

**POTENSI EKSPRESI BIOMARKER PADA IKAN GAMBUSIA  
(*Gambusia affinis*) YANG TERPAPAR LOGAM BERAT  
(STUDI KASUS SUNGAI WANGI DAN KADMIUM)**

**DISERTASI**



Oleh :

**MOH. AWALUDIN ADAM  
NIM. 157080100111002**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN  
BIDANG EKOTOKSIKOLOGI**

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



**POTENSI EKSPRESI BIOMARKER PADA IKAN GAMBUSIA  
(*Gambusia affinis*) YANG TERPAPAR LOGAM BERAT  
(STUDI KASUS SUNGAI WANGI DAN KADMIUM)**

**DISERTASI**



Oleh :

**MOH. AWALUDIN ADAM  
NIM. 157080100111002**

**PROGRAM DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN  
MINAT MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN  
BIDANG EKOTOKSIKOLOGI**

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



**POTENSI EKSPRESI BIOMARKER PADA IKAN GAMBUSIA  
(*Gambusia affinis*) YANG TERPAPAR LOGAM BERAT  
(STUDI KASUS SUNGAI WANGI DAN KADMIUM)**

**DISERTASI**



Oleh :

**NAMA : MOH. AWALUDIN ADAM**  
**NIM : 157080100111002**  
**PROGRAM STUDI : DOKTOR ILMU PERIKANAN DAN KELAUTAN**  
**MINAT : MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN DAN KELAUTAN**  
**BIDANG : EKOTOKSIKOLOGI**

Menyetujui

**KOMISI PEMBIMBING,**

Ketua

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

Anggota I

Anggota II

Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi.

Dr. Yuni Kilawati, SPi., MSi.

Mengetahui,

Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.



JUDUL DISERTASI :

**POTENSI EKSPRESI BIOMARKER PADA IKAN GAMBUSIA  
(*Gambusia affinis*) YANG TERPAPAR LOGAM BERAT  
(STUDI KASUS SUNGAI WANGI DAN KADMIUM)**

Nama Mahasiswa : Moh. Awaludin Adam

NIM : 157080100111002

Program Studi : Perikanan dan Ilmu Kelautan

Minat : Manajemen Sumberdaya Perairan dan Lingkungan

Bidang : Ekotoksikologi

**KOMISI PEMBIMBING :**

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

Anggota : Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi.

Anggota : Dr. Yuni Kilawati, SPi., MSi.

**TIM DOSEN PENGUJI :**

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS.

Dosen Penguji 2 : Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MSi.

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

**TIM DOSEN PENGUJI TAMU :**

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. agr. Moh. Amin, S.Pd., M.Si.

Dosen Penguji 2 : Prof. Dr. Christophe Minier HDR.

Tanggal Ujian : 10 Juli 2019

**SK Penguji : 83/UN10.F06.14.22/PP/2019**

**PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI**

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

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

Malang,  
Mahasiswa

Moh. Awaludin Adam  
157080100111002





*Karya ilmiah ini kutujukan kepada  
Ayahanda dan Ibunda tercinta,  
Istriku dan Anakda tersayang  
Fajarrizma Aryati dan Ibad Danish G*

**HALAMAN RIWAYAT HIDUP**



Moh. Awaludin Adam, Lombok, 30 Juni 1987 anak dari Ayah Moh. Amin dan Ibu Sainah, SD sampai SMP di Lombok Timur dan SMA di Kota Mataram lulus SMA tahun 2005, studi Sarjana S1 Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan Minat Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada tahun 2006, studi Magister S2 Jurusan Bioteknologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya pada tahun 2011. Pengalaman kerja sebagai asisten Praktikum dan asisten Dosen di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya 2008 – 2012; Manajer Pengembangan Produk di Perusahaan New Idea dan New Era, Surabaya 2013 – 2015; Account Eksekutif di Perusahaan PT. Malang Multimedia Mandiri, Malang 2015 – 2016; Dosen Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ibrahimy, Situbondo 2014 – sekarang; Juara I Desain Kampung Tematik Kota Malang: “Bamboo Mewek Park” Tahun 2016; Bidang Pengembangan Sumberdaya Masyarakat (SDM) Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) – Universitas Brawijaya Malang 2017 – 2019; Direktur CV. Ideas Creative Solutions (ICS).

**Malang,  
Penulis**



## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Ibunda *Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D.* selaku pembimbing utama (promotor), Ayahanda *Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi.* dan Ibunda *Dr. Yuni Kilawati, SPi., MSi.* selaku co-promotor.
- Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
- Ketua Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
- Kiayi Pengasuh Pondok Pesantren Salafiyah Safiyah, Sukorejo, Situbondo
- Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ibrahimy, Situbondo.
- Rekan-rekan penulis dan warga desa Beujeng, Kecamatan Beji Pasuruan yang telah banyak memberikan bantuan dan ikut berperan dalam memperlancar penelitian dan penulisan disertasi ini.
- Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan kepada Ibunda dan Ayahanda tercinta, atas dorongan yang kuat, kebijaksanaan dan do'a.
- Ucapan terima kasih secara khusus penulis sampaikan kepada istri tercinta *Fajarrizma Aryati* yang senantiasa memberikan dukungan moral dan material serta menjadi teman setia dalam segala urusan kuliah S3 dari pertama masuk kuliah hingga waktu yang tak terhingga dan Anakda *Ibad Danish Ghaisani* yang selalu menjadi penghibur dan pelipur lara disetiap waktu.

Malang,

Penulis

## RINGKASAN

**Moh. Awaludin Adam** Program Doktor Pascasarjana Universitas Brawijaya 2015. Potensi Ekspresi Biomarker Pada Ikan Gambusia (*Gambusia affinis*) yang Terpapar Logam Berat (Studi Kasus Sungai Wangi dan Kadmium) Komisi Pembimbing; Ketua: Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D. Anggota: Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi. dan Dr. Yuni Kilawati, SPI., MSi.

Kondisi lingkungan disekitar aliran sungai Wangi apabila dilihat dari kondisi eksistingnya sangat memprihatinkan dengan banyaknya sampah yang terdapat di sepanjang aliran. Baik dari sampah pemukiman maupun sampah pertanian, sedangkan dari industri kebanyakan berupa limbah cair. Hasil identifikasi sumber pencemar dibagi menjadi 3 (tiga) area kajian yaitu area kajian I (limbah pabrik/industri), area kajian II (limbah pemukiman) dan area kajian III (limbah pertanian). hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada sungai Wangi = 5,503 yang berarti kondisi sungai Wangi termasuk pada klasifikasi “**cemar sedang**”.

Salah satu biota sebagai biomonitoring di aliran sungai Wangi adalah Ikan Gambusia (*Gambusia affinis*). Ikan gambusia mampu bertahan hidup dan berkembang biak pada lingkungan yang tercemar limbah. Ikan Gambusia dikelompokkan dalam spesies invasive asing dengan ciri-ciri memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi terhadap perubahan lingkungan dan mampu berkembang biak dengan cepat. Dalam mengamati efek yang terjadi, khususnya cemaran logam berat cadmium pada ikan gambusia, perlu dilakukan pengamatan toksisitas kadmium di laboratorium.

Nilai toksisitas letal ( $LC_{50-96}$  jam)  $Cd^{2+}$  pada ikan gambusia (*Gambusia affinis*), yaitu sebesar  $0,03 \pm 0,009$  mg/L yang dapat dikategorikan kedalam golongan dengan daya racun yang sedang (*medium toxic*); Paparan logam berat cadmium menyebabkan meningkatnya aktivitas protease pada ikan gambusia 0,2-0,3 mmol/ml/menit; Pengamatan pada histopatologi memperlihatkan adanya perubahan hiperplasia tulang rawan hyalin, proliferasi sel mukus, hipertropi sel klorid, hiperplasia lamella sekunder dan fusi lamella sekunder; dan paparan akut *Gambusia affinis*  $Cd^{2+}$  dapat menyebabkan perubahan histopathology organisme.  $Cd^{2+}$  (bahkan pada konsentrasi lingkungan) mungkin memiliki dampak negatif pada beberapa proses biokimia yang terhubung dengan produksi spesies oksigen reaktif dan radikal bebas dalam organisme ikan.

Menurut hasil pemeriksaan dan pemindaian secara *scanning elektron mikroskopi*, efek paparan kadmium pada luas permukaan CC dan kepadatannya pada gambusia muda dengan hasil terdapat kerenggangan antara luas permukaan dan kepadatan CC; Selain itu ditemukan hasil bahwa kadmium pada sitoskeleton insang gambusia, dan terutama pada filamen aktin mengalami perubahan morfologi dengan adanya penyerapan dari paparan kadmium; dan Paparan terhadap Kadmium menyebabkan stres oksidatif pada insang ikan *Gambusia* melalui peningkatan enzim SOD, CAT, MDA, GPx, GSH dan  $H_2O_2$ .

Mekanisme penyerapan kadmium memasuki ekosistem perairan melalui aktivitas antropogenik dan biotransformasi yang berlangsung di insang. Mekanisme penyerapan terjadi secara homeostasis dan mengganggu metabolisme ion lainnya dengan menghasilkan hypocalcaemia dan hiperglikemia. Ikan *Gambusia* mampu mengakumulasi dan menganalisa dampak

paparan kadmium pada insang di sitoskeleton, chloride sel dan macropinositosis. Ikan menggunakan insang sebagai organ utama dalam pernapasan. Proses pernapasan berlangsung dalam insang melalui osmosis dan difusi. Organ insang memiliki kemampuan bioavailabilitas terhadap kondisi lingkungan. Ion dan logam berat terfiltrasi dalam organ insang. Sehingga insang juga mampu mengakumulasi logam berat dan ion yang masuk dalam tubuh. Akumulasi logam berat cadmium dalam tubuh ikan terjadi pada organ insang, hati dan ginjal. Pendeteksian akumulasi cadmium dapat dilakukan dengan biomarker metalotionein (MT). Proses penyerapan cadmium terjadi pada protein dalam organ insang. Ekspresi MT menggambarkan tingkat serapan cadmium dan instrument diagnostic pada ikan.



## SUMMARY

**Moh. Awaludin Adam** Doctoral Programme Pascasarjana Universitas Brawijaya 2015. Study Express of Biomarker Potential at Gambusia Fish (*Gambusia affinis*) as Detector of Cadmium (Cd) Pollutant. Promotor; Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA., Ph.D. Co-Promotor: Prof. Dr. Ir. Maftuch, MSi. And Dr. Yuni Kilawati, SPI., MSi.

The environmental conditions around the Wangi river flow when viewed from the existing conditions are very concerning with a large amount of waste found along the stream. Both from residential waste and agricultural waste, while the industry mostly consists of liquid waste. The results of identification of pollutant sources a divided into 3 (three) study areas, namely study area I (factory / industrial waste), study area II (residential waste) and study area III (agricultural waste). The results of data analysis using the pollution index (PI) method, the average pollution index (PIR) on the Wangi river = 5.503, which means that the condition of the Wangi river belongs to the classification of "**moderate pollutants.**"

One biota as biomonitoring in streams Wangi is *Gambusia* fish (*Gambusia affinis*). *Gambusia* fish can survive and breed in waste-polluted environments. *Gambusia* fish a grouped in foreign invasive species with the characteristics of having high adaptability to changes in the background and being able to reproduce rapidly. In observing the effects, in particular, heavy metal cadmium contamination in fish *Gambusia*, need to be observed toxicity of cadmium in the laboratory.

Lethal toxicity value (LC50-96 hours) Cd<sup>2+</sup> in *Gambusia* fish, which is equal to 0.03 ± 0.009 mg / L which a categorized into groups with moderate toxicity (medium toxic). Exposure to heavy metals cadmium causes increased protease activity in fish *Gambusia* 0.2-0.3 mmol /ml/min; Observations on histopathology showed changes hyalin cartilage hyperplasia, mucus cell proliferation, cell hypertrophy chloride, secondary hyperplasia lamellae, and secondary lamellae fusion; and acute exposure *Gambusia affinis* Cd<sup>2+</sup> can cause changes in the organism histopathology. Cd<sup>2+</sup> (even at concentrations environment) may hurt some of the biochemical processes associated with the production of reactive oxygen species and free radicals in the organism of fish.

According to the results of scanning and scanning electron microscopy, the effect of exposure to cadmium on the CC surface area and its density in young adults with results there is a gap between surface area and CC density. Also found results that cadmium on gill *Gambusia* cytoskeleton, and especially on the actin filaments morphologic change with the absorption of cadmium exposure. Exposure to Cadmium causes oxidative stress on the gills of fish *Gambusia* through increasing SOD, CAT, MDA, GPx, GSH, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The mechanism of absorption of cadmium enters the aquatic ecosystem through anthropogenic activity and biotransformation that takes place in the gills. The arrangement of incorporation occurs by homeostasis and interferes with another ionic metabolism by producing hypocalcemia and hyperglycemia. *Gambusia* fish can accumulate and analyze the effects of exposure to cadmium on the gills in the cytoskeleton, cell chloride, and macropinocytosis. Fish use gills as the principal organ in breathing. The breathing process takes place in the gills through osmosis and diffusion. Gill organs have the ability to bioavailability of environmental conditions. Ions and heavy metals filtered in gill organs. So that the gills are also able to accumulate heavy metals and ions that enter the body.

Accumulation of heavy metal cadmium in the shape of the fish occurs in the gills,

liver, and kidneys. Detection of cadmium accumulation to done by biomarker metallothionein (MT). The process of absorption of cadmium occurs in proteins in the gill organs. Expression of MT describes the level of uptake of cadmium and diagnostic instruments in fish.



## KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan tulisan disertasi yang berjudul : **POTENSI EKSPRESI BIOMARKER PADA IKAN GAMBUSIA (*Gambusia affinis*) YANG TERPAPAR LOGAM BERAT (STUDI KASUS SUNGAI WANGI DAN KADMIUM)**. Di dalam tulisan ini, disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi identifikasi dan analisa cemaran limbah Cd sebagai bahan pencemar dan akibat yang ditimbulkan pada ikan gambusia dalam kasus pencemaran yang terjadi di aliran sungai Wangi yang dilakukan dengan langkah-langkah (a) mendapatkan hasil analisa profil serta model hubungan Cd pada ikan gambusia dengan Cd pada lingkungan (b) mendapatkan hasil analisa toksisitas dan memperoleh data tingkat toksik ambang lethal Cd terhadap ikan gambusia (c) menentukan pengaruh level dosis sub kronis pada ukuran ikan gambusia yang berbeda terhadap pertumbuhan dan mendapatkan ekspresi kuantitatif dan kualitatif metalotionein pada insang dan hati Ikan gambusia (d) menentukan ikan gambusia sebagai potensi biomonitoring pencemaran logam berat Cd di sungai Wangi. Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang,

Penulis



	<b>DAFTAR ISI</b>
	<b>Halaman</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>ix</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xviii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xx</b>
<b>GLOSARIUM</b> .....	<b>xxi</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan .....	6
1.4 Manfaat .....	7
1.5 Kebaharuan Penelitian .....	8
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>9</b>
2.1 Hasil Penelitian Terdahulu .....	9
2.2 Landasan Teori .....	11
2.2.1 Aliran Sungai Wangi .....	11
2.2.2 Pencemaran Kadmium (Cd) .....	12
A. Toksisitas .....	12
B. Pencemaran Logam Berat Kadmium (Cd) .....	13
2.2.3. Biologi Ikan Gambusia .....	16
A. Klasifikasi Ikan Gambusia .....	16
B. Habitat Ikan Gambusia .....	18
C. Potensi Biomonitoring .....	18
D. Biomarker .....	19
2.2.4 Metallothionein (MT) .....	21
A. Ekspresi Metallothionein .....	22
B. Mekanisme Pengikatan Logam oleh Metallothionein .....	23
C. Deteksi MT dengan <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	25



2.2.5 Antioksidan dan Radikal Bebas.....	25
A. Produksi ROS pada ikan.....	28
B. Mekanisme Pertemuan Antara Antioksidan dan ROS.....	30
<b>BAB III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN .....</b>	<b>33</b>
3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	33
3.2 Kerangka Operasional Penelitian .....	35
3.2.1. Variable Penelitian .....	37
3.2.2. Hipotesis.....	40
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>41</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	41
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian .....	42
4.3 Instrumen Penelitian .....	42
4.3.1 Bahan.....	42
4.3.2 Alat.....	42
4.3.3 Hewan Uji.....	43
4.4 Metode Pengumpulan Data dan Informasi.....	43
4.4.1 Prosedur Penelitian Tahap I.....	43
4.4.2 Prosedur Penelitian Tahap II.....	44
4.4.3 Prosedur Penelitian Tahap III.....	46
4.5 Analisis Data.....	48
4.5.1 Analisis Data Penelitian Tahap I.....	48
4.5.2 Analisis Data Penelitian Tahap II.....	49
4.5.3 Analisis Data Penelitian Tahap III.....	49
<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>48</b>
5.1 Identifikasi Kualitas Lingkungan Sungai Wangi Yang Teraliri Cemaran Limbah Berdasarkan Indeks Pencemaran Pada Lingkungan .....	48
5.1.1 Identifikasi Sumber Pencemar.....	48
5.1.2 Hasil Analisis Kualitas Air.....	51
5.1.3 Hasil Analisis Logam Berat.....	52
5.1.4 Indeks Pencemaran.....	55
5.1.5 Efek Cemaran Lingkungan terhadap Ikan Gambusia .....	59
5.2 Paparan Dosis Akut Cd dan Dosis Subkronis pada Ikan Gambusia.....	62
5.2.1 Paparan Dosis Akut Cd/Uji Toksisitas Letal (LC <sub>50</sub> -96 jam).....	62
5.2.2 Paparan Dosis Subkronis .....	66

5.3 Pengaruh Paparan Dosis Akut dan Subkronis pada Ikan Gambusia	69
5.3.1 Gejala Klinis Ikan Gambusia.....	69
5.3.2 Gambaran Histologi Insang Ikan Gambusia yang Terpapar Kadmium.....	71
5.3.3 Deteksi Protein Metallothionein.....	83
5.3.4 Aktivitas Magrofage dan Pinositosis.....	86
5.3.5 Pengaruh terhadap Zat Antioksidan.....	89
<b>BAB VI. PEMBAHASAN UMUM.....</b>	<b>94</b>
<b>BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>101</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>103</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>119</b>



DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Hasil Penelitian Terdahulu tentang Topik yang Sama .....	8
3.1 Variabel Penelitian .....	37
5.1 Jenis Industri sekitar Area Kajian I .....	50
5.2 Jenis buangan limbah sekitar Area Kajian II .....	50
5.3 Rata-rata Kualitas Air Musim Penghujan dan Kemarau .....	52
5.4 Hasil Rata-rata Nilai Pengujian Logam Berat Pb, Cd dan Hg di sampel Air, Sedimen dan Ikan .....	54
5.5 Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran Area Kajian I Sungai Wangi – Pasuruan Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017 .....	56
5.6 Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran Area Kajian II Sungai Wangi – Pasuruan Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017 .....	57
5.7 Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran Area Kajian III Sungai Wangi – Pasuruan Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017 .....	57
5.8 Hasil Perhitungan Rata-Rata Ci/Lij Baru .....	59
5.9 Kisaran Konsentrasi pada Perlakuan Berdasarkan Konsentrasi Anjuran dan Persentase Mortalitas .....	68
5.10 Rata-rata mortalitas Ikan Gambusia pada uji definitif akut .....	69
5.11 Hasil Pengujian Probabilitas LC <sub>50</sub> 96 jam dengan Software MINITAB 14..	70
5.12 Rata-rata penurunan konsentrasi kadmium harian .....	73
5.13 Konsentrasi kadmium pada Ikan Gambusia setelah paparan .....	75
5.14 Gejala Klinis ikan gambusia setelah paparan cadmium dosis berbeda dan jumlah kematian ikan selama 28 hari pengamatan .....	77
5.15 Perbandingan aktivitas Catalase (CAT, $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), (SOD, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), hydrogen peroxidase (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), glutathione S-hydrogen (GSH, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), glutathione peroxidase (GPx, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), protease activity (PA, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) and the level of lipid peroxidation (MDA, $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) setelah terpapar CdNO <sub>3</sub> dengan semua kelompok perlakuan dan terhadap kontrol .....	98
5.16 Komparasi hasil pengujian oksidatif stress pada ikan Gambusia yang dipapar Cd dalam aktivitas MDA, Hidrogen Peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), Superoksida (SOD), Catalase (CAT), Glutathione S-hydrogen (GSH) dan Glutathione peroxidase (GPx) dibandingkan dengan perlakuan dan control .....	99

DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 Ikan Gambusia Betina.....	16
2.2 Ikan Gambusia Jantan.....	17
2.3 Beberapa contoh signal dampak pada sistem biologi akibat pemaparan lingkungan terhadap berbagai <i>stressor</i> (Broeg <i>et al.</i> , 2005).....	19
2.4 Ketidakseimbangan vs cacat sebagai indikator toksisitas bahan kimia pencemar (diadopsi dari Depledge, 1989).....	21
2.5 Model struktur pengikatan logam oleh PsMTA.....	24
3.1 Kerangka Konsep Penelitian .....	33
3.2 Operasional Tahap I.....	34
3.3 Operasional Tahap II .....	35
3.4 Operasional Tahap III .....	35
5.1 Peta Hasil Identifikasi Sumber Pencemar pada Sungai Wangi.....	48
5.2 Kondisi Kualitas Lingkungan Sekitar Aliran Sungai Wangi (A) Area Industri, (B) Area Pemukiman dan (C) Area Pertanian.....	50
5.3 Perbandingan Hasil Pengamatan Logam Berat di Aliran Air Sungai dengan Baku Mutu Air .....	53
5.4 LC50 96 jam uji toksisitas definitif akut pada Ikan Gambusia .....	62
5.5 Konsentrasi kadmium pada Ikan Gambusia Cd <sup>2+</sup> subkronis.....	66
5.6 Struktur insang ikan. A) Area industri, B) Area rumah tangga, C) Area pertanian dan K) Kontrol sebagai pembanding. <i>lamella primer</i> (LP) dan <i>lamella</i> sekunder (LS) dari tiga area berbeda telah berubah. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop Olympus perbesaran 40x;20µm.....	69
5.7 Morfologi insang ikan Gambusia yang terpapar Cd, diamati melalui pewarnaan HE (40x), A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop Olympus 40x;20µm adanya perubahan pada <i>lamella primer</i> (LP) dan <i>lamella</i> sekunder (LS).....	71
5.8 Morfologi insang ikan Gambusia yang terpapar Cd, diamati melalui pewarnaan Rhodamin-Fluorescent (40x) dengan penyerapan enzim MT dan diamati dengan mikroskop konfokal (CL-SM), A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop konvokal.....	75
5.9 Hologram insang ikan Gambusia yang terpapar Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop konvokal.....	76



5.10	Tingkat Serapan Paparan Kadmium pada Setiap Perlakuan.....	77
5.11	Morfologi mikrofilamen insang ikan Gambusia secara mikroskopis, (A) menunjukkan mikrofilamen insang ikan tanpa perlakuan; (B) menunjukkan mikrofilamen dengan perlakuan paparan Cd.....	79
5.12	Morfologi penampang sel chloride pada sampel A (tanpa perlakuan paparan CdNO <sub>3</sub> ) dan sampel B (perlakuan paparan Cd <sup>2+</sup> ). Menunjukkan adanya perbedaan luas permukaan dan variasi kerapatan pada CC, PVC yang semula luasnya sempit dengan kerapatan tinggi, setelah terpapar menjadi renggang dan luasnya membesar. ....	80
5.13	Hasil EDAX dari SEM untuk ikan control (A) dan ikan yang diberi perlakuan paparan cadmium (B). Data lengkap tidak ditampilkan.....	81
5.14	Pengukuran protein MT menggunakan ELISA. Data tersebut menampilkan bahwa pada ikan control sesuai dengan hasil pengujian terdeteksi adanya kadar MT 0.015±0.001, tidak terlalu berbeda secara signifikan dengan perlakuan tertinggi 0.042±0.002.....	83
5.15	Hasil Uji Western Blotting Serapan Cd pada Sampel serapan pada berat molekul 75 kDa. Serapan pada K0, K1, K2 dan K3 sebagai area kontrol tetap ada serapan MT-Cd namun tipis. Demikian juga pada C, D dan E hampir sama dengan K. Serapan pada A dan B memiliki ben yang paling tebal.....	84
5.16	Hasil Pengujian ROS pada ikan Gambusia (Rerata±SD). Perlakuan A : 0,03 mg/L 195,01±4,89 U/mL; B : 0,015 mg/L 165,55±7,62 U/mL; C : 0,0115 mg/L 86,17±6,74 U/mL; D : 0,0075 mg/L 28,97±3,17 U/mL; E : 0,0035 mg/L 28,22±3,33 U/mL; dibandingkan dengan control 22,74±0,63 U/mL;.....	88
5.17	Jumlah sel makrofage yang dihasilkan oleh paparan Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L disbanding K (Kontrol) terhadap insang ikan Gambusia.....	90
5.18	Jumlah aktivitas pinositosis pada paparan Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L disbanding K (Kontrol) terhadap insang ikan Gambusia.....	91
5.19	Mekanisme Detoksifikasi Paparan Cd.....	93
5.20	Paparan Akut pada Parameter Oksidatif Stress.....	94
5.21	Paparan Subkronis pada Parameter Oksidatif Stress.....	94

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Peta Lokasi Penelitian .....	119
2. Prosedur Pembuatan Preparasi Sampel .....	120
3. Analisa Perhitungan Statistik .....	140



GLOSARIUM

<b>Atomic Absorbtion Spectofotometer</b>	<b>AAS</b>	Spektrofotometri Serapan Atom adalah salah satu jenis analisa spektrofometri dimana dasar pengukurannya adalah pengukuran serapan suatu sinar oleh suatu atom, sinar yang tidak diserap, diteruskan dan diubah menjadi sinyal listrik yang terukur
<b>Berat Molekul</b>	<b>BM</b>	Berat suatu molekul dalam satuan massa atom (sma)
<b>Confocal Laser Scanning Microscopy</b>	<b>CL-SM</b>	Teknik pencitraan optik untuk meningkatkan resolusi optik dan kontras dari mikrograf dengan cara menambahkan lubang jarum spasial ditempatkan di confocal bidang lensa untuk menghilangkan out-of-focus cahaya
<b>Daerah Aliran Sungai</b>	<b>DAS</b>	Air yang mengalir pada suatu kawasan yang dibatasi oleh titik-titik tinggi dimana air tersebut berasal dari air hujan yang jatuh dan terkumpul dalam sistem tersebut
<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</b>	<b>ELISA</b>	Rapid test atau uji cepat dalam mendeteksi atau mengkuantifikasi jumlah antibodi atau antigen melawan virus, bakteri, atau bahan lain
<b>Imunohistokimia</b>	<b>IHK</b>	Metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup
<b>Kadmium</b>	<b>Cd</b>	Logam kebiruan yang lunak, termasuk golongan II B table berkala dengan konfigurasi elektron [Kr] 4d105s2. unsur ini bernomor atom 48, mempunyai bobot atom 112,41 g/mol dan densitas 8,65 g/cm3
<b>Kadmium Nitrit</b>	<b>CdNO<sub>3</sub></b>	Reaksi hidrolisis antara Cd dan Nitrit dalam perairan sehingga menghasilkan senyawa asam
<b>Lethal Concentration 50</b>	<b>Lc<sub>50</sub></b>	Konsentrasi yang menyebabkan kematian pada 50% binatang percobaan
<b>Metallothionein</b>	<b>MT</b>	Protein dengan berat molekul rendah (4-8 kDa), kaya akan sistein (25-33%), tidak memiliki asam amino aromatik, bersifat mengikat logam berat, serta diketahui berperan dalam homeostasis dan detoksifikasi ion-ion logam
<b>Western Blotting</b>	<b>WB</b>	Sebuah metode untuk mendeteksi protein pada sampel jaringan. Immunoblot menggunakan elektroforesis gel untuk memisahkan protein asli atau perubahan oleh jarak polipeptida atau oleh struktur 3-D protein

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pertumbuhan dan perkembangan industri yang semakin pesat merupakan dampak dari era globalisasi yang terjadi sekarang ini. Namun, perkembangan industri yang tidak terkontrol dan kurangnya kesadaran dari pelaku industri tentang pentingnya menjaga kelestarian lingkungan, menjadi penyebab kerusakan lingkungan. Masalah terbesar seiring perkembangan industri tersebut, adalah pembuangan limbah ke aliran sungai. Limbah inilah yang diperkirakan menjadi penyebab utama terjadinya pencemaran lingkungan perairan.

Permasalahan timbul apabila terjadi pencemaran lingkungan pada suatu wilayah perairan, terkait dampak yang sangat merugikan bagi kehidupan organisme di wilayah tersebut. Pencemaran yang diakibatkan limbah industri akan menimbulkan banyaknya akumulasi bahan pencemar dalam perairan. Bahan-bahan pencemar dari limbah industri banyak mengandung limbah logam berat. Seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Durube, *et.al.*, (2007) dengan hasil bahwa sebagian besar bahan-bahan pencemaran logam berat banyak mengandung zat beracun antara lain raksa (Hg), kadmium (Cd), krom (Cr), timbal (Pb), tembaga (Cu). Lebih lanjut Priadi, *et.al.*, (2014) melaporkan bahan-bahan beracun tersebut merupakan hasil akhir dari proses produksi baik sebagai bahan baku, bahan katalisator maupun bahan utama dalam kegiatannya.

Logam berat dalam limbah akan terbawa oleh aliran air, selanjutnya akan terserap dalam substrat dan tubuh ikan, kemudian dalam tubuh ikan akan diikat oleh protein thionein yang disintesis dalam hati. Selanjutnya akan disebarakan ke

seluruh tubuh melalui mekanisme peredaran darah dalam tubuh ikan (Soemirat, 2005). Salah satu cemaran yang utama adalah logam berat Cd yang memiliki daya toksik tinggi dan bersifat merugikan bagi kesehatan lingkungan perairan, terutama ikan (Wang, *et.al*, 2014). Logam berat Cd akan terakumulasi pada organ hati dan ginjal ikan. Logam berat Cd dapat menimbulkan perubahan pada struktur jaringan, steroid, telur dan sperma pada ikan seperti ikan carp (*Cyprinus carpio*) dan *Rainbow trout* dan beberapa hormon sintetis lainnya pada testis (Levit, 2010).

Salah satu kasus pencemaran perairan yang sedang hangat terjadi yaitu kasus pencemaran aliran air sungai Wangi. Sungai Wangi merupakan aliran sungai yang melintasi Kecamatan Pandaan dan Kecamatan Beji, tepatnya melewati Desa Wangi Kecamatan Beji Kabupaten Pasuruan. Seperti yang dilansir dari Badan Lingkungan Hidup (BLH) Kabupaten Pasuruan tahun 2015 bahwa kondisi sungai Wangi mulai tercemar lagi sama seperti kasus pencemaran dalam beberapa tahun sebelumnya. Kadar logam berat akan semakin meningkat dengan adanya pencemaran di aliran air dan semuanya akan bermuara di laut. Limbah yang didalamnya banyak kandungan logam berat, biasanya berasal dari kegiatan industri, pemukiman dan pertanian (Maslukah, 2010).

Permasalahan dan kasus di atas menggambarkan bahwa sudah banyak penelitian yang mengkhususkan studi tentang analisis pencemaran logam berat diperairan baik perairan sungai maupun perairan laut. Namun secara khusus studi tentang analisa dan identifikasi logam berat khususnya Cd dalam kasus pencemaran yang terjadi di Sungai Wangi, Desa Beujeng, Kecamatan Beji, Kabupaten Pasuruan belum teridentifikasi. Padahal pencemaran Cd bisa sangat berbahaya bagi manusia dan lingkungan perairan. Soemirat, (2005) memaparkan bahwa kasus yang pertama kali dilaporkan terjadi di Jepang yang

menimbulkan penyakit itai-itai sebagai akibat dari keracunan kronis pada nelayan dan keluarganya akibat logam berat Cd dan mengakibatkan kematian sampai 100 jiwa manusia.

Kasus pencemaran yang terjadi tersebut tidak berlebihan apabila timbul kekhawatiran akan berpengaruh terhadap kesehatan masyarakat yang bertempat tinggal di kawasan DAS Wangi. Hal tersebut akan berpengaruh terhadap aktivitas masyarakat yang menggunakan air sungai Wangi untuk kebutuhan sehari-hari banyak juga warga yang memanfaatkan hasil tangkapan ikan (pancing) di aliran sungai Wangi.

Berbagai jenis organisme diketahui dapat mengakumulasi logam berat dalam jumlah besar seperti ikan, kerang-kerangan, tanaman disekitar sungai dan bahkan pada mikroorganisme. Namun dalam kajian ini akan lebih difokuskan terhadap akumulasi logam berat yang terjadi pada ikan, dimana sepanjang aliran sungai Wangi ikan yang banyak dan bisa dijadikan monitor adalah ikan Gambusia (*Gambusia affinis*). Pendekatan inilah yang menjadi dasar penelitian untuk pengembangan proses *biomonitoring* dengan memanfaatkan kemampuan aktivitas biosorpsi (biomarker) melalui metabolisme pada organ insang ikan Gambusia. Menurut Araujo, *et.al.*, (2009) ikan dari famili *Poeciliidae* merupakan salah satu jenis ikan air tawar yang hidup bebas diperairan dan tersebar luas di daerah tropis. Ikan tersebut mudah beradaptasi dan memiliki toleransi tinggi terhadap rentang suhu dan salinitas, bahkan terhadap perairan yang tercemar.

Biomonitoring yang memanfaatkan potensi biomarker dalam organ ikan Gambusia mampu dijadikan suatu indikator untuk menganalisis tingkat cemaran Cd yang terjadi di sungai Wangi. Bioakumulasi logam berat Cd dalam tubuh ikan sebagai penanda/biomarker terdapat pada organ insang, hati dan ginjal mereka (ATSDR, 2008; EPA, 2002; Levit, 2010). Sehingga kajian ini akan lebih

difokuskan pada penelusuran penggunaan biomarker pada ikan Gambusia sebagai monitoring pencemaran di aliran sungai Wangi.

Monitoring yang dilakukan pada kualitas lingkungan aliran sungai wangi menjadi suatu alasan untuk melakukan percobaan pada tingkat laboratorium terkait seberapa besar pengaruh cemaran Cd yang masuk melalui lingkungan menuju ke biota. Besarnya pengaruh tersebut akan mampu diamati dan diketahui bilamana dilakukan suatu percobaan dan pengamatan dalam lingkungan yang terkontrol. Pengaruh yang diharapkan bisa untuk diamati yang paling penting adalah terhadap organ vital dari ikan gambusia yaitu insang. Pengamatan yang sangat diperlukan adalah efeknya terhadap histologi, kadar paparan cemaran, enzim yang bekerja dalam melakukan proses penangkalan dan respon terhadap imunitas dari ikan tersebut dilihat dari kerja enzim yang ada pada organ insang.

## 1.2 Rumusan Masalah

Proses pencemaran lingkungan dari kandungan logam berat memiliki efek biotoksik dalam biokimia tubuh yang menjadi perhatian penting pada ilmu pengetahuan. Logam-logam berat banyak dihasilkan dari sumber antropogenik seperti kegiatan pertambangan dan kegiatan industri. Bahan-bahan beracun tersebut bersifat toksik (beracun) dalam proses oksidasi yang masuk ke dalam perairan (Duruibe, *et.al.*, 2007).

Pengujian pengaruh cemaran logam berat Cd pada perairan sudah pernah dilakukan dengan identifikasi pada pengujian protein MT-1 yang terdapat dalam hati bulu babi (*Deadema setosum*) dan dapat dijadikan sebagai biomonitoring pencemar bahan beracun dari logam berat di perairan pada tingkat molekuler (Rumahlatu, *et.al.*, 2013).

Secara alamiah, unsur logam berat terdapat dalam perairan namun jumlahnya sangat rendah. Kadar ini akan meningkat apabila jumlah limbah yang

mengandung logam berat juga meningkat dan masuk ke dalam perairan sehingga menjadi racun bagi organisme perairan (Hutagalung dan Razak, 1982).

Secara fisiologis, ikan yang terpapar logam berat dapat menyerap melalui rantai makanan maupun secara difusi pasif melalui membran organ luar ikan termasuk kulit dan insang (Siregar, *et.al.*, 2012). Ikan yang hidup pada perairan yang mengandung logam berat akan mengakumulasi logam berat secara pasif sejalan dengan proses absorpsi (Purnawan, *et.al.*, 2013).

Pengujian tingkat akumulasi logam berat pada organ ikan yang berbeda seperti hati, insang dan otot sangat perlu dilakukan. Insang dan hati merupakan indikator penilaian akumulasi logam berat. Konsentrasi logam berat di insang menggambarkan besarnya konsentrasi di perairan, konsentrasi pada hati menggambarkan penyimpanan logam berat. Evaluasi logam berat yang masuk ke dalam tubuh organisme dapat dilakukan dengan menentukan jumlah logam berat terakumulasi pada organisme (Beitinger, 1990).

Biomarker atau biological markers atau marka biologis adalah suatu teknik pengukuran spesimen biologis yang dapat menjelaskan hubungan antara pemaparan lingkungan dan timbulnya kerusakan atau dampak buruk pada organisme (CBM-NRC, 1992). Penggunaan biomarker digunakan untuk mendeteksi dan memantau keberadaan logam berat di dalam perairan. Selain itu, dapat juga digunakan sebagai penanda jumlah logam berat yang terserap ke dalam tubuh organisme dan toksisitas serta pengaruh yang ditimbulkan pada sistem biologis organisme pada kadar tertentu. Kajian biomarker dapat dijadikan sebagai awal pengendalian terjadinya pencemaran karena dengan adanya biomarker pada organisme maka upaya pengendalian pencemaran ekosistem perairan bisa diatasi.

Selain itu perlu juga dilakukan kajian terhadap efek yang terjadi karena adanya paparan logam berat tersebut yang terjadi di lingkungan perairan. Lebih

jelasanya terkait tentang proses kerusakan dan efek yang ditimbulkan sangat diperlukan sebuah percobaan dan pengamatan pada skala laboratorium. Kondisi yang terkontrol pada laboratorium akan mempermudah dalam pengamatan dan lebih spesifik terhadap efek yang ditimbulkan, baik terhadap tingkat kerusakan organ, proses penangkalan yang terjadi terhadap paparan logam berat serta respon yang terjadi terhadap imunitas dari organ yang terpapar tersebut.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan dalam penelitian sebagai berikut :

1. Bagaimana status kualitas lingkungan sungai Wangi yang teraliri cemaran limbah berdasarkan indeks pencemaran pada lingkungan?
2. Berapa batas dosis akut Cd ( $LC_{50}$  96 jam) dan dosis subkronis (28 hari) pada ikan gambusia?
3. Bagaimana efek paparan dosis lethal akut dan dosis sub kronis pada Ikan Gambusia terhadap respon imun dari proses sitotoksisitas pada organ insang?

### **1.3 Tujuan**

#### **1.3.1 Tujuan Umum :**

Mengidentifikasi dan menganalisis cemaran limbah paling berpengaruh pada aliran sungai Wangi sebagai bahan pencemar dan akibat yang ditimbulkan pada ikan Gambusia

#### **1.3.2 Tujuan Khusus :**

1. Mengidentifikasi kualitas lingkungan sungai Wangi yang teraliri cemaran limbah berdasarkan indeks pencemaran pada lingkungan
2. Menganalisa data tingkat toksik ambang lethal akut dan subkronis paparan logam berat paling berpengaruh (cadmium) terhadap Ikan Gambusia

3. Menentukan efek paparan dosis lethal akut dan dosis sub kronis pada ikan Gambusia terhadap respon imun dari proses sitotoksitas pada organ insang

#### 1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kegunaan yang meliputi tiga hal pokok sebagai berikut :

1. Kegunaan bagi dunia pendidikan/ilmu pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam mengkaji atau melakukan kegiatan penelitian tentang akumulasi dan acuan biomonitoring limbah Cd pada ikan Gambusia.

2. Kegunaan bagi masyarakat

Hasil penelitian diharapkan mampu memberikan manfaat bagi masyarakat terutama dalam menyikapi permasalahan yang timbul dalam kehidupan sehari-hari, yang tergolong menjadi :

- a. Kegunaan umum

Meningkatkan perhatian Pemerintah Daerah Kabupaten Pasuruan termasuk Badan Lingkungan Hidup dan Bapedalda dan instansi terkait lainnya terhadap penanganan limbah industri

- b. Kegunaan khusus

Memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat mengenai kualitas air di aliran sungai sehubungan dengan pemanfaatan dan aktivitas masyarakat di sekitar sungai

3. Kegunaan bagi industri/pabrik

Sebagai acuan bagi kegiatan industri untuk selalu memperhatikan pengolahan limbah dalam proses produksi sebelum limbah tersebut dibuang ke perairan.

### 1.5 Kebaharuan Penelitian

Penelitian-penelitian mengenai analisis dan laju akumulasi logam berat memang bukan hal yang baru, demikian juga tentang bioakumulasi yang terjadi pada ikan. Namun sejauh ini belum ada penelitian yang membahas tentang pencemaran di aliran sungai Wangi secara umum, dan cemaran limbah Cd secara khusus. Selain itu belum ada penelitian yang mempopulerkan tentang ikan Gambusia sebagai ikan model dalam bioindikator cemaran limbah logam berat dan efek sitotoksisitas serta kemampuan detoksifikasi yang terjadi pada organ insang.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



**BAB II**  
**TINJAUAN PUSTAKA**

**2.1 Hasil Penelitian Terdahulu**

Studi sebelumnya dan data terbaru dari sungai Wangi (penelitian pendahuluan) mengindikasikan bahwa kandungan logam berat yang terdapat pada aliran sungai Wangi sudah melebihi ambang batas. Beberapa logam berat yang diindikasikan dalam kadar melebihi ambang batas tersebut antara lain logam berat cadmium (Cd), timbale (Pb) dan merkuri (Hg). Dari hasil pengamatan awal tersebut, logam berat paling tinggi yang mencemari aliran sungai Wangi adalah logam berat Cd, baik pada sampel air, sedimen maupun biota ikan Gambusia.

Tabel 2.1. Hasil Penelitian Terdahulu tentang Topik yang Sama

Nama Peneliti	Hasil Penelitian
<p><b>Eisler 1985; 2000;</b> Kadmium Hazard pada Ikan</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kadmium adalah logam yang tidak memiliki sifat menguntungkan dalam mendukung kehidupan yang secara biologis kurang bermanfaat</li> <li>• Pada konsentrasi rendah kadmium beracun bagi semua kehidupan, termasuk tumbuhan, ikan, burung, mamalia (Termasuk manusia), dan mikroorganism</li> <li>• Bisa menyebabkan kanker, cacat lahir dan mutasi genetic</li> </ul>
<p><b>Borgmann et.al., 2005</b> <b>Nordberg et.al., 2007</b> <b>ATSDR, 2008</b> Kasus Pencemaran Lingkungan oleh Racun Kadmium</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Di perairan yang tidak tercemar, konsentrasi kadmium alami umumnya kurang dari 1 µg/L atau 1 bagian per Miliar (ppb)</li> <li>• Uji toksisitas komparatif terhadap 63 logam berat, kadmium adalah logam yang paling beracun</li> <li>• Dalam bentuk unsur kadmiumnya tidak rusak tapi bisa berubah bentuk menjadi senyawa yang berbeda. Beberapa spesies dapat mengikat kuat partikel tanah atau sedimen, tergantung pada keasaman air di sekitarnya</li> </ul>
<p><b>Edmonds dan Peplow 2000;2004</b> Dampak Pencemara Kadmium pada lingkungan dari hasil</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sumber kadmium lainnya adalah batubara dan bahan bakar fosil dan serpihan hasil pembakaran atau bisa juga dilepas ke atmosfir saat letusan vulkanik serta sisa limbah industri, pertanian dan</li> </ul>

pertambangan

rumah tangga

- Kadmium dan logam lainnya yang dihasilkan dari lokasi penambangan bisa mencemari air minum dan sumber air lainnya

**EPA, 2000**

Cadmium Compounds Hazard

- Akumulasi logam berat Cd oleh organisme di tubuh mereka akan menjadi beban dalam tubuh kemudian akan dimakan oleh organisme lainnya dalam rantai makanan yang terjadi pada perairan dan sebagainya, sehingga kadmium akan terakumulasi dan biomagnify dalam makanan Rantai
- Sumber toksisitas kadmium yang paling mungkin terjadi adalah makanan yang terkontaminasi
- Kontaminasi logam berat di perairan mendapat perhatian khusus karena logam berat bersifat persisten dan toksik

**Dallinger et.al., 1996**

**Hansen et.al., 2002**

Laju MT pada

Akumulasi Cadmium di ikan arctic pada perairan dingin

- Orang yang rutin mengonsumsi kerang dan daging ikan (liver dan ginjal) kemungkinan besar akan meningkatkan paparan cadmium
- Kadmium terakumulasi di ginjal, hati, dan insang ikan air tawar
- Akumulasi kadmium di organ ini nampaknya terkait dengan adanya ikatan molekul kadmium yang disebut metallothioneins
- Spesies ikan sering merespons secara berbeda terhadap dampak lingkungan yang sama
- akumulasi kadmium ikan yang tinggi (*Arctic char*) hasil penyerapan logam berat yang meningkat pada insang dari air terjadi karena alkalinitas rendah

**Yudkovski et.al., 2008**

Kuantitatif Evaluasi IHK pada MT Ikan yang terpapar Cadmium

- Alkalinitas berperan dalam apa dan di mana Kadmium dan logam lainnya menumpuk, sehingga metallothionein hati didominasi oleh tembaga dan seng meskipun kadar kadmium tinggi di ginjal
- Peran dari Metallothionein dalam akumulasi ikan ditunjukkan dengan baik
- Akibatnya, di perairan yang cenderung memiliki alkalinitas rendah, ikan dapat menyerap kadmium lingkungan pada tingkat yang lebih tinggi dibandingkan dengan perairan alkalinitas yang sebanding

**Ngatidjan, 1997**

**USEPA, 2002**

Uji Toksisitas Cadmium pada Hewan Uji

- Jumlah kematian hewan uji dipakai sebagai ukuran untuk efek toksik suatu bahan (kimia) pada sekelompok hewan uji.
- Jika dalam hal ini hewan uji dipandang sebagai subjek, respon berupa kematian tersebut merupakan suatu respon diskretik
- Pengamatan terhadap efek ini dilakukan untuk menentukan jumlah respon dari suatu respon diskretik (*all or none response*) pada suatu kelompok hewan uji
- Respon yang bersifat diskret itu dapat berupa kematian, aksi potensial, dan sebagainya.

Santoso, 2006;  
Nadem Ali, 2007  
Teratology in Zebrafish  
Embryos

- Toksisitas janin tampak dari berkurangnya berat badan janin yang tidak bertahan hidup. Data ini sering digunakan sebagai penyokong dalam menilai teratogenisitas toksikan tersebut
- Gangguan perkembangan individu dalam embrio menyebabkan kelainan antara lain kelahiran dengan berat badan tidak normal.
- Individu yang mengalami malformasi (kecacatan) umumnya lebih kecil dibandingkan individu normal.

## 2.2 Landasan Teori

### 2.2.1 Aliran Sungai Wangi

Sungai merupakan perairan mengalir (lotik) yang dicirikan oleh arus yang searah dan relatif kencang, dengan kecepatan berkisar 0,1–1,0 m/detik, serta sangat dipengaruhi oleh waktu, iklim, bentang alam (topografi dan kemiringan), jenis batuan dasar dan curah hujan (Mulyanto, 2007). Semakin tinggi tingkat kemiringan, semakin besar ukuran batuan dasar dan semakin banyak curah hujan, pergerakan air semakin kuat dan kecepatan arus semakin cepat. (Newson, 1997). Sungai sebagai penampung dan penyalur air yang datang dari daerah hulu atas, akan sangat terpengaruh oleh tata guna lahan dan luasnya daerah aliran sungai, sehingga pengaruhnya akan terlihat pada kualitas air sungai (Odum, 1996).

Sungai yang menerima bahan pencemar mampu memulihkan diri (*self purification*) dengan cepat, terutama terhadap limbah penyebab penurunan kadar oksigen (*oxygen demanding wastes*) dan limbah panas (Miller, 1975). Kemampuan sungai untuk memulihkan diri sendiri dari pencemaran dipengaruhi oleh (1) laju aliran air sungai, (2) berkaitan dengan jenis bahan pencemar yang masuk ke dalam badan air (Miller, 1975). Daerah pengaliran, topografi, tumbuh-tumbuhan dan geologi mempunyai pengaruh terhadap debit banjir, debit pengaliran dasar dan seterusnya (Sosrodarsono dan Takeda, 2003).

Pemerintah memperhatikan manfaatnya sungai yang tidak kecil dalam kehidupan, maka untuk pelestariannya dipandang perlu melakukan pengaturan mengenai sungai yang meliputi perlindungan, pengembangan, penggunaan dan pengendalian sungai dari segala bentuk pencemaran yang berakibat rusaknya dan tidak berfungsinya kembali sungai yang tidak sesuai dengan kualitas sebenarnya (Subagyo, 2005). Sungai sebagai sumber air, sangat penting fungsinya dalam pemenuhan kebutuhan masyarakat dan sebagai sarana penunjang utama dalam meningkatkan pembangunan nasional (Odum, 1996).

Sungai Wangi merupakan aliran sungai yang bersumber dari sungai prigen dan bermuara di aliran sungai Bangil Pasuruan. Potensi pencemaran berasal dari limbah pabrik, rumah tangga (perumahan) maupun dari limbah pertanian (BLH Pasuruan, 2015; Adam dan Maftuch, 2016).

## 2.2.2 Pencemaran Kadmium (Cd)

### A. Toksisitas

Toksisitas adalah suatu keadaan yang menandakan adanya efek toksik/racun yang terdapat pada bahan sebagai sediaan single dose atau campuran (USEPA, 2002). Toksisitas ini diteliti pada hewan percobaan yang menunjukkan evaluasi keamanan dari kandungan kimia untuk penggunaan produk rumah tangga, bahan tambahan makanan, kosmetik, obat-obatan, dan sediaan biologi (Paget, 1970).

Uji toksisitas dilakukan untuk mendapatkan informasi atau data tentang toksisitas suatu bahan (kimia) pada hewan uji (USEPA, 2002). Uji toksisitas merupakan efek yang merugikan yang timbul segera sesudah pemberian suatu bahan sebagai dosis tunggal, atau berulang yang diberikan dalam 24 jam (Ngatidjan, 1997). Uji toksisitas dirancang untuk menentukan atau menunjukkan secara kasar median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) dari toksikan.  $LC_{50}$  ditetapkan

sebagai tanda statistik pada pemberian suatu bahan sebagai dosis tunggal yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji (Frank,1996).

## **B. Pencemaran Logam Berat Kadmium (Cd)**

### **1. Pencemaran Logam Berat**

Logam berat yang sangat berbahaya dalam pencemaraan di perairan yaitu Hg, Pb, Cd, Cu dan Zn (Maslukah, 2010). Dimana logam berat tersebut banyak digunakan dalam kegiatan industri seperti pabrik tekstil, cat farmasi dan kimia, pestisida, detergen, percetakan, alat-alat besar dan limbah dari kegiatan manusia lainnya (Novariant, 2008; Soegiarto, *et.al.*, 2008). Beberapa jenis industri dan kegiatan yang potensial sebagai sumber pencemar logam berat, seperti : galangan kapal, percetakan, farmasi dan kimia, cat, pelapisan logam, baterai, pabrik seng, pengantongan semen, stasiun BBM Pertamina, pasar dan pengalengan ikan (Loganathan, *et.al.*, 2008). Buangan limbah pabrik dan kegiatan tersebut ke perairan umumnya tanpa melalui proses pengolahan terlebih dahulu (Mokoagouw, 2008).

Walaupun dilakukan pengolahan limbah, umumnya tidak memadai sehingga menyebabkan pencemaran perairan bahan kimia tersebut (Cheraghi, *et.al.*, 2012). Pembuangan air industri dan kegiatan secara terus menerus bukan saja mencemari badan air tetapi menyebabkan pula terkumpulnya logam berat di sedimen dan biota perairan bahkan dapat sampai pada manusia (Min dan Kang, 2013). Suatu proses produksi dalam industri memerlukan suhu tinggi seperti pertambangan, pemurnian minyak, pembangkit tenaga listrik dan energi minyak, pengecoran logam (Wang, *et.al.*, 2014). Proses tersebut banyak mengeluarkan limbah pencemar, terutama pada logam-logam yang relatif mudah menguap dan larut dalam air seperti Hg, Pb, dan Cd (Darmono 1995; Soegiarto dan Hamami, 2007).

Ditambahkan Mokoagouw, (2008) bahwa peristiwa yang menonjol dan dipublikasikan secara meluas adalah peristiwa pencemaran merkuri (Hg) yang menyebabkan “*Minamata Disease*” dan Kadmium (Cd) yang menyebabkan “*Itai-itai Disease*” pada orang disekitar daerah pencemaran. Karena sifat fisika, kimia senyawa Hg, Pb, Cd, Cu dan Zn yang relatif sukar didegradasi, waktu paruh biologis yang relatif lama dan afinitasnya yang besar terhadap gugus protein organisme hidup, maka logam tersebut akan mudah diabsorpsi dan terakumulasi pada organisme air, kerang dan ikan kemudian mengalami peredaran seterusnya (secara ekologis) (Wang, *et.al.*, 2004).

Siklus peredaran Cd di alam, peredarannya normal sebelum dikenal sebagai bahan kimia untuk industri, namun siklus keseimbangannya terganggu setelah adanya campur tangan manusia dalam kegiatan penambangan dan pemanfaatan secara global (Goldwater and Clarkson 1972). Logam berat mempunyai afinitas yang tinggi terhadap sulfur, sehingga terjadi ikatan pada setiap kesempatan (Saeni 1995).

## 2. Logam Berat Kadmium (Cd)

Kadmium (nama latin *cadmia*) adalah suatu unsur kimia dalam tabel periodik yang memiliki lambang Cd dan nomor atom 48, berat atom 112,4, titik leleh 321°C, titik didih 767°C dan memiliki masa jenis 8,65 g/cm<sup>3</sup> (Widowati *et.al.*, 2008). Kadmium adalah logam berwarna putih perak, lunak, mengkilap, tidak larut dalam basa, mudah bereaksi, serta menghasilkan Kadmium Oksida bila dipanaskan (Hooda, 2004). Kadmium (Cd) umumnya terdapat dalam kombinasi dengan klor (Cd Klorida) atau belerang (Cd Sulfit). Kadmium membentuk Cd<sup>2+</sup> yang bersifat tidak stabil (Colantonio dan Kim, 2016).

Logam kadmium (Cd) mempunyai penyebaran yang sangat luas di alam. Berdasarkan sifat-sifat fisiknya, kadmium (Cd) merupakan logam yang lunak ductile, berwarna putih seperti putih perak (Darmono, 1995). Logam ini akan

kehilangan kilapnya bila berada dalam udara yang basah atau lembab serta cepat akan mengalami kerusakan bila dikenai uap amoniak ( $\text{NH}_3$ ) dan sulfur hidroksida ( $\text{SO}_2$ ). Berdasarkan pada sifat kimianya, logam kadmium ( $\text{Cd}$ ) umumnya mempunyai bilangan valensi  $2+$ , sangat sedikit yang mempunyai bilangan valensi  $1+$  (Soegianto, *et.al.*, 1999). Bila dimasukkan ke dalam larutan yang mengandung ion  $\text{OH}$ , ion-ion  $\text{Cd}^{2+}$  akan mengalami proses pengendapan.

Endapan yang terbentuk dari ion-ion  $\text{Cd}^{2+}$  dalam larutan  $\text{OH}$  biasanya dalam bentuk senyawa terhidrasi yang berwarna putih (Palar, 2004).

### 3. Mekanisme Penyerapan Logam

Penyerapan melalui saluran pencernaan hanya beberapa persen saja tetapi jumlah logam yang masuk melalui saluran pencernaan biasanya cukup besar walaupun penyerapannya relatif kecil. Proses dalam tubuh hewan, logam di serap oleh darah berkaitan dengan protein darah yang kemudian didistribusikan ke seluruh jaringan tubuh. Akumulasi logam yang tertinggi biasanya dalam organ detoksifikasi (hati) dan ekskresi (ginjal). Jaringan-jaringan tersebut biasanya logam juga berkaitan dengan berbagai jenis protein enzim maupun protein lain yang disebut metaloenzim (Connel dan Miller, 2006). Menurut Darmono (2001), kemampuan organisme air dalam menyerap (absorpsi) dan mengakumulasi logam berat masuk kedalam jaringan tubuh melalui beberapa cara yaitu melalui saluran pernapasan (insang), saluran pencernaan dan difusi permukaan kulit. Penyerapan logam melalui pernafasan biasanya cukup besar, baik pada organisme air yang masuk melalui insang maupun hewan darat yang masuk melalui debu di udara ke saluran pernafasan.

### 4. Efek Pencemaran Kadmium

$\text{Cd}$  merupakan salah satu logam berat yang bersifat racun dan merugikan bagi semua organisme hidup, bahkan juga berbahaya untuk manusia (Johri,

*et.al.*, 2010). Dalam badan perairan, kelarutan Cd dalam konsentrasi tertentu dapat membunuh biota perairan (Fagerberg, *et.al.*, 2016). Biota-biota yang tergolong bangsa udang-udangan (crustacea) akan mengalami kematian dalam selang waktu 24 - 504 jam pada rentang konsentrasi antara 0.005-0.15 ppm, bangsa serangga (insecta) akan mengalami kematian dalam selang waktu 24-672 jam dalam rentang konsentrasi antara 0.003-18 ppm, Oligochaeta selang waktu 24-96 jam dengan rentang konsentrasi antara 0.0028-4.6 ppm (Lestari dan Edward, 2004).

Cd merupakan salah satu logam transisi utama yang memiliki efek toksisitas pada organisme akuatik (Soegianto, *et.al.*, 1999). Percobaan yang telah dilakukan pada juvenile udang putih (*L. vaname*) menunjukkan bahwa Cd dengan dosis 30 mg/kg yang diinduksi memberikan peningkatan yang signifikan pada berat tubuh, laju pertumbuhan dan perubahan pada hepatopankreas (struktur OFL). Cd yang diinduksikan hepatotoksitas terakumulasi di seluruh tubuh dan meningkat drastis pada metalothionein hepatopankreas (Yu, *et.al.*, 2015).

### 2.2.3. Biologi Ikan Gambusia

#### A. Klasifikasi Ikan Gambusia

Ikan Gambusia (Gambar 2.1;2.2) merupakan dari ikan genus *Gambusia*, nama ilmiahnya (*Gambusia affinis*). Adapun klasifikasi ikan *Gambusia* menurut Webb, *et.al.*, (2007) sebagai berikut:

Filum : Chordata

Sub Filum : Vertebrata

Kelas : Pisces

Sub Kelas : Teleostei

Ordo : Cyprinodonti

Sub Ordo : Poecilioidei



Gambar 2.1. Ikan Gambusia Betina

Family : Poeciliidae

Subfamily : Poeciliinae

Supertribe : Poeciliini

Tribe : Gambusiini

Genus : Gambusia

Spesies : *Gambusia affinis*



Gambar 2.2. Ikan Gambusia Jantan  
Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2017

Nama umum dari ikan ini adalah Gambusia, *eastern gambusia*, *mosquitofish*, *plague minnow*, *top minnow*, dengan nama lokal ikan Gatul atau ikan cetul. Tubuh yang bulat, warna kehijauan sampai cokelat dan keabu-abuan pada sisi dorsal hingga bagian perut. Pola warna tersebut dapat berubah menjadi warna pucat dengan kondisi lingkungan yang semakin dangkal dengan substrat berpasir dan berlumpur (Webb, *et.al.*, 2007).

Betina berukuran lebih besar dari jantan (maksimal ukuran masing-masing 8 dan 3,5 cm) (Specziar, 2004). Betina Gambusia hampir mirip dengan betina guppi (*Poecillia reticulata*) karena tidak memiliki sirip panjang seperti pada pejantannya, meskipun memiliki sirip yang jelas sementara gambusia memiliki sirip yang ditandai dengan bintik kecil gelap (Vargas dan de Sostoa, 1996).

Betina mendominasi dalam populasi karena umurnya lebih pendek dari jantan (1 tahun; 2 tahun) dan terdapat perbedaan preferensi habitat pada jantan (Webb, *et.al.*, 2007).

Jantan memiliki sirip ekor yang termodifikasi semakin panjang untuk membentuk sebuah tubular gonopodium sebagai transfer sperma ke betina.

Guppi jantan memiliki kesamaan dengan Gambusia jantan dalam ukuran dan morfologi kecuali jantan gambusia kurang ekstensi ke dorsal atau sirip ekor dan guppi jantan memiliki pola warna cerah yang khas (Webb, *et.al.*, 2007).

## B. Habitat Ikan Gambusia

Ikan ini lebih menyukai aliran air yang lebih hangat, mengalir pelan dan antara vegetasi di badan air yang cenderung dangkal (Webb, *et.al.*, 2007).

Spesies ini memiliki toleransi terhadap ekologi yang sangat luas dan memiliki kemampuan untuk bertahan hidup yang panjang dalam kondisi lingkungan yang keras dan mempertahankan populasi pada habitat suboptimal (Otto, 1973).

Spesies ini dapat bertahan pada suhu antara 0,5 dan 38°C untuk adaptasi populasi pada suhu dingin maupun panas (Webb, *et.al.*, 2007).

Selain itu, spesies ini juga memiliki toleransi yang kuat terhadap salinitas antara 0 – 25 ppt serta mampu hidup pada perairan dari hulu sampai hilir sungai yaitu daerah muara dekat laut (Nordile dan Mirandi, 1996). Ikan Gambusia memiliki sistem reproduksi yang aktif pada suhu 18 – 34 °C dan hidup pada konsentrasi oksigen terlarut (DO) yang rendah 0,2 mg/L (McKinsey dan Chapman, 1998; Webb, *et.al.*, 2007).

## C. Potensi Biomonitoring

Spesies dari ikan ini dikenal secara global sebagai biokontrol untuk larva nyamuk. Gambusia ikut berperan dalam menurunnya jumlah spesies ikan di dalam dan luar Australia sebagai predator telur dan larva nyamuk dengan perilaku yang agresif sehingga mempengaruhi pola makan dan perilaku reproduksi. Kebiasaan gambusia yang menggigit sirip pada ikan lain merupakan cara untuk menekan pertumbuhan dari spesies lainnya dan dapat menyebabkan infeksi oleh bakteri dan jamur sampai terjadi kematian. Gambusia juga dapat mempengaruhi kualitas air dengan mengurangi populasi zooplankton sehingga memicu pertumbuhan fitoplankton yang dapat menyebabkan kurangnya pakan alami (Webb, *et.al.*, 2007).

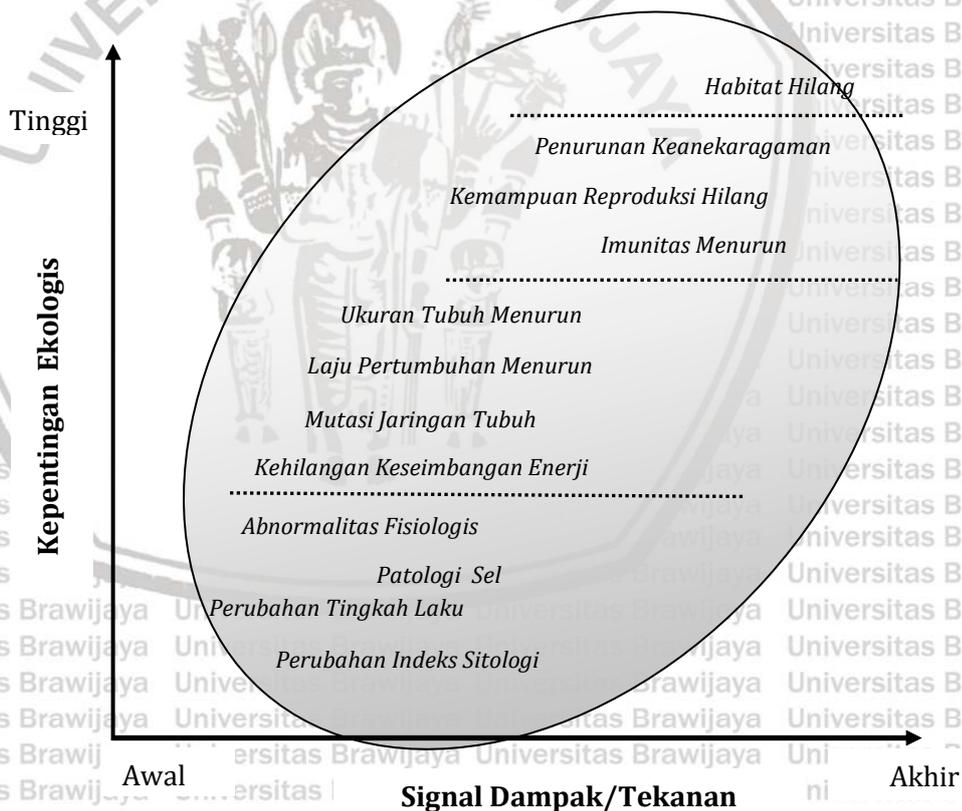
Evaluasi keberadaan residu farmasi dan metabolitnya di biota air yang telah dilakukan pada beberapa jenis farmasi dan dua metabolit termasuk

carbamazepine (CBZ) yang dianalisis spesies *G. affinis* yang ditangkap di daerah tercemar dari sungai Suquia (Cordoba-Argentina). Pengamatan pada pola akumulasi dari spesies ikan menunjukkan jalur yang berbeda untuk bioakumulasi. Hasilnya menunjukkan bahwa pada insang dan otot ikan bisa memetabolisme CBZ melalui jalur CBZ-EP (Valdes, *et.al.*, 2016).

#### D. Biomarker

##### 1. Pengertian Biomarker

Dalam arti luas *biomarker* atau *biological markers* atau marka biologis adalah suatu teknik pengukuran spesimen biologis yang dapat menjelaskan hubungan antara pemaparan lingkungan dan timbulnya kerusakan atau dampak buruk pada organisme (CBM-NRC, 1992).



Gambar 2.3. Beberapa contoh signal dampak pada sistem biologi akibat pemaparan lingkungan terhadap berbagai *stressor* (Broeg *et al.*, 2005).

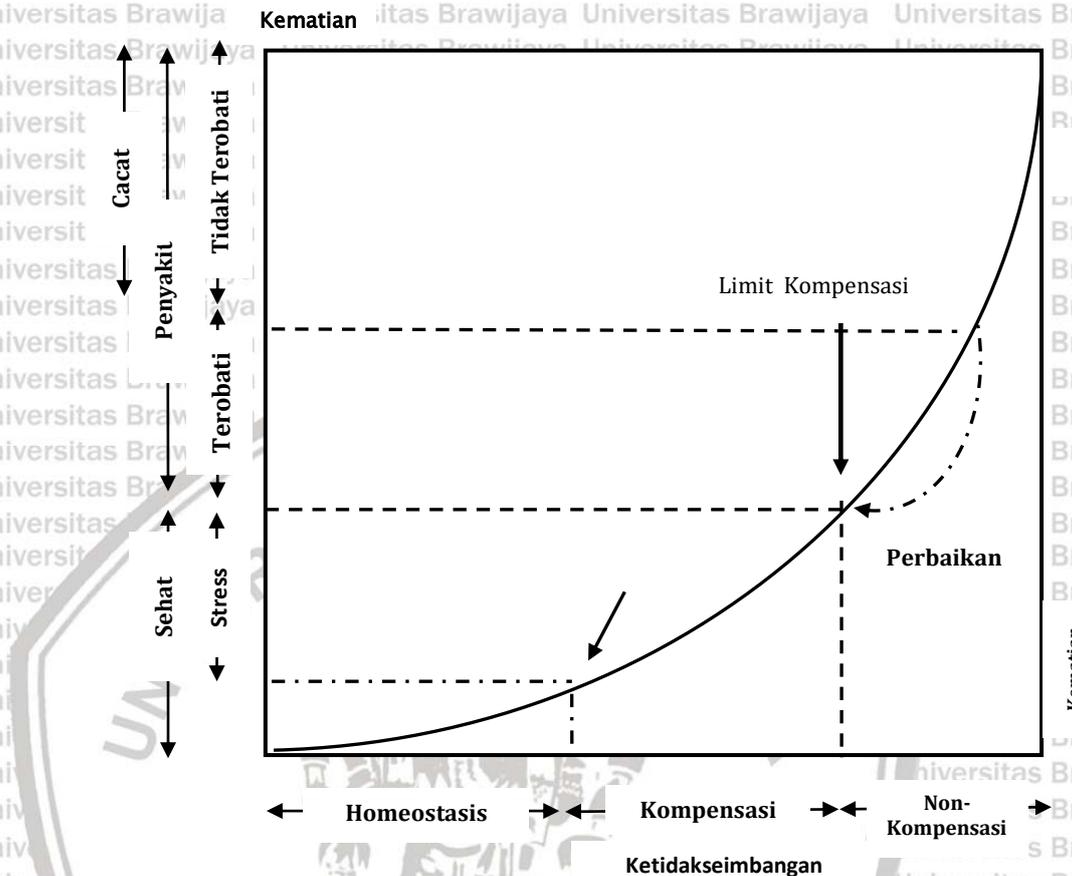
Dalam biomarker, respon biologis yang diukur adalah level terendah dalam organisasi biologis, seperti: respon-respon molekuler, biokimiawi dan fisiologis, sehingga hasil yang diberikan bersifat jangka pendek dan sangat sensitif yang merupakan respon organisme terhadap *stressor* di dalam lingkungan (Langston et al., 2007). Walaupun juga memberikan respon yang relatif sensitif terhadap *stressor* lingkungan (Gambar 2.3) dan relevansi ekologis yang tinggi, namun sifatnya jangka panjang (Broeg et al., 2005).

## 2. Keutamaan Biomarker

Pemberian suatu *toxicant* dalam konsentrasi yang memadai dapat menghasilkan suatu respon berlanjut, yang diawali dengan pemaparan dan kemungkinan dapat menghasilkan perkembangan suatu penyakit (Hagger et al., 2006). Peristiwa ini bermula dengan pemaparan eksternal, lalu diikuti dengan pemantapan konsentrasi internal yang berujung pada sampainya kontaminan pada suatu titik rawan (Chambers et al., 2002). Hal ini kemudian diikuti oleh perubahan-perubahan, yang umumnya buruk atau tidak diinginkan, pada titik rawan tersebut, baik perubahan yang dapat balik (*reversible*) maupun yang tidak dapat balik (*irreversible*), dan perkembangan kondisi penyakit yang dapat dengan mudah dikenali (Depledge, 1989) (Gambar 2.4).

Pemahaman yang lebih baik terhadap kondisi penyakit yang ditimbulkan oleh bahan kimia meningkatkan jumlah biomarker spesifik dan bermanfaat dalam ekstrapolasi pada spesies lainnya (Handy et al., 2003). Menjadi suatu kenyataan bahwa semakin cepat kita mengetahui dampak pada suatu titik rawan, maka prediksi terhadap ancaman bahaya atau penyakit akan lebih sensitif. Namun dalam banyak kasus, mekanisme pasti tentang bagaimana suatu toksikan menimbulkan kerusakan sel, jaringan atau organ belum diketahui secara pasti,

sehingga indikator-indikator non-spesifik harus dipakai dalam penggunaan biomarker (Galloway et al., 2004).



Gambar 2.4. Ketidakseimbangan vs cacat sebagai indikator toksisitas bahan kimia pencemar (diadopsi dari Depledge, 1989).

#### 2.2.4 Metallothionein (MT)

Metallothionein merupakan protein pengikat logam (metal-binding protein) yang memiliki fungsi dalam proses pengikatan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup. Biomarker merupakan akhir dari uji ekotoksikologi yang menunjukkan efek pada organisme hidup. Salah satu kunci fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini, dari suatu pengaruh senyawa toksik secara biologi dan biomarker dipercaya sebagai respon pada sub organisme (molekuler, biokimia dan fisiologi) reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi (spektrum) biologi yang lebih tinggi (Hanson, 2008).

Metallothionein berfungsi sebagai biomarker pencemaran logam berat, sehingga dapat digunakan sebagai alat untuk monitoring lingkungan perairan yang tercemar logam berat seperti Cd, Pb dan Hg (Dewi et al., 2014).

Metallothionein merupakan protein yang sangat akurat sebagai indikator pencemaran di suatu perairan. Hal ini didasarkan pada suatu fenomena alam di mana logam-logam dapat terserap di dalam jaringan tubuh organisme yang dimungkinkan karena adanya protein tersebut. Dengan demikian, metallothionein merupakan protein pengikat logam (metal-binding protein) yang berfungsi dan berperan dalam proses pengikatan/penyekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Lasut, 2002). Sifat utama dari MT adalah mengandung 26-33% asam amino cysteine (Cys) serta tidak mempunyai asam amino aromatik atau histidin. MT merupakan protein (polipeptida) yang mempunyai massa molekul yang kecil (4-8 kDa). MT adalah protein yang terkonservasi, yang ditemukan tidak hanya pada berbagai tingkat jaringan/organ (misalnya hati, ginjal, insang, testis, usus, otot, plasma, eritrosit, sel-sel epitelial dan urine) tetapi ditemukan juga pada sitoplasma dan nukleus yang ada pada tiram (Anwar, 2008).

#### a. Ekspresi Metallothionein (MT)

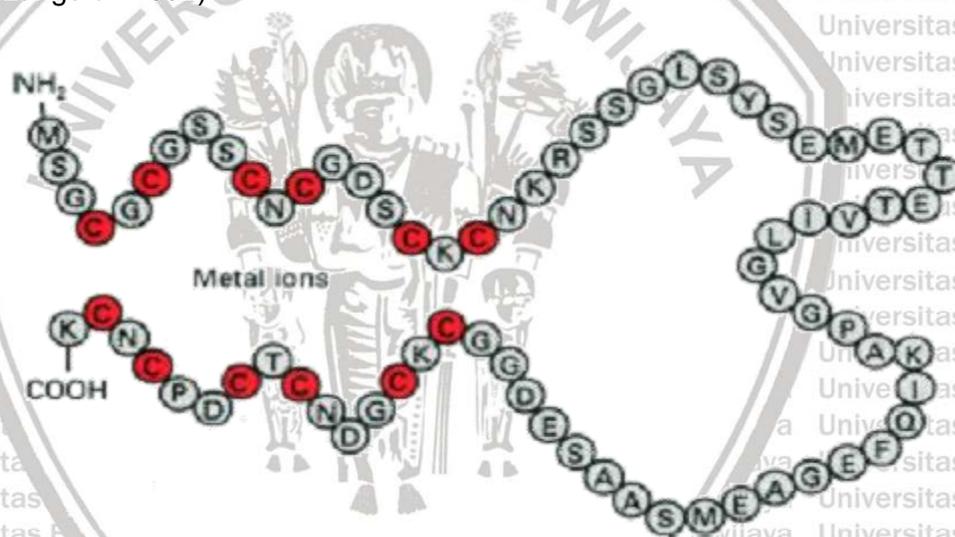
Ekspresi protein metallothionein memiliki potensi menjadi biomarker lingkungan sensitive (Rumahlatu, *et.al.*, 2013). Berdasarkan hasil penelitian, hubungan kuat dapat disimpulkan antara paparan logam, stres oksidatif, perbedaan seks dan tingkat protein MT (Coyle *et.al.*, 2002). Oleh karena itu, penelitian ini merupakan langkah penting untuk memahami proses respon MT secara keseluruhan. Namun, hasil ini harus dikombinasikan dengan hasil dari genom, transcriptomic, metabolomika, fungsional dan fisiologis penelitian untuk mengungkap kompleksitas tanggapan metallothionein (Abdelmigid, *et.al.*, 2014).

Metallothionein pertama kali ditemukan pada tahun 1957 sebagai protein yang mengandung banyak sulfur dan mengikat cadmium (Cd) dari ginjal kuda (Vallee 1991), dan menunjukkan hubungan yang erat dengan beberapa ion logam lainnya seperti zink (Zn) dan cupper (Cu) (Kagi & Kojima 1987). Sejak itu, MT telah diidentifikasi hampir pada berbagai organisme yang berbeda termasuk tanaman, mamalia, fungi bahkan pada beberapa prokariot (Vallee 1991; Cobbett & Goldsbrough 2002). MT merupakan protein (polipeptida) yang mempunyai massa molekul yang kecil (4-8 kDa), dan sifat utamanya adalah mengandung 26-33% asam amino cysteine (Cys) serta tidak mempunyai asam amino aromatik atau histidin (Binz & Kagi, 1999). MT adalah protein yang terkonservasi, yang ditemukan tidak hanya pada berbagai tingkat jaringan/organ (misalnya hati, ginjal, insang, testis, usus, otot, plasma, eritrosit, sel-sel epitelial dan urine) tetapi ditemukan juga pada sitoplasma dan nukleus (Cherian 1994).

#### **b. Mekanisme Pengikatan Logam oleh Metallothionein**

Ion logam biasanya terlibat dalam proses biologi yang kompleks, termasuk perannya sebagai kofaktor atau sebagai modulator didalam reaksi biokimia oksidasi dan reduksi. Sel perlu menyimpan cadangan logam tetapi tidak berlebihan atau pada konsentrasi toksik. Ion-ion logam tersebut selanjutnya dibebaskan secara perlahan sebagai fungsi keperluan sel (Carpene 1993). Peningkatan konsentrasi dari logam-logam esensial dan non-esensial didalam tanah, dapat memacu terjadinya gejala keracunan dan terhambatnya pertumbuhan pada sejumlah besar tanaman (Hall 2001). Peranan MT didalam mekanisme detoksifikasi logam berkaitan dengan kemampuan MT dalam mengikat logam-logam yang dapat bersifat toksik seperti logam esensial ( $Cu^{+}$  dan  $Zn^{2+}$ ) dan logam non-esensial ( $Cd^{2+}$  dan  $Hg^{2+}$ ) (Kagi & Kojima 1987). MT juga digunakan sebagai indikator pencemaran karena kepekaan dan keakuratannya. Hal ini didasarkan pada suatu fenomena alam 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 pengekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Bebianno *et.al.*, 1993). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino Cys maka protein ini mengandung kelompok 'thiol' (sulfhydryl, -SH) dalam jumlah yang besar. Kelompok ini mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, mercury, copper, dan cadmium. Residu sulfhydryl dari Cys mampu mengikat logam, dimana 1 ion logam (misalnya: Cd, Zn atau Hg) untuk 3 residu -SH, atau 1 ion logam dengan 2 residu -SH (Bebiano & Langston 1992).



Gambar 2.5 Model struktur pengikatan logam oleh PsMTA (Kille *et.al.*,1991)

MT mengandung banyak residu Cys yang dibutuhkan untuk mendetoksifikasi logam-logam berat dengan mengikat kation dari logam transisi (Kagi 1991). MT memiliki dua domain yang mempunyai peranan fungsional yaitu domain  $\beta$ (N-terminal) yang terlibat dalam homeostasis dari ion logam esensial, dan domain  $\alpha$ (C-terminal) yang mengikat dengan kuat logam-logam toksik (Hamer 1986; Cherian *et.al.*,1994). Mekanisme kedua pengikatan ion logam

oleh kedua domain tersebut telah diamati oleh Kille *et.al.*, (1991) pada asosiasi antara logam dengan PsMTA (Pisum sativum MTA), yang kemudian diilustrasikan dalam bentuk model (Gambar 2.5).

### c. Deteksi MT dengan **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Metode ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) dirancang untuk mendeteksi dan mengukur peptida, protein, antibodi dan hormon (Boster Biological Technology, 2011). Cara kerja metode ELISA yaitu dengan menggunakan aktivitas enzim untuk mendeteksi pengikatan antigen (Ag) dan antibodi (Ab). Enzim akan mengubah sampel menjadi produk berwarna yang nantinya akan mengindikasikan keberadaan Ag maupun Ab (Bull, 1976).

Metode ELISA adalah tes serologis yang umumnya dilakukan dalam berbagai bentuk pada tipe antigen dan reagen yang digunakan pada saat melakukan tes. Teknik tes ELISA hanya dapat mendeteksi antibody spesifik genus dan tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi serogrup atau serovar.

Prinsip teknik ELISA secara umum adalah antibodi yang terdapat dalam serum dimasukkan ke dalam anti gen yang sudah difiksasi pada penyangga padat (plat mikrotiter), yang kemudian dilakukan inkubasi selama waktu tertentu dan dicuci untuk menghilangkan antibody yang berlebihan. Selanjutnya ditambahkan antibody anti-spesies yang dikonjugasi dengan enzim (Setiawan, 2007). Metode ELISA diyakini sebagai metode yang mudah dilakukan serta cukup sensitif terhadap bahan pencemar khususnya logam berat (Rachmawati *et al.*, 2004).

### 2.2.5 Antioksidan dan Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom tunggal atau berkelompok yang sedikitnya mempunyai satu orbit terluar yang mempunyai satu elektron tunggal (tidak berpasangan) di mana seharusnya mempunyai elektron berpasangan (lorio, 2007). Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu elektron

tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Selama metabolisme oksidatif, banyak oksigen yang dikonsumsi akan terkait pada hidrogen selama fosforilasi oksidatif, kemudian membentuk air. Akan tetapi, diperkirakan bahwa 4-5% oksigen yang dikonsumsi saat bernapas tidak diubah menjadi air, tetapi akan membentuk radikal bebas. Maka, konsumsi akan meningkat selama pelatihan, juga akan terjadi peningkatan produksi radikal bebas dan peroksida lipid, yang kemudian radikal bebas tadi akan menimbulkan respon inflamasi menyebabkan kerusakan otot setelah pelatihan.

Tubuh mempunyai sistem pertahanan antioksidan yang tergantung dari asupan vitamin, antioksidan dan mineral dan produksi antioksidan endogen seperti glutation. Vitamin A (betakaroten), C dan E adalah antioksidan dan vitamin utama. (Clarkson dan Thompson, 2000). Pada keadaan normal (saat istirahat) sistem pertahanan antioksidan di dalam tubuh dapat secara mudah mengatasi radikal bebas yang terbentuk. Selama waktu terjadi peningkatan pemakaian oksigen (contohnya saat pelatihan) produksi radikal bebas diyakini berperan menyebabkan penyakit kardiovaskuler, kanker, penyakit Alzheimer dan Parkinson (Capelli dan Cysewski, 2006). Pemakaian oksigen meningkat banyak selama pelatihan, di mana menyebabkan peningkatan terbentuknya radikal bebas. Tubuh akan melawan peningkatan radikal bebas tersebut dengan sistem pertahanan antioksidan. Ketika produksi radikal bebas melebihi kemampuan mengatasinya maka kerusakan oksidatif akan terbentuk. Radikal bebas yang terbentuk selama pelatihan kronik dapat melebihi kapasitas proteksi sistem antioksidan, akan membuat imunitas terhadap penyakit menurun dan cidera.

Karena itu dibutuhkan asupan vitamin sebagai zat antioksidan. Radikal bebas menyerang membran dan merusak sel dimana dibutuhkan sistem kekebalan untuk melawannya. Jika pembentukan radikal radikal bebas dan penyerangannya tidak dikendalikan di dalam otot selama pelatihan, maka otot

dalam jumlah besar dapat dengan mudah menjadi rusak. Kerusakan otot dapat mempengaruhi performa dikarenakan terjadinya kelelahan (Abramson dan Vaccarino, 2002).

Antioksidan pada keadaan ini berbahaya karena mereka mempunyai kemampuan untuk melakukan perubahan elektron tanpa menjadi reaktif. Tubuh manusia mempunyai pertahanan sistem antioksidan. Antioksidan yang dibentuk di dalam tubuh dan juga didapat dari makanan seperti buah-buahan, sayur-sayuran, biji-bijian, kacang-kacangan, daging dan minyak. Ada dua garis pertahanan antioksidan di dalam sel. Garis pertahanan pertama, terdapat di membran sel larut lemak yang mengandung vitamin A (betakaroten) E, dan koensim Q (Clarkson dan Thompson, 2000). Tubuh dalam keadaan normal akan memproduksi radikal bebas yang berhubungan dengan metabolisme sel fisiologis. Contohnya, sintesis beberapa hormon akan menghasilkan radikal bebas, juga lekosit polimorfonukleus akan membentuk radikal bebas untuk membunuh bakteri yang membantu tubuh memerangi infeksi. Radikal bebas yang lain, seperti Nitric Oxide (NO) merupakan dasar homeostatis di dalam tubuh, karena NO berperan penting, termasuk menjaga tonus vaskuler, agregasi platelet, adhesi sel, dan lain-lain. Adapun hal yang diyakini menyebabkan peningkatan radikal bebas berasal dari berbagai sumber seperti kegiatan fisik, kimiawi dan alam. Faktor alam yang menyebabkan peningkatan radikal bebas adalah pulusi, radiasi, faktor fisik adalah kehamilan, overtraining, gaya hidup yaitu merokok, minum alkohol, makanan buruk, kurang berolahraga, efek psikologis seperti stres, emosi, berbagai penyakit, faktor lain seperti obat-obatan, terapi radiasi (Iotio, 2007).

Pada keadaan sehat, tubuh dapat mencegah terbentuknya radikal bebas karena sistem pertahanan natural antioksidan tubuh, yang mempunyai kemampuan melawan aksi oksigen dari radikal bebas. Menurunnya efektivitas

sistem tersebut menyebabkan defisiensi absolut atau relatif kadar antioksidan di dalam tubuh (Iorio, 2007). Radikal bebas berpotensi bahaya karena cenderung mengisi orbit externa yang tunggal dengan elektron lain. Adanya dua elektron pada orbit yang sama merupakan kondisi energi yang stabil secara maksimal. Ketika radikal bebas dekat dengan target molekul, yang mempunyai satu atau lebih elektron, seperti molekul dari asam lemak tidak jenuh (seperti asam arachinoid), radikal bebas tersebut akan segera menarik keluar elektron dari target molekul tadi. Karena efek aksi oksigen ini, radikal bebas tersebut akan kehilangan potensi berbahayanya, sedangkan molekul lain seperti pada karbohidrat, lipid, asam amino, peptide, protein, nukleotid, asam nukleat dan lain-lain (Iorio, 2007).

#### a. Produksi ROS pada ikan

Masuknya logam berat dalam tubuh makhluk hidup dapat terjadi melalui udara, air, dan makanan yang di konsumsi oleh makhluk hidup atau dapat di katakan bahwa terakumulasi logam berat dalam tubuh makhluk hidup melalui rantai makanan. Logam berat dibutuhkan makhluk hidup sebagai logam esensial dalam proses metabolisme dan juga sebagai co-faktor enzim tetapi dalam jumlah yang sangat kecil. Jika penyerapan logam melebihi batas aman akan berbahaya bagi tubuh makhluk hidup tersebut, sebab akan meracuni yang dapat mengganggu proses metabolisme. Logam berat merupakan zat pencemaran yang berbahaya, logam yang masuk kedalam tubuh kita melalui sistem pencernaan kita akan bereaksi dengan unsur belerang dan enzim dalam tubuh kita sehingga enzim akan tidak bekerja dengan baik selain itu juga logam berat yang masuk kedalam tubuh kita juga akan bereaksi dengan Gugus karboksilat(-CooH) juga amino (-NH<sub>2</sub>) dalam asam amino.

Radikal bebas adalah molekul yang pada dasarnya tidak berpasangan dalam struktur kimianya sehingga radikal bebas ini akan mencari pasangan

untuk berikatan. Pada dasarnya semua biomolekul berpasangan untuk mencapai kestabilan, sehingga untuk mencapai kestabilan ini radikal bebas akan mencari elektron bebas yang lain untuk berikatan untuk mencapai kestabilan. Sifat dari oksigen ( $O_2$ ) pada dasarnya adalah akseptor elektron sehingga akan menerima elektron bebas walaupun sudah mencapai kestabilan, sehingga akan membentuk superoksida ( $O_2^-$ ), radikal-radikal bebas yang berikatan dengan oksigen ini disebut dengan Reactive Oxygen Spesies (ROS) (Danusantoso, 2003).

Terbentuknya ROS dalam tubuh kita disebabkan juga oleh stres oksidatif, ROS akan dengan mudah merusak lemak peroksida dari membran lipid, membran sel dari phospholipid, dan lipoprotein dengan menyebar pada reaksi berantai. (Hazra, Sarkar, Biswas, & Mandal, 2010) ROS sendiri dapat menyerang semua jenis biomolekul seperti asam nukleat, protein dan asam amino sehingga mengganggu metabolisme. Kerusakan DNA merupakan konsekuensi dari modifikasi materi genetik yang mengakibatkan kematian sel, mutagenesis, karsinogenik dan penuaan (Kunwar & Priyadarsini, 2011) oleh tubuh kita ROS dihasilkan oleh proses metabolisme tubuh kita yang akan digunakan secara terprogram untuk mengnonaktifkan sel-sel. ROS terdiri dari Superoksidaradical ( $O_2^-$ ), HydrogenPeroxide ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl Radical (OH) dan Singlet Oxygen ( $O_2$ ), dan akan meningkat jika terpapar sinar UV, Radiasi Ionik dan jika terpapar polusi (Kunwar & Priyadarsini, 2011).

Toksistas logam berat bagi Makhluk Hidup. Akumulasi logam berat melalui makanan dan air yang kita konsumsi selain itu juga melalui pencemaran oleh limbah-limbah. Akumulasi ini mengganggu metabolisme makhluk hidup, sehingga dapat menyebabkan penyakit degeneratif, berikut beberapa gejala keracunan oleh logam berat Kadmium (Cd) Menurut (Sudarmaji, Mukono, & Prasasti, 2006) dalam tubuh manusia kadmium terutama di eliminasi melalui urin.

Hanya sedikit yang diabsorpsi, yaitu sekitar 5-10%. Proporsi yang besar adalah absorpsi melalui pernafasan yaitu antara 10-40% tergantung keadaan fisik.

Gejala umum keracunan Cd adalah sakit di dada, nafas sesak (pendek), batuk-batuk dan lemah. Gejala akut keracunan Cd adalah sesak dada, kerongkongan kering dan dada terasa sesak, nafas pendek, nafas terengah-engah, distress dan bisa berkembang ke arah penyakit radang paru-paru, sakit kepala dan menggigil, bahkan dapat diikuti dengan kematian.

#### **b. Mekanisme Pertemuan Antara Antioksidan dan ROS**

Masuknya ion-ion logam berat ke dalam tubuh kita melalui makanan, air yang kita konsumsi sehari-hari, lewat pencemaran udara. Ion-ion logam berat akan masuk melalui sistem pencernaan, dan akan berikatan dengan albumin sehingga akan masuk ke dalam peredaran darah kita. Sebagian akan dipakai oleh tubuh untuk sistem metabolisme tubuh kita yaitu sebagai co-faktor enzim, tetapi logam yang dipakai untuk co-faktor hanya sampai batas tertentu, jikalau logam berat terserap oleh tubuh kita secara berlebihan dapat bersifat racun bagi tubuh kita yang akan menyebabkan terjadinya gejala-gejala penyakit-penyakit, ion logam berat yang terakumulasi dalam tubuh kita akan membutuhkan waktu paruh yang lama untuk detoksifikasi, ion-ion logam berat yang terakumulasi akan memicu terjadinya stres oksidatif akibat berikatannya ion logam berat ini dengan sulfida sehingga menghasilkan Superoksidaradical ( $O_2^-$ ), Hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ ), Hydroxyl Radical (OH) dan singlet oksigen ( $-O_2$ ), yang dapat memicu terjadinya ROS. ROS dapat menyebabkan penyakit karsinogenik (pembentukan kanker) maupun tetranogenik (salah pembentukan organ) akibat dari mutasi genetik.

Mekanisme yang paling umum terjadi di mana radikal bebas dapat melawan pertahanan antioksidan, radikal bebas tersebut akan menyerang

komponen biokimia di dalam tubuh dan membentuk hydroperoksida. Dalam bentuk patofisiologis tersebut sel akan mulai memproduksi radikal bebas dalam jumlah banyak, dikarenakan stres eksogen (unsur kimia, fisik dan biologi) dan atau aktivitas metaboliknya (khususnya pada membran plasma, mitokondria, retikulum endoplasma, dan sitosol); sitosol diantaranya terdapat radikal hidroksil (HOH) yang berbahaya, merupakan salah satu reaktif oxygen species (ROS) yang paling berbahaya.

Radikal hidroksil dapat menyerang setiap macam molekul (termasuk karbohidrat, lemak, asam amino, peptide, protein, nukleotid, asam nukleat dan lain-lain). Akibat dari proses ini, setiap molekul akan kehilangan satu elektron dan kemudian menjadi radikal. Setelah itu akan mulai terjadi reaksi rantai radikal, dikarenakan adanya molekul oksigen (melalui pernapasan), dan terbentuknya hidroperoksida (ROOH), sejenis Reactive Oxygen Metabolites (ROMs). Walaupun Hidroperoksida termasuk jenis kimia yang relatif stabil, mereka juga berpotensi membentuk radikal bebas lagi dan dapat mengoksidasi target molekul yang lain. Setelah itu sel akan menarik keluar hidroperoksida di lingkungan ekstraseluler, termasuk darah, cairan cerebro-spinal, cairan pleura dan lain-lain (lorio, 2007). Cidera oksidatif setelah pelatihan dapat dicegah dengan asupan antioksidan seperti vitamin A, C, E, tidak hanya selama pelatihan, juga sehari-hari. Sebaliknya, ada beberapa peneliti menunjukkan antioksidan tidak mempengaruhi kerusakan otot dan respon peradangan yang disebabkan oleh pelatihan sangat berat.

Salah satu kemungkinan penyebab hasil yang berbeda adalah karena efek antioksidan sepertinya berbeda pada kondisi pelatihan seperti intensitas dari stres mekanik dan asupan oksigen. Antioksidan adalah unsur kimia atau biologi yang dapat menetralkan potensi kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas tadi. Beberapa antioksidan endogen (seperti enzim superoxide-dismutase dan

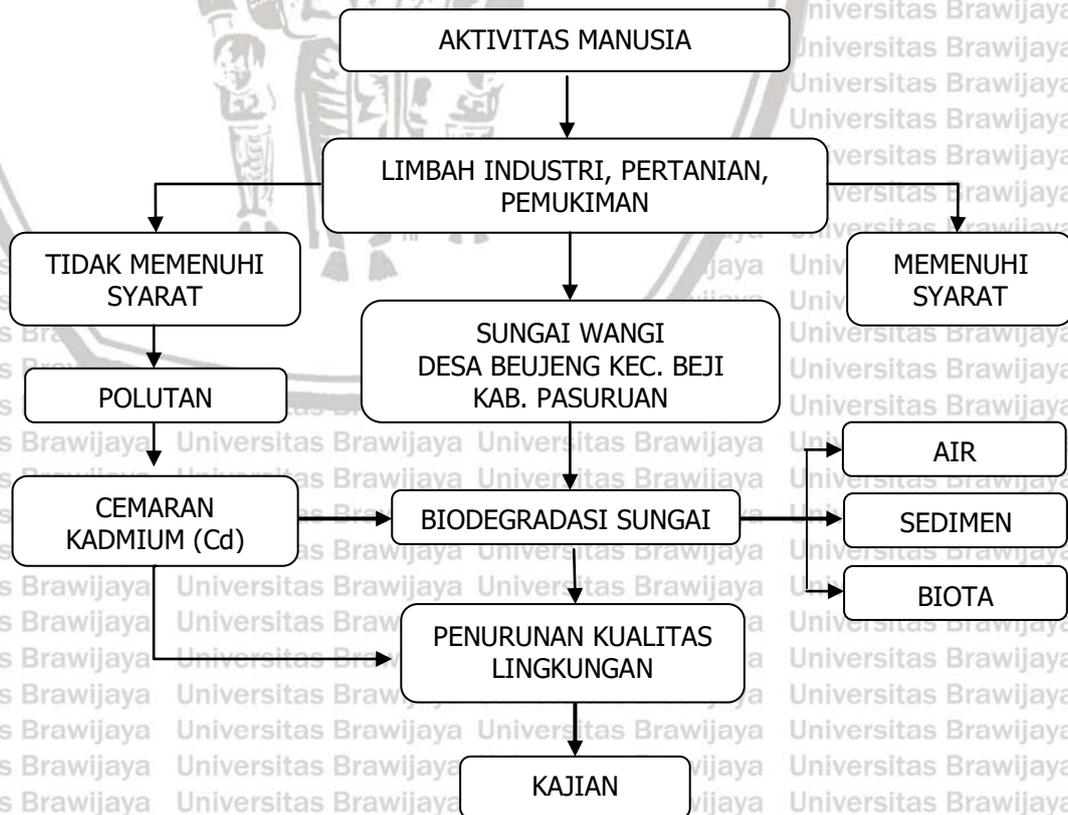
katalase) dihasilkan oleh tubuh, sedangkan yang lain seperti vitamin A, C, dan E merupakan antioksidan eksogen yang harus didapat dari luar tubuh seperti buah-buahan dan sayur-sayuran (Iorio, 2007). Menurut Kumalaningsih (2006), antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Menurut Kartikawati (1999), terdapat tiga macam mekanisme kerja antioksidan pada radikal bebas, yaitu:

- a. Antioksidan primer yang mampu mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contohnya adalah superoksida dismutase (SOD), glutatión peroksidase, dan katalase yang dapat mengubah radikal superoksida menjadi molekul air.
- b. Antioksidan sekunder berperan mengikat radikal bebas dan mencegah amplifikasi senyawa radikal. Beberapa contohnya adalah vitamin A (betakaroten), vitamin C, vitamin E, dan senyawa fitokimia.
- c. Antioksidan tersier berperan dalam mekanisme biomolekuler, seperti memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas

**BAB III**  
**KERANGKA KONSEP PENELITIAN**

**3.1. Kerangka Konsep Penelitian**

Peningkatan jumlah penduduk yang diikuti dengan peningkatan aktivitas pembangunan untuk meningkatkan pertumbuhan ekonomi akan memacu peningkatan aktivitas di segala bidang termasuk industri, agrikultur dan pemukiman. Kondisi ini berpotensi menyebabkan besarnya volume limbah yang dihasilkan oleh aktivitas tersebut. Limbah yang dihasilkan baik dari aktivitas industri, pertanian maupun pemukiman sebagian besar terbuang ke arah perairan umum terutama aliran air sungai karena mindset dari masyarakat tentang sungai adalah sebagai tempat buangan. Seperti pada kasus yang terjadi di aliran sungai Wangi, Desa Beujeng, Kecamatan Beji, Kabupaten Pasuruan.

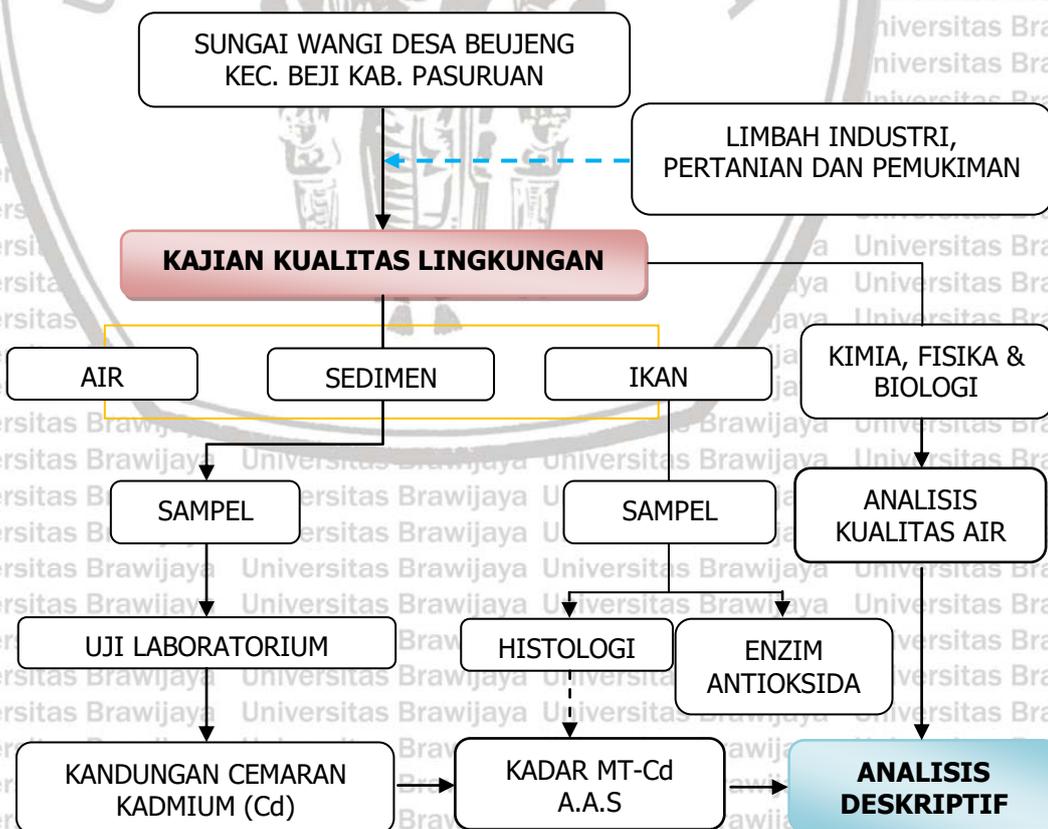


Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Adanya limbah yang terbuang ke aliran sungai menyebabkan terjadinya biodegradasi sungai baik dari perairan, substrat dan biota yang terdapat didalamnya. Pencemaran pada badan air berarti turunnya kualitas air sampai ke tingkat tertentu menyebabkan air tidak dapat berfungsi lagi sesuai dengan peruntukannya. Oleh karena itu, diperlukan adanya tindakan identifikasi dan sampling terhadap limbah yang mengandung bahan pencemar baik dari perairan, substrat maupun biotanya untuk diujikan di laboratorium. Pengujian tersebut perlu dilakukan sampai ke tingkat jaringan dan protein dari biota yang ditemukan sehingga akan mampu dilakukan suatu analisis tentang limbah pencemar pada aliran sungai secara detail. Untuk lebih jelasnya kerangka konsep penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 berikut.

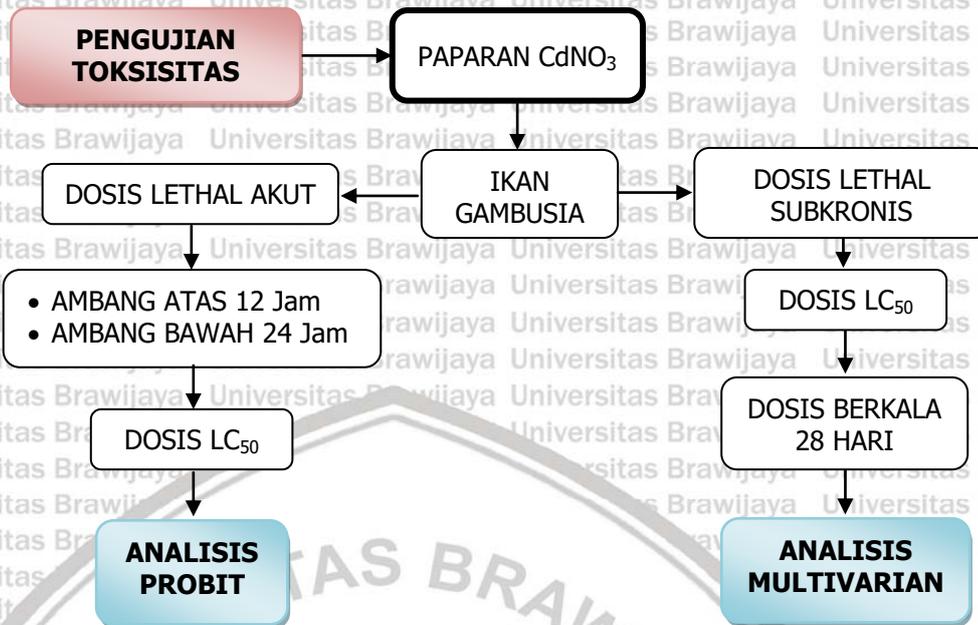
### 3.2 Kerangka Operasional Penelitian

#### A. Kerangka Operasional Penelitian Tahap I



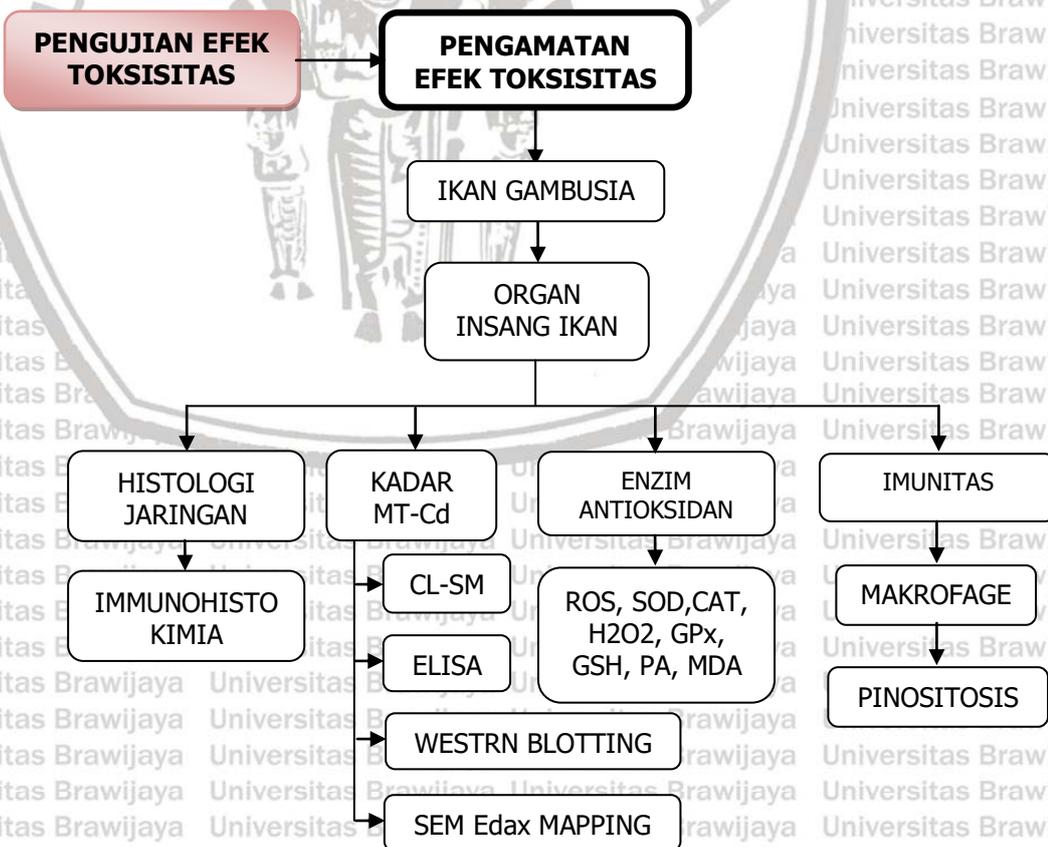
Gambar 3.2 Operasional Tahap I

### B. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II



Gambar 3.3 Operasional Tahap II

### C. Kerangka Operasional Penelitian Tahap III



Gambar 3.4 Operasional Tahap III

### 3.2.1. Variable Penelitian

Tahapan pada penelitian disertasi yang dilakukan, dijelaskan pada Tabel 3.1 berikut :

**Tabel 3.1 Variable Penelitian**

No.	Rumusan Masalah	Tujuan Penelitian	Variabel	Data Yang dibutuhkan	Metode Pengumpulan Data	Metode Analisis Data	Hasil Yang diharapkan
1.	Bagaimana interaksi antara Cd di perairan dan sedimen terhadap Cd pada Ikan Gambusia	Memperoleh interaksi antara Cd pada Ikan Gambusia dengan Cd pada lingkungan	Cd pada perairan, dan sedimen, serta Cd pada Ikan Gambusia	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kandungan Cd pada sedimen</li> <li>2. Kandungan Cd pada perairan</li> <li>3. Kandungan Cd pada Ikan Gambusia</li> </ol>	Deskriptif, Data Primer : observasi lapang dengan cara mengambil sampel Cd di lingkungan dan Cd pada Ikan Gambusia pada kurun waktu 4 kali pengambilan selama 2 di musim penghujan dan 2 kali di musim kemarau Data sekunder : kajian pustaka	Statistic Deskriptif Data primer : diperoleh dari observasi langsung di lapang tentang kandungan Cd di lingkungan dan pada Ikan Gambusia dengan metode analisis <i>Atomic Absorbtion Spectrofotometer / AAS</i> (Basset et al., 1994). Data Selanjutnya dianalisis untuk mengetahui interaksi tersebut dengan menggunakan analisis regresi	Ditemukannya interaksi antara Cd di lingkungan (Cd sedimen, dan Cd pada perairan) terhadap kandungan Cd pada Ikan Gambusia (organ insang, hati dan organ total)

No.	Rumusan Masalah	Tujuan Penelitian	Variabel	Data Yang dibutuhkan	Metode Pengumpulan Data	Metode Analisis Data	Hasil Yang diharapkan
2.	Berapa batas dosis akut Cd ( $Lc_{50}$ 96 jam) dan dosis subkronis (28 hari) pada ikan gambusia	Memperoleh data tingkat toksik ambang lethal akut dan lethal subkronis paparan Cd terhadap Ikan Gambusia	Penentuan ambang lethal atas dan bawah dan dosis subkronis paparan Cd terhadap Ikan Gambusia	Tingkat kematian Ikan Gambusia pada uji pendahuluan dalam rangka menentukan nilai ambang lethal bawah dan atas serta pengaruh pada dosis lethal subkronis. Tingkat kematian Ikan Gambusia pada uji sesungguhnya untuk menentukan nilai $Lc_{50}$ 96 jam dan pengaruh pada dosis lethal subkronis	Eksperimen, dengan melakukan uji pendahuluan untuk menentukan ambang lethal bawah ( $Lc_{100}$ 24 jam) dan ambang lethal atas ( $Lc_0$ 12 jam) nilai ini digunakan untuk menentukan median lethal concentration sebagai dasar untuk uji sesungguhnya untuk menentukan dosis lethal $Lc_{50}$ 96 jam serta pengaruhnya masing-masing pada dosis lethal subkronis selama 28 hari. Hewan uji (Ikan Gambusia) diuji dengan level dosis 0%, 12,5%, 25% dan 50% dari ambang lethal konsentrasi ( $Lc_{50}$ 96 jam) (USEPA, 2000)	Analisis Probit untuk menentukan dosis lethal $Lc_{50}$ 96 jam dan analisa multivarian pengaruh paparan pada dosis lethal subkronis selama 28 hari	Pengaruh yang terjadi pada paparan dosis akut Cd ( $Lc_{50}$ 96 jam) dan dosis subkronis (28 hari) pada Ikan Gambusia

No.	Rumusan Masalah	Tujuan Penelitian	Variabel	Data Yang dibutuhkan	Metode Pengumpulan Data	Metode Analisis Data	Hasil Yang diharapkan
3.	Bagaimana pengaruh paparan dosis lethal akut dan dosis sub kronis pada Ikan Gambusia terhadap respon imun dari proses detoksifikasi pada organ insang	Menentukan pengaruh paparan dosis lethal akut dan dosis sub kronis pada Ikan Gambusia terhadap respon imun dari proses detoksifikasi pada organ insang	Histologi organ insang ikan gambusia, Kadar MT-Cd, Enzim Antioksidan, Imunitas	Preparasi Jaringan, Dot Slide Preparat, Ekspresi MT kuantitatif kadar MT, kualitatif: Berat Molekul MT, intensitas MT melalui prosedur imunohistokimia, Jumlah Makrofage, Aktivitas Pinositosis, Aktivitas Enzim Antioksidan, Aktivitas Sel	Organ insang dari hewan uji (Ikan Gambusia) diuji dengan dosis lethal akut (LC <sub>50</sub> 96 jam) dan dosis subkronis (USEPA, 2000)	Eksperimen untuk menguji interaksi pemaparan dosis akut dan sub kronis Cd terhadap kadar MT dan intensitas MT melalui prosedur imunohistokimia dengan analisis Multivariant (Gasperz, 1991) Kuantitatif MT: prosedur spektrofotometri, dan kualitatif MT: berat molekul dengan CL-SM, ELISA, SEM Edax Mapping, aktivitas enzim antioksidan (ROS, PA, SOD, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , GPx, GSH, MDA, CAT) dan respon imun, Makrofage, Aktivitas Pinositosis,	Ada pengaruh yang signifikan interaksi pemaparan dosis akut dan sub kronis terhadap ekspresi MT secara kuantitatif (umol) dan kualitatif untuk mengetahui berat molekul MT yang terekspresi (KDa) dan intensitas MT yang terekspresi

### 3.2.2 Hipotesis

: Analisis pencemaran limbah Cd yang terjadi di daerah aliran sungai Wangi, Desa Beujeng, Kecamatan Beji, Kabupaten Pasuruan dengan percobaan paparan Cd pada ikan model (*Gambusia affinis*) dapat memberikan gambaran :

- Status kualitas lingkungan sungai Wangi yang teraliri cemaran limbah berdasarkan indeks pencemaran pada lingkungan
- Data tingkat toksik ambang lethal akut dan subkronis paparan logam berat paling berpengaruh (cadmium) terhadap Ikan Gambusia
- Efek paparan dosis lethal akut dan dosis subkronis pada Ikan Gambusia terhadap respon imun dari proses sitotoksitas pada organ insang

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di sepanjang aliran sungai wangi yang berlokasi di Desa Beujeng, Kecamatan Beji, Kabupaten Pasuruan. Area sampling ditentukan secara purposive berdasarkan tingkat konsentrasi logam berat Cd yang sudah dilakukan pada sampling pendahuluan. Lokasi untuk penelitian (Lampiran 1) ditentukan 3 (tiga) area kajian. Area kajian I (pertama) adalah aliran air pada lokasi pembuangan limbah industri, area kajian II (kedua) adalah aliran air pada lokasi pembuangan limbah permukiman dan area kajian III (ketiga) adalah aliran air pada lokasi pembuangan limbah pertanian. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan variabel sampel ikan gambusia dan logam berat Cd.

Pengujian kualitas air, logam berat, dan preparasi dilakukan pada laboratorium dilingkungan Universitas Brawijaya Malang (Laboratorium Sentral Ilmu Hayatai (LSIH) Sub Bidang Bioecotox-UB, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA UB, Laboratorium Anatomi dan Patologi Fakultas Kedokteran UB, Laboratorium Fisiologi dan Ilmu Faal Fakultas Kedokteran UB, Laboratorium Bioscience UB). Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2017 sampai Maret 2018.

### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang diambil adalah air, sedimen, dan organisme hidup yang ada pada aliran sungai (ikan). Populasi penelitian adalah ikan yang hidup di daerah aliran sungai Wangi. Pengambilan sampel dilakukan pada area

pengambilan sampel yang telah ditentukan dengan mengambil 30% dari populasi tergantung keseragaman dari sampel. Pengambilan sampel secara random sehingga setiap sampel mendapatkan peluang yang sama untuk menjadi sampel sehingga bisa mewakili kondisi populasi yang sebenarnya.

### 4.3 Instrumen Penelitian

#### 4.3.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah larutan Kadmium-Nitrit ( $\text{CdNO}_3$ ), air limbah yang mengandung logam berat, sedimen, formalin, xylol, paraffin padat, pewarna *hematoksin eosin* (HE), aquabidest, bahan pengujian hematologi, bahan pengujian histologi, bahan pengujian teratogenik, bahan pengujian kadar MT.

#### 4.3.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah

- a. Perangkat pengujian kadar Cd yang disebut *Atomic Absorption Spectrofotometry* (AAS). Metode analisa AAS digunakan untuk memperoleh kadar Cd yang terkandung di dalam air, sedimen dan ikan.
- b. Peralatan untuk mengukur kualitas air dan sedimen yaitu pH meter, DO meter, thermometer.
- c. Peralatan untuk uji toksik ambang lethal yaitu wadah untuk aklimatisasi ikan *Gambusia*, wadah untuk pemeliharaan ikan *Gambusia* pada saat pengujian.
- d. *Scanning Electron Microscopy* (SEM) FEI Tipe Inspect S-50 yang digunakan untuk memperoleh gambar mikrostruktur dari jaringan organ ikan *Gambusia*.
- e. Peralatan untuk pengujian preparat metode *Energy Dispersive X-Ray* (EDX).
- f. Peralatan untuk preparasi jaringan organ ikan *Gambusia*.
- g. Peralatan untuk pengamatan preparat jaringan organ ikan *Gambusia*.

#### 4.3.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan gambusia yang diperoleh dari lokasi penelitian di Desa Beujeng Kecamatan Beji Kabupaten Pasuruan Jawa Timur dan ikan gambusia hasil kultur.

#### 4.4 Metode Pengumpulan Data dan Informasi

Penelitian yang dilakukan menggunakan metode deskriptif dan uji laboratorium. Metode deskriptif digunakan untuk pengambilan sampel air dan sampel ikan di lapangan (kualitas lingkungan) dan uji laboratorium untuk pengujian hematologi dan histologi, pengujian immunohistokimia dan pengujian ELISA-CLSM untuk ekspresi enzim metallothionein (Lampiran 2).

Data yang dikumpulkan adalah data primer dan data sekunder. Data primer diambil langsung di lapangan dan data sekunder dikumpulkan dari literatur dan informasi dari instansi terkait.

##### 4.4.1 Prosedur Penelitian Tahap I (Kajian Kualitas Lingkungan)

Sampel air yang diuji berasal dari sampel air limbah yang mengandung logam berat Cd pada stasiun pengambilan sampel yang sudah ditentukan di Desa Beujeng Kecamatan Beji Kabupaten Pasuruan. Pengamatan air secara langsung di lokasi penelitian yaitu suhu, warna, bau, pH. Sampel air diambil dengan menggunakan botol untuk diuji DO, BOD, COD dan kandungan logam berat Cd. Sampel sedimen diambil dari sedimen pada setiap stasiun yang telah ditentukan. Teknik pengambilan sampel sedimen diambil dengan menggunakan pipa paralon pada kedalaman 10-15 cm dari permukaan sedimen. Sampel dipisahkan dari kerikil, potongan binatang, tumbuhan dan objek lain. Sampel kemudian disaring dengan menggunakan ayakan dengan ukuran 2 mesh. Sampel dimasukkan ke dalam botol, disegel dan dimasukkan ke dalam kotak pendingin. Sampel disimpan dalam *freezer* sebelum dilakukan pengukuran.

Sampel sedimen diambil untuk diukur kadar logam berat Cd, warna, tekstur dan kelembaban. Sedangkan untuk sampel ikan gambusia diambil pada stasiun yang telah ditentukan. Teknik pengambilan ikan gambusia adalah secara langsung diambil dari air dan disimpan dalam wadah beserta air dan substratnya. Ikan gambusia yang telah diambil, kemudian diukur kandungan logam berat Cd-nya.

#### 4.4.2 Prosedur Penelitian Tahap II (Kajian Toksik Akut)

Uji toksik akut dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi Cd yang terlarut di perairan terhadap jaringan ikan gambusia. Prosedur penelitian uji toksik akut/lethal kronis dilakukan pada dua tahap yaitu uji pendahuluan dan dilanjutkan dengan uji sesungguhnya (definitive). Kisaran lama pengujian adalah kelipatan 24 jam. Dosis yang digunakan berdasarkan skala logaritmik yang dibaca secara *progressive bisection* (Guthrie, *et al.*,1980).

Sebelum melakukan pengujian utama, uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan ambang lethal yaitu ambang bawah ( $LC_{0-24jam}$ ) dan ambang atas ( $LC_{100-12jam}$ ). Konsentrasi ambang atas adalah konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% dari hewan uji. Konsentrasi ambang bawah adalah konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian sama sekali pada hewan uji (USEPA, 2002). Dosis ambang lethal ini selanjutnya dipergunakan untuk menentukan nilai *median lethal concentration* ( $LC_{50-96jam}$ ). Prosedurnya sebagai berikut :

- 1) Ikan gambusia yang akan diuji, diaklimatisasi terlebih dahulu selama 2 hari dengan tujuan agar ikan bisa menyesuaikan diri dengan kondisi yang baru.
- 2) Larutan  $CdNO_3$  dibuat dengan konsentrasi 0,001 ppm ; 0,01 ppm ; 0,1 ppm ; 0 ppm ; 1 ppm ; 10 ppm sesuai dengan skala logaritmik (Guthrie, *et al.*,1980), masing-masing perlakuan diulang 2 kali. Larutan yang telah dibuat

dimasukkan ke dalam masing-masing wadah yang berbeda dengan volume larutan 2000 ml.

3) Kemudian ikan gambusia yang sudah diaklimatisasi dipapar dalam larutan  $\text{CdNO}_3$ . Pengamatan dilakukan setiap 12 jam (Yilmaz, 2003) dan jumlah kematian hewan uji pada masing-masing perlakuan dihitung setelah 48 jam.

4) Berdasarkan hasil perhitungan jumlah kematian hewan uji maka dapat ditentukan konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian pada hewan uji (ambang bawah/ $\text{LC}_{0\ 24\text{jam}}$ ) dan konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% pada hewan uji (ambang atas/ $\text{LC}_{100\ 48\text{jam}}$ ) (van der Geest, et al., 1999).

5) Persentase mortalitas hewan uji dihitung dari jumlah hewan uji yang mati dibagi dengan jumlah total semula pada kadar perlakuan.

$$\text{Mortalitas (\%)} = \frac{\sum \text{Hewan Uji Mati}}{\sum \text{Hewan Uji}} \times 100\%$$

Selanjutnya dilakukan pengujian ulangan untuk menentukan nilai  $\text{LC}_{50\ 96\text{jam}}$ . Nilai  $\text{LC}_{50}$  merupakan konsentrasi yang menyebabkan kematian hewan uji sebesar 50% dari yang diujikan. Uji pengulangan dilakukan terhadap lima konsentrasi uji yang berada di antara ambang atas dan ambang bawah serta kontrol (USEPA, 2002). Penentuan konsentrasi uji definitive sesuai dengan skala logaritmik dan dilihat pada Tabel Rand (Guthrie, et al., 1980).

Sebelum dilakukan uji pengulangan, ikan gambusia diaklimatisasi terlebih dahulu selama 2 hari. Setelah itu, ikan gambusia yang telah diaklimatisasi dipaparkan dalam larutan  $\text{CdNO}_3$  dengan volume larutan 2000 ml. Pengamatan dilakukan setiap 12 jam sekali (Yilmaz, 2003) selama 96 jam dan dihitung jumlah ikan gambusia yang mati dari masing-masing perlakuan dan dihitung secara kumulatif setelah 96 jam. Pada akhir pengujian, jumlah dan proporsi kematian pada setiap perlakuan dicatat untuk kemudian dihitung  $\text{LC}_{50-96\text{jam}}$ .

#### 4.4.3 Prosedur Penelitian Tahap III (Kajian Lethal Sub Kronis)

Uji toksik subkronis adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian bahan kimia uji dengan dosis berulang selama tidak lebih dari 10% seluruh umur hewan (USEPA, 2002). Uji toksisitas subkronis dilakukan untuk mengevaluasi efek senyawa, apabila diberikan pada hewan uji secara berulang-ulang. Uji ini menyangkut evaluasi seluruh hewan untuk mengetahui efek patologi kasar dan efek histologi. Uji ini dapat menghasilkan informasi toksisitas zat uji yang berkaitan dengan organ sasaran, efek pada organ dan hubungan dosis efek dan dosis respons. Pada uji toksisitas subkronis dilakukan melalui dua tahapan yaitu uji pendahuluan dan uji pengulangan.

Pada uji pendahuluan, langkah pertama yang dilakukan adalah aklimatisasi ikan gambusia selama 2 hari agar dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Larutan  $\text{CdNO}_3$  dibuat dengan dosis 0%; 12,5%; 25%; 37,5% dan 50% dari dosis  $\text{LC}_{50-96\text{jam}}$ , yang diperoleh pada penelitian tahap II. Hewan uji dipapar  $\text{CdNO}_3$  selama 10% dari harapan hidup ikan gambusia (USEPA, 2002).

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan mengukur penurunan konsentrasi Cd sehingga diperoleh penurunan konsentrasi Cd harian yang akan digunakan sebagai dasar penentuan dosis paparan pada uji subkronis sesungguhnya (definitif).

Uji pengulangan dilakukan setelah diperoleh dosis paparan pada uji pendahuluan. Langkah awal adalah mengaklimatisasi ikan gambusia selama 2 hari, kemudian ikan gambusia yang telah diaklimatisasi dipapar dengan konsentrasi  $\text{CdNO}_3$  yang berbeda (0%; 12,5%; 25%; 37,5% dan 50% dari dosis  $\text{LC}_{50-96\text{jam}}$ ). Pemaparan pada hewan uji dilakukan selama 10% dari harapan hidup hewan uji (USEPA, 2002); pada umumnya hewan uji ikan dilakukan pemaparan selama 28 hari (OECD, 2002). Pengamatan dilakukan terhadap kematian ikan

gambusia. Ikan yang mati sesaat langsung diambil untuk dilakukan pengujian

SEM dan HE.

#### **4.5 Analisis Data**

##### **4.5.1 Analisis Data Penelitian Tahap I**

###### **A. Analisis Status Perairan**

Pengolahan data merupakan suatu langkah untuk membandingkan hasil

analisis laboratorium dari sifat fisik dan kimia sampel air sesuai dengan Baku

Mutu PP Nomor 82 Tahun 2001 kelas 3, Permenkes Nomor 416 Tahun 1990,

Permenkes Nomor 492 Tahun 2010 dan Kepmen LH Nomor 202 Tahun 2004.

Untuk Analisis data yang digunakan yaitu Metode Storet sebagai acuan dalam

menentukan kualitas air sungai dengan tujuan untuk mengetahui status mutu air

sungai.

###### **B. Analisis Kualitas Lingkungan**

Analisis deskriptif dari observasi langsung digunakan untuk analisis kajian

kualitas air (fisik, kimia dan biologi). Data kualitas air meliputi data fisik

(kedalaman perairan, kecerahan, suhu, warna, bau, rasa); data kimia air (BOD,

COD, pH, logam berat, nitrat); data biologi (jenis-jenis organisme dalam

perairan).

###### **C. Analisis Jalur**

Hasil yang diperoleh pada penelitian tahap I dianalisis menggunakan

analisis jalur, dilanjutkan dengan analisis deskriptif. Analisis jalur digunakan

untuk mendeskripsikan adanya akibat langsung atau tidak langsung dari

beberapa variable penyebab (eksogenous) terhadap beberapa variabel akibat

(endogenous). Analisis jalur dapat dilakukan antar variabel atau secara bersama-

sama antara variabel. Kegunaan analisis jalur untuk mengetahui hubungan

struktural antara variabel penyebab terhadap variabel akibat (Leras, 2005).

Analisis jalur pada penelitian ini digunakan untuk melihat adanya hubungan langsung dan tidak langsung antara masukan logam berat Cd pada lingkungan perairan yang meliputi air dan sedimen (faktor eksogenous) terhadap ikan gambusia (faktor endogenous).

#### 4.5.2 Analisis Data Penelitian Tahap II

Perhitungan toksik akut dilakukan untuk mendapatkan nilai  $LC_{50\ 96jam}$ , yaitu konsentrasi toksikan yang menyebabkan kematian 50% hewan uji. Nilai  $LC_{50\ 96jam}$  dihitung dengan metode analisis probit (USEPA, 2002), yaitu dengan cara mengkorelasikan proporsi kematian hewan uji di akhir pengujian terhadap nilai logaritma konsentrasi Cd yang diujikan pada kertas semi log. Penentuan nilai  $LC_{50\ 96jam}$  dihitung dengan bantuan perangkat lunak MINITAB versi 14. Nilai konsentrasi dihitung dari  $LC_{50\ 96jam}$  yang dikalikan dengan nilai faktor aplikasi 0,001 untuk bahan-bahan pencemar yang persisten seperti logam berat (Frias-Espeticuetas, *et.al.*, 2008).

#### 4.5.3 Analisis Data Penelitian Tahap III

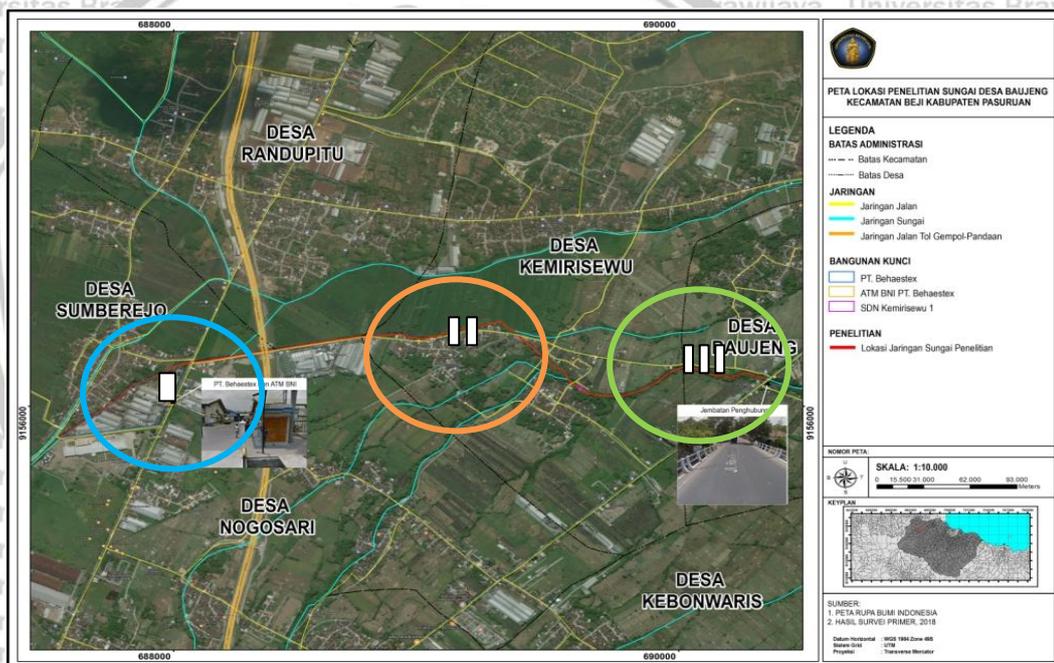
Pengamatan yang dilakukan pada penelitian tahap III adalah kematian ikan gambusia. Ikan yang mati sesaat kemudian langsung diambil untuk pengujian histologi IHK dengan SEM, EDX, HE, dan kadar MT dengan CL-SM dan ELISA. Pada penelitian tahap III diperoleh titik jenuh akumulasi Cd pada ikan gambusia dan tingkat akumulasi Cd pada bagian-bagian jaringan ikan gambusia serta dapat diketahui terjadinya pertukaran ion dengan Cd. Hasil pengamatan yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis jalur yang digunakan untuk melihat adanya hubungan langsung dan tidak langsung antara masukan logam berat Cd pada lingkungan perairan terhadap akumulasi Cd pada jaringan tubuh ikan. Semua hasil pengamatan dianalisis secara deskriptif. Output pada penelitian tahap III ini adalah dapat ditentukan tingkat akumulasi Cd dan tingkat kerusakan jaringan ikan gambusia.

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Identifikasi Kualitas Lingkungan Sungai Wangi Yang Teraliri Cemaran Limbah Berdasarkan Indeks Pencemaran Pada Lingkungan

#### 5.1.1 Identifikasi Sumber Pencemar

Data yang ditampilkan merupakan data hasil pengamatan di lapangan serta data sekunder sebagai data pendukung. Hasil identifikasi dibuatkan peta seperti yang terlihat pada Gambar 5.1.



**Gambar 5.1.** Peta Hasil Identifikasi Sumber Pencemar pada Sungai Wangi

Hasil identifikasi sumber pencemar dibagi menjadi 3 (tiga) area kajian yaitu area kajian I (limbah pabrik/industri), area kajian II (limbah pemukiman) dan area kajian III (limbah pertanian).

#### a. Karakteristik Sumber Pencemar di Area Kajian I

Area kajian I meliputi daerah pabrik/industri yang ditandai dengan blok warna biru pada Gambar 5.1. Pencemaran diakibatkan oleh pemanfaatan sungai

sebagai tempat pembuangan limbah cair industri. Adapun jenis industri yang teridentifikasi di sekitar area kajian I sebagai berikut :

**Tabel 5.1** Jenis Industri sekitar Area Kajian I

No	Jenis Industri	Limbah yang Dihasilkan
1.	Tekstil	Limbah Cair
2.	Pengolahan Ikan	Limbah Cair dan Limbah Padat
3.	Pengolahan Plastik	Limbah Cair
4.	Pengecatan Besi/Knalpot	Limbah Cair

Sumber : Hasil Survey Pribadi, 2017.

Banyaknya limbah cair yang terbuang ke aliran sungai wangi, terutama limbah dari industri memberikan potensi pencemaran yang sangat luar biasa.

Berdasarkan hasil pemantauan dilapang dan hasil wawancara dengan beberapa masyarakat yang tinggal di sekitar aliran sungai, menjelaskan bahwa setiap malam (dini hari) beberapa industri membuang limbah cair. Pada saat tersebut, timbul bau yang tidak sedap dari buangan limbah.

Selain buangan pada malam hari, terkadang ada pabrik yang membuang limbah cair pada pagi maupun siang hari. Namun terdapat perbedaan antara buangan limbah tersebut. Limbah yang dibuang pada pagi maupun siang hari cenderung terlihat lebih jernih dan tidak berbau menyengat.

#### **b. Karakteristik Sumber Pencemar di Area Kajian II**

Area kajian II meliputi daerah perumahan/pemukiman yang ditandai dengan blok warna orange pada Gambar 5.1. Pencemaran diakibatkan oleh pemanfaatan sungai sebagai tempat pembuangan limbah cair pemukiman.

Adapun jenis buangan yang teridentifikasi di area kajian II sebagai berikut :

**Tabel 5.2** Jenis buangan limbah sekitar Area Kajian II

No	Jenis Pemukiman	Limbah yang Dihasilkan
1.	Rumah Rakyat	Limbah Cair Deterjen
2.	Warung Makan	Limbah Cair Deterjen

Sumber : Hasil Survey Pribadi, 2017.

Limbah cair yang mendominasi pada area kajian II ini dari jenis deterjen.

Limbah cair tersebut berasal dari aktivitas warga dalam hal mandi dan mencuci.

Penggunaan sabun menghasilkan limbah deterjen yang sangat berlimpah.



**Gambar 5.2.** Kondisi Kualitas Lingkungan Sekitar Aliran Sungai Wangi (A) Area I (Industri), (B) Area II (Pemukiman) dan (C) Area III (Pertanian)

### c. Karakteristik Sumber Pencemar di Area Kajian III

Area kajian III meliputi daerah pertanian yang ditandai dengan blok warna hijau pada Gambar 5.1. Pencemaran diakibatkan oleh pemanfaatan sungai sebagai tempat pembuangan limbah cair pertanian. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan dilapang, sisa pestisida yang terdapat dalam aliran pemupukan di lahan pertanian semua terbuang ke aliran sungai Wangi. Sehingga bisa

disimpulkan pada area kajian III ini yang mendominasi adalah limbah cair pestisida.

### 5.1.2 Hasil Analisis Kualitas Air

Observasi dan survey lapangan sudah dilakukan selama 2 musim yang berbeda untuk mendapatkan perbedaan data kualitas lingkungan. Pengamatan kualitas air selama penelitian pada musim yang berbeda yaitu musim hujan (bulan Oktober 2016 sampai Februari 2017) dan musim kemarau (bulan Maret sampai September 2017) dilakukan untuk menjawab tujuan pertama dari penelitian ini yang dapat dilihat pada Tabel 5.3. Sedangkan kegiatan yang dilakukan selama penelitian dapat dilihat pada Gambar 5.2. Kondisi lingkungan disekitar aliran sungai Wangi apabila dilihat dari kondisi eksistingnya sangat memprihatinkan dengan banyaknya sampah yang terdapat di sepanjang aliran. Baik dari sampah pemukiman maupun sampah pertanian, sedangkan dari industri kebanyakan berupa limbah cairan.

**Tabel 5.3.** Rata-rata Kualitas Air Musim Penghujan dan Kemarau

Paramater	Oktober 2016 - Februari 2017			Maret - September 2017		
	Area I	Area 2	Area 3	Area I	Area 2	Area 3
Suhu (°C)	28	29	27	30	31	30
pH	6.1	6.5	7.1	5.8	6.2	6.4
DO (mg/L)	7.6	7.2	7.7	6.2	6.3	6.1
BOD (mg/L)	21	25	30	18	30	35
COD (mg/L)	46	32	57	53	49	66
Arus (cm/menit)	180	140	150	110	120	110
Detergent Air	24.17	25.78	22.2	27.35	35.39	20.17
Detergent Sedimen	310	390	374	365	460	290

Sumber : Olahan Data Pribadi, 2017

Dari Tabel 5.3 dan Gambar 5.3, terlihat perbedaan hasil pengamatan pada musim penghujan dan musim kemarau. Pada setiap parameter terdapat perbedaan, kandungan oksigen terlarut pada musim penghujan lebih tinggi dari pada musim kemarau. Demikian juga halnya dengan BOD pada musim kemarau

lebih rendah jika dibandingkan dengan musim penghujan pada setiap area kajian. Namun nilai hasil pengamatan COD justru berbeda dengan pengamatan yang lain. Pada musim kemarau nilai COD justru meningkat drastis.

Hal tersebut diatas sangat erat kaitannya dengan kondisi lingkungan yang teraliri limbah yang didalamnya terdapat proses akumulasi bahan-bahan kimia dalam perairan.

### 5.1.3 Hasil Analisis Logam Berat

Berdasarkan hasil penelitian yang ditunjukkan dalam Tabel 5.4 dan Gambar 5.3 menunjukkan bahwa kadar Pb, Cd dan Hg pada perairan rata-rata sebesar 0,031 ppm, 0,019 dan 0,009 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kadar Pb, Cd dan Hg telah melebihi dari standar baku mutu yang diperbolehkan yakni untuk Pb, Cd dan Hg pada air sebesar 0,01 ppm, 0,01 ppm dan 0,002 ppm (Gambar 5.3).

**Tabel 5.4.** Hasil Rata-rata Nilai Pengujian Logam Berat Pb, Cd dan Hg di sampel Air, Sedimen dan Ikan

Paramater	Oktober 2016 - Februari 2017			Maret - September 2017		
	Area 1	Area 2	Area 3	Area 1	Area 2	Area 3
<b>Pb Air</b>	0.023	0.032	0.024	0.033	0.035	0.029
<b>Sedimen</b>	0.321	0.322	0.354	0.324	0.322	0.341
<b>Ikan</b>	0.043	0.052	0.054	0.053	0.055	0.059
<b>Cd Air</b>	0.02	0.013	0.029	0.01	0.015	0.002
<b>Sedimen</b>	0.386	0.253	0.244	0.286	0.235	0.318
<b>Ikan</b>	0.059	0.036	0.061	0.048	0.037	0.021
<b>Hg Air</b>	0.003	0.015	0.005	0.002	0.014	0.006
<b>Sedimen</b>	0.012	0.174	0.023	0.014	0.085	0.022
<b>Ikan</b>	0.006	0.019	0.009	0.006	0.012	0.008

Sumber : Olahan Data Pribadi, 2017

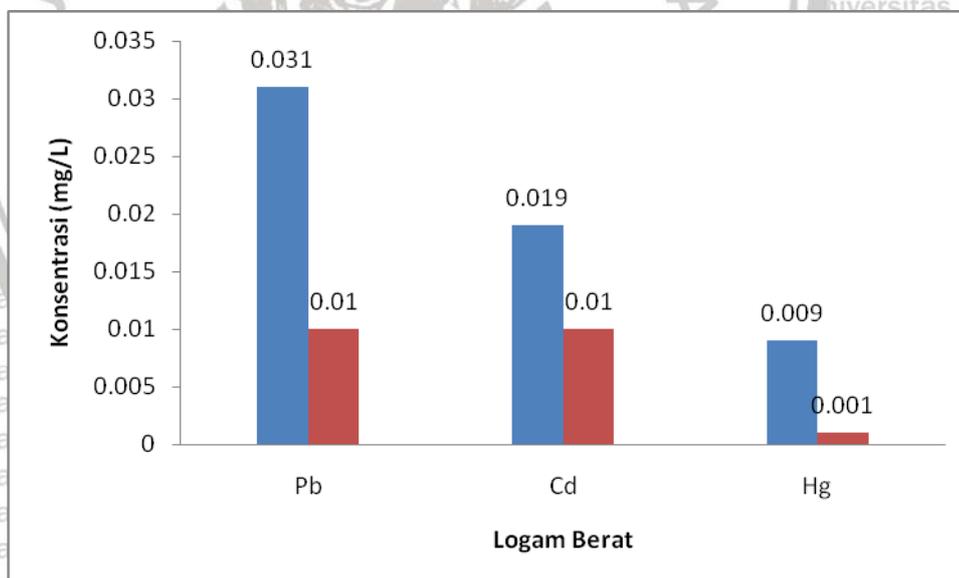
Hal ini disebabkan karena tingginya pencemaran logam berat Pb, Cd dan Hg dari sungai yang terkontaminasi limbah industry, pemukiman dan pertanian.

Salah satu sungai yang terkontaminasi logam berat Pb, Cd dan Hg adalah sungai Wangi, karena sekitar sungai tersebut terdapat pabrik yang berpotensi

menghasilkan limbah yang mengandung Pb, Cd dan Hg. Kadar Pb, Cd dan Hg pada sedimen rata-rata sebesar 0,325 ppm, 0,289 dan 0,085 ppm, hal ini menunjukkan bahwa nilai tersebut belum melampaui standar baku mutu yang diperbolehkan.

Kadar Pb, Cd dan Hg pada sedimen melampaui ambang batas, hal ini dikarenakan sedimen mudah tersuspensi akibat pergerakan massa air yang mana dapat melarutkan kembali logam yang terkandung dalam air tersebut.

Kadar Pb, Cd dan Hg akan terakumulasi dalam tubuh ikan gambusia melalui absorpsi logam yang masuk ke dalam insang dan masuk ke dalam saluran pencernaan melalui aktivitas osmosis dan difusi. Proses bioakumulasi logam dalam jaringan ikan melalui rantai makanan serta tingginya proses pengambilan logam Pb, Cd dan Hg dari perairan atau sedimen menyebabkan tingginya konsentrasi Pb, Cd dan Hg dalam tubuh ikan gambusia juga.



**Gambar 5.3** Perbandingan Hasil Pengamatan Logam Berat di Aliran Air Sungai dengan Baku Mutu Air

Menurut Vouk (1986) mengatakan bahwa terdapat 80 jenis dari 109 unsur kimia di muka bumi ini yang telah teridentifikasi sebagai jenis logam berat.

Berdasarkan sudut pandang toksikologi, logam berat ini dapat dibagi dalam dua jenis, yaitu:

1. Jenis pertama adalah logam berat esensial, di mana keberadaannya dalam jumlah tertentu sangat dibutuhkan oleh organisme hidup, namun dalam jumlah yang berlebihan dapat menimbulkan efek racun. Contoh logam berat ini adalah Zn, Cu, Fe, Co, Mn dan lain sebagainya.
2. Jenis kedua adalah logam berat tidak esensial atau beracun, di mana keberadaannya dalam tubuh masih belum diketahui manfaatnya atau bahkan dapat bersifat racun, seperti Hg, Cd, Pb, Cr dan lain-lain.

Logam berat ini dapat menimbulkan efek kesehatan bagi organisme tergantung pada bagian mana logam berat tersebut terikat dalam tubuh. Daya racun yang dimiliki akan bekerja sebagai penghalang kerja enzim, sehingga proses metabolisme tubuh terputus. Lebih jauh lagi, logam berat ini akan bertindak sebagai penyebab alergi, mutagen, teratogen atau karsinogen bagi manusia. Jalur masuknya adalah melalui kulit, pernapasan dan pencernaan.

Adanya logam berat di perairan, berbahaya baik secara langsung terhadap kehidupan organisme, maupun efeknya secara tidak langsung terhadap kesehatan manusia. Hal ini berkaitan dengan sifat-sifat logam, yaitu :

1. Sulit didegradasi, sehingga mudah terakumulasi dalam lingkungan perairan dan keberadaannya secara alami sulit terurai (dihilangkan).
2. Dapat terakumulasi dalam organisme termasuk kerang dan ikan, dan akan membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsi organisme tersebut.
3. Mudah terakumulasi di sedimen, sehingga konsentrasinya selalu lebih tinggi dari konsentrasi logam dalam air. Disamping itu sedimen mudah tersuspensi karena pergerakan masa air yang akan melarutkan kembali

logam yang dikandungnya ke dalam air, sehingga sedimen menjadi sumber pencemar potensial dalam skala waktu tertentu.

### 5.1.4 Indeks Pencemaran

Penentuan status mutu air pada sungai Wangi didasarkan atas Metode Indeks Pencemaran (IP). Persebaran nilai indeks sungai Wangi dapat dilihat pada Gambar 5.8, sedangkan rincian hasil perhitungan status mutu air dengan metode Indeks Pencemaran tercantum pada Tabel 5.5

#### a. Indeks Pencemaran (IP) di Area Kajian I

**Tabel 5.5** Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran Area Kajian I Sungai Wangi – Pasuruan Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017

Parameter	Lij	Satuan	Ci	Ci/Lij	Ci/lij baru
pH	6,0 - 9,0		5,95	0,99	0,33
Residu Tersuspensi	50	mg/l	33,5	0,67	0,67
Residu Terlarut	1000	mg/l	362,5	0,36	0,36
Oksigen Terlarut	6	mg/l O <sub>2</sub>	6,9	1,15	1,30
BOD	2	mg/l	19,5	9,75	7,47
COD	10	mg/l	49,5	4,95	4,54
Nitrat	10	mg/l NO <sub>3</sub>	0,89	0,07	0,07
Nitrit	0,06	mg/l NO <sub>2</sub>	0,087	1,30	1,57
Amoniak	0,5	mg/l NH <sub>3</sub> -N	0,71	1,42	1,76
Detergent	200	mg/l MBAS	25,76	0,13	0,48
Merkuri	0,001	mg/l Hg	0,003	3	3,39
Timbal	0,01	mg/l Pb	0,035	3,5	3,72
Kadmium	0,01	mg/l Cd	0,034	3,4	3,66
Bakteri Koli Tinja	100	JPT/100 ml	1,67 x 10 <sup>5</sup>	1670,00	17,11
Bakteri Total Koli	1000	JPT/100 ml	6,7 x 10 <sup>5</sup>	670,00	15,13
				<b>jumlah</b>	<b>61,56</b>
				<b>rata-rata</b>	<b>4,104</b>
				<b>nilai maks</b>	<b>17,11</b>
				<b>PIJ</b>	<b>5,83</b>

Keterangan :

(Cij/Lij) R = konsentrasi parameter kualitas air rata-rata

(Cij/Lij) M = konsentrasi parameter kualitas air maksimum

Pij = Indeks Pencemaran

Berdasarkan hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada area kajian I adalah = 5,83 yang berarti kondisi area kajian I termasuk pada klasifikasi “**cemar sedang**”.

#### b. Indeks Pencemaran (IP) di Area Kajian II

**Tabel 5.6** Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran

Area Kajian II Sungai Wangi – Pasuruan

Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017

Parameter	Lij	Satuan	Ci	Ci/Lij	Ci/lij baru
pH	6,0 - 9,0		6,35	0,91	0,79
Residu Tersuspensi	50	mg/l	34,5	0,69	0,19
Residu Terlarut	1000	mg/l	382,5	0,38	-1,09
Oksigen Terlarut	6	mg/l O <sub>2</sub>	6,75	1,13	1,26
BOD	2	mg/l	27,5	13,75	6,69
COD	10	mg/l	40,5	4,05	4,04
Nitrat	10	mg/l NO <sub>3</sub>	0,79	0,08	-4,51
Nitrit	0,06	mg/l NO <sub>2</sub>	0,077	1,30	1,54
Amoniak	0,5	mg/l NH <sub>3</sub> -N	0,61	1,22	1,43
Detergent	200	mg/l MBAS	30,59	0,15	-3,08
Merkuri	0,001	mg/l Hg	0,015	15	6,88
Timbal	0,01	mg/l Pb	0,032	3,2	3,53
Kadmium	0,01	mg/l Cd	0,014	1,4	3,53
Bakteri Koli Tinja	100	JPT/100 ml	1,67 x 10 <sup>5</sup>	1670,00	17,11
Bakteri Total Koli	1000	JPT/100 ml	6,7 x 10 <sup>5</sup>	670,00	15,13
				<b>jumlah</b>	<b>51,64</b>
				<b>rata-rata</b>	<b>3,443</b>
				<b>nilai maks</b>	<b>17,11</b>
				<b>PIJ</b>	<b>5,38</b>

Keterangan :

(Cij/Lij) R = konsentrasi parameter kualitas air rata-rata

(Cij/Lij) M = konsentrasi parameter kualitas air maksimum

Pij = Indeks Pencemaran

Berdasarkan hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada area kajian II adalah = 5,38 yang berarti kondisi area kajian II termasuk pada klasifikasi “**cemar sedang**”.

### c. Indeks Pencemaran (IP) di Area Kajian III

**Tabel 5.7** Hasil Penentuan Status Mutu Air Metode Indeks Pencemaran Area Kajian III Sungai Wangi – Pasuruan Pengukuran Bulan Oktober 2016 dan September 2017

Parameter	Lij	Satuan	Ci	Ci/Lij	Ci/lij baru	
pH	6,0 - 9,0		6,75	0,99	0,33	
Residu Tersuspensi	50	mg/l	31,5	0,67	0,67	
Residu Terlarut	1000	mg/l	332,5	0,36	0,36	
Oksigen Terlarut	6	mg/l O <sub>2</sub>	6,9	1,15	1,30	
BOD	2	mg/l	32,5	9,75	7,47	
COD	10	mg/l	61,5	4,95	4,54	
Nitrat	10	mg/l NO <sub>3</sub>	0,89	0,07	0,07	
Nitrit	0,06	mg/l NO <sub>2</sub>	0,087	1,30	1,57	
Amoniak	0,5	mg/l NH <sub>3</sub> -N	0,71	1,42	1,76	
Detergent	200	mg/l MBAS	21,185	0,13	0,48	
Merkuri	0,001	mg/l Hg	0,006	3	3,39	
Timbal	0,01	mg/l Pb	0,026	3,5	3,72	
Kadmium	0,01	mg/l Cd	0,016	3,4	3,66	
Bakteri Koli Tinja	100	JPT/100 ml	1,57 x 10 <sup>5</sup>	1570,00	16,98	
Bakteri Total Koli	1000	JPT/100 ml	5,7 x 10 <sup>5</sup>	570,00	14,78	
Keterangan :					<b>jumlah</b>	<b>50,01</b>
(Cij/Lij) R = konsentrasi parameter kualitas air rata-rata					<b>rata-rata</b>	<b>3,334</b>
(Cij/Lij) M = konsentrasi parameter kualitas air maksimum					<b>nilai maks</b>	<b>16,98</b>
Pij = Indeks Pencemaran					<b>PIJ</b>	<b>5,30</b>

Berdasarkan hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada area kajian III adalah = 5,30 yang berarti kondisi area kajian III termasuk pada klasifikasi "cemar sedang".

Secara umum, berdasarkan cara yang ditentukan oleh metode indeks pencemaran hasil harga indeks pencemaran di sungai Wangi pada area kajian I, II dan III adalah cemar sedang. Hasil perhitungan dari ketiga area kajian tersebut disajikan pada Tabel 5.8.

Tabel 5.8 Hasil Perhitungan Rata-Rata Ci/Lij Baru

Parameter	Ci/lij baru		
	Area I	Area II	Area III
pH	0,33	0,79	0,33
Residu Tersuspensi	0,67	0,19	0,67
Residu Terlarut	0,36	-1,09	0,36
Oksigen Terlarut	1,30	1,26	1,30
BOD	7,47	6,69	7,47
COD	4,54	4,04	4,54
Nitrat	0,07	-4,51	0,07
Nitrit	1,57	1,54	1,57
Amoniak	1,76	1,43	1,76
Detergent	0,48	-3,08	0,48
Merkuri	3,39	6,88	3,39
Timbal	3,72	3,53	3,72
Kadmium	3,66	3,53	3,66
Bakteri Koli Tinja	17,11	17,11	16,98
Bakteri Total Koli	15,13	15,13	14,78
<b>Jumlah</b>	<b>61,56</b>	<b>51,64</b>	<b>50,01</b>
<b>Rata-rata</b>	<b>4,104</b>	<b>3,443</b>	<b>3,334</b>
<b>Nilai maks</b>	<b>17,11</b>	<b>17,11</b>	<b>16,98</b>
<b>PIJ</b>	<b>5,83</b>	<b>5,38</b>	<b>5,30</b>
<b>Rata-rata</b>		<b>5,503</b>	

Keterangan :

(Cij/Lij) R = konsentrasi parameter kualitas air rata -rata

(Cij/Lij) M = konsentrasi parameter kualitas air maksimum

Pij = Indeks Pencemaran

Berdasarkan hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada sungai Wangi secara umum (area kajian I, II dan III) adalah = 5,503 yang berarti kondisi sungai Wangi termasuk pada klasifikasi “**cemar sedang**”

Pada saat ini, ada beberapa jenis standar kualitas air minum baik yang bersifat nasional maupun internasional. Kualitas air yang bersifat nasional hanya berlaku untuk negara yang menetapkan standar, sedangkan yang bersifat internasional berlaku pada negara yang belum memiliki standar kualitas air

tersendiri. Namun standar internasional ini dapat digunakan di negara man saja dengan menyesuaikan kondisi dan situasi negara yang bersangkutan (Sutrisno, 1987).

## **5.2 Paparan Dosis Akut Cd dan Dosis Subkronis pada Ikan Gambusia**

### **5.2.1 Paparan Dosis Akut Cd/Uji Toksisitas Letal (LC<sub>50</sub>-96 jam)**

Tujuan kedua dari penelitian ini mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian lethal dosis akut dan subkronis paparan Cd terhadap ikan Gambusia.

Untuk menjawab hal tersebut dilakukan eksperimen dan observasi di laboratorium.

Uji toksisitas cadmium pada ikan Gambusia dilakukan dua tahap yaitu tahap uji pendahuluan dan uji definitif. Tahap uji pendahuluan dilakukan selama 24 jam untuk mencari konsentrasi ambang letal atas dan ambang letal bawah.

Tahap pengujian selanjutnya adalah uji definitif untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> selama 96 jam dengan pengamatan setiap 24 jam.

Determinasi LC<sub>50</sub> Cd<sup>2+</sup> pada Ikan Gambusia dengan paparan selama 96 jam diperoleh berdasarkan nilai ambang letal bawah dan ambang letal atas kadmium pada Ikan Gambusia. Konsentrasi ambang letal atas adalah konsentrasi terendah yang menyebabkan kematian 100% dari hewan uji, sedangkan konsentrasi ambang letal bawah adalah konsentrasi tertinggi yang tidak menyebabkan kematian sama sekali pada hewan uji (USEPA, 2002).

#### **a. Uji pendahuluan**

Pada uji pendahuluan, konsentrasi Cd<sup>2+</sup> yang digunakan didasarkan pada deret logaritmik yaitu 1 mg/L; 0,1 mg/L; 0,01 mg/L; 0,001 mg/L; 0,0001 mg/L dan tanpa pemberian Cd<sup>2+</sup> sebagai kontrol. Variabel yang diamati pada uji pendahuluan adalah mortalitas hewan uji.

**Tabel 5.9.** Kisaran Konsentrasi pada Perlakuan Berdasarkan Konsentrasi Anjuran dan Persentase Mortalitas

Perlakuan	Konsentrasi (mg/L)	Mortalitas (%)
A	1 mg/L air	100
B	0,1 mg/L air	80
C	0,01 mg/L air	50
D	0,001 mg/L air	40
E	0,0001 mg/L air	10
<b>K (Kontrol)</b>	Tanpa Kadmium (CdNO <sub>3</sub> )	0

Keterangan : Berdasarkan data mortalitas tersebut di atas diduga nilai LC<sub>95</sub> berada diantara pada perlakuan A dan B dan LC<sub>5</sub> berada di E. maka kisaran uji definitif berada antara B sampai C. Setiap perlakuan konsentrasi cadmium diuji dengan ulangan minimal tiga kali.

Hasil yang diperoleh dari uji pendahuluan adalah pada perlakuan kontrol tidak terjadi kematian hewan uji. Pada konsentrasi Cd<sup>2+</sup> tertinggi (1 mg/L), kematian hewan uji mencapai 100%, sedangkan pada paparan Cd<sup>2+</sup> dengan konsentrasi yang berbeda menyebabkan jumlah mortalitas hewan uji yang bervariasi. Tabel 5.9 menunjukkan mortalitas ikan Gambusia meningkat seiring dengan semakin tingginya konsentrasi Cd<sup>2+</sup>.

#### b. Uji definitif

Konsentrasi pada uji definitif didasarkan pada nilai ambang letal atas dan ambang letal bawah yang diperoleh pada uji pendahuluan. Berdasarkan penentuan konsentrasi dengan metode Quantal Responses (Finney, 1971) diperoleh konsentrasi perlakuan pada uji definitif sebagai berikut 0,095 mg/L; 0,08 mg/L; 0,0625 mg/L; 0,05 mg/L; 0,035 mg/L; 0,025 mg/L; 0,0125 mg/L.

Rata-rata mortalitas ikan Gambusia pada uji akut definitif tertinggi pada pengamatan 96 jam sebesar 70% yaitu pada konsentrasi 0,095 mg/L, sedangkan tanpa paparan tidak terjadi kematian. Pada uji toksisitas akut definitif, kematian hewan uji pada kontrol tidak melebihi 20% yang merupakan batas kematian maksimum yang memungkinkan dalam uji toksisitas akut (USEPA, 2002).

**Tabel 5.10** Rata-rata mortalitas Ikan Gambusia pada uji definitif akut

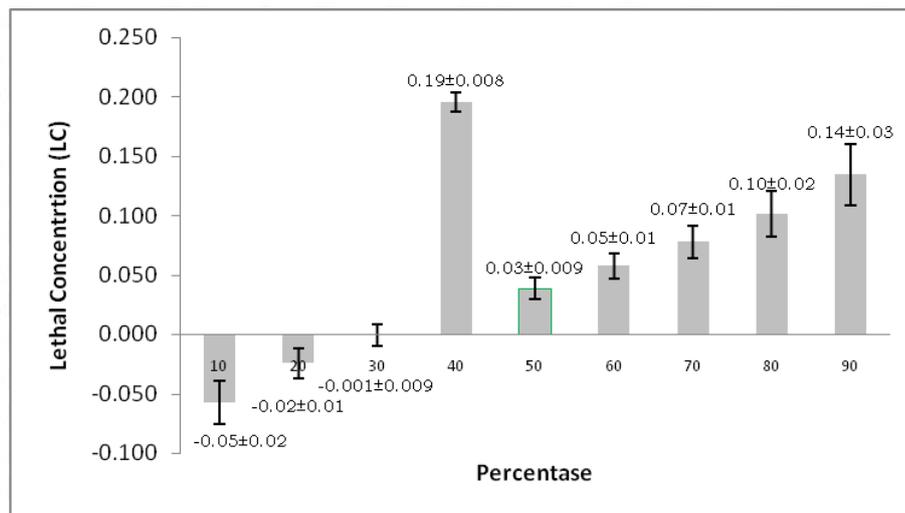
Konsentrasi (mg/L)	Mortalitas 24 jam (%)	Mortalitas 48 jam (%)	Mortalitas 96 jam (%)
0	0	0	0
0,0125	5	6	9
0,0250	12	11	12
0,0350	46	51	49
0,0500	54	52	56
0,0625	59	60	60
0,0800	60	63	62
0,0950	75	70	77

Tabel 5.10 menunjukkan bahwa pada paparan selama 24, 48 dan 96 jam, setiap paparan menyebabkan tingkat mortalitas yang hampir sama. Paparan tertinggi dengan konsentrasi 0,0950 mg/L menyebabkan mortalitas sebesar rata-rata 70%. Berdasarkan hasil analisa probit diperoleh nilai  $LC_{50}$  24, 48 dan 96 jam sebesar  $0.0385574 \pm 0,009$  mg/L (Gambar 5.4).

**Tabel 5.11** Hasil Pengujian Probabilitas  $LC_{50}$  96 jam dengan Software MINITAB 14

Percent	Percentile	Error	Lower	Upper
1	-0.135634	0.0348909	-0.253451	-0.0871238
2	-0.115222	0.0305902	-0.218146	-0.0725381
3	-0.102272	0.0278841	-0.195790	-0.0632387
4	-0.0925296	0.0258641	-0.179005	-0.0562117
5	-0.0846052	0.0242335	-0.165376	-0.0504707
6	-0.0778602	0.0228564	-0.153798	-0.0455625
7	-0.0719462	0.0216586	-0.143666	-0.0412391
8	-0.0666509	0.0205952	-0.134612	-0.0373496
9	-0.0618350	0.0196368	-0.126396	-0.0337945
10	-0.0574020	0.0187630	-0.118850	-0.0305047
20	-0.0244611	0.0126872	-0.0636572	-0.0051812
30	-0.0007084	0.0093219	-0.0261237	0.0153435
40	0.0195874	0.0081184	0.0018227	0.0370056
50	0.0385574	0.0090297	0.0226201	0.0625763
60	0.0575274	0.0114550	0.0396252	0.0919390
70	0.0778232	0.0149023	0.0558659	0.125307
80	0.101576	0.0194402	0.0737931	0.165438
90	0.134517	0.0261230	0.0978515	0.221896
93	0.149061	0.0291467	0.108326	0.246972
94	0.154975	0.0303844	0.112569	0.257184
95	0.161720	0.0318007	0.117399	0.268841
96	0.169644	0.0334702	0.123062	0.282548
97	0.179387	0.0355298	0.130009	0.299412
98	0.192337	0.0382777	0.139225	0.321851
99	0.212749	0.0426271	0.153714	0.357254

Note : Standard 95.0% Fiducial CI



**Gambar 5.4** LC50 96 jam uji toksisitas definitif akut pada Ikan Gambusia

Gambar tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi  $\text{Cd}^{2+}$  berbanding lurus dengan persentase mortalitas ikan Gambusia. Semakin tinggi konsentrasi  $\text{Cd}^{2+}$ , maka jumlah ikan Gambusia yang mati semakin banyak. Persentase kematian meningkat secara bertahap dengan meningkatnya konsentrasi logam berat kadmium klorida (Banavathu, *et al.*, 2016).

Kematian ikan gambusia pada uji toksisitas letal disebabkan oleh masuknya kadmium ke dalam jaringan tubuh makhluk hidup melalui beberapa jalan yaitu pencernaan, penetrasi melalui kulit, dan saluran pernapasan (pengambilan dari air melalui membran insang) (Hirata *et al.*, 2003; Muaja, Koleangan & Runtuwene 2013; Gadhave *et al.*, 2014). Hal ini yang menyebabkan terjadinya penghambatan enzim karbonik anhidrase dan transport ATP-ase terutama pada mitokondria akson parasinaptik dan sedikit pada endoplasmik retikulum. Menurut Quinlan, Evans & Gutteridge (1994), penghambatan ATP-ase berkaitan dengan  $\text{Ca}^{2+}$  yang menyebabkan peningkatan pelepasan neuro-transmitter. Tingkah laku ikan gambusia yang akan mati akibat terpapar  $\text{Cd}^{2+}$  selama percobaan ditandai dengan operculum terbuka lebar, sering berada di

permukaan air, berenang tidak teratur dan selanjutnya mati. Selain itu, permukaan kulit dari ikan gambusia nampak banyaknya mengeluarkan lendir (*moLPus*) sebagai akibat terpaparnya oleh logam  $Cd^{2+}$ , berbeda halnya pada ikan kontrol yang tidak ditemukan lendir pada kulit ikan gambusia. Menurut Levit (2010), ikan yang terpapar toksik dapat diketahui dari tingkah laku ikan tersebut, yaitu dengan gerakan hiperaktif, menggelepar, dan lumpuh. Hal ini diduga sebagai suatu cara untuk memperkecil proses biokimia dalam tubuh yang teracuni, sehingga efek letal yang terjadi lebih lambat. Berdasarkan hasil dari analisis probit didapatkan nilai  $LC_{50}$ -96 jam pada ikan gambusia adalah 0.03 mg/L, artinya pada konsentrasi tersebut didapatkan kematian 50% hewan uji dalam waktu pemaparan 96 jam. Epa (2016), menyatakan ambang batas untuk konsentrasi cadmium diperairan umum untuk irigasi dan perikanan adalah  $<0.01$ . Sehingga nilai  $LC_{50}$  dapat dijadikan sebagai konsentrasi acuan dalam melakukan percobaan paparan akut Cd pada ikan model yaitu ikan Gambusia.

## 5.2.2 Paparan Dosis Subkronis

### a. Penurunan konsentrasi kadmium (Cd) harian

Uji toksisitas subkronis adalah salah satu uji praklinik untuk mengidentifikasi ciri fisik maupun organ yang diberikan senyawa uji secara berulang dalam waktu tertentu selama 28 atau 90 hari (Casarett and Doull, 2008). Prinsip uji toksisitas subkronis yaitu sediaan uji dalam beberapa tingkat dosis diberikan setiap hari pada beberapa kelompok hewan uji. Tujuan uji toksisitas subkronik adalah untuk memperoleh informasi adanya efek toksik zat yang tidak terdeteksi pada uji toksisitas akut (OECD, 2001).

Konsentrasi yang digunakan pada uji toksisitas subkronis didasarkan pada konsentrasi  $LC_{50}$  96 jam yang dihasilkan pada uji akut definitif ( $0,03 \pm 0,009$  mg/L). Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  96 jam maka konsentrasi  $Cd^{2+}$  yang digunakan

dalam uji toksisitas subkronis adalah 12,5% (0,0035 µg/L); 25% (0,0075 µg/L); 37,5% (0,0115 µg/L); 50% (0,015 µg/L); 100% (0,03 µg/L) dan tanpa paparan Cd<sup>2+</sup> sebagai kontrol.

Pengujian toksisitas subkronis dilakukan dua tahap yaitu tahap uji pendahuluan dan tahap uji definitif. Tahap uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui penurunan konsentrasi media uji setiap hari, sedangkan tahap uji definitif dilakukan untuk mengetahui tingkat mortalitas dan konsentrasi kadmium di dalam tubuh hewan uji. Uji subkronis dilakukan selama 28 (dua puluh delapan) hari, hal ini didasarkan pada 10% dari harapan hidup dari ikan (280 hari). Hal ini sesuai dengan USEPA (2002), bahwa uji toksisitas subkronis pada hewan uji dilakukan selama 10% dari siklus hidupnya.

**Tabel 5.12** Rata-rata penurunan konsentrasi kadmium harian

Konsentrasi Paparan Cd <sup>2+</sup> (mg/L)	Konsentrasi Cd air (mg/L)
0%	0,001±0,001
12,5%	0,0035±0,002
25%	0,0075±0,004
37,5%	0,0125±0,01
50%	0,015±0,01
100%	0,03±0,02

Pada uji pendahuluan diperoleh hasil bahwa setiap hari konsentrasi kadmium mengalami penurunan yang bervariasi pada setiap konsentrasi. Tabel 5.12 menunjukkan penurunan tertinggi pada paparan konsentrasi larutan Cd<sup>2+</sup> 100% (0,03±0,02 mg/L) dan pada konsentrasi 25% sebesar 0,075±0,004 mg/L.

Penurunan konsentrasi kadmium yang terjadi pada setiap perlakuan rata-rata lebih tinggi dari penurunan konsentrasi harian pada kontrol.

Penurunan konsentrasi kadmium harian semakin tinggi dengan meningkatnya konsentrasi paparan. Penurunan konsentrasi harian pada paparan

subkronis digunakan untuk mengetahui jumlah larutan  $Cd^{2+}$  yang harus ditambahkan pada media uji definitif agar konsentrasinya konstan.

#### b. Persentase konsentrasi kadmium pada Ikan Gambusia

Pengujian dilanjutkan dengan uji toksisitas subkronis definitif.

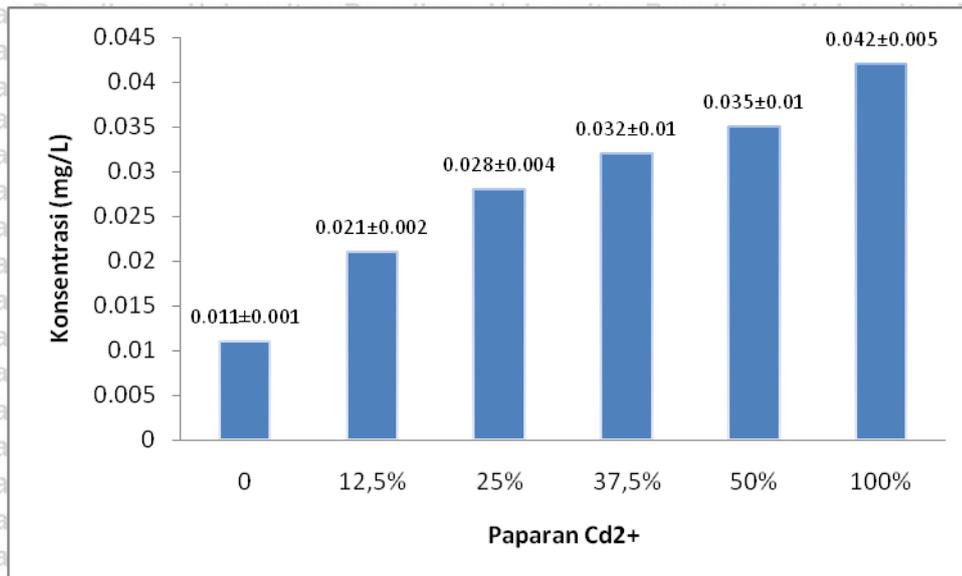
Berdasarkan hasil dari uji toksisitas subkronis pendahuluan, konsentrasi kadmium dalam tubuh ikan Gambusia tertinggi pada paparan  $Cd^{2+}$  100% (Tabel 5.13).

Konsentrasi kadmium dalam ikan Gambusia setelah paparan  $Cd^{2+}$  selama 28 hari menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi paparan maka semakin tinggi pula konsentrasi kadmium dalam tubuh Ikan Gambusia dan konsentrasinya lebih tinggi dari konsentrasi kontrol (Gambar 5.7).

**Tabel 5.13** Konsentrasi kadmium pada Ikan Gambusia setelah paparan

Perlakuan Paparan	Jumlah Sampel (ekor)	Konsentrasi $Cd^{2+}$ (mg/L)
0	30	0,011±0,001
12,5%	30	0,021±0,002
25%	30	0,028±0,004
37,5%	30	0,032±0,01
50%	30	0,035±0,01
100%	30	0,042±0,02

Hal ini disebabkan pada uji toksisitas subkronis, paparan dilakukan setiap hari dengan dosis yang sama. Oleh karena sifat dari kadmium yang mudah diabsorpsi ikan Gambusia dan tidak bisa terurai, maka apabila ikan Gambusia dipapar setiap hari dengan dosis yang sama selama 28 hari berturut turut maka kadmium terakumulasi di dalam tubuh ikan Gambusia. Kadmium yang diabsorpsi oleh ikan Gambusia akan terakumulasi di dalam tubuhnya sehingga semakin lama waktu paparan maka semakin tinggi konsentrasi kadmium di dalam tubuh ikan. Konsentrasi kadmium di dalam tubuh ikan Gambusia ditentukan oleh konsentrasi dan lama waktu paparan.



**Gambar 5.5** Konsentrasi kadmium pada Ikan Gambusia Cd<sup>2+</sup> subkronis

### 5.3 Pengaruh Paparan Kadmium Subkronis pada Ikan Gambusia

#### 5.3.1 Gejala Klinis Ikan Gambusia

##### a. Investigasi Gejala Klinis

Selama paparan kadmium, ikan gambusia menunjukkan gejala klinis yang berbeda-beda pada setiap perlakuan konsentrasi. Mulai dari gejala klinis ikan dengan sisik terlepas dan berenang tidak beraturan sampai dengan organ insang yang pucat pada dosis paling tinggi (perlakuan A). Kemudian ada juga yang menunjukkan gejala klinis berenang dengan menabrak dinding akuarium dan agresif terhadap ikan yang lain. Lebih lengkap disajikan pada Tabel 5.14. Perilaku tersebut menunjukkan paparan kadmium memberikan efek secara langsung berdasarkan perubahan tingkah laku ikan gambusia. Bahaya tersebut berupa adanya kandungan toksik pada kadmium.

**Tabel 5.14.** Gejala Klinis ikan gambusia setelah paparan cadmium dosis berbeda dan jumlah kematian ikan selama 28 hari pengamatan

Perlakuan Paparan Kadmium	Jumlah Sampel Ikan	Minggu Pengamatan Post Mortem	Gejala Klinis
A	30	1	Hari kedua dalam minggu pertama ikan sudah ada yang mati. Sisik terlepas, berenang tidak beraturan, organ insang yang pucat. Sering berenang dipermukaan. Mulut sering membuka dengan gerakan lebih cepat dari ikan normal. Ikan cenderung menjauhi cahaya.
B	30	2	Kematian ikan baru terlihat pada minggu kedua. Berenang dengan menabrak dinding akuarium dan lebih banyak berada di permukaan. Agresif terhadap ikan yang lain. Gerakan mulut tidak terlalu cepat. Sisik banyak terlepas pada minggu ketiga. Ikan cenderung menjauhi cahaya.
C	30	3	Kematian ikan mulai terlihat pada minggu ketiga. Berenang dengan menabrak dinding akuarium dan tidak terlalu agresif terhadap ikan yang lain.
D	30	3	Kematian ikan mulai terlihat pada minggu ketiga. Berenang dengan menabrak dinding akuarium dan tidak terlalu agresif terhadap ikan yang lain.
E	30	4	Tidak menunjukkan gejala klinis yang berarti
K	30	4	Tidak ada gejala klinis

*NB: Pengamatan Secara Visual*

Apabila diamati dari gejala klinis yang terjadi, keracunan akibat paparan kadmium tersebut sudah ditunjukkan dua hari setelah paparan pada perlakuan A.

Perlakuan B mulai menunjukkan gejala klinis yang berarti pada minggu kedua dengan adanya kematian ikan. Pada perlakuan C dan D menunjukkan gejala klinis yang hampir sama terutama adanya kematian pada minggu ketiga.

Perlakuan E tidak menunjukkan gejala klinis yang berarti, namun ditemukan ikan yang mati pada minggu keempat. Sedangkan perlakuan control tidak ditemukan kematian ikan.

## b. Pemeriksaan Post Mortem

Tabel 5.14 menunjukkan jumlah ikan yang mati di akhir percobaan tertinggi pada konsentrasi 100% dengan gejala klinis yang lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan konsentrasi yang lain. Apabila dibandingkan dengan ikan kontrol, dari awal perlakuan tidak menunjukkan adanya gejala apapun. Percobaan dengan konsentrasi 25% hingga 75% menunjukkan gejala klinis yang hampir sama, sedangkan konsentrasi 12,5% cenderung tidak menunjukkan gejala yang tidak berarti (cenderung sama dengan ikan kontrol).

Tingkat kematian pada setiap perlakuanpun menunjukkan adanya perbedaan, dengan kematian tertinggi pada konsentrasi 100% pada minggu pertama, kemudian konsentrasi 75% pada minggu kedua. Sementara itu perlakuan konsentrasi 25% dan 50% menunjukkan tingkat kematian pada jumlah yang sama pada minggu ketiga, sedangkan terendah pada konsentrasi 12,5% pada minggu keempat, dan ikan kontrol tanpa ada kematian sama sekali.

## 5.3.2 Pengujian Histologi Insang Ikan Gambusia dengan Pewarna HE

### a. Insang Gambusia Sampel Sungai Wangi

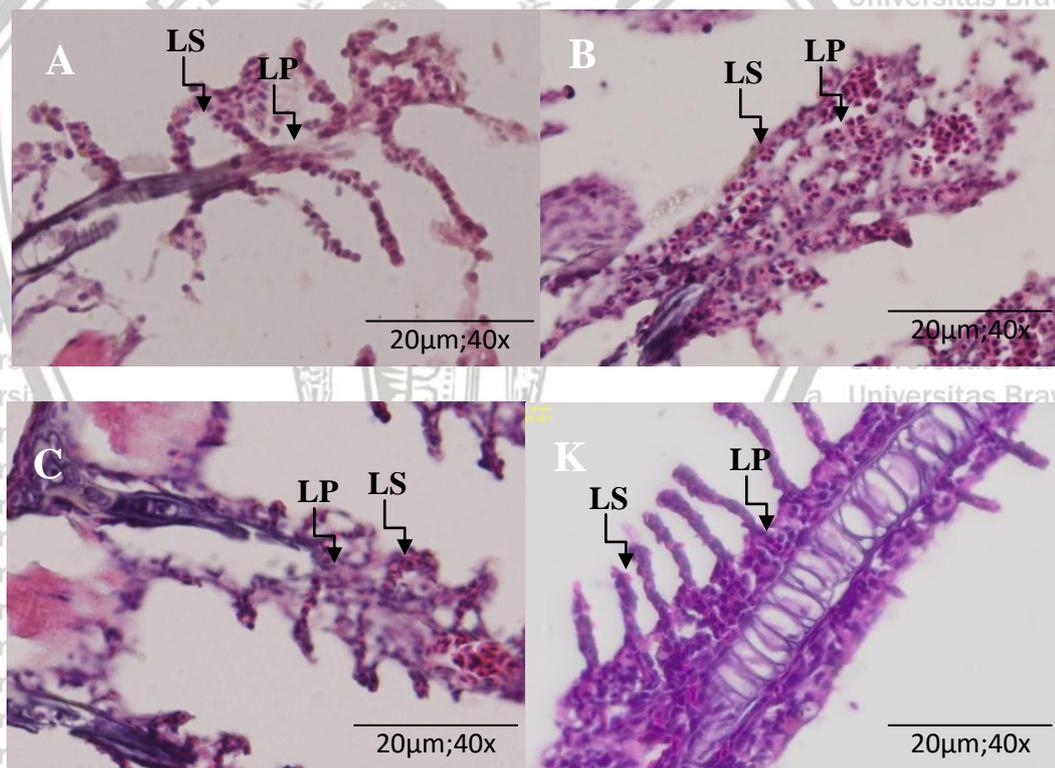
Penampilan histologi insang ikan Gambusia menggunakan pewarna *Hematoksilin* dan *Eosin* yang diambil dari sampel kawasan industri, rumah tangga dan pertanian menunjukkan kerusakan insang. Kerusakan itu jelas terlihat di *lamella primer* (LP) dan *lamella* sekunder (LS) (Gambar 5.4). Dari tiga area berbeda, area Industri menunjukkan kerusakan *lamella primer* (LP) dan *lamella* sekunder (LS) dibandingkan dengan area Rumah Tangga dan Pertanian. Sel-sel LP dan LS berperan penting dalam proses homeostasis pemasukan cairan ke dalam insang ikan. Proses ini memungkinkan logam berat untuk pertama kali diserap ke dalam tubuh melalui sel klorida. Hasil pengamatan

menunjukkan bahwa kerusakan terjadi ketika organisme terpapar oleh limbah yang mengandung logam berat.

Proporsi kecil deterjen dapat diidentifikasi memiliki toksisitas sedang (10-100 mg/L) dan beberapa memiliki toksisitas sangat rendah (hingga 10.000 mg/L).

Deterjen dapat menyebabkan kerusakan pada epitel respirasi insang seperti pembesaran dan vakuolisasi sel dengan perubahan distrofik menjadi nekrotik.

Tanda-tanda klinis keracunan termasuk gangguan pernapasan dan kemudian karena tidak aktif. Karakteristik dalam pemeriksaan pato-anatomi adalah meningkatkan jumlah lendir pada kulit dan insang, dan kongesti pada pembengkakan edema pada alat insang. Lendir mudah dikeluarkan dari permukaan tubuh dan insang.



**Gambar 5.6.** Struktur insang ikan. A) Area industri, B) Area rumah tangga, C) Area pertanian dan K) Kontrol sebagai pembandingan. *lamella primer* (LP) dan *lamella sekunder* (LS) dari tiga area berbeda telah berubah. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop Olympus perbesaran 40x;20µm

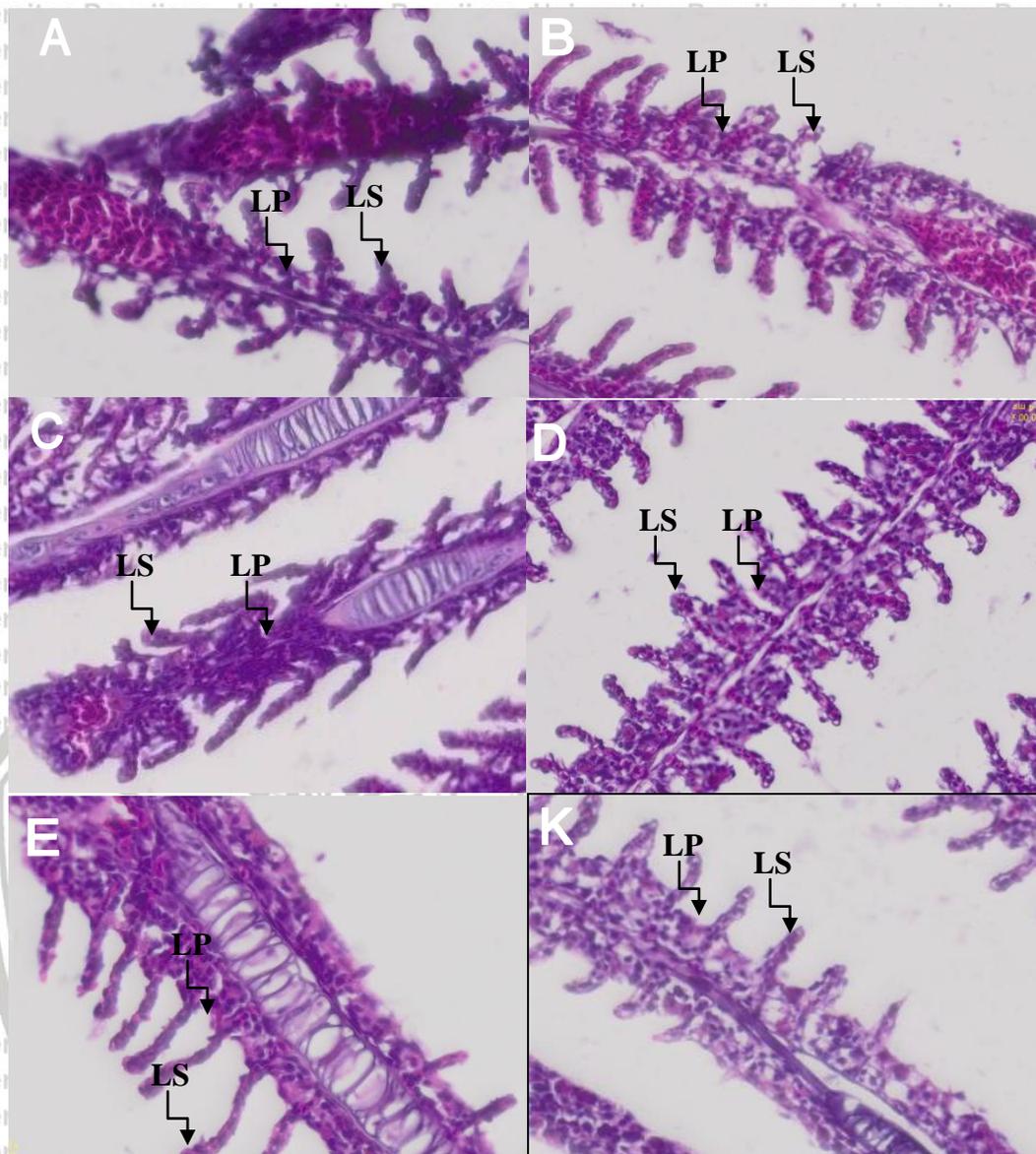
Dari gambar 5.6 terlihat adanya perbedaan penampakan pada LP dan LS disetiap sampel. Pada sampel area industri, kondisi LP mengalami penyusutan sedangkan bentuk dari LS tidak beraturan. Demikian juga halnya dengan sampel area rumah tangga dan pertanian dengan LP bentuk tetap namun LS tidak beraturan, penampakan yang berbeda pada sampel insang control dengan LP dan LS yang masih utuh.

#### **b. Insang Gambusia Sampel Sungai Wangi**

Gambaran histologi insang ikan Gambusia menggunakan pewarna *Hematoksilin* dan *Eosin* yang dibahas adalah tentang kondisi normal yang berfungsi sebagai control dan kondisi diberikan paparan Cd. Perbandingan difokuskan kepada efek paparan terhadap kondisi dan kerusakan insang ikan gambusia.

Gambar histology inang ikan Gambusia control artinya ikan tidak diberi paparan Cd. Insang diambil pada bagian sebelah kanan. Insang merupakan salah satu organ sasaran toksisitas Cd dan berperan sebagai organ respirasi yang selalu berhubungan langsung dengan air di sekelilingnya. Permukaan insang berfungsi sebagai tempat pertukaran ion-ion tertentu serta berfungsi sebagai organ osmoregulasi.

Dari hasil pengamatan preparat natif dan histopatologi yang dilakukan di laboratorium ditemukan sebanyak 10 kasus kerusakan pada insang ikan gambusia selama paparan kadmium. Pengamatan pada histopatologi memperlihatkan adanya perubahan *lamella primer* (LP) dan *lamella* sekunder (LS) seperti hiperplasia dan haemorrhage (Gambar 5.7).



**Gambar 5.7.** Morfologi insang ikan Gambusia yang terpapar Cd, diamati melalui pewarnaan HE (40x), A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop Olympus 40x;20 $\mu$ m adanya perubahan pada lamella primer (LP) dan lamella sekunder (LS).

Hasil analisa histopatologi menunjukkan bahwa kerusakan yang ditimbulkan oleh paparan pada perlakuan A, B dan C mengalami perubahan sel.

Perlakuan tersebut memberikan gambaran bahwa besarnya efek yang ditimbulkan pada tingkat sel di organ insang ikan gambusia mempunyai fungsi sebagai alat pernafasan dan *homeostasis*. Sehingga akan menjadi bagian utama dan paling penting dalam proses yang terdampak oleh paparan benda asing. Hal

tersebut diasumsikan terjadi karena, adanya pelepasan sel-sel dari jaringan penyokongnya (membran basal) yang disebabkan oleh sel mengalami nekrosis akibat kadar oksigen yang berkurang pada lingkungannya, sehingga merangsang terjadinya stres akibat hipoksia. Menurut Roberts (2001), hipoksia terjadi apabila sel-sel darah yang membawa oksigen ke dalam jaringan tidak dapat memenuhi proses metabolisme di dalam tubuh untuk berbagai keperluan.

Harper dan Jeffrey (2008), menambahkan bahwa hipoksia dapat mengakibatkan terjadinya keadaan patologis diantaranya nekrosis, hiperplasia, hiperemi dan hipertropi pada berbagai jaringan organ yaitu insang, hati, limpa, dan ginjal.

Selain itu efek yang ditimbulkan oleh paparan lainnya adalah hiperplasia lamella sekunder pada insang terjadi akibat adanya pembelahan sel epitel yang tidak terkontrol, sedangkan pada lamella primer disebabkan oleh pembelahan sel-sel chlorid secara berlebihan (Roberts, 2001). Hiperplasia sel-sel lamella insang diawali dengan beberapa kejadian diantaranya edema, kematian sel dan lepasnya sel-sel epithelium pada lamella insang (Widayati, 2008). Fusi lamella terjadi akibat peningkatan patologi hiperplasia secara terus menerus dan menyebabkan terisinya ruang antar lamella sekunder oleh sel-sel baru yang kemudian memicu terjadinya perlekatan pada kedua sisi lamella. Kejadian ini didukung oleh Benli dan Ozkul (2008), yang menyatakan bahwa kejadian fusi lamella merupakan level kerusakan berat karena fusi lamella merupakan kerusakan tahap lanjutan dari kerusakan hiperplasia.

### 5.3.3 Pengujian Serapan Paparan pada Insang Ikan Gambusia

#### a. Pengujian *Convocal Laser – Scanning Microscopy (CL-SM)*

Hasil pengamatan laboratorium menunjukkan perbandingan dengan ikan kontrol, morfologi insang ikan yang dipapar cadmium sebanding dengan ikan lainnya yang dipapar. Lamella sekunder dilapisi oleh epitel yang merupakan dua lapisan sel skuamosa yang tebal, sedangkan lapisan epitel bertingkat melapisi

filamen primer. Epitel sel insang dibuat untuk bagian yang lebih besar dari sel perkerasan (PVC), beberapa sel mukosa dan beberapa sel klorida (LP).

Kadmium, pada konsentrasi 0,0075 mg/L dan 0,0035 mg/L untuk jangka waktu 28 hari perlakuan, tidak mengubah morfologi insang. Namun, setelah adanya perlakuan 0,030 mg/L, 0,015 mg/l dan 0,0115 mg/l, perubahan diamati pada beberapa filamen, misalnya pengangkatan epitel, pecah dan atau hipertrofi sel pada lamella sekunder.

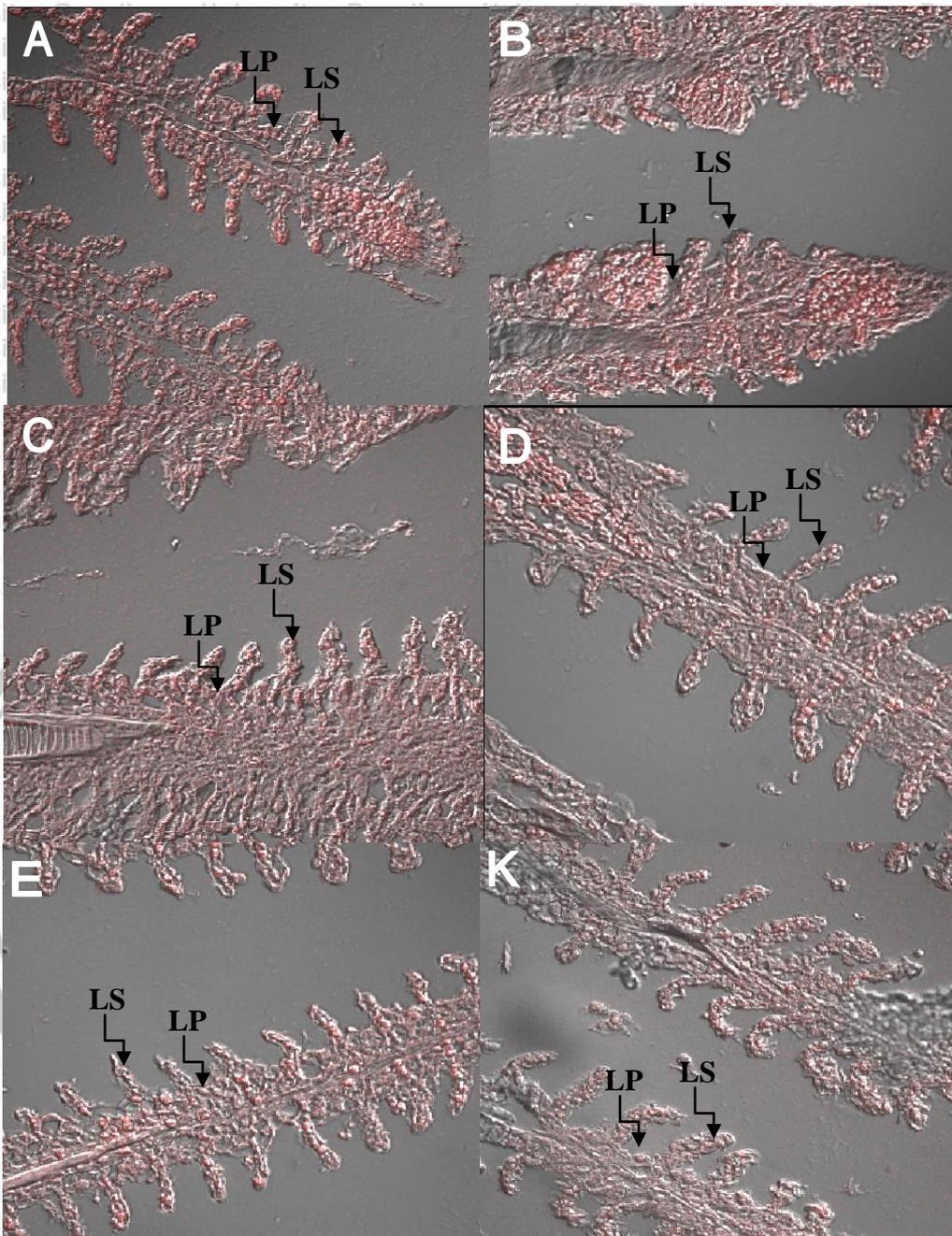
Salah satu tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kadmium pada insang gambusi remaja dan morfologi LP. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi tinggi atau setelah paparan polutan yang lama, perubahan dapat muncul pada beberapa filamen insang seperti pengangkatan epitel, hiperplasia dan atau hipertrofi sel lamella sekunder.

Perubahan morfologi yang serupa telah dijelaskan untuk berbagai toksisitas dan iritasi lainnya (Hasil Seminar Nasional Biologi II UNESA, 2018). Namun, pada tahap paparan akut maupun subkronis, kadmium tidak menyebabkan munculnya sel apoptosis atau kelebihan sel nekrotik, seperti yang telah dilaporkan untuk nila pada kondisi yang berbeda (Bonga *et al.*, 1990). Pertimbangan morfologi permukaan LP tampak bahwa, dalam beberapa LP, kadmium menyebabkan perataan permukaan bersamaan dengan penurunan mikrovili yang signifikan, jika tidak penghilangan total permukaan LP. Namun, perubahan permukaan tidak terdistribusi secara merata pada populasi LP. Pengamatan konflik yang sama telah dilakukan pada ikan rainbow trout (Perry and Wood, 1985). Tahapan paparan subkronis dengan konsentrasi kadmium subletal (dari 3,5 sampai 30 µg/l) menunjukkan gangguan pada sitoskeleton aktin. Hal itu muncul di LP yang terletak di daerah interlamellar insang, di persimpangan antara filamen primer dan sekunder. Perubahan sesuai dengan mikrofilamen sitoskeleton pada bagian apikal sel, yang melekat pada protein tertentu dalam membran sel. Beberapa

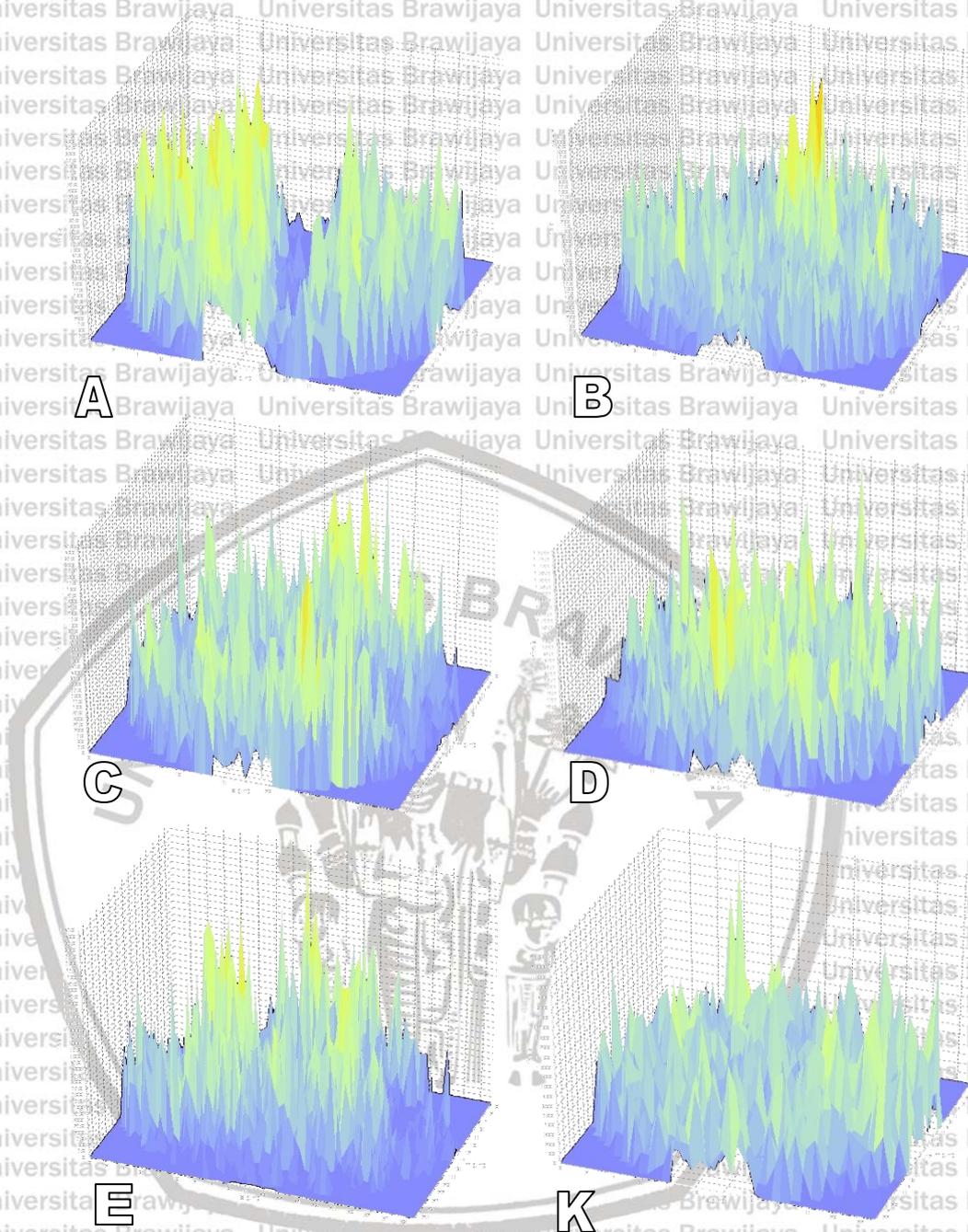
penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa dalam berbagai jenis sel mamalia, proses pengatur tingkatan yang disebabkan oleh kondisi anisosmotik bersamaan dengan munculnya reorganisasi drastis jaringan aktin sitoplasma dan perinuklear (Cornet, Lambert and Hoffmann, 1993). Hal ini sesuai dengan fenomena dua langkah, sebuah depolimerisasi awal jaringan aktin diikuti oleh repolimerisasi untuk membentuk agregat filamen aktin (Cantiello, 1995). Pada kelenjar rektum hiu, hilangnya sementara aktin F-aktin juga disebabkan oleh hipotonisitas yang diterapkan pada permukaan sel basolateral (Cooper, 1991).

Karena insang salmon terlibat dalam pengangkutan ion, ada kemungkinan bahwa perubahan jaringan aktin yang disebabkan cadmium terkait dengan fenomena reorganisasi aktin yang telah diamati pada jaringan lain yang menunjukkan sifat osmoregulator (Cantiello, 1997; Izdebska *et al.*, 2018). Selanjutnya, studi tentang proses regulasi volume pada sel tumor secara jelas menunjukkan peran sumber kalsium intraseluler pada reorganisasi mikrofilamen semacam itu (Cornet, Lambert and Hoffmann, 1993). Membran dalam mikrofilamen inilah yang memungkinkan terjadinya pergerakan hidrofobik kecil (tidak ada afinitas untuk molekul).

Preparat insang ikan baik perlakuan maupun kontrol, jaringan filamen mikro dari filamen primer dan sekunder diwarnai dengan menggunakan antibodi MT dan menunjukkan pewarnaan homogen tepi apikal sel epitel (Gambar 5.9). Pada hasil yang ditampilkan dari slice pertama pada pewarnaan sitoskeleton sudah menunjukkan adanya serapan antibody primer dan sekunder dengan pewarna rhodamin. Tebal tipisnya hasil serapan tergantung dari besarnya konsentrasi cadmium yang dipaparkan.



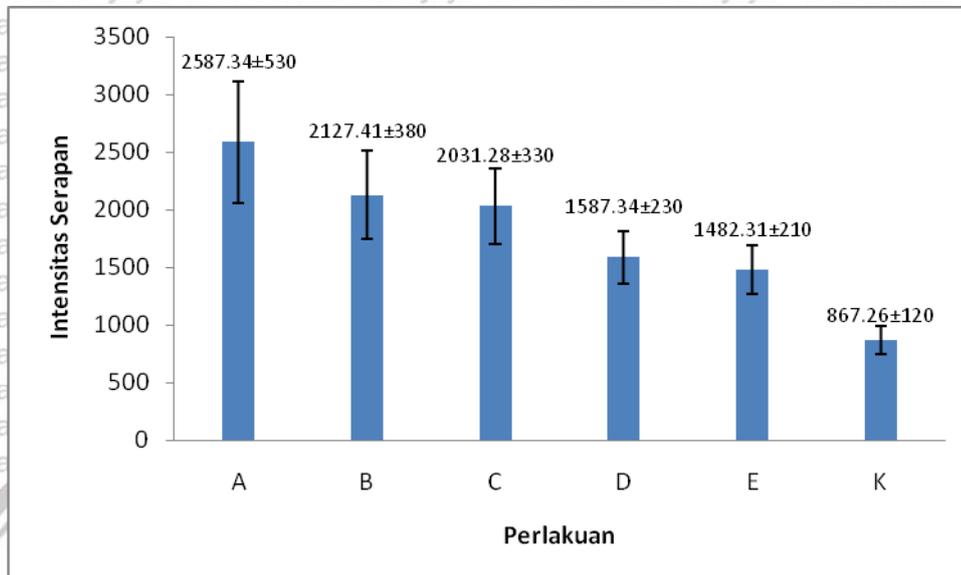
**Gambar 5.8.** Morfologi insang ikan *Gambusia* yang terpapar Cd, diamati melalui pewarnaan Rhodamin-Fluorescent (40x) dengan penyerapan enzim MT dan diamati dengan mikroskop konfokal (CL-SM), A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop konvokal.



**Gambar 5.9.** Hologram insang ikan Gambusia yang terpapar Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L; dan dibandingkan dengan kontrol, diamati mikroskop konvokal.

Pada Gambar 5.8A menunjukkan hasil serapan pewarna yang lebih tebal karena konsentrasi cadmium yang dipaparkan lebih besar. Demikian juga dengan Gambar 5.8B, 5.10C, dan 5.10D, menunjukkan tingkat serapan yang semakin tipis. Sedangkan untuk Gambar 5.8E dan 5.8K menunjukkan hasil

serapan pewarna yang hampir sama tipisnya. Melalui transportasi pasif (hidrofobik), pengaruh kadmium pada konsentrasi kalsium sitosolik pada ikan telah ditunjukkan secara meluas.



**Gambar 5.10.** Tingkat Serapan Paparan Kadmium pada Setiap Perlakuan

Pada epitel insang, transport kalsium dilakukan melalui LPs, seperti yang telah ditunjukkan pada belut Amerika (Flik and Verbost, 1993) dan ikan nila (Flik *et al.*, 1993). Apabila dianalogikan dengan kalsium, kadmium memasuki LP insang melalui jalur  $\text{Ca}^{2+}$  dan setelah beberapa kejadian, menyebabkan lipase dalam kadar  $\text{Ca}^{2+}$  sitosolik (Verbost *et al.*, 1994; Lin and Sung, 2003). Perubahan kadmium yang disebabkan oleh keseimbangan  $\text{Ca}^{2+}$  sangat penting mengingat peran yang dimainkan oleh kalsium dalam mengatur perakitan dan pemeliharaan struktur aktin (Janmey, 1994). Kemungkinan hal ini menjadi penyebab utama reorganisasi aktin pada ikan yang telah diobati dengan polutan (Risjani, Couteau and Minier, 2014).

Pada insang LP, jaringan mikrotubulus kurang berkembang daripada mikrofilamen. Pencemaran Kadmium hanya menginduksi sedikit perubahan pada pewarnaan tubulin (Soegianto *et al.*, 2008), karena jaringan mikrofilamen dan mikrotubulus sangat saling terkait, sehingga ada kemungkinan gangguan pada

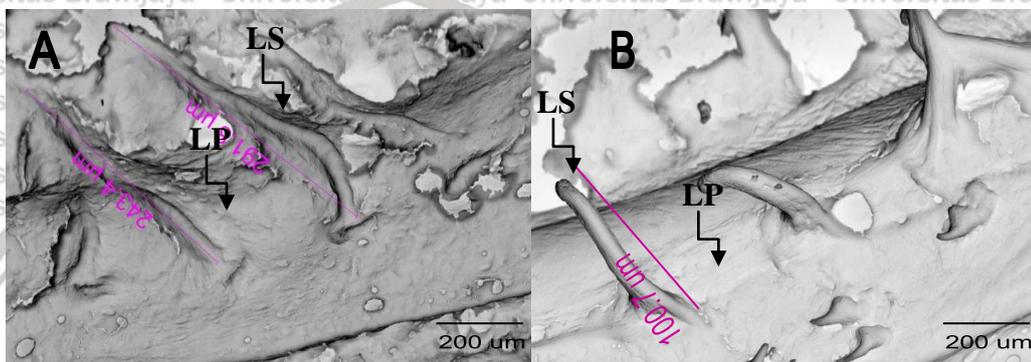
jaringan aktin kadmium dapat mempengaruhi mekanisme mikrotubulus karena telah ditunjukkan pada keratinosit manusia dengan adanya tingkat kalsium yang tinggi (Zhang, 2005). Hasil penelitian jelas menunjukkan terdapat efek kadmium pada jaringan mikrofilamen aktin. Hal ini menimbulkan pertanyaan tentang dampak yang mungkin terjadi dari perubahan struktural pada fungsi sitoskeletal. LP cabang tidak hanya terlibat dalam transportasi kalsium misalnya,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase terletak pada sistem tubularnya yang luas dan merupakan salah satu enzim kunci untuk osmoregulasi. Terlepas dari kemungkinan efek langsung kadmium pada area  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Schoenmakers dan Flik, 1992; Izdebska *et al.*, 2018), efek tidak langsung dari logam dimungkinkan melalui hubungan antara enzim dan jaringan aktin (Vandekerckhove, 1990; Cooper, 1991; Lewis *et al.*, 1995). Selain itu, ada kemungkinan filamen aktin berinteraksi dengan sistem transportasi lainnya seperti yang terjadi pada berbagai jenis sel (Lewis *et al.*, 1995) atau lebih spesifik lagi dengan beberapa saluran teraktivasi sementara seperti yang terjadi pada proses pengaturan volume (Levit, 2010).

#### **b. Pengujian dengan Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Gambar 5.11 menunjukkan representasi Gambar SEM secara mikroskopi dari insang ikan kontrol dan yang diberi perlakuan kadmium. Pengamatan pada kondisi normal, *lamella sekunder* (LS) memiliki rumbai dan panjangnya sekitar 243,4 – 291,8  $\mu\text{m}$  sedangkan untuk ikan yang diberi perlakuan memiliki panjang sekitar 100,7  $\mu\text{m}$  dengan tampilan *lamella sekunder* (LS) tumpul (proliferasi).

Pada Gambar 5.12 apabila diamati pada kondisi normal, *lamella primer* (LP) datar atau sedikit cekung. Kondisi yang menampakkan adanya peregangan (pembesaran) sel pada LP menunjukkan adanya proses penyerapan (Gambar 5.11). Pengamatan SEM tidak memungkinkan untuk mendeteksi perbedaan morfologi antara permukaan sel klorida yang berada di dasar lamella sekunder,

kadang-kadang disebut sel  $\alpha$ -klorida dan yang ditemukan di wilayah interlamellar (sel  $\beta$ -klorida). Namun, pada ikan gambusia yang diberi perlakuan kadmium, membran apikal menunjukkan morfologi variabel. Pada beberapa sel, ornamen apikal itu dalam kondisi normal, sedangkan di tempat lain (bahkan di daerah interlamelar yang sama), membran apikal terasa lebih halus, karena mikrovili jarang atau bahkan sama sekali tidak ada. Hal ini tidak tergantung pada konsentrasi kadmium (7,5 dan 3,5  $\mu\text{g/l}$  air) dan kontrol.

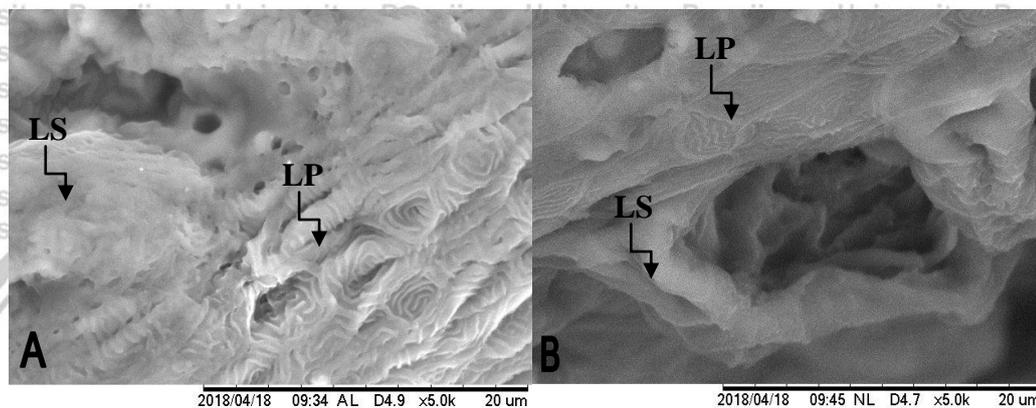


**Gambar 5.11.** Morfologi mikrofilamen insang ikan Gambusia secara mikroskopis, (A) menunjukkan mikrofilamen insang ikan tanpa perlakuan; (B) menunjukkan mikrofilamen dengan perlakuan paparan Cd

Scanning microscopy menunjukkan bahwa insang ikan gambusia menyerap air tercemar cadmium dengan peningkatan yang cepat pada area permukaan individu LP, dan juga beberapa hari kemudian, dengan meningkatnya kerapatan LP matang, yaitu sel yang sepenuhnya berkembang. Daribanyaknya ikan, hanya sebagian kecil membran apikal LP yang tersedia dan terpapar air karena ditutupi oleh PVC (Perry and Wood, 1985). Pengamatan saat ini sesuai dengan Pisam and Rambourg (1991) dan menunjukkan bahwa insang gambusia apeks LP tidak ditutupi, bahkan sebagian oleh PVC seperti yang diamati pada jenis ikan lainnya seperti ikan nila (Wendelaar Bonga *et al.*, 1990).

Adanya kadmium, luas permukaan LP termodifikasi dalam 7 hari pertama, sementara perubahan kepadatan individu LP memakan waktu lebih

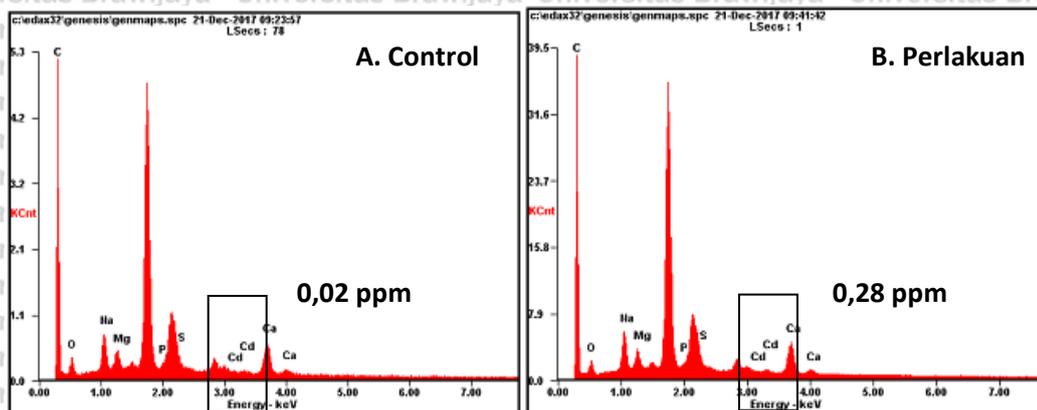
lama. Pada tahap pemaparan kadmium, LP berasal dari sel yang belum matang yang berada di lapisan basal epitel (Pisam *et al.*, 1995) dan tidak terdeteksi dengan pemindaian mikroskop elektron. Keterlambatan yang terjadi sebelum kenaikan densitas dapat dikorelasikan dengan tingkat pergantian dari LPs dan dengan kemunculan pada permukaan epitel sel matang yang baru. Pada nilai yang terpapar air yang diasamkan, proliferasi LP yang ditandai juga telah diamati (Wendelaar Bonga *et al.*, 1990).



**Gambar 5.12.** Morfologi penampang sel pada sampel A (tanpa perlakuan paparan Cd) dan sampel B (perlakuan paparan Cd). Menunjukkan adanya perbedaan luas permukaan dan variasi kerapatan pada LP dan LS yang semula luasnya sempit dengan kerapatan tinggi, setelah terpapar menjadi renggang dan luasnya membesar.

Gambar 5.12 menunjukkan variasi kerapatan LP dan LS dan luas permukaan pada insang ikan gambusia yang normal dan terpapar kadmium. Hasil referensi (ditunjukkan sebagai hari ke-0) menggambarkan hasil yang berbeda untuk ikan kontrol A) diberikan pada kondisi aklimasi dan penanganan yang sama daripada ikan yang diberi kadmium; B) diuji secara acak selama periode percobaan dari hari 0 sampai hari 28. Nilai rata-rata ikan kontrol ini tidak menunjukkan heterogenitas variannya. Analisis mikrograf SEM menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kontrol dan yang diberi perlakuan. Luas permukaan dan area fraksional masing-masing meningkat dari luas area 99,1 % setelah terpapar menjadi 147,8 % dari nilai ikan perlakuan konsentrasi tinggi

sampai rendah. Tidak ada variasi yang signifikan yang diamati pada kerapatan LP. Kurva pada Gambar 5.13 menunjukkan dua komponen yang berbeda, yaitu area sel permukaan dan kerapatan sel. Dengan adanya paparan cadmium selama 28 hari terjadi peningkatan konsentrasi cadmium.



**Gambar 5.13.** Hasil EDAX dari SEM untuk ikan control (A) dan ikan yang diberi perlakuan paparan cadmium (B). Data lengkap tidak ditampilkan.

Konsentrasi hasil Edax ikan control menunjukkan angka 0,02 ppm (ambang batas 0,03 ppm). Hal ini berarti bahwa masih berada di bawah ambang batas untuk ikan kontrol, sedangkan konsentrasi hasil Edax untuk ikan yang diberikan perlakuan paparan cadmium konsentrasi meningkat menjadi 0,28 ppm. Jauh diambang batas bagi kehidupan organisme. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada tampilan morfologi insang ikan dengan perlakuan.

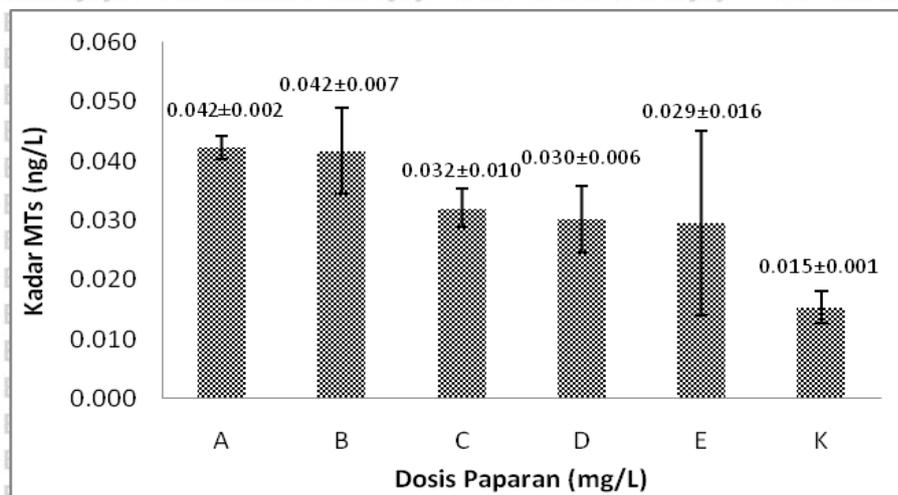
Ikan gambusia mampu beradaptasi dengan tekanan osmotik (Lamatsch *et al.*, 2015), dengan mekanisme posesif yang dibutuhkan untuk menginduksi berbagai modifikasi fisiologis, biokimia dan morfologi (Solbakken, Hansen and Stefansson, 1996). Sebuah racun yang mengganggu proses pengangkutan ion dapat menimbulkan efek hormonal yang mengingatkan pada respons endokrin alami. Misalnya, kortisol dan hormon pertumbuhan (GH) telah terlibat dalam proses pemadaman (Zhang *et al.*, 2011). Perlakuan kortisol kronis (10 hari) pada trout pelangi menyebabkan peningkatan luas permukaan individu LP, kepadatan

dan daerah fraksional (Perry and Wood, 1985; Prat *et al.*, 1996). Variasi kortisol juga diasumsikan terkait dengan penyesuaian morfologi area permukaan LP yang muncul pada ikan yang dikirim ke berbagai gangguan asam basa (Perry and Wood, 1985; Pedersen, Mills and Hoffmann, 1999). Mengingat kemiripan antara data saat ini dan hasil yang diperoleh dari gangguan asam basa atau proses pemadaman, kemungkinan kortisol juga terlibat dalam perubahan morfologi yang disebabkan cadmium. Beberapa percobaan juga menunjukkan efek GH pada area permukaan LP, kepadatan dan luas fraksi operarsular dan branchial LP (Perry and Wood, 1985; Flik *et al.*, 1993). Namun, hormon ini diketahui menginduksi kenaikan jumlah sel aksesori yang signifikan. Efek seperti itu meniru apa yang terjadi secara alami selama pemadaman karena sel-sel aksesori yang terkait dengan LP matang (Pisam *et al.*, 1995). Pengamatan SEM tidak menunjukkan kemunculan sel aksesori pada gambusia yang diberi kadmium. Oleh karena itu, hal ini bertentangan dengan implikasi hormon pertumbuhan dalam respons yang disebabkan cadmium. Namun, percobaan lebih lanjut sangat diperlukan untuk mengkonfirmasi hipotesis implikasi atau bukan jalur hormonal dalam respon gambusia terhadap polusi cadmium pada jenis ikan dan biota air lainnya, karena tingkat resapan dan kemampuan dari masing-masing organisme berbeda.

#### **a. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Hasil pengujian pada deteksi protein MT menggunakan ELISA Kit menggambarkan efek yang begitu besar dengan paparan oleh cadmium. Hasil deteksi protein pada Gambar 5.14 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara dosis perlakuan dengan tanpa perlakuan. Terjadi peningkatan jumlah protein MT dengan meningkatnya konsentrasi paparan Cd pada dosis sub kronis. Perlakuan dengan dosis tinggi (A dan B) mengakibatkan tingginya kadar

MT. Sedangkan perlakuan rendah (C, D dan E) kadar MT sedang dan perlakuan control dengan kadar MT paling rendah.



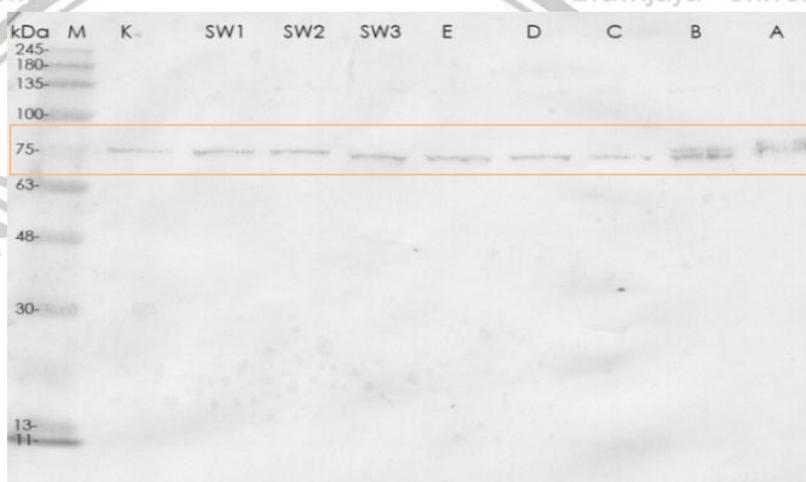
**Gambar 5.14** Pengukuran protein MT menggunakan ELISA. Data tersebut menampilkan bahwa pada ikan control sesuai dengan hasil pengujian terdeteksi adanya kadar MT  $0.015\pm 0.001$ , tidak berbeda secara signifikan dengan perlakuan tertinggi  $0.042\pm 0.002$

Perbedaan tersebut mencerminkan tingkat serapan dari paparan cadmium yang diberikan terhadap antibody. Hasil analisa statistic uji t menunjukkan bahwa dengan paparan yang tinggi menghasilkan nilai t yang tinggi pula dengan standar deviasi. Pengaruh kadar MT yang berbeda dipengaruhi oleh tingkat paparan dengan dosis yang berbeda. Paparan tersebut menggambarkan kondisi tingkat pencemaran yang berbeda pada lingkungan. Pada ikan control masih terdeteksi adanya MT sebesar  $0,015$  mg/L. Adanya MT yang terdeteksi tersebut menggambarkan bahwa sekalipun ikan control mengandung logam cadmium. Dengan demikian, hasil deteksi ekspresi MT pada ikan perlakuan menunjukkan adanya serapan dan akumulasi Cd. Walaupun hasil yang ditampilkan tidak berbeda secara signifikan. Namun hasil ini sudah bisa menjawab tentang adanya proses penyerapan. Besar kecilnya hasil serapan tersebut menunjukkan adanya proses penyeimbangan terhadap kondisi

lingkungan sekitar. Penyeimbangan kondisi ini mampu dilakukan oleh organisme yang memiliki tingkat adaptasi yang tinggi.

#### b. Uji Western Blotting

Seperti dapat dilihat pada Gambar 5.15, analisis Western blot menunjukkan induksi protein dengan berat molekul kira-kira 75 kDa. Induksi ini terdeteksi paling jelas pada konsentrasi kadmium tertinggi (pada perlakuan A dan B dengan konsentrasi 0,03 mg/L dan 0,015 mg/L). Protein baru secara imunologis cross-reactive dengan protein MT 70 kDa dari ikan gambusia (Gambar 5.15).



**Gambar 5.15.** Hasil Uji Western Blotting Serapan Cd pada Sampel serapan pada berat molekul 75 kDa. Serapan pada K0, K1, K2 dan K3 sebagai area kontrol tetap ada serapan MT-Cd namun tipis. Demikian juga pada C, D dan E hampir sama dengan K. Serapan pada A dan B memiliki ben yang paling tebal.

Berdasarkan penelitian ini menunjukkan dengan jelas bahwa protein yang terdeteksi adalah protein MTs sebagai biomarker pengikat logam berat. Dari hasil pengujian diperkirakan total serapan cadmium lebih tinggi pada sampel dengan perlakuan paparan Cd dari pada kontrol. Insang yang menjadi sampel untuk pengujian ELISA dan WB merupakan organ pertama dalam proses respirasi dan osmoregulasi. Hal ini berarti proses homeostasis pun pertama kali terjadi pada insang. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa akibat dari paparan Cd pada

organ insang adalah terjadinya penumpukan sel pada ujung filamen dari lamella sekunder pada insang karena proses penyerapan Cd.

Penelitian ini tidak melihat ada yang signifikan hubungan antara paparan kadmium dan tingkat MT-Cd, meskipun diketahui bahwa paparan kadmium bisa meningkatkan pelepasan metallothionein ke dalam plasma darah sampel yang terpapar pada Cadmium (Nordberg, 2009). Kelihatannya bahwa peningkatan kadar metallothionein plasma tidak menstimulasi reaksi autoimun dalam kasus ini. Peneliti percaya pada penjelasan mengenai fenomena ini bisa terjadi. Tingkat paparan kadmium dalam penelitian ini tidak setinggi itu dilaporkan dalam studi (Jin *et al.*, 2003) pada autoantibodi anti-laminin; dengan demikian, mungkin tidak cukup tinggi untuk membangkitkan respons imun ke metallothionein. Anti-Autoantibodi laminin hanya ada pada objek itu yang kadar kadmiumnya melebihi 20 lg/g Cr (Desaimehta *et al.*, 1995).

### 5.3.4 Pengaruh terhadap Oksidatif Stres

#### a. Efek Dosis Akut

Efek paparan akut terhadap Cd<sup>2+</sup> pada penanda stres oksidatif yang dipilih dan aktivitas enzim detoksifikasi disajikan pada Tabel 5.15. Aktivitas CAT dan SOD yang secara signifikan lebih tinggi ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ) ditemukan pada ikan yang terpapar dengan konsentrasi CdNO<sub>3</sub> : 1, 0.1 dan 0.01 mg/L dibandingkan dengan kelompok kontrol; Namun, tidak ada perbedaan yang signifikan dalam aktivitas CAT dan SOD antara kelompok 0.001 dan 0.0001 mg / L dan kelompok kontrol diamati.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH dan GPx menunjukkan aktivitas yang secara signifikan lebih tinggi ( $p < 0,01$ ) pada kelompok 1, 0.1, 0.01 dan 0.001 mg/L dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kelompok eksperimen lainnya, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, GSH, dan Aktivitas GPx tidak jauh berbeda dari pada kelompok kontrol, tetapi tidak ada

perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok kontrol dan setiap kelompok eksperimental yang ditemukan sehubungan dengan aktivitas protease.

**Tabel 5.15.** Perbandingan aktivitas Catalase SOD, hydrogen peroxidase, glutathione S-hydrogen, glutathione peroxidase, protease activity dan MDA setelah terpapar CdNO<sub>3</sub> dengan semua kelompok perlakuan dan terhadap kontrol.

Indicators	Concentration of CdNO <sub>3</sub>					
	Control	A;1 mg/L	B;0,1 mg/L	C;0,01 mg/L	D;0,001 mg/L	E;0,0001 mg/L
CAT	0.55±0.27	3.41±0.47**	2.45±0.22**	2.28±0.42**	1.63±0.50	0.73±0.34
SOD	0.36±0.16	3.04±0.18**	2.53±0.26**	2.42±0.37**	1.58±0.24*	1.51±0.04*
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8.82±1.92	92.57±9.54**	69.19±8.94**	29.62±3.89**	24.13±3.03**	15.84±3.08*
GSH	25.73±3.03	110.53±22.29**	97.95±11.67*	89.88±10.02**	64.85±10.85**	54.56±4.32**
GP <sub>x</sub>	1165.33±42.78	3531.19±488.01**	3153.92±292.75**	2709.59±147.71**	2387.66±171.12**	1909.79±101.65
Protease	0.79±0.06	1.20±0.09**	1.06±0.33*	0.98±0.24	0.92±0.14	0.95±0.22
MDA	2.70±1.14	31.53±7.11**	27.21±5.17**	21.53±2.04**	12.49±2.93**	8.91±1.42*

NB: mean ± standard error of the mean (\* $p < 0,05$ ), (\*\* $p < 0,01$ )

Tingkat MDA secara signifikan lebih rendah ( $p < 0,01$ ) pada ikan yang terpapar CdNO<sub>3</sub> pada konsentrasi 0.0001 mg/L dan secara signifikan lebih tinggi ( $p < 0,01$ ) pada konsentrasi 1, 0.1, 0.01 dan 0.001 mg/L dibandingkan dengan kontrol, sedangkan pada kelompok eksperimen lainnya tidak ada perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $p > 0,05$ ) yang diamati.

#### b. Efek Dosis Subkronis

Beberapa hasil pengujian oksidatif stres dan ROS terhadap ikan yang terpapar Cd dimaksudkan untuk menganalisa sejauh mana ikan Gambusia mampu bertahan jika diamati dari marker oksidatif stresnya. Berikut merupakan hasil dari pengujian beberapa oksidatif stress yang sudah dilakukan. Hasil uji ANOVA menunjukkan (Tabel 5.16), ada perbedaan yang signifikan antara kasus dan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ ). Kenaikan rata-rata semua kadar enzim antioksidan menunjukkan bahwa adanya peningkatan stres oksidatif telah terjadi pada ikan Gambusia yang terkena paparan Cd. Stres oksidatif merupakan

sebuah kondisi berbahaya bila terjadi ketidakseimbangan antara ROS (Gambar 5.16), termasuk superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil, dan/atau dengan antioksidan yang tidak kuat pertahanan, termasuk SOD, katalase, dan peroksidase.

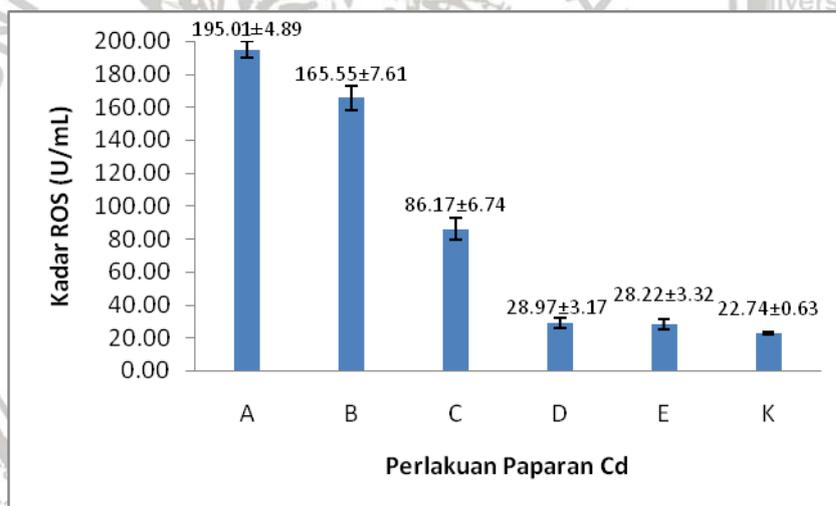
Proses difusi konsentrasi lingkungan yang lebih besar di dalam sel ikan mengakibatkan adanya serapan dari bahan lingkungan. Sebuah mekanisme menarik yang menjelaskan peran tidak langsung Cd sebagai radikal bebas mampu menyebabkan stress dan gangguan homeostasis sel atau stimulasi terhadap daya tahan tubuh. Gangguan tersebut dimediasi oleh *reactive oxygen species* (ROS) (Gambar 5.16) yang diproduksi oleh sel sebagai respon terhadap stressor. Semakin besar konsentrasi stressor maka semakin besar pula konsentrasi ROS yang ditimbulkan (Analisa ANOVA, 2018).

**Tabel 5.16.** Komparasi hasil pengujian oksidatif stress pada ikan *Gambusia* yang dipapar Cd dalam aktivitas MDA, Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Superoksida (SOD), Catalase (CAT), Glutathione S-hydrogen (GSH) dan Glutathione peroxidase (GPx) dibandingkan dengan perlakuan dan control.

Parameter	Konsentrasi CdNO <sub>3</sub>					
	0,03 mg/L	0,015 mg/L	0,011 mg/L	0,007 mg/L	0,003 mg/L	Kontrol
MDA $\mu$ L	744,500 $\pm$ 9,13*	738,05 $\pm$ 10,49*	721,94 $\pm$ 16,01	720,50 $\pm$ 18,85	710,39 $\pm$ 8,11	705,99 $\pm$ 3,96
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2,537 $\pm$ 0,31*	2,51 $\pm$ 0,12*	1,52 $\pm$ 0,43	1,39 $\pm$ 0,25	1,50 $\pm$ 0,36	1,42 $\pm$ 0,27
SOD	15,365 $\pm$ 1,64*	12,346 $\pm$ 1,11*	12,495 $\pm$ 4,25*	11,631 $\pm$ 1,35	4,904 $\pm$ 3,13	3,533 $\pm$ 1,57
CAT	18,614 $\pm$ 1,14*	16,479 $\pm$ 0,74*	13,363 $\pm$ 1,04	11,20 $\pm$ 0,59	10,33 $\pm$ 0,36	10,02 $\pm$ 0,16
GSH	75,543 $\pm$ 2,56*	66,66 $\pm$ 4,93*	67,213 $\pm$ 9,51*	55,548 $\pm$ 4,02	52,03 $\pm$ 3,01	28,15 $\pm$ 4,46
GPx	7555,42 $\pm$ 86,5,29*	4938,11 $\pm$ 608,89*	1393,07 $\pm$ 19,9,19*	1180,65 $\pm$ 16,1,12	485,46 $\pm$ 75,11	472,74 $\pm$ 40,59

Selain memicu produksi ROS, paparan stressor Cd juga memicu produksi enzim antioksidan seperti catalase (CAT), hydrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoksida dismutase (SOD) (Tabel 5.16). Data tersebut menunjukkan hal yang sama dengan analisa data ROS, bahwa semakin tinggi konsentrasi stressor Cd maka terjadi pula peningkatan produksi enzim antioksidan. Hal ini berarti bahwa tubuh ikan *Gambusia* (khususnya insang) melakukan perlawanan dengan

peningkatan respon imun (antibodi) dengan adanya bahan asing yang masuk. SOD dianggap sebagai enzim kunci dalam pengaturan konsentrasi intraseluler ROS. SOD bertindak sebagai baris pertama pertahanan terhadap ROS, memecah superoksida menjadi  $H_2O_2$ . SOD bertindak sebagai garis pertahanan pertama melawan ROS, dismutating superoksida sampai  $H_2O_2$ . Dengan demikian, aktivitas SOD meningkat menunjukkan bahwa ia memainkan peran positif dalam mengendalikan tingkat seluler ROS ini dan atau memperbaiki kerusakan oksidatif radikal bebas oleh stres Cd. Permibilitas *transition pore mitokondria* (PTPM) di membran luar mitokondria memungkinkan SOD bocor ke sitoplasma yang kemudian dirubah menjadi  $H_2O_2$  di sitoplasma oleh SOD.  $H_2O_2$  adalah enzim lain yang terproduksi kurang reaktif yang tidak bermuatan dan dapat menyebar melalui membran aquaporin seperti aquaporin 8 (delapan).



**Gambar 5.16.** Hasil Pengujian ROS pada ikan Gambusia (Rerata±SD). Perlakuan A : 0,03 mg/L 195,01±4,89 U/mL; B : 0,015 mg/L 165,55±7,62 U/mL; C : 0,0115 mg/L 86,17±6,74 U/mL; D : 0,0075 mg/L 28,97±3,17 U/mL; E : 0,0035 mg/L 28,22±3,33 U/mL; dibandingkan dengan control 22,74±0,63 U/mL;

Gambar 5.16 di atas menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan antara perlakuan dengan kelompok kontrol ( $p < 0,05$ ). Perlakuan A dan B merupakan perlakuan yang menunjukkan reaktif yang paling tinggi. Stres yang

disebabkan oleh Cd mampu meningkatkan aktivitas ROS pada insang ikan Gambusia.

Peningkatan kadar MDA pada serum insang ikan yang terpapar Cd menunjukkan peningkatan peroksidasi lipid. Diketahui itu hasil radikal oksigen akibat logam menghasilkan serangan tidak hanya DNA, tapi juga komponen seluler lainnya yang melibatkan residu asam lemak tak jenuh fosfolipid ganda, yang sangat sensitif terhadap oksidasi.

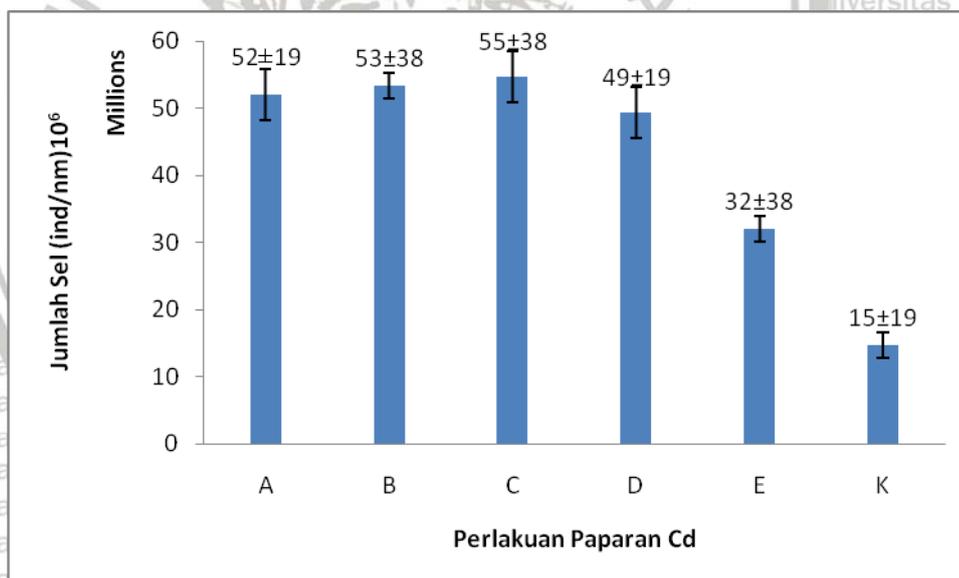
Keseluruhan proses peroksidasi lipid terdiri dari tiga tahap: inisiasi, propagasi dan penghentian inisiasi. Tahap pertama, melibatkan serangan ROS yang mampu melakukan pengacakan sebuah atom hidrogen dari kelompok metilen di lipid. Hal itu adanya ikatan rangkap yang berdekatan dengan kelompok metilen melemahkan ikatan antara karbon dan hidrogen sehingga hidrogen bisa lebih mudah dikeluarkan dari molekul asam lemak. Asam lemak tanpa ikatan rangkap atau dengan satu ikatan bisa mengalami oksidasi tapi bukan rantai lipid peroksidasi mengarah pada pembentukan radikal lipo-peroksil ( $\text{ROO}\cdot$ ). Setelah terbentuk, radikal lipo-peroksil ( $\text{ROO}\cdot$ ) dapat diatur ulang melalui reaksi siklisasi terhadap endoperoksida (prekursor dari malondialdehyde) dengan produk akhir peroksidasi proses menjadi MDA. MDA bersifat mutagenik pada bakteri dan sel mamalia dan karsinogenik pada tikus. Kenaikan lipid peroksidasi dengan peningkatan kadar MDA telah diamati pada sebuah kelompok eksperimental tikus albist kadmium. Telah dilaporkan dalam penelitian lain bahwa Cd melalui rute yang berbeda menyebabkan peningkatan peroksidasi lemak di membran eritrosit dan jaringan seperti hati, ginjal, otak dan testis dimana MDA digunakan sebagai indikator kerusakan oksidatif. MDA adalah salah satu manifestasi utama oksidatif kerusakan dan telah ditemukan memainkan peran penting dalam toksisitas Cd. MDA adalah peroksidasi lipid yang terkenal indikator dan telah ditemukan meningkat di hati dan ginjal setelah paparan Cd.

Hasil pertahanan tubuh untuk paparan Cd terlihat pada Gambar 5.17 menampilkan adanya perbedaan signifikan antara jumlah sel makrofage.

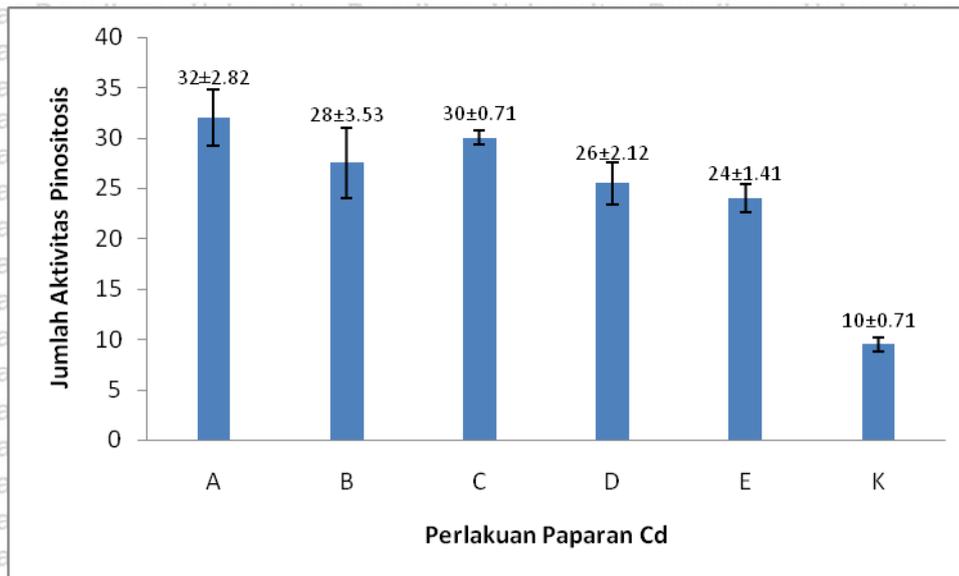
Gambar tersebut menampilkan adanya indicator kegiatan tingkat seluler dari insang ikan gambusia dalam pertahanannya pada paparan Cd. Dalam hal ini adanya peristiwa endositosis.

Aktivitas pinositosis ditampilkan pada Gambar 5.18 menunjukkan besarnya aktivitas sangat tergantung juga pada besarnya paparan konsentrasi.

Semakin tinggi konsentrasi paparan semakin besar pula jumlah aktivitas pinositosisnya. Jika dibandingkan hasil jumlah makrofage dan aktivitas pinositosisnya, maka akan didapatkan hasil bahwa terdapat korelasi tentang peningkatan jumlah makrofage akan meningkatkan pula jumlah aktivitas pinositosisnya.



**Gambar 5.17.** Jumlah sel makrofage yang dihasilkan oleh paparan Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L dibanding K (Kontrol) terhadap insang ikan Gambusia



**Gambar 5.18.** Jumlah aktivitas pinositosis pada paparan Cd; A: 0,03 mg/L; B:0,015 mg/L; C:0,0115 mg/L; D:0,0075 mg/L; E : 0,0035 mg/L disbanding K (Kontrol) terhadap insang ikan Gambusia

Dalam penelitian ini, jumlah makrofag menunjukkan korelasi yang sama dengan jumlah aktivitas pinositosis. Jumlah makrofag pada ikan dengan perlakuan yang meningkat dibandingkan dengan jumlah ikan kontrol (Gambar. 5.17). Sebaliknya, aktivitas pinositosis makrofag berbeda signifikan antara perlakuan dengan tanpa ikan kontrol (Gambarr 5.18). Khususnya, makrofag dari semua ikan yang diberi perlakuan menunjukkan kapasitas yang sama untuk fagositosis, tetapi dalam beberapa kasus, aktivitas fagositik menurun pada ikan dengan paparan kadmium yang lebih rendah. Pada penelitian yang sudah dilakukan bahwa ada persamaan dengan penelitian lain yang menunjukkan bahwa aktivitas fagositik lebih tinggi pada ikan dari air yang relatif tidak tercemar (Seeley, Gillespie and Weeks, 1990), dan lebih rendah infis yang ditangkap dari air yang tercemar (Moulis, 2010). Fagositosis memainkan peran kunci baik dalam respon imun non-spesifik dan spesifik dan mewakili garis pertahanan kekebalan terhadap agen penyerbu (Risjani, Couteau and Minier, 2014; Yamamoto *et al.*, 2014; Hodgkinson, Grayfer and Belosevic, 2015). Berdasarkan penelitian, jumlah makrofag bisa dijadikan sebagai biomarker pencemaran lingkungan dan dapat

digunakan untuk membandingkan aktivitas makrofag pada ikan dari daerah yang tercemar dan tidak tercemar.

Aktivitas fagositik yang lebih rendah pada ikan perlakuan berkorelasi dengan tingkat kritis oksigen terlarut air dan tingkat tinggi polutan lainnya.

Pembahasan sebelumnya, menunjukkan bahwa kualitas air dengan paparan kadmium memiliki tingkat kritis oksigen terlarut. Kandungan oksigen terlarut adalah salah satu parameter terpenting kualitas air, karena oksigen sangat penting untuk semua organisme yang hidup di air. Kadar oksigen di lingkungan dapat memodulasi respons imun; hipoksia menekan aktivitas makrofag dan mengurangi tingkat anti-tubuh yang bersirkulasi, yang pada gilirannya, meningkat oleh hiperoksia (Watts, Munday and Burke, 2001; Uribe *et al.*, 2011).

Pembuangan polutan antropogenik ke lingkungan perairan mempengaruhi organisme air, seperti yang ditunjukkan oleh perubahan sel-sel imun pada penelitian ini (Risjani, Couteau and Minier, 2014). Polusi ini berdampak pada beberapa respon fisiologis dari organisme akuatik, termasuk perubahan fisiologis dalam sirkulasi fagosit jaringan dan aktivitas fagositik, mirip dengan pengamatan dalam penelitian kami.

### 5.3.5 Mekanisme Detoksifikasi Paparan Cd

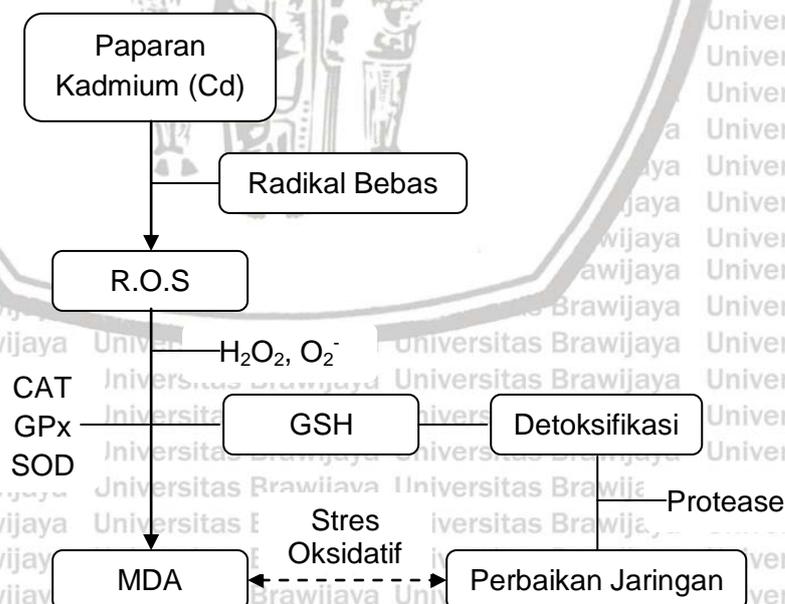
Radikal bebas merupakan suatu molekul atau atom yang tidak memiliki pasangan elektron pada orbital luar sehingga tidak stabil dan sangat reaktif terhadap sel-sel di dalam tubuh untuk mendapatkan pasangan elektron. Kelainan pada protein, lipid, dan karbohidrat dapat terjadi karena kerusakan penyusun sel yang disebabkan oleh aktivitas radikal bebas didalam tubuh (Chen dkk, 1996).

Reactive oxygen species (ROS) merupakan radikal bebas yang diperoleh dari proses biokimia di dalam tubuh (Alfarabi dkk, 2010), dalam kasus ini adalah paparan logam berat Cd (Gambar 5.20). Salah satu sumber radikal bebas adalah pencemaran bahan kimia berupa toksin yang akan meningkatkan kadar radikal

bebas secara mendadak, sebagian obat seperti anastesi dan pestisida serta pelarut yang digunakan untuk industri merupakan sumber eksogen radikal bebas.

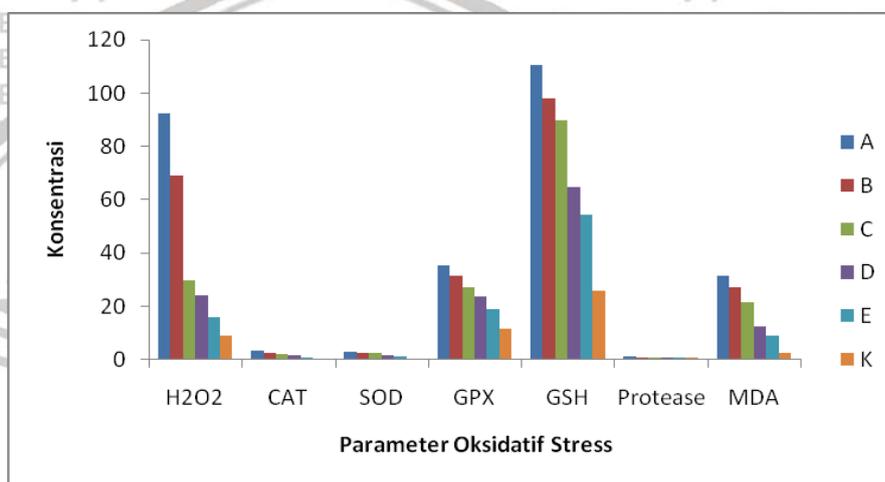
Radikal bebas merupakan produk samping dari metabolisme dan dihasilkan secara terus-menerus pada makhluk hidup. Reactive oxygen species (ROS) dalam jumlah yang berlebih dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif sehingga terjadi kerusakan oksidatif pada protein, DNA dan lemak (Muhilal., 1991). Reaksi peroksidasi lipid yang menghasilkan radikal bebas terjadi melalui tiga tahap yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi (Murray et al, 2001).

Tahap Inisiasi adalah tahap pembentukan awal radikal bebas dan menyebabkan banyaknya radikal bebas yang terbentuk. Tahap propagasi adalah reaksi pembentukan radikal bebas dengan melibatkan radikal bebas dalam jumlah yang sama dan bersifat sangat reaktif. Tahap terminasi adalah tahap perubahan senyawa radikal menjadi non radikal pada saat dua molekul radikal bereaksi (Muhilal, 1991).

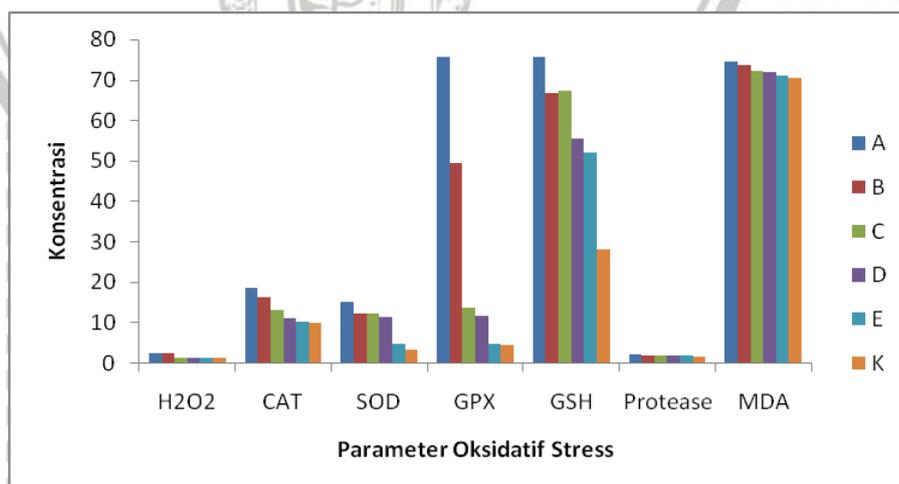


**Gambar 5.19.** Mekanisme Detoksifikasi Paparan Cd

Kadar malondialdehid (MDA) yang tinggi dalam plasma pada gambar diatas dapat digunakan sebagai indikator adanya radikal bebas dan kerusakan oksidatif pada membran sel, karena senyawa radikal bebas menyerang membran lipid yang mengandung asam lemak tak jenuh ganda akan membentuk MDA yang merupakan salah satu produk akhir peroksidasi lipid. Radikal bebas dan kerusakan oksidatif dapat dihambat dan dicegah dengan senyawa antioksidan, dengan cara menambahkan gugus atom hidrogen pada elektron yang tidak memiliki pasangan sehingga dapat stabil (Wijaya, 1996).



Gambar 5.20. Paparan Akut pada Parameter Oksidatif Stress



Gambar 5.21. Paparan Subkronis pada Parameter Oksidatif Stress

Paparan Cd<sup>2+</sup> yang diberikan kepada ikan *Gambusia* baik dosis akut maupun subkronis (Gambar 5.20 dan 5.21) menggambarkan adanya hasil yang berbeda. Perlakuan dosis akut menggambarkan paparan dengan dosis tinggi dan sesaat menyebabkan peningkatan enzim antioksidan semakin tinggi juga terutama pada enzim GSH yang memberikan daya detoksifikasi. Sedangkan perlakuan dosis subkronis dengan paparan lebih lama dan dosis rendah menyebabkan peningkatan enzim antioksidan yang semakin perlahan.

Antioksidan esensial yang diproduksi dalam tubuh ikan *Gambusia* berperan penting karena dapat menetralkan radikal bebas dalam tubuh dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga terbentuk molekul yang stabil dan mengakhiri reaksi radikal bebas. Antioksidan tidak hanya penting untuk menghalangi terjadinya tekanan oksidatif dan kerusakan jaringan, tetapi juga penting dalam mencegah peningkatan produksi proinflamatori sitokin, yang merupakan hasil pengaktifan dari respon pertahanan tubuh yang terjadi terus menerus.

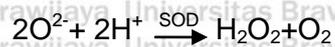
Melalui enzim yang bersifat antioksidan yaitu enzim yang berfungsi dengan mengkatalis proses oksidasi molekul yang dilakukan oleh katalase dan glutathione peroxidase. Selain itu enzim juga berfungsi memperbaiki jaringan atau sel yang telah dirusak radikal bebas dilakukan oleh enzim protease.

Kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas diduga menjadi penyebab paparan logam berat. Antioksidan merupakan jalur pertahanan tubuh pertama yang akan mencegah jaringan periodonsium dari serangan radikal bebas sehingga mempertahankan kondisi jaringan periodonsium yang sehat.

Smalley (1998), untuk menghindari kerusakan oksidatif dari produksi superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) tersebut, maka antioksidan seperti superoxide dismutase (SOD) distimulasi untuk mengkonversikan superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dengan hydrogen

peroxide( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sehingga SOD berperan sebagai katalis untuk menukarkan superoxide dengan oksigen dan hydrogen peroxide.

Hydrogen peroxide akhirnya akan dihilangkan oleh enzim yang kedua terlibat disebut catalase yang lebih banyak terdapat di dalam sel intraselular dibanding sel ekstraselular. Catalase ini bertindak sebagai penghancur hydrogen peroxide dan superoxide. Secara ringkasnya dapat disimpulkan seperti di bawah :



Mekanisme untuk mencegah hydroxyl radical ( $\text{OH}^-$ ) yang akan merusak sel adalah dengan pengikatan radikal bebas dengan antioksidan dan juga dilakukan oleh reduce glutathione (GSH). Jadi tubuh masih dapat bergantung kepada pertahanan antioksidan dari serangan ROS yang masih berada di bawah kondisi normal. Walaupun mekanisme kerja setiap antioksidan berbeda, namun peranannya adalah sama yaitu untuk melindungi sel dan jaringan supaya tetap sehat.

Untuk mencegah terjadinya ketoksikan, maka metabolit Cd kemudian didetoksifikasi secara cepat oleh cadangan glutathion sel yang aktif (GSH), Cd akan berikatan dengan gugus sulfenil yang terkandung dalam GSH.

Terbentuknya asam merkapturat dan konjugat sistein akibat dari reaksi yang terjadi antara GSH dengan Cd yang kemudian diekskresikan melalui urin.

Peroksidasi lipid akan terjadi jika pembentukan metabolit Cd berbanding terbalik dengan laju detoksifikasi GSH (Murugesk dkk, 2005).

## BAB VI

### PEMBAHASAN UMUM

#### 6.1 Gambaran Umum Mekanisme Toksisitas Kadmium pada Insang Ikan Gambusia

Air merupakan penyokong kehidupan yang paling penting dalam sistem dan kualitasnya untuk kesehatan, selain kebutuhan udara. Sumberdaya alam yang satu ini juga digunakan dalam berbagai kepentingan untuk makhluk hidup seperti manusia terutama untuk kebutuhan akuakultur, industri, irigasi dan kebutuhan lainnya (Kumar and Singh, 2010). Sumber air yang sangat melimpah banyak ditemukan di negara kita. Proses industrialisasi yang begitu cepat dan pesat menimbulkan efek negatif antaranya pertumbuhan penduduk yang tinggi dan pengelolaan limbah yang tidak bijaksana menyebabkan masalah pencemaran air.

Beberapa kasus pencemaran air oleh limbah industri diduga merupakan sumber utama dari masalah tersebut, selain limbah pertanian dan rumah tangga. Residu yang disebabkan oleh limbah pabrik mengandung berbagai macam polutan beracun termasuk senyawa kimia organik, logam (anorganik), pestisida dan berbagai senyawa logam beracun. Logam beracun seperti merkuri, timbal dan kadmium memiliki peran penting dalam fungsi metabolik dan bisa menjadi racun bagi manusia walaupun dalam konsentrasi sangat rendah (Macirella and Brunelli, 2017). Hal inilah yang menjadi sumber utama kontaminasi pada

pencemaran air melalui pelepasan atau pembuangan limbah industri, pertanian dan rumah tangga serta sisa pembakaran bahan bakar. Salah satu biota hewan air yang mengalami dampak langsung dari proses pencemaran tersebut adalah ikan. Terutama ikan yang hidup disepanjang aliran air sungai disekitar tempat pembuangan limbah tersebut. Adanya polutan dalam

air tersebut akan berdampak pada ekosistem perairan dan menimbulkan efek buruk bagi kesehatan ikan.

Berbagai kontaminan termasuk logam berat beracun, salah satunya cadmium dilaporkan terjadi disetiap sungai, waduk yang sangat tidak menguntungkan bagi organisme air (Abumourad, Authman and Abbas, 2013).

Secara umum kontaminan tersebut tidak terurai namun terjadi akumulasi pada organ ikan tersebut. Salah satu jenis ikan sungai yang banyak hidup di daerah tercemar adalah ikan gambusia (*Gambusia affinis*). Ikan ini hidup pada aliran air yang sedikit tenang, berarus dan bergerombol. Beberapa penelitian terdahulu tentang ikan ini, banyak yang membahas tentang pencemaran air terutama air sungai yang tercemar logam berat, salah satunya cadmium.

Cadmium sendiri merupakan satu dari tiga logam berat beracun selain merkuri dan timbal. Efek dari toksisitas cadmium ini sudah banyak dibahas oleh peneliti sebelumnya terutama efek pada insang, hati dan ginjal ikan. Namun dalam bahasan kali ini akan dipaparkan hasil analisa dari percobaan riset yang telah dilakukan mengenai mekanisme toksisitas dari paparan cadmium pada insang ikan Gambusia.

Kadmium memasuki ekosistem perairan melalui aktivitas antropogenik dan biotransformasi pertama berlangsung di insang secara homeostatis dan mengganggu metabolisme kalsium normal menghasilkan hypocalcaemia dan hiperglikemia. Sangat jelas bahwa bisa disimpulkan bahwa ikan merupakan perhatian utama untuk menganalisa dampak paparan kadmium pada insang di aktin sitoskeleton dan macropinositosis. Pelajaran ini menunjukkan bahwa kadar Cd dalam ikan berpotensi tinggi mengalami akumulasi dan berbahaya bagi kesehatan manusia yang mengkonsumsinya.

Sifatnya yang tidak korosif dan kumulatif telah berhasil sangat penting karena aplikasinya dalam lempeng listrik atau menggembleng ini juga digunakan

sebagai pigmen warna untuk cat, plastik, dan sebagai bahan katoda untuk nikel-kadmium baterai. Aktivitas antropogenik seperti; operasi peleburan, penggunaan pupuk fosfat, pigmen, rokok rokok, mobil dll telah berkontribusi pada masuknya kadmium ke dalam rantai makanan manusia dan hewan (Hamilton, 2004; Duruibe and Ogwuegbu, 2007; Cuypers *et al.*, 2010; Colantonio and Kim, 2016). Kehadiran kadmium lebih tinggi konsentrasi dari batas maksimum yang diijinkan dalam air, vegetasi dan makanan telah dilaporkan oleh penulis (Noël-Lambot *et al.*, 1980; Baldisserotto, Chowdhury and Wood, 2005; Cannino *et al.*, 2009; Levit, 2010; Moulis, 2010).

Tingkat Cd yang lebih tinggi juga telah terdeteksi di limbah lumpur (kaya akan hampir semua nutrisi dan karenanya umumnya digunakan sebagai pupuk tanaman), berbagai sayuran (Roblenbeck *et al.*, 1999), pakan ternak dan jaringannya (Kumar *et al.*, 2007). Topsoil yang memperkaya lumpur berkontribusi terhadap akumulasi Cd di darah, susu, rambut, hati dan ginjal domba, kambing, sapi, kerbau (Brebner *et al.*, 1993; Swarup *et al.*, 2005; Balagangatharathilagar *et al.*, 2006 dan Patra *et al.*, 2007). Di India, berbagai tingkat konsentrasi kadmium telah dilaporkan hadir di ekosistem perairan yang lebih dari 5ng/ml di sungai Yamuna di Agra, Delhi, Etawah dan Mathura (Ajmal *et al.*, 1985) dan 0,50-1 14,8 mg/kg di Sedimen sungai Yamuna di Agra dan Delhi tapi airnya di sekitar kawasan industri telah ditemukan mengandung lebih tinggi tingkat kadmium (Singh, 2001 dan Kaushik *et al.*, 2003). Demikian pula, Sungai Hindon (Uttar Pradesh) juga pernah ada terkontaminasi logam berat termasuk kadmium (Jain dan Sharma, 2001 dan Sharma, 2003). Apalagi tinggi konsentrasi kadmium (70-100 ng/ml) telah terdeteksi di kota Bombay (Agrawal dan Raj, 1978), kolam Lalbag kota Baroda (Kannan, 1997) dan jaringan ikan yang dapat dimakan dan ayam di pasar UP barat (Kumar *et al.*, 2006 dan 2007; Burger, 2008).

## 6.2 Jalur Penyerapan Ikan dan Homeostasis

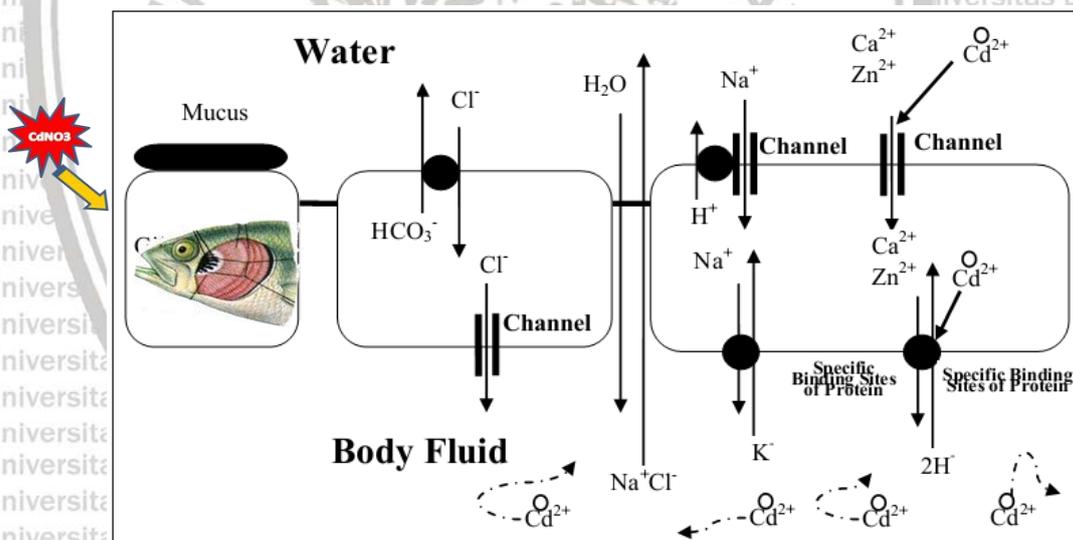
Pada ikan, kemungkinan daerah penyerapan logam adalah insang (saluran pernafasan), usus (menelan asupan) dan kulit (*transcutaneous uptake*).

Dalam perairan, spesiasi kadmium dapat lebih rumit oleh aspek lain yakni kimia air seperti perubahan pembebanan karbon organik dan perubahan signifikan dalam rasio ion mayor terhadap minor dalam badan air. Khususnya, peran kalsium dalam memodifikasi ketersediaan kadmium dapat menjadi semakin penting dalam air yang lebih bersih. Efek utama kalsium pada toksisitas kadmium melalui persaingan situs pengikatan organismal. Kalsium bersifat antagonis terhadap penyerapan cadmium dan dilepaskan oleh insang secara tidak langsung dapat mempengaruhi akumulasi oleh jaringan lain. Ikan, seperti mamalia, harus mempertahankan cairan tubuh mereka yang ionik dan homeostasis osmotik melalui mekanisme ion osmoregulasi, yang dilakukan terutama oleh ionosit insang (kulit pada embrionik tahapan). Percobaan menggunakan ikan gambusia menjawab banyak masalah yang diperdebatkan atau tidak diketahui dalam bidang osmoregulasi ikan. Homologi jalur transportasi ion dan sistem hormon ikan gambusia juga menginformasikan terkait bidang osmoregulasi. Dalam air laut dan juga di lingkungan air tawar, ada kemungkinan bahwa efek utama kalsium pada toksisitas kadmium melalui persaingan untuk situs pengikatan organismal, daripada byaltering spesiasinya.

Kalsium bersifat antagonis terhadap penyerapan cadmium dan dilepaskan oleh insang dan secara tidak langsung dapat mempengaruhi akumulasi oleh jaringan lain (Wang, *et al.*, 2009). Hubungan terbalik antara kalsium dan kadmium paling mudah dijelaskan sebagai kompetisi untuk mengikat situs pada remis (Gambar 6.1). Ikan, seperti mamalia, harus mempertahankan cairan tubuh mereka yang ionik dan homeostasis osmotik melalui canggih mekanisme iono-osmoregulasi, yang dilakukan terutama oleh ionosit insang

(kulit pada embrionik tahapan), bukan sel tubular ginjal pada mamalia (Guh, Lin and Hwang, 2015).

Selanjutnya logam seperti seng, besi dan selenium berpotensi mempengaruhi serapan dan toksisitas kadmium dengan bersaing dengan kadmium untuk mengikat situs membran onepithelial dan sel spesies akuatik atau untuk ligan lain yang mungkin mempengaruhi ketersediaan kadmium secara tidak langsung, dan ion hidrogen berperan melalui proses fisiologis dan spesiasi kadmium (Wright and Welbourn, 1994). Dalam lingkungan sedimen, bioakumulasi kadmium sangat bergantung pada kadmium terlarut yang ada di air pori dan mungkin juga tergantung pada bentuk kimia dari fase padat kadmium, karena banyaknya ligan yang tersedia, baik organik maupun anorganik, memiliki pengaruh besar pada kadmium. ketersediaan (Nebeker *et al.*, 1986).

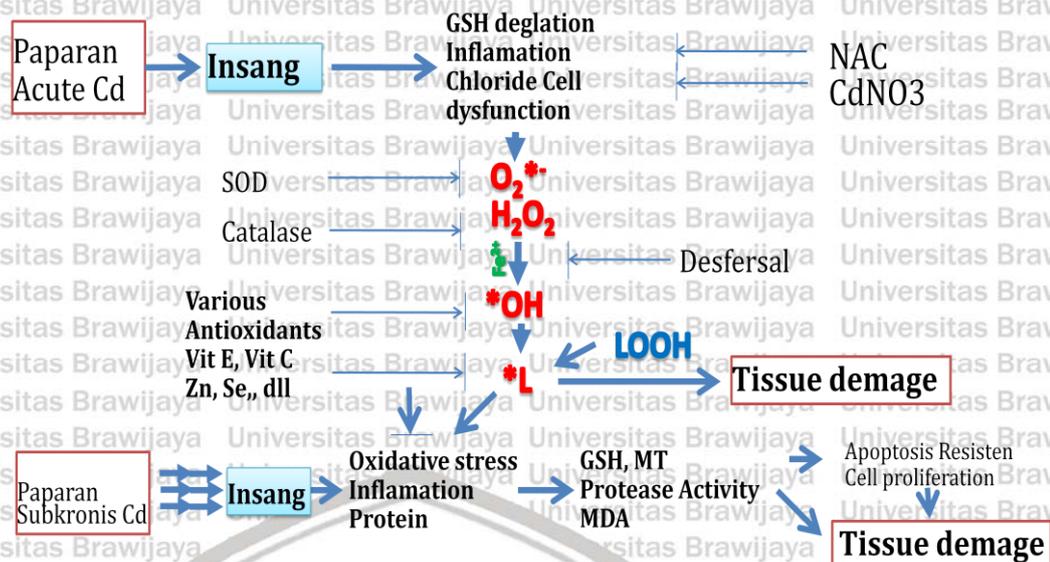


**Gambar 6.1.** Diagram skematik jalur transportasi ion esensial (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> dan Cl<sup>-</sup>) dan interaksi mereka dengan kation kadmium beracun (Cd<sup>2+</sup>) dalam epitel organisme akuatik. Setelah penyerapan (transportasi melintasi membran plasma), Cd<sup>2+</sup> reaktif bebas akan bersirkulasi melalui cairan tubuh dan mengikat beberapa protein, kemudian memindahkannya ke dalam kompartemen yang berbeda, di mana mereka didetoksifikasi atau tidak.

Meskipun dominasi oksida besi dalam penyerapan kadmium dalam sedimen aerobik, asam humat juga telah terbukti memiliki kapasitas pengikatan kadmium yang signifikan dalam sedimen air tawar dan dapat mengurangi

ketersediaan kadmium pada organisme bentik. Selanjutnya, kadmium dipegang sebagian dalam kombinasi dengan karbonat dan sulfida, dan sebagian dalam kombinasi organik kompleks. Selain itu, kadmium bergabung dengan fraksi bahan organik yang kaya sulfur yang sangat berlebihan, karena kontribusi organik dan anorganik secara luas bervariasi. Jadi efek gabungan dari pH, agen pengompleks organik, dan potensi redoks dari sedimen perlu dipertimbangkan dalam menilai ketersediaan kadmium. Konsentrasi asam sulfat sebagai prediktor toksisitas kadmium sedimen berdasarkan fakta bahwa setiap  $Cd^{2+}$  bebas di perairan maka akan bertukar dengan sulfida volatile asam (sebagian besar FeS) menginformasikan CdS tidak larut (Di Toro *et al.*, 2001).

Logam Ion biasanya diserap melalui difusi pasif atau dimediasi transportasi di atas insang sementara logam terkait dengan bahan organik yang tertelan dan diserap oleh endositosis melalui usus. Sesuai dengan alurnya bahwa ion kadmium memasuki sel klorida di insang melalui saluran kalsium (Olsson, PE, 1998). Setelah masuk dalam sel logam dibentuk untuk saling berinteraksi dengan komponen sitoplasma seperti enzim (menyebabkan toksik efek) dan Metallothionein (MTs) (mungkin sedang didetoksifikasi). Setelah diambil melalui proses penyerapan, Cd mencapai organ insang (Gambar 6.2 Hasil Analisa Penelitian, 2018), ginjal dan hati dimana akan diikat oleh MTs, glutathione (GSH) dan protein lainnya (Thévenod, 2009).



**Gambar 6.2.** Mekanisme seluler pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang diinduksi oleh Cd<sup>2+</sup>. Skala waktu dan peningkatan konsentrasi Cd<sup>2+</sup> intraseluler dari peningkatan kadar enzim antioksidan glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), superoksida dismutase (SOD) dengan hasil akhir adanya kerusakan jaringan pada organ insang ikan gambusia. (Hasil Analisa, 2018)

Meskipun Metallothionein diinduksi di insang tidak terlihat mampu mengikat sebagian besar akumulasi Cd<sup>2+</sup>. Di satu sisi, karena kelompok thiolnya, MTs mampu mengikat dan mendetoksifikasi Cd, di sisi lain MTs bisa menekan Reaksi Oksidatif Spesies (ROS) yang dihasilkan dari hasil stress oksidatif.

Alasan ini diyakini karena tingginya afinitas Cd<sup>2+</sup> untuk situs pengikatan Ca<sup>2+</sup> di insang (Flick et al., 1987) dan juga dipercaya bahwa Cd<sup>2+</sup> berikatan dengan yang aktif situs pada basolateral Ca<sup>2+</sup> pompa dalam sel klorida. Dengan demikian terlihat bahwa Cd<sup>2+</sup> memasuki insang melalui saluran Ca pada sisi apikal dan selanjutnya ditranslokasi ke sirkulasi interaksi dengan Ca<sup>2+</sup>-ATPases pada sisi basolateral. Namun, beberapa penelitian menghasilkan disosiasi Cd dari MTs karena penurunan stabilitas pengikatan. Secara intraseluler, Cd dalam bentuk ikatan atau tidak, berujung pada kerusakan mitokondria dan atau kematian sel (Cuypers et al., 2010).

## BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

### 7.1 Kesimpulan

Secara umum dari hasil penelitian yang sudah dilakukan, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut :

- Hasil analisis data dengan menggunakan metode *pollution index* (PI), jumlah indeks pencemaran rata-rata ( $PI_{rata-rata}$ ) pada sungai Wangi = 5,503 yang berarti kondisi sungai Wangi termasuk pada klasifikasi “**cemar sedang**”. Salah satu biota sebagai biomonitoring di aliran sungai Wangi adalah Ikan Gambusia (*Gambusia affinis*).
- Toksisitas letal ( $LC_{50-96}$  jam)  $Cd^{2+}$  pada ikan gambusia (*Gambusia affinis*), yaitu sebesar  $0,03 \pm 0,009$  mg/L yang dapat dikategorikan kedalam golongan dengan daya racun yang sedang (*medium toxic*); Paparan logam berat cadmium menyebabkan meningkatnya aktivitas protease pada ikan gambusia 0,2-0,3 mmol/ml/menit; Pengamatan pada histopatologi memperlihatkan adanya perubahan lamella primer dan lamella sekunder. Paparan akut *Gambusia affinis*  $Cd^{2+}$  dapat menyebabkan perubahan histopathology organisme.
- Efek dari paparan logam berat cadmium dari hasil pemeriksaan dan pemindaian secara *scanning elektron mikroskopi*, menampakkan luas permukaan LP terdapat kerenggangan antara luas permukaan dan kepadatan LP; Selain itu ditemukan hasil bahwa kadmium pada sitoskeleton insang gambusia. Paparan menyebabkan stres oksidatif pada insang ikan *Gambusia* melalui peningkatan enzim SOD, CAT, MDA,

GPx, GSH dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Adanya proses detoksifikasi terhadap paparan Cd oleh ikan Gambusia.

## 7.2 Saran

Penelitian yang dilakukan ini belum sepenuhnya merupakan hasil yang optimal. Masih banyak hal yang perlu untuk digali lebih mendalam, baik dari interaksi dari limbah yang terdapat di lingkungan ke biota perairan maupun alur dari cemaran limbah logam berat secara spesifik. Terutama pada ekspresi dari MT-Cd yang belum bisa diidentifikasi letaknya dan belum adanya antibody anti-fish. Selain itu perlu dilakukan kajian lebih mendalam terkait kemampuan ikan gambusia dan perubahan yang terjadi ketika ikan tersebut dijadikan sebagai biomonitoring dan bioindikator pencemaran. Untuk itu masih diperlukan penelitian lanjutan terkait parameter utama ikan gambusia dijadikan sebagai biomonitoring dan bioindikator, serta potensi immunomodulator, detoksifikasi dan bioremediasi dari ikan Gambusia.

## DAFTAR PUSTAKA

Abdelmigid, HM., AZ. Hasan dan Sanaa, MF. Gad El-Rab. 2014. Expression of Metallothionein as a Biomarker in Response to Various Stress Factors in Different Organisms. International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 10, 683-695. Journal homepage: <http://www.journalijar.com>. ISSN 2320-5407

Abumourad, M. M. N. Authman, and W. T. Abbas, "Heavy Metal Pollution and Metallothionein Expression : A Survey on Egyptian Tilapia," vol. 9, no. 1, pp. 612–619, 2013.

Adam, M.A., dan Maftuch. 2015. Evaluasi Pengoptimalan Instalasi Pengolahan Air Limbah Terhadap Pencemaran Sungai Wangi Di Pasuruan. Journal of Environmental Engineering & Sustainable Technology. JEEST. Vol. 02 No. 01, July 2015, Pages 01-05. <http://jeest.ub.ac.id>. P-ISSN:2356-3109 E-ISSN 2356-3117 1

Adam, M.A., Maftuch, Yuni K., dan Yenny, R. 2017. Uji Toksisitas Letal Akut Cd<sup>2+</sup> Terhadap Gambusia (*Gambusia affinis*) dan Pengaruh pada Aktivitas Protease. Disampaikan pada Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan (Semnaskanut 2017). No Prosiding BP07. Banjarbaru, 18 November 2017.

Adam, Moh Awaludin, and Maftuch. 2017. "Kondisi Total Leukosit Dan Protein Plasma Ikan Koi (*Cyprinus Carpio Koi*) Pasca Perendaman Ekstrak *Gracilaria Verrucosa* Yang." *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan* 8 (1): 11–18. <http://www.samakia.aperiki.ac.id/index.php/JSAPI/article/view/116>.

Adam, M. A., Maftuch, M., Kilawati, Y. and Tahirah, S. N. 2018. Analysis of Heavy Metal Pollutant in Wangi River Pasuruan and Its Impact on *Gambusia affinis*. *Jurnal Pembangunan Dan Alam Lestari*. 9(2): 120–128. <https://doi.org/10.21776/ub.jp.al.2018.009.02.09>

Adam, M.A., Maftuch, Y Kilawati, A Soegianto and Y Risjani. 2019. The effects of acute exposure to cadmium nitrate (CdNO<sub>3</sub>) on gambusia fish (*Gambusia affinis*). IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 259 012004. doi:10.1088/1755-1315/259/1/012004

Adam, Moh Awaludin., Maftuch, Y Kilawati and Y Risjani. 2019. Clinical Symptoms of *Gambusia* Fish (*Gambusia affinis*) After Exposure to Cadmium Absorbed in The Gills. *Poll Res*. 38 (March Suppl. Issue) : S88-S93 (2019). Copyright © EM International. ISSN 0257–8050.

Adam, Moh Awaludin., Maftuch, Y Kilawati and Y Risjani. 2019. Detection of Metallothionein Protein Biomarkers (MTs) and Pinocytosis Activity in *Gambusia* Fish (*Gambusia affinis*) Exposed to Cadmium. *Journal Nature Environment and Pollution Technology*. ISSN 0972-6268 (Print), ISSN 2395-3454 (Online). V ol. 18, No. 3 (September), Year 2019.

Ali, Nadeem., Gunnar Carlsson and Leif Norrgren. 2010. Teratology in zebrafish embryos: A tool for risk assessment. RESEARCH PAPER. Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), P.O. Box 7028, SE- 750 07 Uppsala, Sweden.

- Ali, Nadem. 2007. Teratology in Zebrafish Embryos: A Tool for Risk Assessment. Master of Science Programme in Veterinary Medicine for International Students Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala 2007. Report no. 65. ISSN 1403-2201
- Anwar, Y. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Fragmen cDNA dari Gen Penyandi Metallothionein dari Kedelai Kultivar Slamet. Skripsi. ITB. Bogor.
- APHA. American Public Health Association. 2012. Standard Method for The Examination of Water and Wastewater. 22th edition. Washington, 3111 b.
- Araju, FG., MG., Peixoto, BCT., Pinto, dan TP. Teixeira. 2009. Distribution of Guppies *Poecilia reticulata* (Peters, 1860) and *Phalloceros caudimaculatus* (Hensel, 1968) along a polluted stretch of the Paraíba do Sul River, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 69(1):41-48.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2008. Cadmium Toxicity. Case Studies in Environmental Medicine (CSEM). [www.atsdr.cdc.gov/csem](http://www.atsdr.cdc.gov/csem)
- Badan Lingkungan Hidup. 2015. Ditemukan ada 7 Pabrik yang Menyebabkan Pencemaran Sungai Wangi. [www.radarbromo.com](http://www.radarbromo.com) akses tanggal 12 November 2015.
- Baldisserotto, M. J. Chowdhury, and C. M. Wood, "Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation , calcium and cadmium uptake from the water , and their interactions in juvenile rainbow trout," vol. 72, pp. 99–117, 2005.
- Banerjee, D., Kumar, P. A., Kumar, B., Madhusoodanan, U. K., Nayak, S., & Jacob, J. (2002). Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Current Science*, 83(10), 1193–1194.
- Bebiano, M.J., J.A. Nott & W. J. Langston. 1993. Cadmium metabolism in the clam *Rudipes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquatic Toxicology* 27: 315-334
- Bebiano, M. J. & W. J. Langston. 1992. Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry & Physiology* 103C(1): 79-85
- Benli. A.C.K. dan A. Ozkul. 2008. Sublethal Ammonia Exposure of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Effect on Gill, Liver, and Kidney. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. Chemosphere, New York.
- Bergmeyer, Hans Ulrich. 1974. *From the Preface to the 1st Edition. METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS: Volume 2*. Second Edi. Verlag Chemie GmbH. doi:10.1016/B978-0-12-091302-2.50004-9.
- Bijanti, R., 2005. Hematologi Ikan Teknik Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Hematologi Ikan. Bagian Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Binz, P. A. and Kagi, J. H. R. (1999). Metallothionein: molecular evolution and classification. In *Metallothionein*, vol. IV (ed. C. Klaassen), pp. 7-13. Basel: Birkhauser.

- Blair, R Clifford, and Richard A Taylor. 2007. "MINITAB 14 Supplement for: Biostatistics for the Health Sciences." *Methods*.
- Bockman, R. S., & Biochimie, L. De. (1967). the Proteolytic Activity of  $\gamma$ -Globulin Preparations, 554–563.
- Bonga and C. J. M. Van Der Meij, "a n d Tissue of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*," *Comp. Biochem. Physiol.*, pp. 235–243, 1989.
- Borgmann, U., Couillard, Y., Doyle, P., and Dixon, D.G., 2005, Toxicity of sixty-three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 24, no. 3, p. 641–652.
- Boster Biological Technology. 2011. *ELISA Handbook: Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*. 3942 Valley Ave., Suite B, Pleasanton, CA 94566.
- Bourson, P. C. Moser, A. J. Gower, and A. K. Mir, "Central and peripheral effects of the dihydropyridine calcium channel activator BAY K 8644 in the rat," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 160, no. 3, pp. 339–347, 1989.
- Bryman, Alan, and Duncan Cramer. 2005. *Quantitative Data Analysis With SPSS 12 and 13*.
- Bull. 1976. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). World Health Organ.
- Cannino, E. Ferruggia, C. Luparello, and A. M. Rinaldi, "Cadmium and mitochondria," *Mitochondrion*, vol. 9, no. 6, pp. 377–384, 2009.
- Cantiello, "Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation," *J. Exp. Zool.*, vol. 279, no. 5, pp. 425–435, 1997.
- Cantiello, "Role of the actin cytoskeleton on epithelial Na<sup>+</sup> channel regulation," *Kidney Int*, vol. 48, pp. 970–984, 1995.
- Carlson, Jeanette M, Embriette R Hyde, Joseph F Petrosino, Ananda B W Manage, and Todd P Primm. 2015. "Comparative Biochemistry and Physiology , Part C The Host Effects of *Gambusia Af Fi Nis* with an Antibiotic-Disrupted Microbiome ☆." *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 178. Elsevier Inc.: 163–68. doi:10.1016/j.cbpc.2015.10.004.
- Carpene, E. 1993. Metallothionein in marine molluscs. Hal. 55-72 dalam Dallinger, R. & P. S. Rainbow (ed.). *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers. Boca Raton
- Carpene E, Giulia A, Gloria I., 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *Jurnal of TraceElements in Medicine and Biology* 21 S1: 35-39
- Checconi, Paola, Rossella Sgarbanti, Ignacio Celestino, Dolores Limongi, Anna Teresa Palamara, and Lucia Nencioni. 2013. "The Environmental Pollutant Cadmium Promotes Influenza Virus Replication in MDCK Cells by Altering Their Redox State," 4148–62. doi:10.3390/ijms14024148.
- Cherian, M. G.; Jayasurya, A. & Bay, B-H. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation research*, 533:201-9, 2003.

- Chow, E.S.H and Shuk, H.C. 2003. Cadmium Affects Muscle Type and Axon Growth in Zebrafish Embryonic Somitogenesis. Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, 83 Tat Chee Avenue, Kowloon, Hong Kong. TOXICOLOGICAL SCIENCES 73,149 –159 (2003). DOI: 10.1093/toxsci/kgf046.
- Clemow, Y. H., & Wilkie, M. P. (2015). Effects of Pb plus Cd mixtures on toxicity , and internal electrolyte and osmotic balance in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 161, 176–188. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.032>
- Cobbett CS, Goldsbrough PB (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Biol*. 53:159-182
- Colantonio, N. dan Y. Kim. 2016. Cadmium (II) removal mechanisms in microbial electrolysis cells. Elsevier. ScienceDirect. *Journal of Hazardous Materials* 311 (2016) 134–141
- Cook, M.J. and Frank, A.F. 2016. Methods Used in Teratogenic Testing Department of Drug Toxicity Evaluation and Pathology, John Wyeth & Brother Ltd, Maidenhead, Berkshire. *Lab. Anim.* (1968) 2,219-228.
- Cooper, J. A. 1991. The role of actin polymerization in cell motility. *Annu. Rev. Physiol.* 53:585-605.
- Cornet, I. H. Lambert, and E. K. Hoffmann, "Relation between cytoskeleton, hypo-osmotic treatment and volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells," *J. Membr. Biol.*, vol. 131, no. 1, pp. 55–66, 1993.
- Couillard, Y, Peter G.C, Campbell, Andre Tessier. 1993. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradien. *American Society of Limnology and Oceanography* 38(2): 299-313
- Coyle, P., J.C. Philcox, L.C. Carey and A.M. Rofe, 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.*, 59: 627-647.
- Cragger M BS; Aaron J. Berger, BS; David L. Rimm, MD, PhD. 2006. Immunohistochemistry and Quantitative Analysis of Protein Expression. *Arch Pathol Lab Med-Vol 130*. Hal 1029.
- Cuypers et al., "Cadmium stress: An oxidative challenge," *BioMetals*, vol. 23, no. 5, pp. 927–940, 2010.
- Dallinger Reinhard, Margit Egg, Giinther K&k, and Rudolf Hofer, 1997. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquatic Toxicology* 38, 47-66
- Darmono. 1995. Logam dalam Sistem Biologi Mahkluk Hidup. UI press. Jakarta.
- Darmono. 2001. Lingkungan Hidup Dan Pencemaran. Jakarta : UI PRESS.
- Darmono. 2006. Lingkungan Hidup dan Pencemaran: Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam. Jakarta (ID): UI Pr.
- Darwin, I. S. (2008). Factors influencing male mating behaviour in *Gambusia affinis* ( Baird & Girard ) with a coercive mating system, 1607–1622. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.01827.x>

De Recherche and L. R. Es, "Cadmium : Bioaccumulation , Histopathology and Detoxifying Mechanisms in Fish," vol. 1, no. 4, pp. 60–79, 2013.

DeForest DK, Brix KV, Adams WJ. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquat Toxicol.* 2007;84: 236–246

Desaimehta, C. C. Mao, S. Rajagopalan, T. Robinson, and S. K. Datta, "Structure and Specificity of T-Cell Receptors Expressed By Potentially Pathogenic Anti-Dna Autoantibody-Inducing T-Cells in Human Lupus," *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 2, pp. 531–541, 1995.

Devos, P. Devos, and M. Cornet, "Effect of cadmium on the cytoskeleton and morphology of gill chloride cells in parr and smolt Atlantic salmon ( *Salmo salar* )," pp. 15–27, 1998.

Dewi, N. K., Purwanto dan Henna R. S. 2014. Metallothionein in The Fish Liver as Biomarker of Cadmium (Cd) Pollution in Kaligarang River Semarang. *Manusia dan Lingkungan.* 21 (3) : 304-309.

Di Toro, H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin, and R. C. Santore, "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 20, no. 10, pp. 2383–2396, 2001.

DJ, Finney. 1982. "Probit Analysis." *Cambridge University Press*, 256. doi:10.1038/161417a0.

Dojlido, J.R, Andy B. G. 1993. *Chemistry Of Water Water Pollution.* ElsevierScientific Publishing Company. New York. 2 hlm 86

Duruibe, J O, and M O C Ogwuegbu. 2007. "Heavy Metal Pollution and Human Biotoxic Effects." *International Journal of Physical Sciences* 2 (5): 112–118.

EC. Commission Regulation no 1881/2006 of 19 Desember 2006. Setting Maximum Levels for Certain Contaminant in Foodstuffs.

Edmonds Robert and Dan Peplow, 2000. Environmental Impacts of Hardrock Mining in Eastern Washington, Fact Sheet #8. University of Washington College of Forest Resources and College of Ocean and Fishery Sciences Center for Streamside Studies November 2000.

Eisler, R. 1985. Cadmium Hazards To Fish, Wildlife, And Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.2), Contaminant Hazard Reviews Report No. 2. 46 pp.

Eisler, R., 2000. Handbook of Chemical Risk Assessment: Health Hazards to Humans, Plants and Animals. Vol. 3, CRC Press, Boca Raton, FL., USA

Enane, K. Frenkel, J. M. O'Connor, K. S. Squibb, and J. T. Zelikoff, "Biological markers of macrophage activation: applications for fish phagocytes.," *Immunology*, vol. 80, no. 1, pp. 68–72, 1993.

Epa, U. S. (2016a). Aquatic Life Ambient Water Quality Criteria Cadmium - 2016, (March).

Epa, U. S. (2016b). Aquatic Life Ambient Water Quality Criterion for Selenium – Freshwater.

Ercal, N. (2014). Effects of Lead and Cadmium on Brain Endothelial Cell Survival,

Monolayer Permeability, and Crucial Oxidative Stress Markers in an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier, 258–275.  
<https://doi.org/10.3390/toxics2020258>

Esteban, A. Cuesta, E. Chaves-Pozo, and J. Meseguer, "Phagocytosis in Teleosts. Implications of the New Cells Involved," *Biology (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 907–922, 2015.

Fagerberg, B., J. Kjell Dahl, G. Sällsten, L. Barregård, N. Forsgård, K. Österberg, L. M. Hultén dan G. Bergström. 2016. Cadmium exposure as measured in blood in relation to macrophage density in symptomatic atherosclerotic plaques from human carotid artery. *Atherosclerosis*. S0021-9150(16)30011-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.011.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. 1977. Water Quality Criteria for European Freshwater Fish. Rome (IT): EIFAC.

Farabi, MJ., 2016. METODE IMUNOHISTOKIMIA. <http://makhyanjibril.blogspot.com/2012/03/metode-immunohistokimia.html>. Diakses tanggal 18 Maret 2016 pukul 21.00 WIB.

Fernando, A. A. and V. P. E. Phang. 1985. Culture of The Gatul, *Poecilia reticulata*, In Singapore. *Aquaculture*, 51:49-63

Flik, W. Atsma, J. C. Fenwick, F. Rentierdelrue, J. Smal, and S. E. W. Bonga, "Homologous Recombinant Growth Hormone and Calcium Metabolism in the Tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Adapted to Fresh Water," *J. Exp. Biol.*, vol. 185, pp. 107–119, 1993.

Frank, C. Lu., 1995, Toksikologi Dasar Asas, Organ Sasaran, dan Penilaian Resiko. Edisi II, Penerjemah Edi Nugroho, 358, UI-Press, Jakarta.

Frankenne F, Noel-Lambot F, Disteche A. 1980. Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium-loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comp Biochem Physiol* 66C: 179-182.

Gaddum, J. H. 1948. "Probit Analysis." *Nature* 161 (4090): 417–18. doi:10.1038/161417a0.

Gadhawe, P. D., R. S. Brar, H. S. Banga, and A. Dhawan. 2014. "Studies on Acute Toxicity of Synthetic Pyrethroid  $\lambda$ -Cyhalothrin on Freshwater Fish *Labeo Rohita*." *Veterinary World* 7 (1): 7–9. doi:10.14202/vetworld.2014.7-9.

Galtsoff, P. S. 1964. The American Oyster *Crassostera Virginica*, Gmelin Fishery Bulletin Vol. 64, US, Departmen of Interior Fish and Wildlife Service, Burean of Commercial Fisheries.

Gao, Caiqiu, Chao Wang, Lei Zheng, Liuqiang Wang, and Yucheng Wang. 2012. "A LEA Gene Regulates Cadmium Tolerance by Mediating Physiological Responses," 5468–81. doi:10.3390/ijms13055468.

Genten, F., Terwinghe, E and Danguy, A., 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers, Enfield, NH, USA. Departemen of Histology and Biopathology of Fish Fauna Laboratory

Geyer, Rebecca L, Geoffrey R Smith, Jessica E Rettig, and Geoffrey R Smith. 2016. "Effects of Roundup Formulations , Nutrient Addition , and Western Mosquitofish ( *Gambusia Affinis* ) on Aquatic Communities." doi:10.1007/s11356-016-6381-2.

- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., Reich, A., & Groneberg, D. a. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*, 1, 22. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-22>
- Guh, C.-H. Lin, and P.-P. Hwang, "Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation.," *EXCLI J.*, vol. 14, pp. 627–659, 2015.
- Guilak, G. R. Erickson, and H. P. Ting-Beall, "The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes," *Biophys. J.*, vol. 82, no. 2, pp. 720–727, 2002.
- Guo, S., Zheng, J., Yuan, S., Zhu, Q., & Wu, C. (2017). Immunosuppressive effects and associated compensatory responses in zebrafish after full life-cycle exposure to environmentally relevant concentrations of cadmium. *Aquatic Toxicology*, 188(April), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.04.014>
- Hall JL. 2002. Cellular Mechanism for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *J. Exp.Bot* 53: 1-11
- Hammer, D.H., 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 913/951.
- Hamilton, "Review of selenium toxicity in the aquatic food chain," vol. 326, pp. 1–31, 2004.
- Hansen James A., Paul G. Welsh, Josh Lipton, Dave Cacela, And Anne D. Dailey, 2002. Relative Sensitivity Of Bull Trout (*Salvelinus Confluentus*) And Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) To Acute Exposures Of Cadmium And Zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 1, 67–75.
- Hanson N, Andrew L. 2008. Biomarker Analyses in Fish Suggest Exposure to Pollutants in an Urban Area With a Landfill. Submitted Manuscript.
- Hanson, N., 2008. Does Fish Health Matter ? The Utility of Biomarkers in Fish for Environmental Assessment. Ph.D. Thesis Department of Plant and Environmental Sciences University of Gothenburg.
- Harahap, S. 1991. Tingkat pencemaran air kali cakung ditinjau dari sifat fisika kimia khususnya logam berat dan keanekaragaman jenis hewan makrobentos. Thesis PSL. Program Pasca Sarjana IPB. Bogor
- Harisha, S. 2007. *Biotechnology Procedures and Experiments Handbook*.
- Harper, M. dan S. Jeffrey. 2008. Morphologic Effects of The Stress Response in Fish. Experimental Pathology Laboratories Inc. in Sterling, Virginia.
- Hart, R. J. Potts, and R. D. Watkin, "Cadmium adaptation in the lung - A double-edged sword?," *Toxicology*, vol. 160, no. 1–3, pp. 65–70, 2001.
- Hirata, Taku, Toyoji Kaneko, Toshihiro Ono, Takeru Nakazato, Norihisa Furukawa, Sanae Hasegawa, Shigeo Wakabayashi, et al. 2003. "Mechanism of Acid Adaptation of a Fish Living in a pH 3.5 Lake." *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284: R1199–1212. [doi:10.1152/ajpregu.00267.2002](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00267.2002).

- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Hodgkinson, L. Grayfer, and M. Belosevic, "Biology of Bony Fish Macrophages," *Biology (Basel)*, vol. 4, no. 4, pp. 881–906, 2015.
- Hooda, P.S., 2010. Front Matter. In: Trace Elements in Soils, Hooda, P. (Ed.). John Wiley and Sons, Ltd., New York, USA., ISBN-13: 9781444319484
- Hooper, R. Day, R. Slocombe, J. Handlinger, and K. Benkendorff, "Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 22, no. 4, pp. 363–379, 2007.
- Hossain MK, Hossain MD, Rahma MH. 2007. Histo-pathology of some diseased fishes. *Journal Life Earth Science* 2(2): 47-50.
- Hutagalung, H. P. 1991. Pencemaran Laut oleh Logam Berat dan petunjuk Praktek Logam Berat. Erlangga. Jakarta.
- Hutagalung, H.P. 1984. Mengenal AAS (Absorpsi Atomic Spectrofotometer). *Pawarta Oceana* 3 : 17-18 LON-LIPI. Jakarta
- Hwang, T.-H. Lee, and L.-Y. Lin, "Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms," *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 301, no. 1, pp. R28–R47, 2011.
- Irianto, E.W dan B. Machbub, 2003. Fenomena Hubungan Debit Air dan Kadar Zat Pencemar dalam Air Sungai (Studi Kasus: Sub DAS Citaru Hulu). *JLP*. Vol 17 (52) Tahun 2005. Hal : 1-4.
- Iwasaki, N. 1989. *Guppies : Fancy Strains and How To Produce Them*. Japan's Foremost Gatul Breeder. 144p.
- Izdebska, W. Zielińska, D. Grzanka, and M. Gagat, "The Role of Actin Dynamics and Actin-Binding Proteins Expression in Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Its Association with Cancer Progression and Evaluation of Possible Therapeutic Targets," *Biomed Res. Int.*, vol. 2018, pp. 1–13, 2018.
- Janmey, "Phosphoinositides and Calcium as Regulators of Cellular Actin Assembly and Disassembly," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 169–191, 1994.
- Jin et al., "RNA-mediated neurodegeneration caused by the fragile X premutation rCGG repeats in *Drosophila*," *Neuron*, vol. 39, no. 5, pp. 739–747, 2003.
- Johri, N., Jacquillet, G., & Unwin, R. (2010). Heavy metal poisoning: The effects of cadmium on the kidney. *BioMetals*, 23(5), 783–792. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9328-y>
- Jollie, W. P. and L. G. Jollie. 1964. The Fine Structure of the Ovarian Follicle of the Ovoviviparous Poeciliid Fish: *Lebistes reticulatus*. *Journal of Morphology* 144:479-502.
- Kagi, J. H. R. and Kojima, Y. (eds.) (1987) *Experientia (Suppl.)* 52, Birkhauser Verlag, Basel
- Kagi JH. 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:613–626.
- Kefaloyianni, E. (2005). Acute thermal stress and various heavy metals induce

tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *Journal of Experimental Biology*, 208(23), 4427–4436. <https://doi.org/10.1242/jeb.01924>

Kementrian Lingkungan Hidup. 1982. Undang Undang Pokok Pengelolaan Lingkungan Hidup No 4 Tahun 1982, Pasal 1 No 7.

Kille, P., Stephens, P.E., Kay, J., 1991. Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Biochem. Biophys. Acta* 1089, 407/410.

Kirpichnikov, V. S. 1981. Genetic Bases of Fish Selection. Springer Veerlag. Berlin Heidelberg. New York. 410p.

Korte et al., "Coincidence of familial platelet glycoprotein Ib/IX deficiency (Bernard-Soulier syndrome), idiopathic autoantibody against platelet glycoprotein Ib/IX, familial appearance of antiphospholipid antibodies, and familial factor XII deficiency," *Ann. Hematol.*, vol. 68, no. 2, pp. 101–104, 1994.

Krisnadi, 2012. Pixel, Megapixel dan RGB. MK Photography. Madia. Jakarta.

Kristanto, P. 2002. Ekologi Industri. Andi Offset. Yogyakarta. 349 hlm

Kuhlmann WD.1984. Immuno Enzyme Techniques in Chytochemistry. Basel : Verlag Chemie.

Kumar and A. Singh, "Cadmium toxicity in fish: An overview," *Environ. Health Perspect.*, vol. 1, no. 1, pp. 41–47, 2010.

Kurniawan, T.A., G.Y.S. Chan, W.-H. Lo, S. Babel. 2006. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* 118 hal83–98.

Labeda, D.P. 1990. Environmental Biotechnology. Isolation of Biotechnological Organisme From Nature. USA: Mc. Graw Hill Publishing Company.

Lacroix-Desmazes et al., "Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals," *J. Immunol. Methods*, vol. 216, no. 1–2, pp. 117–137, 1998.

Lamatsch, Dunja K, Sofia Adolfsson, Alistair M Senior, and Guntram Christiansen. 2015. "A Transcriptome Derived Female-Specific Marker from the Invasive Western Mosquitofish ( *Gambusia Affinis* )." 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0118214.

Lamatsch, S. Adolfsson, A. M. Senior, and G. Christiansen, "A Transcriptome Derived Female-Specific Marker from the Invasive Western Mosquitofish ( *Gambusia affinis* )," pp. 1–16, 2015.

Larasati, 2010. Prosedur Tetap Pengecatan Imunohistokimia p53. Cancer chemoprevention research center. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.

Lasut, Markus T. 2002. Metallothionein: Suatu Parameter Kunci yang Penting dalam Penetapan Baku Mutu Air Laut (BMAL) Indonesia. *Jurnal Ekoton* Vol. 2, No. 1 Hal: 61-68.

Lehr S, Kotzka J, Herkner A, Klein E, Siethoff C, Knebel B, Noelle V, Brüning JC, Klein HW, Meyer HE, Krone W, Müller-Wieland D. 1999. Identification of

- tyrosine phosphorylation sites in human Gab-1 protein by EGF receptor kinase in vitro. *Biochemistry*. Jan 5;38(1):151-9.
- Lestari dan Edward., 2004. Dampak Pencemaran Logam Berat Terhadap Kualitas Air Laut Dan Sumberdaya Perikanan (Studi Kasus Kematian Massal Ikan-Ikan Di Teluk Jakarta). Kelompok Penelitian Pencemaran Laut, Balai Dinamika Laut, Pusat Penelitian Oseanografi. MAKARA, SAINS, VOL. 8, NO. 2, AGUSTUS 2004: 52-58.
- Levit, S.M., 2010. A literature review of effects of cadmium on fish. Centre for Science in Public Participation, Bozeman, Montana, November 2010. <http://www.nature.org/images/cadmium-literature-review-dec-2010-2.pdf>
- Lewis, P. J. Jensen, K. R. Johnson, and M. J. Wheelock, "E-cadherin mediates adherens junction organization through protein kinase C.," *J. Cell Sci.*, vol. 107 ( Pt 1, pp. 3615–3621, 1995.
- Lin and W.-T. Sung, "The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes.," *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 76, no. 2, pp. 215–228, 2003.
- Lingga, P. dan H. Susanto. 1987. Ikan Hias Air Tawar. PT Gramedia Jakarta. Jakarta
- Liu and P. A. Roche, "Macropinocytosis in phagocytes: Regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells," *Front. Physiol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 1–7, 2015.
- Loganathan, P., M.J. Hedley and N.D. Grace, 2008. Pasture soils contaminated with fertilizer-derived cadmium and fluorine: Livestock effects. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 192: 29-66.
- Macirella and E. Brunelli, "Morphofunctional Alterations in Zebrafish (*Danio rerio*) Gills after Exposure to Mercury Chloride," 2017.
- Maslukah L. 2007. Konsentrasi Logam Berat (Pb, Cd, Cu, Zn) Terlarut dalam Seston dan dalam Sedimen di Estuari Banjir Kanal Barat, Semarang. *Jurnal Sumberdaya Perairan*. 2(1):1-4.
- Miller, G. T. Jr., 1975: *Living in the Environment; Concepts, Problems, and Alternatives*, Wadsworth Publishing & Co., Belmont.
- Min, E.Y., Tae Young, A., and Ju-Chang K. 2016. Bioaccumulation, alterations of metallothionein, and antioxidant enzymes in the mullet *Mugil cephalus* exposed to hexavalent chromium. *Biomed Central. Research Article;Open Access. Fisheries and Aquatic Sciences* (2016) 19:19. DOI 10.1186/s41240-016-0020-1
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase \* Autoxidation of. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10), 3170–3175.
- Mohanty, Bidut Prava, Malaya Ranjan Mahananda, and Suchismita Pradhan. 2013. "Cadmium Induced Toxicity and Antioxidant Activities in *Labeo Rohita* ( Hamilton )" 1 (2): 41–47. doi:10.13189/eer.2013.010203.
- Mokoagouw, D. 2008. Indeks Keanekaragaman Biota Perairan Sebagai Indikator Biologis Pencemaran Logam Berat Di Perairan Pantai Bitung, Sulawesi Utara. *Ekoton* Vol. 8 No.2:31-40

Moulis, "Cellular mechanisms of cadmium toxicity related to the homeostasis of essential metals," *BioMetals*, vol. 23, no. 5, pp. 877–896, 2010.

Muaja, Arter D, Harry S J Koleangan, and Max R J Runtuwene. 2013. "Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT Dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik ( *Saurauia Bracteosa* DC ) Dengan Metode Soxhletasi." *Journal of Natural Products* 2 (2): 115–18.

Mulyanto. 1992. Diktat Kuliah Manajemen Perairan, Fakultas Perairan, Universitas Brawijaya

Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi Dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksilin Dan Eosin (H&E). Balai Penelitian Veteriner. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti.

Murthy, S. Geetha Bali, S.K. Sarangi. 2011. Effect of Lead on Metallothionein Concentration in Lead-Resistant Bacteria *Bacillus cereus* Isolated From Industrial Effluent. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(71), pp. 15966-15972

Nair, O. Degheselle, K. Smeets, E. Van Kerkhove, and A. Cuyper, "Cadmium-Induced Pathologies : Where Is the Oxidative Balance Lost ( or Not )?," pp. 6116–6143, 2013.

Nebeker, S. T. Onjukka, M. A. Cairns, and D. F. Krawczyk, "Survival of daphnia magna and hyalella azteca in cadmium-spiked water and sediment," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 5, no. 10, pp. 933–938, 1986.

Nelson, J. S. 1984. *Fishes of The World*. John Willey and Sons. Inc. New York. P:221-222.

Nemmiche, Saïd. 2017. "Oxidative Signaling Response to Cadmium Exposure." *Toxicological Sciences* 156 (1): 4–10. doi:10.1093/toxsci/kfw222.

Neumann, J. L. Stafford, D. Barreda, A. J. Ainsworth, and M. Belosevic, "Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 25, no. 8–9, pp. 807–825, 2001.

Ngatidjan, 1997, Metode Laboratorium dalam Toksikologi, 32-35, Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Nies D. H. 1999. Microbial Heavy-Metal Resistance. Springer-Verlag. Appl Microbiol Biotechnol 51: 730-750

Noël-Lambot, J. M. Bouquegneau, F. Frankenne, and A. Disteche, "Cadmium , Zinc and Copper Accumulation in Limpets ( *Patella vulgata* ) from the Bristol Channel with Special Reference to Metallothioneins," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 2, pp. 81–89, 1980.

Nordberg, G. F. (2009). Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.015>

Novianto, Rio T.W.D., Fida Rachmadiarti, and Raharjo. 2012. "Analisis Kadar Timbal (Pb) Dan Kadmiun (Cd) Pada Udang Putih (*Penaeus Marguiensis*) Di Pantai Gesek Sedati Sidoarjo." *Lentera Bio* 1 (2): 63–66.

Nunes, B., Miranda, M. T., & Correia, A. T. (2016). Absence of effects of different types of detergents on the cholinesterasic activity and histological

markers of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after a sub-lethal chronic exposure. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6608-2>

Odum, E. P. 1996. *Dasar –Dasar Ekologi*. Terjemahan Samingan T. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta

OECD (2000) OECD guideline for the testing of chemicals. Fish Juvenile Growth test 301(January):231–236

OECD, Revised Draft Fish Toxicity Testing Framework, no. September. 2011.

Ohsawa, C.-Y. Ji, and N. Kasai, "Age at menarche and comparison of the growth and performance of pre- and post-menarcheal girls in China," *Am. J. Hum. Biol.*, vol. 9, no. 2, pp. 205–212, 1997.

Ojo and C. M. Wood, "In vitro characterization of cadmium and zinc uptake via the gastro-intestinal tract of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Interactive effects and the influence of calcium," vol. 89, pp. 55–64, 2008.

Ozkuthu F, Sekeroglu N and Kara SM . 2006. Monitoring of cadmium and micronutrients in spices commonly consumed in Turkey. *Res J Agric & Biol Sci*:223-226. Promega. 1996. Protocol

Paget, G. E., 1970, *Method In Toxicology*, England, Blackwell Scientific Publication Oxford and Edinburgh.

Palar, H. 1994. *Pencemaran & Toksikologi Logam Berat*. PT. Rineka Cipta. Jakarta.

Parenrengi A, Syarifuddin T, Sri L. 1998. Studi Jenis dan Kelimpahan Plankton pada Berbagai Kedalaman dan Hubungannya dengan Komposisi Makanan Tiram Mabe (*Pteria penguin*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* volume IV no.4. Balai Penelitian Perikanan Pantai Maros. Watampone.

Pedersen, J. W. Mills, and E. K. Hoffmann, "Role of the F-actin cytoskeleton in the RVD and RVI processes in Ehrlich ascites tumor cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 252, no. 1, pp. 63–74, 1999.

Peplow, Daniel and Robert Edmonds, 2004. Health Risks Associated with Contamination of Groundwater by Abandoned Mines Near Twisp in Okanogan County, Washington, USA. *Environmental Geochemistry and Health*, Volume 26, Number 1.

Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air Dan Pengendalian Pencemaran Air. Pelaksanaan Undang-undang Nomor 23 Tahun 1997 tentang Pengelolaan Lingkungan hidup

Peraturan Pemerintah. Menteri Negara Lingkungan Hidup. Keputusan Nomor: KEP-51/MENLH/10/1995 tentang Baku Mutu Limbah Cair Bagi Kegiatan Industri.

Perry and C. M. Wood, "Kinetics of Branchial Calcium Uptake in the Rainbow Trout: Effects of Acclimation to Various External Calcium Levels," *J. Exp. Biol.*, vol. 116, no. 1, pp. 411–433, 1985.

Philip J. Brandhuber, *Methods for the Detection of Residual Concentrations of Hydrogen Peroxide in Advanced Oxidation Processes*. 2009.

Pisam and A. Rambourg, "Mitochondria-Rich Cells in the Gill Epithelium of Teleost Fishes: An Ultrastructural Approach," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 130, no. C, pp. 191–232, 1991.

Pisam, C. Lemoal, B. Auperin, P. Prunet, and A. Rambourg, "Apical structures of mitochondria-rich alpha and beta in euryhaline fish gill - their behavior in various living-conditions," *Anat. Rec.*, vol. 241, pp. 13–24, 1995.

Placer, A., Cushman, L., & Connor, B. (1966). Estimation of Product Dialdehyde), 364, 359–364.

Plhalova, L., Zivna, D., Bartoskova, M., Blahova, J., Sevcikova, M., Skoric, M., ... Svobodova, Z. (2014). The effects of subchronic exposure to, 35.

Poletaev and L. Osipenko, "General network of natural autoantibodies as immunological homunculus (Immunculus)," *Autoimmun. Rev.*, vol. 2, no. 5, pp. 264–271, 2003.

Prat et al., "Renal epithelial protein (Apx) is an actin cytoskeleton-regulated Na<sup>+</sup>channel," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 30, pp. 18045–18053, 1996.

Priadi, CP., Anita, Putri NS., dan Setyo SM. 2014. Adsorpsi Logam Seng Dan Timbal Pada Limbah Cair Industri Keramik Oleh Limbah Tanah Liat Reaktor, Vol. 15 No. 1, April 2014, Hal. 10-19

Purbonegoro, T. 2008. Pengaruh Logam Berat Kadmium (Cd) Terhadap Metabolisme dan Fotosintesis di Laut. *Oseana*, VolumeXXXIII : 25-31

Putra S.E dan Putra J.A. 2005. Bioremoval Metode Alternatif Untuk Menanggulangi Pencemaran Logam Berat. [www.Che-is-try.org](http://www.Che-is-try.org)

Quinlan, Gregory J, Timothy W Evans, and John M C Gutteridge. 1994. "Oxidative Damage To Plasma Proteins In Adult Respiratory Distress Syndrome" 20 (5): 289–98.

Rachmawati,S., A, Lee., T,B, Murdiati., I.Kennedy. 2004. Pengembangan Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Teknik Untuk Analisis Aflatoxin B1 Pada Pakan Ternak. *Prosiding Seminar Parasitologi dan Toksikologi Veteriner*

Rahmana, P., Uun, Y dan Asus, M., 2013. Perubahan Struktur Mata Dan Otak Pada Larva Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Yang Terinfeksi Viral Nervous Necrosis (VNN) Dengan Pemeriksaan Scanning Microscope (SEM). *Student Journal*. Vol.I No.1 pp1-10. Universitas Brawijaya.

Ramos-Vara, JA. 2005. "Technical Aspects of Immunohistochemistry". *Vet Pathol* 42 (4): 405–426. doi:10.1354/vp.42-4-405. PMID 16006601

Rašković BS, Stanković MB, Marković ZZ, PoleksićVD. 2011. Histological methods in the assessment of different feed effects on liver and intestine of fish. *Journal of Agricultural Sciences* 56(1): 87-100

Ratmini NA. 2009. Kadungan Logam Berat Timbal (Pb), Merkuri (Hg), dan Cadmium (Cd) pada Daging Ikan Sapu-Sapu (*Hyposarcus pardalis*) di Sungai Ciliwung Stasiun Srengseng, Condet dan Manggarai. *vis vitalis*. Vol.02 No 1.

- Recherche, Laboratoire De, and L R Es. 2013. "Cadmium : Bioaccumulation , Histopathology and Detoxifying Mechanisms in Fish" 1 (4): 60–79.
- Regoli, F., D. Pellegrini, G.W. Winston, S. Gorbi, S. Giuliani, C. Virno-Lamberti and S. Bomparde, 2002. Application of Biomarkers for Assessing the Biological Impact of Dredged Materials in the Mediterranean: the Relationship between Antioxidant Responses and Susceptibility to Oxidative Stress in the Red Mullet, (*Mullus barbatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 44:912-922.
- Riani, E. 2004. Manajemen Kualitas Air. Dalam Pelatihan Dasar Karantina Ikan Tingkat Ahli dan Terampil. Pusat Karantina Ikan, Bogor
- Ringwood, H., J. Hoguet, C. Keppler and M. Gielazyn, 2004. Linkages Between Cellular Biomarker Responses and Reproductive Success in Oysters—*Crassostrea virginica*. *Marine Environmental Res.*, 58: 151-155
- Risjani, J. Couteau, and C. Minier, "Cellular immune responses and phagocytic activity of fishes exposed to pollution of volcano mud," *Mar. Environ. Res.*, vol. 96, pp. 73–80, 2014.
- Roberts, R.J. 2001. *Fish Pathology*. 3rd ed WB Saunders, Toronto.
- Rumahlatu, D., AD. Corebima, M. Amin dan F. Rohman. Activation, Concentration, and Expression of Metallothionein-1 On Sea Urchin as Biomonitoring Heavy Metal Cadmium. *Research Inveny: International Journal Of Engineering And Science* Issn (e): 2278-4721, Issn (p):2319-6483, [www.researchinveny.com](http://www.researchinveny.com) Vol.3, Issue 3 (June2013), PP 06-12
- Ruttkay-Nedecky et al., "The role of metallothionein in oxidative stress," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 6044–6066, 2013.
- Saeni, M.S. dan H.R. Wuryanduri. 1995. Pengaruh Pencemaran Pb, Cd, dan Cu dalam Kangkung, Bayam dan Air Terhadap Pencemaran dalam Rambut di Kotamadya Bogor. *Buletin Kimia IPB*. No.12:55-78
- Sandro, S.R., Lestari, S. Ida, A. dan Purwiyanto, S. 2006. Analisa Kandungan Logam Berat Pada Daging Kepiting Di Perairan Muara Sungai Banyusin. *Fishtech*. [www.fishtech.unsri.ac.id](http://www.fishtech.unsri.ac.id). Vol. 2. Hal. 46-52
- Sanusi, H.S., Hutagalung H.P., Razak H. 1984. Hubungan Antara Umur, Kadar Air Raksa (Hg) dan Kadmium (Cd) yang Terakumulasi Oleh kerang Hijau (*Mystylus viridis* L.) yang Dibudidayakan di Perairan teluk Jakarta. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 70 hlm
- Schoenmakers and G. Flik, "Sodium-extruding and calcium-extruding sodium/calcium exchangers display similar calcium affinities," *J. Exp. Biol.*, vol. 168, no. 1, pp. 151–159, 1992.
- Secombes and T. C. Fletcher, "The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish," *Annu. Rev. Fish Dis.*, vol. 2, no. C, pp. 53–71, 1992.
- Seeley, P. D. Gillespie, and B. A. Weeks, "A simple technique for the rapid spectrophotometric determination of phagocytosis by fish macrophages," *Mar. Environ. Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 37–41, 1990.
- Setiawan, I. M. 2007. Pemeriksaan Enzim-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk Diagnosis Leptospirosis. *Jurnal Ebbers Papyrus*. 13 (3) : 125-136.

- Siddiqui, M. H., Al-wahaibi, M. H., Sakran, A. M., Basalah, M. O., & Ali, H. M. (2012). Effect of Calcium and Potassium on Antioxidant System of *Vicia faba* L Under Cadmium Stress, 6604–6619. <https://doi.org/10.3390/ijms13066604>
- Simes D.C, Maria J.B, Jose J.G.M. 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology* 63 :307-318
- Singla, P, Ghoshal, H. Lin, Q. Wei, Z. Dong, and G. Csányi, "PKC $\delta$ -Mediated Nox2 Activation Promotes Fluid-Phase Pinocytosis of Antigens by Immature Dendritic Cells," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. March, 2018.
- SNI. Standarisasi Nasional Indonesia. 2009. Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Pangan. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- SNI. Standarisasi Nasional Indonesia. 2011. Cara Uji Kimia Bagian 5: Penentuan Kadar Logam Berat Timbal (Pb) dan Kadmium (Cd) pada Produk Perikanan. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Soegiarto A, and Hamami. 2007. Trace Metal Concentrations in Shrimp and Fish Collected from Gresik Coastal Waters. (Short Report) doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.235 *Indonesia ScienceAsia33* (2007): 235-238
- Soegiarto, A, Bambang Irawan and Mochammad Affandi . 2008. Toxicity of Drilling Waste and Its Impact on Gill Structure of Post Larvae of Tiger Prawn (*Penaeus monodon*). © IDOSI Publications, 2008 ISSN 1990-925X. *Global Journal of Environmental Research* 2 (1): 36-41, 2008
- Soegiarto,A., Mireile C.D, Jean, P.T. and Guy C. 1999. Impact of cadmium on the Structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). ©Infremer/Elsivier, Paris. *Aquatic Livig Resour*, 12 (1) (1999) 57-70.
- Soemirat JS. 2005. Kesehatan Lingkungan. Gajah Mada Univ Press. Yogyakarta
- Sofian A, Nugroho K. 2006. Peran Pemeriksaan Imunohistokin Vimentin sebagai Penanda Asal Kanker Endometrium. *MKI*. Jakarta. Vol 13 No 2. 45-50
- Solbakken, T. Hansen, and S. Stefansson, "Effects of photoperiod and temperature on growth and Parr-smolt transformation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L. ) and subsequent performance in seawater," *Aquac. Nutr.*, vol. 2, no. 2, pp. 65–69, 1996.
- Specziar A., 2004. Life history pattern and feeding ecology of the introduced eastern mosquitofish, *Gambusia holbrooki*, in a thermal spa under temperate climate, of Lake Hévíz, Hungary. *Hydrobiologia*, 522 (1-3), 249-260.
- Subhi, M. 2013. Perizinan Pembuangan Limbah Cair Kegiatan Industri Dalam Hubungannya Dengan Pengendalian Pencemaran Air (Studi Di Kabupaten Ketapang)
- Supriatno dan Lelifajri, 2009. Analisis Logam Berat Pb dan Cd dalam Sampel Ikan dan Kerang secara Spektrofotometri Serapan Atom. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*, 7(1), pp.5–8.

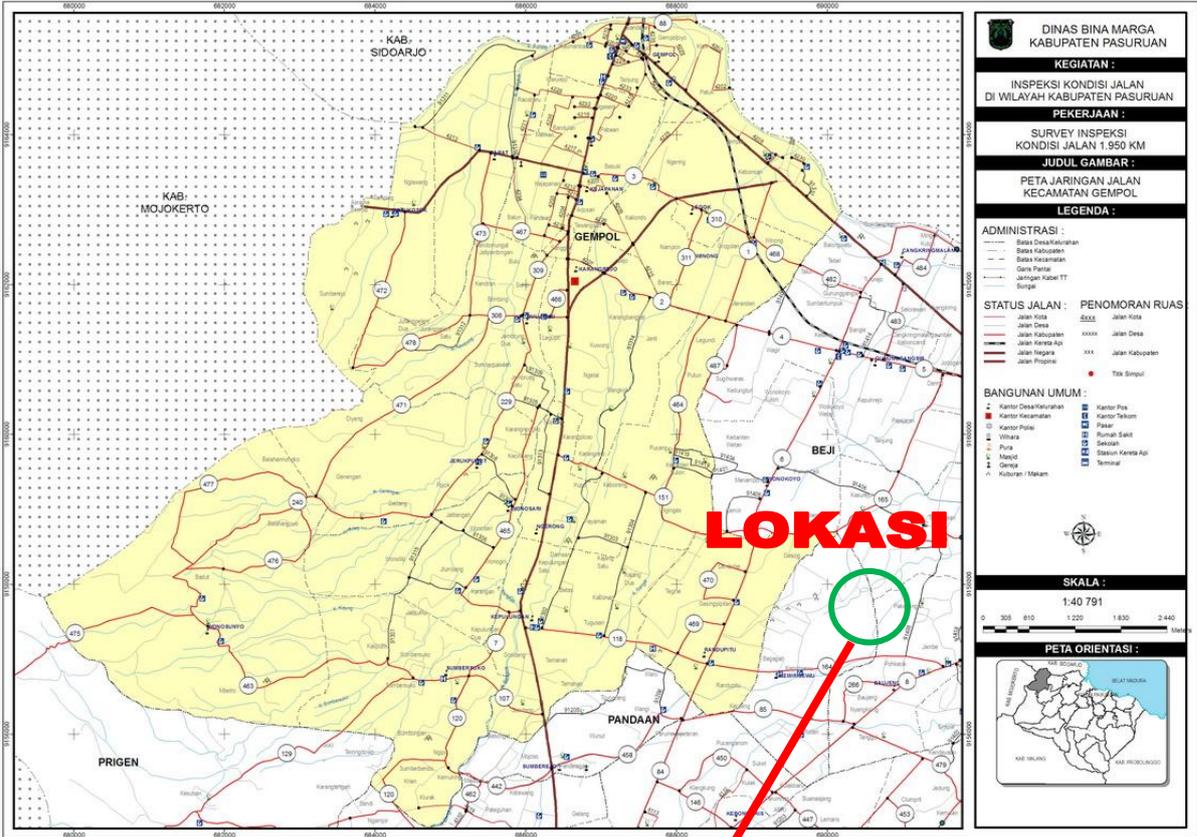
- Supriyati M.D, Adelina R, Nawangsari D.A, Ikawati M, Meiyanto E. 2009. Modulasi ekspresi c-Myc sel epitelial kelenjar payudara tikus oleh ekstrak etanolik kulit jeruk keprok (*Citrus reticulata*). Cancer Chemoprevention Research Center. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta
- Tang, S., Doering, J. A., Sun, J., Beitel, S. C., Shekh, K., Crawford, S., ... Shekh, K. (2016). *Linking oxidative stress and magnitude of compensatory responses with life-stage specific differences in sensitivity of white sturgeon (Acipenser transmontanus) to copper or cadmium.* <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03301>
- Tarigan Z, Edward dan Rozak A. 2003. Kandungan Logam Berat Pb, Cd, Cu, Zn dan Ni dalam Air Laut dan Sedimen di Muara Sungai Membramo, Papua dalam Kaitannya dengan Kepentingan Budidaya Perikanan. Makara.Vol 7(3).
- Thévenod, "Cadmium and cellular signaling cascades: To be or not to be?," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 238, no. 3, pp. 221–239, 2009.
- Thoha, H. 1991. Pencemaran Laut dan Dampaknya Terhadap Lingkungan. Amerta VI (2) : 10-13
- Tyas, Nanik Mustikaning, Djamar Tumpal Floranthus Lumban Batu, and Ridwan Affandi. 2016. "The Lethal Toxicity Test of Cr6+ on (*Oreochromis Niloticus*)." *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 21 (2): 128–32. doi:10.18343/jipi.21.2.128.
- Undang-Undang RI Nomor 23 Tahun 1997 tentang Pengelolaan Lingkungan Hidup penjelasan pasal 15 ayat (1)
- Undang-Undang RI Nomor 32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup.
- Uribe, H. Folch, R. Enriquez, and G. Moran, "Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review.," *Vet. Med. (Praha)*., vol. 56, no. 10, pp. 486–503, 2011.
- US Environmental Protection Agency (EPA), 2000. Cadmium Compounds Hazard Summary-Created in April 1992; Revised in January 2000. Accessed November 19, 2010. <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/cadmium.html>.
- USEPA., 2002. Summary of biological assessment programs and biocriteria development for states, tribes, territories and interstate omissions: Streams and wadeable rivers. EPA 822-R-02-048, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC., USA.
- Valdes M.E., B. Huerta, D.A. Wunderlin, M.A. Bistoni, D.Barceló dan S.Rodriguez-Mozaz. 2016. Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals infish underfield and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolism by fish. Elsevier, Science Direct. *Science of the Total Environment* 557–558 (2016) 58–67
- Vallee, R. (1991). Cytoplasmic dynein: advances in microtubule-based motility. *Trends Cell Biol.* 1, 25-29.

- Vargas M.J. & De Sostoa A., 1996. Life history of *Gambusia holbrooki* (Pisces, Poeciliidae) in the Ebro delta (NE Iberian peninsula). *Hydrobiologia* 341(3): 215-224.
- Verboost, T. J. Schoenmakers, G. Flik, and S. E. Wendelaar Bonga, "Kinetics of ATP- and Na(+)-gradient driven Ca<sup>2+</sup> transport in basolateral membranes from gills of freshwater- and seawater-adapted tilapia.," *J. Exp. Biol.*, vol. 186, pp. 95–108, 1994.
- Vesey, "Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: Focus on the interaction with essential metals," *Toxicol. Lett.*, vol. 198, no. 1, pp. 13–19, 2010.
- Vouck. 1986. *General Chemistry of Metal. Handbook on the Toxicology of Metal.* Elsevier. New York.
- Wang, J., Zhang, P., Shen, Q., Wang, Q., Liu, D., Li, J., & Wang, L. (2013). The Effects of Cadmium Exposure on the Oxidative State and Cell Death in the Gill of Freshwater Crab *Sinopotamon henanense*, 8(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064020>
- Watts, B. L. Munday, and C. M. Burke, "Immune responses of teleost fish," *Aust. Vet. J.*, vol. 79, no. 8, pp. 570–574, 2001.
- Webb, A., M. Maughan, dan M. Knott. 2007. *Pest fish profiles; Gambusia holbrooki – Gambusia.* ACTFR, James Cook University.
- Wendelaar Bonga, G. Flik, P. H. M. Balm, and J. C. A. van der Meij, "The ultrastructure of chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus* during exposure to acidified water," *Cell Tissue Res.*, vol. 259, no. 3, pp. 575–585, 1990.
- Widayati, E.D. 2008. *Studi Histopatologi Insang Ikan Mujair (Oreochromis mossambicus) Pada Konsentrasi Sublethal Air Lumpur Sidoarjo.* Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.
- Widowati W, Sastiono A, Jusuf R. R. 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran.* Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Wright and P. M. Welbourn, "Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota," *Environ. Rev.*, vol. 2, no. 2, pp. 187–214, 1994.
- Yamamoto et al., "Deregulation of the actin cytoskeleton and macropinocytosis in response to phorbol ester by the mutant protein kinase C gamma that causes spinocerebellar ataxia type 14," *Front. Physiol.*, vol. 5 APR, no. April, pp. 1–11, 2014.
- Yap C. K., A. Ismail, H. Omar, dan S. G. Tan. 2004. Toxicities and Tolerances of Cd, Cu, Pb and Zn in a primary producer (*Isochrysis galbana*) and in a primary consumer (*Perna viridis*). *Environmental International* 29:1100–1101.
- Yennie Y, Tina J.M. 2005. Kandungan Logam berat Air Laut, Sedimen dan Daging Kerang Darah ( *Anadara granosa* ) di Perairan Menthok dan Tanjung Jabung Timur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia*, 12 (1):27-32.12(1):27-32

- Yong, R.N., A.M.O. Mohamed & S.P Warkenting. 1992. Principles of contaminant transport in soils. Development in Geotechnical Engginering. 73. Elsevier Amsterdam. 327 hal
- Yu, YY., SJ. Chen, M. Cheng, LX., Tian, J. Niu, YJ., Liu, dan DH., Xu. 2015. Effect of cadmium-polluted diet on growth, salinity stress, hepatotoxicity of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): Protective effect of Zn(II) – curcumin. Elsevier ; Springer – Science Direct. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 125 (2016) 176–183
- Zangger K, Gong SHEN, Gulin OZ, James D.OTVOS, and Ian M.ARMITAGE. 2001. Oxidative Dimerization in Metallothionein is a Result of Intermolecular Disulphide bonds between cysteins in the  $\alpha$ -domain. *J Biochem* 359 : 353-360
- Zhan, H., Zhang, J., Chen, Z., Huang, Y., & Ruuhola, T. (2017). Effects of Cd exposure on key life history traits and activities of four metabolic enzymes in *Helicoverpa armigera* ( Lepidopteran: Noctuidae ). *Chemistry and Ecology*, 0(0), 1–14. <https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1299714>
- Zhang, "Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations," *J. Cell Sci.*, vol. 118, no. 23, pp. 5549–5562, 2005.
- Zhang, J. Gan, C. Ke, X. Liu, and J. Zhao, "Short communication Identification and expression profile of a new cytochrome P450 isoform ( CYP414A1 ) in the hepatopancreas of *Venerupis ( Ruditapes ) philippinarum* exposed to benzo [ a ] pyrene , cadmium and copper," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 33, no. 1, pp. 85–91, 2011.

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Peta Lokasi Penelitian



## Lampiran 2. Prosedur Pembuatan Preparasi Sampel

### 1. Prosedur Analisis Logam Berat Cd

Menurut Departemen Pekerjaan Umum, 1990; Widiati, 2010, metode analisis logam Cd sebagai berikut:

- Menimbang masing-masing sampel padat  $\pm$  15 gr dengan timbangan sartorius untuk mendapatkan berat basah.
- Mengoven sampel padat pada suhu  $\pm$  105°C selam 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 HNO<sub>3</sub> dengan perbandingan 1:1 ( HNO<sub>3</sub>:HCL) sebanyak  $\pm$  10-15 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 Absorbtion 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 Cd pada sampel, karena prinsip kerja mesin AAS hanya menentukan nilai absorbansi dengan sampel.

## 2. Prosedur Analisis Haematologi

Pengambilan sampel darah ikan berukuran besar (>10cm). Prosedur pengambilan darah ikan (Bijanti, 2005) sebagai berikut:

- Membius ikan dengan menggunakan larutan anastesi
- Menyiapkan mikro spuit lengkap dengan jarumnya, hisap larutan antikoagulan sampai memenuhi seluruh dinding syringe.
- Mengeluarkan larutan antikoagulan (Na Citrat 3,8%) dari spuit, sisakan larutan heparin tersebut sebanyak  $\pm 50 \mu\text{l}$  dalam spuit.
- Menusukkan jarum / spuit dan jarumnya yang telah berisi larutan antikoagulan pada garis tengah tubuh di belakang sirip anal.
- Memasukkan jarum kedalam musculus sampai mencapai tulang belakang (columna spinal).
- Memastikan tidak ada gelembung air yang masuk kedalam spuit, kemudian ditarik perlahan – lahan sampai darah masuk kedalam spuit.
- Setelah didapatkan, kemudian memasukkan darah ke dalam tabung ependof.

### a. Metode Pengamatan Sel Darah Ikan (Bijanti, 2005)

Setelah dilakukan pembuatan preparat ulas selanjutnya dilakukan persiapan pengamatan darah ikan dengan prosedur sebagai berikut:

- Mengambil contoh darah satu tetes, diletakkan di atas objek glass dan dibuat hapusan darah ditunggu hingga kering kemudian diberi methanol.
- Hapusan darah yang telah kering kemudian diberi pewarna giemsa sebanyak 1 tetes kemudian dibuat hapusan dan dibiarkan selama  $\pm 20$  menit agar warna terserap.

- Setelah 20 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan air mengalir dan kemudian dikeringkan.

- Preparat diamati di bawah mikroskop.

b. Pengamatan Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit) (Bijanti, 2005)

Peralatan yang digunakan adalah pipet eritrosit ukuran 11  $\mu\text{L}$ , cover glass, kamar hitung Neubauer, Mikroskop Cahaya, Counter. Bahan yang digunakan adalah sampel darah ikan, Natrium Sitrat 3,8% (anti koagulan) dan larutan hayem. Prosedur kerja : darah ikan yang telah dicampur dengan anti koagulan di ambil dengan pipet eritrosit sebanyak 0,5  $\mu\text{L}$  kemudian diencerkan dengan larutan hayem dalam pipet eritrosit sampai menunjukkan angka 11  $\mu\text{L}$ . Setelah itu darah yang telah tercampur dikocok hingga homogeny dalam pipet tersebut kemudian campuran tersebut diambil sedikit (20 $\mu\text{L}$ ) dan dimasukkan dalam kamar hitung improved neubauer dan ditutup dengan cover glass, sebelum memasukkan kedalam improved neubauer terlebih dahulu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar larutan yang diambil benar – benar yang telah homogen. Dengan menggunakan mikroskop cahaya banyaknya dihitung jumlah eritrosit pada semua kotak eritrosit.

c. Perhitungan Jumlah Sel Darah Merah (Eritrosit)

Mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor diturunkan atau diafragma dikecilkan, focus diatur dahulu dengan memakai lensa obyektif 10X, diatur sehingga gambaran kamar hitung bujur sangkar dengan jelas batasnya serta distribusi sel darah merah tampak jelas.

Selanjutnya lensa obyektif di ubah 45X dengan hati – hati dan sel darah merah dihitung pada kotak bujur sangkar kecil (warna merah), sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis atas haruslah dihitung,

sedangkan sel yang menyinggung garis batas sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005). Jumlah eritrosit dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Jumlah eritrosit (sel/mm}^3\text{)} = N \times \frac{1}{5 \text{ area} \times \frac{1}{250} (\text{Volume})} \times 200 \text{ (pengenceran)}$$

Keterangan:

N : Jumlah Eritrosit Terhitung (Bijanti, 2005).

d. Pengamatan Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit) (Bijanti, 2005)

Darah ikan yang telah tercampur dengan anti koagulan diambil dengan pipet leukosit sebanyak 0,5  $\mu\text{L}$ , kemudian diencerkan dengan larutan Turk dalam pipet leukosit sampai menunjukkan angka 11  $\mu\text{L}$ . Setelah itu darah yang telah tercampur dikocok hingga homogen dalam pipet tersebut. Kemudian campuran tersebut diambil 2 tetes dan dimasukkan dalam kamar hitung Haemocytometer dan ditutup dengan cover glass, sebelum memasukkan ke dalam Haemocytometer terlebih dahulu dibuang 2 tetes dimaksudkan agar larutan yang diambil benar – benar yang telah homogen. Dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x dan dihitung banyaknya jumlah leukosit.

e. Penghitungan Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

Mikroskop diletakkan pada meja yang datar, lensa kondensor diturunkan atau diafragma dkecilkan, kamar hitung dengan bidang bergarisnya diletakkan dibawah lensa obyektif dan fokus mikroskop diarahkan pada garis – garis tersebut. Leukosit dihitung pada keempat bidang besar (kotak warna hijau). Perhitungan dimulai dari sudut kiri atas, terus ke kanan, kemudian turun ke bawah dan dari kanan ke kiri. Cara seperti ini dilakukan pada keempat bidang besar. Penghitungan dilakukan dengan catatan sel yang menyinggung garis batas sebelah kiri atau garis batas

sebelah kanan atau garis bawah tidak boleh dihitung (Bijanti, 2005).

Jumlah Leukosit dihitung dengan menggunakan rumus: Jumlah Leukosit

$$(\text{sel/mm}^3) = N \times \frac{1}{4 \text{ area} \times 0,1 (\text{Volume})} \times 20 (\text{pengenceran})$$

Keterangan: N : Jumlah Leukosit Terhitung (Bijanti, 2005).

f. Perhitungan Konsentrasi Hemoglobin

Pengukuran hemoglobin menurut (wedemeyer dan Yasutake, 1977;

Wahjuningrum et al., 2008): Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan

dengan metode sahli. Prinsip metode ini adalah mengkonversikan

hemoglobin dalam darah ke dalam bentuk asam hemotin oleh asam

klorida. Darah dihisab menggunakan pipet sahli sampai skala 20 mm<sup>3</sup> dan

dipindahkan ke dalam tabung hemoglobin yang berisi HCL 0,1 N sampai

skala 10 (warna kuning), didalamnya 3-5 menit agar hemoglobin bereaksi

dengan HCL membentuk asam hemotin. Kemudian diaduk dan

ditambahkan akuades sedikit demi sedikit hingga warnanya sama dengan

warna standar. Pembacaan skala lajur gram/100 ml yang berarti

banyaknya hemoglobin dalam gram per 100 ml darah.

g. Pengamatan Mikronuclei Pada Sel Darah Ikan

Sampel darah perifer diperoleh dari vena caudal dari sampel ikan

dandioleskan pada slide yang bersih. Setelah difiksasi dalam etanol murni

selama 20 menit, slide dibiarkan kering udara dan kemudian dilanjutkan

dengan pewarnaan Giemsa 10% selama 25 menit. Pengamatan

dilakukan menggunakan mikroskop Olympus BH2. Lima slide dibuat

dari masing – masing ikan 1.000 eritrosit dilakukan skoring dari setiap

slide diamati di bawah perbesaran 1000 X untuk menentukan frekuensi

inti berlekuk, inti lobed, pemula, memecah-belah dan juga sel micronuclei,

yang dihitung seperti sel per 1000 (‰) (Guner dan Muranh, 2011).

Diikuti tiap sel dan dihitung frekuensi mikronuclei dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Frekuensi Mikronuclei} = \frac{\sum \text{micronuclei} \times (1000)}{\text{Total Sel yang dihitung}}$$

(Betancur et al, 2009)

### 3. Prosedur Analisis Histologi (Immunohistokimia)

Uji histopatologi digunakan untuk mengetahui kerusakan jaringan insang, dan hati ikan yang tercemar Cd. Analisis yang digunakan adalah analisis deskriptif.

#### 1. Metode Pembuatan Preparat

Prosedur dalam pembuatan preparat histologis menggunakan metode standar Luna (1960) dan Bancroft dan Steven (1982) sebagai berikut:

1. Hewan uji dibedah dan diambil organ sampel, diawetkan dengan formalin 4 % selama 24 jam.
2. Fiksasi, memindahkan organ sampel Hewan uji ke dalam paraformaldehida (PFA) selama 24 jam.
3. Dehidrasi, dilakukan secara bertingkat dengan alkohol 70 %, 80 %, 90 %, 95 % serta alkohol masing-masing 1 jam.
4. Clearing, dilakukan selama 1 jam yaitu dimasukkan ke dalam larutan alkohol-xylol, lalu memasukannya ke dalam xylol murni I,II,III masing-masing selama 20 menit.
5. Infiltrasi, menggunakan paraffin. Organ sampel dimasukkan ke dalam xylol:paraffin cair dengan perbandingan 1:1 selama 20 menit di dalam oven dengan suhu 60°
6. Embedding, tahapan menanam jaringan organ sampel. Paraffin cair dituangkan ke dalam cetakan sampai penuh, masukan jaringan organ atau membenamkan potongan organ sampel ke dalam paraffin tersebut.

Jaringan organ sampel diletakan pada posisi dasar tengah dengan posisi melintang. Biarkan sampai paraffin membeku atau mengeras.

7. Sectioning, sampel jaringan organ sampel dipotong menggunakan mikrotom dengan ketebalan 6-10 mikron.
8. Affixing, perekatan dengan menggunakan albumin dan gliserin dengan perbandingan 1:1 disimpan dalam kotak persediaan selama 24 jam.
9. Deparaffinasi, untuk menghilangkan paraffin, sediaan dimasukan ke dalam xylol selama 10 menit.
10. Staining atau pewarnaan, proses pewarnaan dengan menggunakan haematoxylin dan Eosin sebagai berikut:

- Sediaan histologis dihisap xylolnya dengan menggunakan kertas saring kemudian berturut-turut dimasukan ke dalam larutan alkohol 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, dan 30% masing-masing selama 5 menit lalu dicuci dengan aquades selama 5 menit. Dicuci dengan air mengalir selama kurang lebih 2 menit.
- Dimasukan ke dalam haematoxylin selama 4 menit, dicuci dengan air mengalir selama 10 menit . Dimasukan ke dalam aquades dan alkohol 50 %, 60%, 70%, 90%, 95% masing-masing beberapa celupan.

Dimasukan ke dalam eosin selama 1,5 menit , masukan ke dalam alkohol 70 %, 80%, 90%, 95%.

- Preparat dianginkan sampai kering dan dimasukan ke dalam xylol selama 15 menit. Sediaan histologi ditetesi dengan Canada Balsam lalu ditutup dengan cover glass.

11. Mounting dan labelling penutupan preparat dengan menggunakan kaca penutup (Cover glass) dan memberi identitas pada preparat organ mata dan otak.

12. Pengamatan dan perhitungan jumlah sel organ sampel pada jaringan menggunakan mikroskop binokuler merk Olympus BX41 dengan pembesaran 40-1000x dan difoto menggunakan kamera digital merk Olympus tipe CX21FS1.

#### 4. Metode Pengamatan Immunohistokimia

##### Pengamatan Densitas dan Intensitas Metallothionein Pada Jaringan

##### Organ Sampel Ikan Gambusia

##### 1. Pembedahan dan Pengawetan Organ sampel Ikan Gambusia

Menurut Farabi (2012), pembedahan dan pengawetan jaringan dapat dilakukan dengan cara :

- a. Organ dalam dibedah menggunakan sectio set
- b. Kemudian organ sampel Ikan Gambusia diambil dan ditimbang
- c. Organ sampel dimasukkan ke dalam botol kaca yang telah diisi dengan larutan formalin 10%

##### 2. Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histopatologi menurut Muntiha (2001), prosedur histopatologi antara lain :

- a. Organ difiksasi dengan formalin 10% selama semalam.
- b. Pemotongan Jaringan Makros.
  1. Diambil organ yang telah difiksasi.
  2. Jaringan dipotong dengan ketebalan 0,3-0,5 mm.
  3. Jaringan disusun kedalam tissue cassette sesuai dengan kode.
  4. Dimasukkan 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. Diletakkan keranjang di dalam mesin vakum untuk penghilangan udara dari jaringan dengan temperatur (59-60°C) selama 30 menit.

2. Keranjang diambil dan dikeluarkan tissue cassette.

e. Pengeblokan

1. Dihangatkan paraffin cair, pinset, dan cetakan.
2. Paraffin cair dituangkan kedalam cetakan.
3. Jaringan dari Tissue Tex Prosesor dimasukkan kedalam cetakan yang telah diisi paraffin 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. Rapikan sisi-sisi blok. Ganti etiket dengan yang permanen.
7. Disimpan di freezer.

f. Pemotongan dengan Mikrotom

1. Blok dijepit pada mikrotom.
2. Blok paraffin dipotong dengan pisau mikrotom. Kemiringan :  $\pm 300$ . Tebal  $\pm 2-5$  mikron.
3. Hasil pemotongan (berupa pita/irisan tipis yang saling bersambung) dimasukkan kedalam waterbath yang diisi air yang

sudah dihangatkan  $50^{\circ}\text{C}$ , kemudian diambil dengan kaca objek (Meletakkan potongan di waterbath tidak boleh terbalik).

4. Disusun dalam object glass box.

5. Dimasukkan ke dalam inkubator bersuhu  $60^{\circ}\text{C}$

### 3. Pewarnaan Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan dengan menggunakan sampel bagian organ sampel Ikan Gambusia menurut Larasati (2010), yaitu sebagai berikut:

1. Lakukan deparafinasi preparat (blok parafin) dengan xylol sebanyak 3 kali masing-masing 3 menit.
2. Rehidrasi preparat dengan menggunakan etanol 100%, 95% dan 70%. Masing-masing selama dua menit, dua menit, dan satu menit
3. Masing-masing sample ditetesi CDS sebanyak 3 kali setiap 5 menit. CDS berfungsi dalam menstabilkan pH jaringan.
4. Ditetesi 3CDTA dan dibiarkan selama 10 menit. Berfungsi sebagai fiksasi jaringan.
5. Ditetesi Na-sitrat dan dibiarkan selama 10 menit.
6. Dibilas dengan CDS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
7. Ditetesi  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3% dan dibiarkan selama 30 menit.
8. Dibilas dengan CDS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
9. Diinkubasi serum 1% in CDS dan ditunggu selama 30 menit.
10. Ditetesi antibody Metallothionein dan diinkubasi dikulkas selama 1 malam
11. Dibilas dengan CDS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
12. Ditetesi 2nd AB in CDS dengan perbandingan 1:200 dan dibiarkan selama 60 menit.
13. Dibilas dengan CDS sebanyak 3 kali setiap 5 menit.
14. Ditetesi detection antibody dan dibiarkan selama 60 menit.
15. Dibilas CDS sebanyak 2 kali setiap 5 menit.

16. Dicuci aquades dan dibiarkan selama 5 menit.

17. Ditetesi DAB (Male Fresh) dengan perbandingan 1:46 hingga berwarna coklat.

18. Dibilas dengan  $D_2H_2O$ .

19. Ditetesi dengan haematoxylin selama 10 menit.

20. Dibilas dengan  $D_2H_2O$ .

21. Dibilas dengan air kran.

#### 4. Pengamatan Mikroskop

Pada pengamatan mikroskop, digunakan dot slide mikroskop dengan merk OLYMPUS SN 3K19322 :

##### a. Fungsi Scan

1. Nyalakan seluruh power, mikroskop, CPU, layar monitor, dan power server.
2. Tunggu sampai proses loading selesai.
3. Setelah computer siap, klik 2 kali Dot Slide.
4. Untuk proses scan diprogram dot slide ada lima pilihan koak yang terdiri dua baris atas dan bawah.
5. Kotak atas digunakan untuk single scan (satu slide).
6. Kotak bawah digunakan untuk multisingle scan (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 joystick sesuai gambar objek yang dimaksud.
3. Atur focus di joystick, 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.

5. Analisis Densitas metallothionein

Prosedur analisis densitas metallothionein dapat dilakukan dengan dua cara yaitu sebagai berikut :

a. Manual

1. Menyalakan computer
2. Menunggu sampai proses loading selesai
3. Setelah komputer siap, buka perangkat lunak olyVIA
4. Membuka scan gambar pada file
5. Memilih gambar yang diperlukan menggunakan image navigator
6. Menghitung banyak metallothionein menggunakan hand tally counter.

b. Otomatis

• olyVIA

1. Menyalakan komputer
2. Tunggu sampai proses loading selesai
3. Buka perangkat lunak olyVIA
4. Buka scan gambar pada file

5. Memilih gambar yang diperlukan menggunakan image navigator di layar

6. Klik copy display to clipboard untuk memindah gambar

- Paint

1. Klik start pada layar komputer

2. Buka Paint

3. Klik copy display to clipboard untuk memindah gambar

4. Pada Paint, pilih paste

5. Pilih save as untuk menyimpan gambar

- imageJ

1. Buka Mozilla Firefox/Google Chrome atau web browser lainnya

2. Download ITCN 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. Results, didapatkan hasil jumlah MT pada gambar

## 5. Prosedur Analisis Kadar Metallothionein (CLSM-ELISA)

### 1. Tahap Homogenasi

- Menggerus jaringan dalam mortal yang sudah didinginkan dan menambahkan 3 ml buffer homogenisasi (0,5 M sukrosa, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8,6, mengandung 0,01%  $\beta$ -mercaptoethanol) dalam plastik atau tabung kaca.

- Menghomogenasi jaringan dengan menggunakan homogenizer jaringan.

- Menambahkan kedalam homogenat dengan Aliquot (larutan induk) (3ml).

- Sebagai kontrol, jumlah yang diketahui dari standar metalotionein untuk mengkalibrasi hasil sampel yang diperoleh. Aliquot dapat disimpan pada -20 °C.

- Percobaan dapat berhenti di langkah ini.

## 2. Tahap ekstraksi

- Mensentrifugasi homogenat di 30.000 x g selama 20 menit untuk mendapatkan supernatan yang mengandung metalotionein.

- Menambahkan 1,05 ml etanol absolute dingin ( -20 °C) dan 80 ml kloroform per 1 ml supernatan yang dihasilkan.

- Mensentrifugasi sampel dingin (pada 0 - 4 °C) pada 6000 x g selama 10 menit.

- Menambahkan 3 ml etanol dingin pada supernatan yang dihasilkan dan menyimpan pada suhu -20 °C selama 1 jam

- Langkah analisis bisa berhenti saat ini.

## 3. Tahap Pemurnian dan Kuantifikasi Metalotionein

- Mensentrifugasi supernatan pada 6000 x g selama 10 menit.

- Mencuci pelet yang dihasilkan dengan etanol: kloroform: homogenisasi penyangga (87:1:12)

- Mensentrifugasi lagi pada 6000 x g selama 10 menit.

- Mengeringkan di bawah aliran gas nitrogen untuk menyelesaikan penguapan.

- Resuspended pelet kering dalam 300 ml dari 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.

- Mensuspensikan fraksi metalotionein menjadi 4,2 ml 0,43 mM 5,5 dithiobis (*asam nitrobenzoic*) dalam buffer fosfat 0,2 M, pH 8.

- Mendinginkan selama 30 menit pada suhu kamar untuk mengurangi konsentrasi sulfhidril

- Membaca absorbansi pada 412 nm dalam spektrofotometer.

- Mencatat hasilnya.

#### 4. Tahap Estimasi

- Sebuah kurva standar dengan glutation (GSH) digunakan sebagai acuan standar untuk kuantifikasi adanya MT pada sampel.

- GSH berisi satu sistein per molekul, dengan demikian, itu adalah standar untuk mengukur sistein dalam analisis protein.

Jumlah metalotionein dalam sampel diperkirakan menggunakan GSH yang standar, dengan asumsi bahwa 1 mol MT berisi 20 mol sistein. Sebagai contoh, dari kurva standar, jika didapatkan nilai absorbansi pada sampel 2,5, maka nilai  $x$  adalah 0,44 (dari perhitungan yang diperoleh persamaan kurva standar GSH adalah  $x = (2,5 - 0,0524) / 5,5553$ ). Sehingga kadar MT adalah  $0,44 / 20 = 0,022$  umol

Prosedur analisis intensitas metallothionein dapat dilakukan dengan cara yaitu sebagai berikut :

- olyVIA
  1. Menyalakan komputer
  2. Tunggu sampai proses loading selesai
  3. Buka perangkat lunak olyVIA
  4. Buka scan gambar pada file
  5. Memilih gambar yang diperlukan menggunakan image navigator di layar
  6. Klik copy display to cliCdoard untuk memindah gambar

- Paint

1. Klik start pada layar komputer
2. Buka Paint
3. Klik copy display to clipboard untuk memindah gambar
4. Pada Paint, pilih paste
5. Pilih save as untuk menyimpan gambar

- imageJ

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.
6. Tekan M pada keyboard untuk mengetahui hasil ukuran warna.

### Lampiran 3. Analisa Perhitungan Statistik

#### Analisa One Way Anova Logam Berat

##### Descriptives

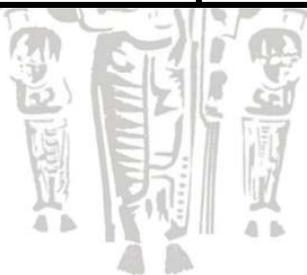
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	Between-Component Variance
						Lower Bound	Upper Bound			
A	0.45	3	.5800	.13229	.07638	.2514	.9086	.48	.73	
	0.452	1	.8300	.	.	.	.	.83	.83	
	0.454	1	.6000	.	.	.	.	.60	.60	
	Total	5	.6340	.14433	.06454	.4548	.8132	.48	.83	
	Model	Fixed Effects			.13229	.05916	.3795	.8885		
	Random Effects				.07479	.3122	.9558			.00476
B	0.45	3	.5167	.07371	.04256	.3336	.6998	.46	.60	
	0.452	1	.7300	.	.	.	.	.73	.73	
	0.454	1	.5400	.	.	.	.	.54	.54	
	Total	5	.5640	.10691	.04781	.4313	.6967	.46	.73	
	Model	Fixed Effects			.07371	.03296	.4222	.7058		
	Random Effects				.06969	.2642	.8638			.00857
C	0.45	3	.4967	.03786	.02186	.4026	.5907	.47	.54	
	0.452	1	.6900	.	.	.	.	.69	.69	
	0.454	1	.5300	.	.	.	.	.53	.53	
	Total	5	.5420	.08815	.03942	.4326	.6514	.47	.69	
	Model	Fixed Effects			.03786	.01693	.4692	.6148		
	Random Effects				.06534	.2609	.8231			.00905
D	0.45	3	.5010	.01652	.00954	.4600	.5420	.49	.52	
	0.452	1	.6300	.	.	.	.	.63	.63	
	0.454	1	.5100	.	.	.	.	.51	.51	
	Total	5	.5286	.05801	.02594	.4566	.6006	.49	.63	

	Model	Fixed Effects			.01652	.00739	.4968	.5604		
		Random Effects				.04470	.3363	.7209		.00442
E	0.45		3	.4667	.02082	.01202	.4150	.5184	.45	.49
	0.452		1	.5200	.	.	.	.	.52	.52
	0.454		1	.4600	.	.	.	.	.46	.46
	Total		5	.4760	.02881	.01288	.4402	.5118	.45	.52
	Model	Fixed Effects			.02082	.00931	.4359	.5161		
		Random Effects				.01833	.3971	.5549		.00057

## ANOVA

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	(Combined)	.048	2	.024	1.381	.420
		L Unweighted	.000	1	.000	.017	.908
		Line Deviation	.005	1	.005	.293	.643
		ar	.043	1	.043	2.469	.257
		Term					
		Within Groups		.035	2	.017	
	Total		.083	4			
B	Between Groups	(Combined)	.035	2	.017	3.207	.238
		L Unweighted	.000	1	.000	.075	.810
		Line Deviation	.004	1	.004	.801	.465
		ar	.031	1	.031	5.614	.141
		Term					
		Within Groups		.011	2	.005	
	Total		.046	4			
C	Between Groups	(Combined)	.028	2	.014	9.842	.092
		Line Unweighted	.001	1	.001	.581	.525
		Line Weighted	.005	1	.005	3.352	.209

		ar Deviation					
		T	.023	1	.023	16.331	.056
		er					
		m					
		Within Groups	.003	2	.001		
		Total	.031	4			
D	Between	(Combined)	.013	2	.006	23.651	.041
	Groups	Li Unweighted	.000	1	.000	.223	.684
		ne Weighted	.001	1	.001	4.718	.162
		ar T Deviation					
		er	.012	1	.012	42.583	.023
		m					
		Within Groups	.001	2	.000		
		Total	.013	4			
E	Between	(Combined)	.002	2	.001	2.831	.261
	Groups	L Unweighted	.000	1	.000	.077	.808
		i Weighted	.000	1	.000	.104	.778
		n e Deviation					
		a					
		r T	.002	1	.002	5.558	.142
		er					
		m					
		Within Groups	.001	2	.000		
		Total	.003	4			



## Analisa ROS

## Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
A	1	22.375	1.973750E2	.	.	.	197.3750	197.3750
	1	22.384	1.893820E2	.	.	.	189.3820	189.3820
	1	23.473	1.982830E2	.	.	.	198.2830	198.2830
Total	3	1.950133E2	4.8979641	2.8278409E0	182.846116	207.180551	189.3820	198.2830
B	1	22.375	1.648750E2	.	.	.	164.8750	164.8750
	1	22.384	1.592980E2	.	.	.	159.2980	159.2980
	1	23.473	1.734890E2	.	.	.	173.4890	173.4890
Total	3	1.658873E2	7.1494569	4.1277409E0	148.127098	183.647569	159.2980	173.4890
C	1	22.375	8.987500E1	.	.	.	89.8750	89.8750
	1	22.384	7.839200E1	.	.	.	78.3920	78.3920
	1	23.473	9.023800E1	.	.	.	90.2380	90.2380
Total	3	8.616833E1	6.7369476	3.8895785E0	69.432828	102.903839	78.3920	90.2380
D	1	22.375	2.612500E1	.	.	.	26.1250	26.1250
	1	22.384	3.239400E1	.	.	.	32.3940	32.3940
	1	23.473	2.838200E1	.	.	.	28.3820	28.3820
Total	3	2.896700E1	3.1751786	1.8331902E0	21.079419	36.854581	26.1250	32.3940
E	1	22.375	2.987500E1	.	.	.	29.8750	29.8750
	1	22.384	2.438900E1	.	.	.	24.3890	24.3890
	1	23.473	3.039200E1	.	.	.	30.3920	30.3920
Total	3	2.821867E1	3.3266473	1.9206407E0	19.954817	36.482517	24.3890	30.3920

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	47.980	2	23.990		
	Li Contrast	15.714	1	15.714		
	n e Deviation					
	ar T er m	32.266	1	32.266		
	Within Groups	.000	0	.		
Total	47.980	2				
B	Between Groups	102.229	2	51.115		
	Li Contrast	86.151	1	86.151		
	n e Deviation					
	ar T er m	16.078	1	16.078		
	Within Groups	.000	0	.		
Total	102.229	2				
C	Between Groups	90.773	2	45.386		
	Li Contrast	24.268	1	24.268		
	n e Deviation					
	ar T er m	66.504	1	66.504		
	Within Groups	.000	0	.		
Total	90.773	2				
D	Between Groups	20.164	2	10.082		
	Li Contrast	.469	1	.469		
	n e Deviation					
	ar T er m	19.694	1	19.694		
	Within Groups	.000	0	.		
Total	20.164	2				
E	Between Groups	22.133	2	11.067		
	Li Contrast	6.938	1	6.938		
	n e Deviation					
	ar T er m	15.195	1	15.195		
	Within Groups	.000	0	.		
Total	22.133	2				

## Analisa MDA

## Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
A	702.5	1	7.341670E2	.	.	.	.	734.1670	734.1670
	705.167	1	7.515000E2	.	.	.	.	751.5000	751.5000
	710.297	1	7.478330E2	.	.	.	.	747.8330	747.8330
Total	3	7.445000E2	9.1345437	5.2738313E0	721.808535	767.191465	734.1670	751.5000	
B	702.5	1	7.501670E2	.	.	.	.	750.1670	750.1670
	705.167	1	7.318330E2	.	.	.	.	731.8330	731.8330
	710.297	1	7.321670E2	.	.	.	.	732.1670	732.1670
Total	3	7.380557E2	10.4900517	6.0564342E0	711.996934	764.114400	731.8330	750.1670	
C	702.5	1	7.075000E2	.	.	.	.	707.5000	707.5000
	705.167	1	7.191670E2	.	.	.	.	719.1670	719.1670
	710.297	1	7.391670E2	.	.	.	.	739.1670	739.1670
Total	3	7.219447E2	16.0151896	9.2463740E0	682.160730	761.728603	707.5000	739.1670	
D	702.5	1	7.398330E2	.	.	.	.	739.8330	739.8330
	705.167	1	7.195000E2	.	.	.	.	719.5000	719.5000
	710.297	1	7.021670E2	.	.	.	.	702.1670	702.1670
Total	3	7.205000E2	18.8529013	1.0884728E1	673.666797	767.333203	702.1670	739.8330	
E	702.5	1	7.191670E2	.	.	.	.	719.1670	719.1670
	705.167	1	7.088330E2	.	.	.	.	708.8330	708.8330
	710.297	1	7.031670E2	.	.	.	.	703.1670	703.1670
Total	3	7.103890E2	8.1126970	4.6838678E0	690.235944	730.542056	703.1670	719.1670	

## ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
A	Between Groups	166.880	2	83.440	.	.
	Linear Contrast	63.494	1	63.494	.	.
	Quadratic Deviation	103.386	1	103.386	.	.
	Within Groups	.000	0	.	.	.
	Total	166.880	2			

B	Between Groups	(Combined)	220.082	2	110.041		
		Linear Contrast	124.411	1	124.411		
		Residual Deviation					
		Total	95.671	1	95.671		
	Within Groups		.000	0			
	Total		220.082	2			
C	Between Groups	(Combined)	512.973	2	256.486		
		Linear Contrast	512.523	1	512.523		
		Residual Deviation					
		Total	.450	1	.450		
	Within Groups		.000	0			
	Total		512.973	2			
D	Between Groups	(Combined)	710.864	2	355.432		
		Linear Contrast	675.061	1	675.061		
		Residual Deviation					
		Total	35.803	1	35.803		
	Within Groups		.000	0			
	Total		710.864	2			
E	Between Groups	(Combined)	131.632	2	65.816		
		Linear Contrast	116.385	1	116.385		
		Residual Deviation					
		Total	15.247	1	15.247		
	Within Groups		.000	0			
	Total		131.632	2			

