <sup>a</sup>
	Residual	.001	7	.000		
	Total	.002	8			

a. Predictors: (Constant), Pb

b. Dependent Variable: Densitas\_MT

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.197	.006		30.261	.000
	Pb	.177	.040	.857	4.399	.003

a. Dependent Variable: Densitas\_MT

**Lampiran 9.** Hasil Regresi Intensitas Metallothionein dengan Logam Berat Pb pada Kupang Menggunakan SPSS.

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Pb <sup>a</sup>		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: Intensitas\_MT

**Model Summary<sup>b</sup>**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.950 <sup>a</sup>	.902	.888	568.834

a. Predictors: (Constant), Pb

b. Dependent Variable: Intensitas\_MT

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2.095E7	1	2.095E7	64.749	.000 <sup>a</sup>
	Residual	2265001.264	7	323571.609		
	Total	2.322E7	8			

a. Predictors: (Constant), Pb

b. Dependent Variable: Intensitas\_MT

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	26155.716	400.231		65.352	.000
	Pb	19993.387	2484.685	.950	8.047	.000

a. Dependent Variable: Intensitas\_MT

**Lampiran 10.** Hasil Uji BNT 5% Densitas Metallothionein dengan Menggunakan SPSS.

a. Uji Normalitas

Tests of Normality							
Lokasi		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Densitas_MT	Ketingan	.319	3	.	.886	3	.341
	Bangil	.203	3	.	.994	3	.849
	Kraton	.290	3	.	.926	3	.474

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji BNT 5%

Test of Homogeneity of Variances			
Densitas_MT			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.261	2	6	.349

ANOVA					
Densitas_MT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.989	.425
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.002	8			

## Lampiran 10. Lanjutan

- Post Hoc.

### Multiple Comparisons

Densitas\_MT

Tukey HSD

(I) Lokasi	(J) Lokasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ketingan	Bangil	.0164000	.0127909	.454	-.022846	.055646
	Kraton	.0146000	.0127909	.526	-.024646	.053846
Bangil	Ketingan	-.0164000	.0127909	.454	-.055646	.022846
	Kraton	-.0018000	.0127909	.989	-.041046	.037446
Kraton	Ketingan	-.0146000	.0127909	.526	-.053846	.024646
	Bangil	.0018000	.0127909	.989	-.037446	.041046



**Lampiran 11. Hasil Uji BNT 5% Intensitas Metallothionein dengan Menggunakan SPSS**

a. Uji Normalitas

Tests of Normality						
Lokasi	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Intensitas_MT	Ketingan	.200	3	.995	3	.860
	Bangil	.233	3	.979	3	.724
	Kraton	.280	3	.938	3	.519

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji BNT 5%

Test of Homogeneity of Variances			
Intensitas_MT			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.073	2	6	.207

ANOVA					
Intensitas_MT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9343660.222	2	4671830.111	5.181	.491
Within Groups	5410114.000	6	901685.667		
Total	1.475E7	8			

## Lampiran 11. Lanjutan

- Post Hoc

### Multiple Comparisons

Intensitas\_MT

Tukey HSD

(I) Lokasi	(J) Lokasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ketingan	Bangil	2265.000	775.322	.060	-113.90	4643.90
	Kraton	2040.333	775.322	.086	-338.57	4419.23
Bangil	Ketingan	-2265.000	775.322	.060	-4643.90	113.90
	Kraton	-224.667	775.322	.955	-2603.57	2154.23
Kraton	Ketingan	-2040.333	775.322	.086	-4419.23	338.57
	Bangil	224.667	775.322	.955	-2154.23	2603.57



Lampiran 12. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Pengambilan Sampel Kupang (*Corbula faba*)



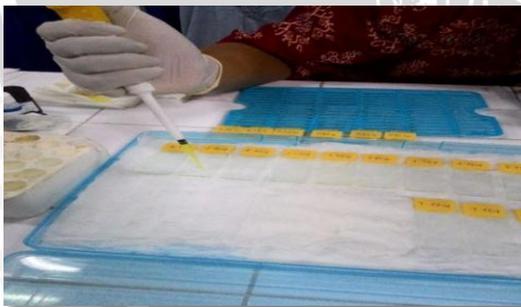
Pengukuran Kualitas Air



Pengeblokan dan pemotongan jaringan makros



Bahan yang digunakan dalam pewarnaan Immunohistokimia



Pewarnaan Imunohistokimia



Pengamatan Sampel dengan Menggunakan Mikroskop Dot Slide