

HUBUNGAN KADAR LOGAM BERAT TIMBEL (Pb), CADMIUM (Cd) DAN MERKURI (Hg) TERHADAP EKSPRESI METALLOTHIONEIN (MT) PADA LAMBUNG TIRAM (*Crasostrea iradalei*)

Asus Maizar Suryanto Hertika*, Fitryadhi Akbar Hidayatullah, Mulyanto

¹ Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya,
Jl. Veteran, Malang 65145, Indonesia
Email: asusmaizar@yahoo.com

Abstrak - Pencemaran logam berat merupakan salah satu problem yang sering terjadi di wilayah pesisir. Masukan logam berat tersebut terutama dari aliran sungai yang bermuara ke pesisir dan juga aktifitas di wilayah pesisir. Untuk mendeteksi pencemaran logam berat dapat digunakan biomarker Metallothionein (MT) yang terekspresi, karena sifat MT merupakan protein yang mengikat logam esensial maupun non esensial pada tubuh organisme. Penelitian ini bertujuan untuk menghitung nilai densitas maupun intensitas MT yang terekspresi pada jaringan lambung tiram *Crassostrea iradalei*, serta untuk mengetahui hubungan antara kadar logam berat Pb, Cd, dan Hg terhadap nilai densitas dan intensitas MT pada lambung tiram *Crassostrea iradalei*. Metode yang digunakan adalah deskriptif, sampel tiram diambil dari tiga stasiun di pantai Talang Siring, Pamekasan, Madura. Analisis nilai densitas dan intensitas MT digunakan metode Imunohistokimia, selanjutnya preparat di scan dengan mikroskop OLYMPUS SN 3K19322. Estimasi densitas dan intensitas dengan program imagej. Analisis kadar logam berat menggunakan metode Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS). Hasil penelitian menunjukkan kandungan logam berat pada lambung Tiram *Crassostrea iradalei* Pb berkisar 0,76 - 1,14 mg/l, Cd berkisar 0,7 - 0,22 mg/l, dan Hg berkisar 0,1 - 0,16 mg/l. Hasil analisis kadar Densitas Metallothionein pada lambung tiram menunjukkan nilai $266,9 \times 10^{-4} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$. $83,5 \times 10^{-4} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$. Hasil analisis regresi korelasi hubungan antara logam berat serta ukuran tiram terhadap densitas MT dari ketiga stasiun diperoleh koefisien korelasi (r) = 0,620 - 0,812, Hasil analisis Intensitas Metallothionein pada lambung tiram menunjukkan nilai berkisar antara 16.025 - 21.337 pixel. Hasil analisis regresi korelasi hubungan antara logam berat serta ukuran tiram terhadap intensitas MT dari ketiga stasiun diperoleh koefisien korelasi (r) berkisar antara 0,712 - 0,919, sehingga menunjukkan hubungan tergolong sangat kuat.

Kata Kunci : Logam berat, Metallothionein, *Crassostrea iradalei*

Abstract-Heavy metal pollution is one of the problems that often occurs in coastal areas and streams that flow into coastal areas or also activities in coastal areas. To detect heavy metal pollution can be used biomarker metallothionein (MT) expression. The nature of MT is a protein that binds to metals essential and non-essential in the body of the organism. This study aimed to calculate the density and intensity MT in the stomach tissue of the oyster *Crassostrea iradalei*, as well as to determine the relationship between levels of heavy metals Pb, Cd, and Hg to the density and intensity MT of the oyster stomach. The method used descriptive, oyster samples taken from the three stations on the beach Talang Siring, Pamekasan, Madura. Analysis of the density and intensity of MT used methods Immunohistochemistry, further preparations scanned with a microscope OLYMPUS SN 3K19322. Estimates of density and intensity with ImageJ program. Analysis of levels of heavy metals using Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS). The results showed the heavy metal content of the stomach oyster *Crassostrea iradalei*, Pb ranges from 0.76 to 1.14 mg / l, Cd ranges from 0.7 to .22 mg / l, and Hg ranged from 0.1 to 0.16 mg / l, The results of the analysis of density MT levels in the stomach oysters showed the value of $266.9 \times 10^{-4} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$. $83.5 \times 10^{-4} \text{ MT}/\mu\text{m}^2$. The regression and correlation analysis between heavy metals as well as the size of the oysters on the MT density of the third station showed the correlation coefficient (r) = 0.620 to 0.812, the results of the analysis of MT intensity in the stomach oysters indicates the value range between 16025-21337 pixel. The regression and correlation analysis between heavy metals as well as the size of the oysters to the MT intensity of the third station showed the correlation coefficient (r) ranged from 0.712 to 0.919, thus showed very strong relationship.

Key Words: Heavy Metals, Metallothionein, *Crassostrea iradalei*

I. PENDAHULUAN

Pantai Talang siring terletak di dipesisir Selatan pulau Madura dengan beragam aktifitas manusia. Hal tersebut dikhawatirkan akan menimbulkan pencemaran khususnya logam berat (Hg, Pb, dan Cd). Mekanisme umum toksisitas ion logam dapat dibagi dalam tiga kategori: (1) menghalangi fungsi kelompok fungsional biologis penting terutama protein dan enzim, (2) menggantikan ion logam esensial dalam biomolekul, dan (3) memodifikasi struktur aktif biomolekul yang berakibat terhadap terganggunya fungsi spesifiknya (Murthy *et. al.*, 2011).

Tiram termasuk spesies makrofauna benthik yang merupakan salah satu bioindikator terbaik untuk mengetahui tingkat kontaminasi logam berat di suatu daerah. Tiram merupakan biota yang potensial terkontaminasi logam berat, karena sifatnya yang *filter feeder*, sehingga biota ini sering digunakan sebagai hewan uji dalam pemantauan tingkat akumulasi logam berat pada organisme laut jenis bivalvia [1]. *Crassostrea iridalei* yang merupakan salah satu jenis tiram yang hidup pada habitat mangrove. Tiram ini dapat mengakumulasi logam berat dari perairan. Keberadaan tiram telah banyak digunakan sebagai indikator pencemaran logam dalam ekosistem laut. Metallothionein yang terdapat pada tiram dianggap sebagai biomarker yang baik terhadap paparan logam berat. Hal ini bahwa metallothionein penting terhadap pertahanan detoksifikasi logam non-esensial seperti timbal, kadmium dan merkuri [2].

Organisme menanggapi stres logam berat menggunakan sistem pertahanan yang berbeda seperti pengucilan, kompartementalisasi, pembentukan kompleks dan sintesis protein pengikat seperti Metallothionein (MT) dan phytochelatins (PC) [3] dan Murthy *et. al.*, 2011. Metallothionein (MT) adalah protein non-enzimatik yang mempunyai kandungan sistein tinggi, tidak mempunyai asam amino aromatik dan tidak stabil oleh panas. Gugus tiol dari kelompok ini (-SH) merupakan residu sistein yang memungkinkan MT mengikat logam berat. MT dilaporkan terdapat pada vertebrata, termasuk banyak spesies ikan dan avertebrata air [4], terutama pada moluska [5]. Fungsi Metallothionein [6], [7], [4] diperkirakan terlibat pada proses homeostasi detoksifikasi kelebihan logam esensial dan non esensial.

Keadaan pantai Talang Siring Pamekasan yang memiliki karakteristik lingkungan pesisir dengan berbagai macam aktifitas manusia seperti penangkapan, dan pariwisata, yang menghasilkan berbagai macam bahan pencemar diantaranya logam

berat. Keberadaan Metallothionein pada tiram dapat digunakan untuk mendeteksi adanya pencemaran logam berat di perairan. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui ekspresi densitas intensitas metallothionein pada lambung tiram *Crassostrea iridalei* yang hidup pada Pantai Talang Siring Pamekasan Madura dan hubungannya dengan kadar logam berat Pb, Cd dan Hg didalam lambung tiram.

II. METODE PENELITIAN

Metode penelitian adalah deskriptif, Penelitian dilakukan di Pantai Talang Siring, Pamekasan, Madura, untuk pengukuran logam berat di perairan dan lambung tiram dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA UB, pembuatan preparat dan scanning preparat dilakukan di laboratorium Anatomi Fak. Kedokteran UB, dan laboratorium Fisiologi dan Ilmu Faal Fak Kedokteran UB untuk prosedur pewarnaan imunohistokimia. Sampel tiram diambil dari tiga stasiun di pantai Talang Siring, Pamekasan, Madura. Stasiun 1 terletak di daerah mangrove, stasiun 2 terletak di area wisata dan penambatan kapal nelayan, stasiun 3 terletak di wilayah penangkapan ikan. Stasiun pengamatan pada gambar 1



Gambar 1. Lokasi Penelitian dan Letak stasiun (Google earth, 2015)

Sampel tiram diambil pada saat surut terendah di daerah intertidal. Pengambilan sampel dilakukan pada 3 stasiun yang telah ditentukan. Dari 3 stasiun tersebut, masing-masing titik diambil 3 sampel tiram, jadi banyak sampel keseluruhan berjumlah 9 sampel. Sampel untuk menentukan kadar logam berat di perairan diambil sebelum air surut. Logam berat di perairan dan organ lambung tiram dikur dengan prosedur *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS)

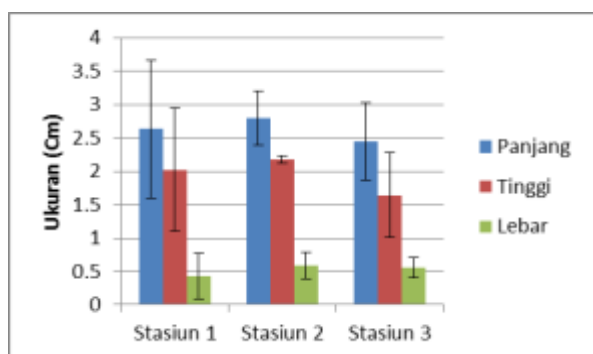
Prosedur penelitian untuk meliputi: 1). Preparasi sampel tiram *Crassostrea iridalei* yaitu mengukur tiram panjang, lebar dan tingginya, selanjutnya dilakukan pembedahan untuk mengambil organ lambung, 2). Pembuatan preparat irisan jaringan [8]

meliputi fiksasi organ dengan formalin 10% selama semalam, pemotongan jaringan makros, proses dehidrasi, proses vakum, pengeblokan, pemotongan dengan mikrotom, 3). Pewarnaan imunohistokimia (IHK) [9], 4) Scanning dengan preparat dot slide OLYMPUS SN 3K19322, 5) estimasi nilai densitas dan intensitas Metallothionein dengan bantuan program imagej.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ukuran Tiram

Hasil pengukuran dimensi panjang, lebar dan tinggi kerang menunjukkan rata-rata terbesar pada stasiun 2 dengan nilai panjang 2,79 cm, tinggi 2,18 cm, dan lebar 0,59 cm, sedangkan ukuran tiram terkecil pada stasiun 3 dengan nilai panjang 2,44 cm, tinggi 1,64 cm, dan lebar 0,56 cm. Dimensi ukuran kerang disajikan pada Gambar 2.

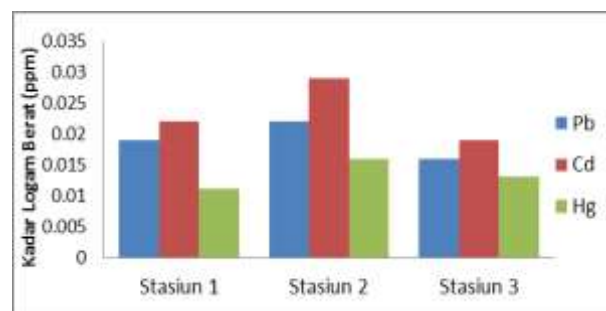


Gambar 2. Dimensi Ukuran Tiram

Hasil penelitian menunjukkan rata rata ukuran tiram terbesar pada stasiun 2 dan terkecil adalah ukuran tiram dari stasiun 3. Ukuran tiram berpengaruh terhadap kadar metallothionein pada tiram tersebut. Selain itu umur tiram juga sangat berpengaruh terhadap daya akumulasi logam berat yang ada di lingkungannya. Diduga semakin besar ukuran tiram (tua), semakin banyak tiram tersebut menyerap logam berat dan semakin banyak pula produksi metallothionein yang dihasilkan oleh tiram tersebut. Hal ini sesuai menurut Amiard [6], bahwa metabolisme dan ukuran tiram sangat mempengaruhi terhadap kandungan metallothionein pada tiram tersebut, dimana semakin besar ukuran tiram maka kadar metallothionein juga semakin tinggi. Begitu juga Isani dan Carpena [10], mengatakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kadar metallothionein dalam tiram yaitu umur tiram.

Kadar Logam Berat di Perairan

Kadar logam berat Pb, Cd dan Hg pada perairan pantai Talang Siring di ketiga stasiun menunjukkan hasil yang berbeda-beda, hal ini dikarenakan adanya perbedaan karakteristik maupun sumber bahan pencemar dari tiap stasiun pengamatan. Hasil pengukuran kadar logam berat di perairan ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kadar Logam Di Perairan

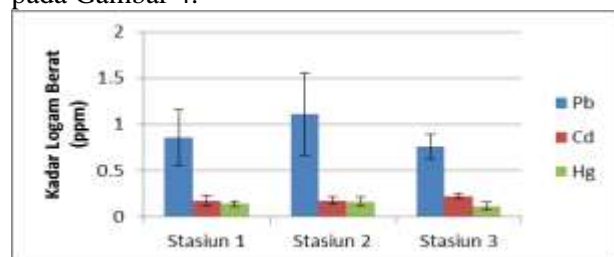
Secara keseluruhan, kadar logam berat Pb pada perairan pantai Talang Siring di tiga stasiun berkisar antara 0,016 – 0,022 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kadar logam berat Pb di perairan pantai Talang Siring masih di bawah ambang batas yang telah ditetapkan oleh Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001 yaitu sebesar 0,03 ppm. Namun jika dibandingkan dengan Kepmen LH No. 51 Tahun 2004, kadar logam berat Pb di perairan Talang Siring telah melampaui batas yang diperbolehkan untuk kehidupan biota laut, yaitu sebesar 0,008 ppm.

Kadar logam berat Cd pada perairan pantai Talang Siring di tiga stasiun berkisar antara 0,019 – 0,029 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kadar logam berat Cd di perairan pantai Talang Siring telah melewati ambang batas yang diperbolehkan untuk kepentingan biota laut. Menurut Kementrian Negara Kependudukan dan Lingkungan Hidup No. 02 Tahun 1988, nilai ambang batas Cd untuk kepentingan biota laut tidak boleh lebih dari 0,01 ppm.

kadar logam berat Hg pada perairan pantai Talang Siring di tiga stasiun berkisar antara 0,011 – 0,016 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kadar logam berat Hg di perairan pantai Talang Siring telah melewati ambang batas yang diperbolehkan untuk kepentingan biota laut. Menurut Peraturan Pemerintah No. 82 Tahun 2001, nilai ambang batas Hg untuk kepentingan biota laut tidak boleh lebih dari 0,002 ppm. Begitu pula jika dibandingkan dengan Kepmen LH No. 51 Tahun 2004 tentang baku mutu air laut untuk biota laut, nilai ambang batas Hg untuk kepentingan biota laut tidak boleh lebih dari 0,001 ppm.

Kadar Logam Berat di Lambung Tiram

Hasil pengukuran kadar logam berat di lambung tiram yang diambil dari ketiga stasiun ditunjukkan pada Gambar 4.

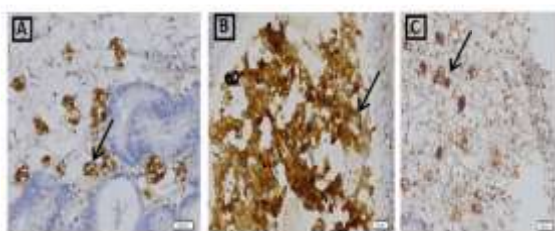


Gambar 4. Kadar logam Berat Pada Lambung Tiram

Gambar 4. Menunjukkan bahwa pada lambung tiram *C.iredalei* yang diambil dari stasiun 1 kadar logam berat Pb 0,856 ppm, Cd 0,174 ppm dan Hg 0,139 ppm. Sementara kadar pada Pb 1,143 ppm, Cd 0,176 ppm, dan Hg 0,164 ppm, dan pada stasiun 3 kadar logam berat Pb 0,75 ppm, Cd 0,22 ppm, dan Hg 0,113 ppm. Menurut Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan (POM) No. 03725/B/SK/VII/89 dalam Wulandari *et al.* (2012), batas maksimum cemaran logam berat dalam bahan pangan, untuk Hg adalah 0,5 mg/l, Cd 1 mg/l dan Pb 2 mg/l.

Nilai Densitas dan Intensitas Metallothionein

Hasil pewarnaan imunohistokimia sampel lambung tiram *Crassostrea iradalei* ditunjukkan pada Gambar 5.

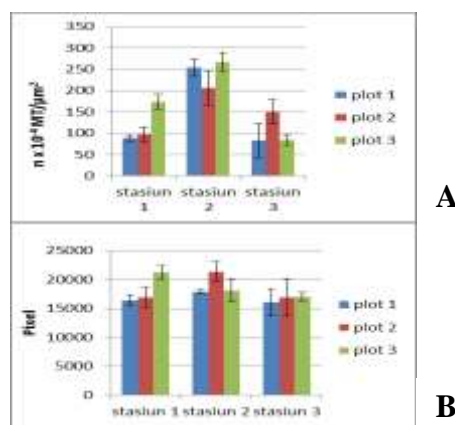


Gambar 5. Contoh Hasil Pewarnaan Imunohistokimia Preparat Lambung Tiram *Crassostrea iradalei* dari sampel yang diambil (A) Stasiun 1, (B) Stasiun 2, dan (C) stasiun 3. Blok warna coklat (tanda panah) menunjukkan ekspresi metallothionein (MT). Scan dengan mikroskop dot slide OLYMPUS SN 3K19322. Skala 20 μ m.

Proses terbentuknya warna coklat melalui prosedur imunohistokimia dijelaskan oleh Ramos-Vara [11], bahwa prinsip metode ini adalah peroksidase, yaitu antigen yang ada pada jaringan diikat dengan antibody primer yang spesifik. Lalu antibody primer yang terikat antigen kemudian diikat pula dengan antibody sekunder (antibody

primer) yang telah dilabel enzim peroksidase. Penambahan substrat yang berisi kromogen dan H_2O_2 akan memunculkan endapan berwarna coklat dan H_2O . Endapan coklat merupakan hasil penguraian substrat (kromogen dan H_2O) oleh enzim peroksidase. Warna coklat yang muncul menandakan reaksi positif (+), yang artinya didalam jaringan terdapat antigen. Apabila jaringan tersebut tidak terdapat antigen, maka tidak akan muncul warna coklat.

Berdasarkan gambar hasil scan preparat yang diperoleh kemudian dianalisis Densitas dan Intensitas MT yang terekspresi, hasil estimasi nilai densitas dan intensitas MT disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Nilai Densitas (A) dan Intensitas (B) Metallothionein dari Ketiga Stasiun

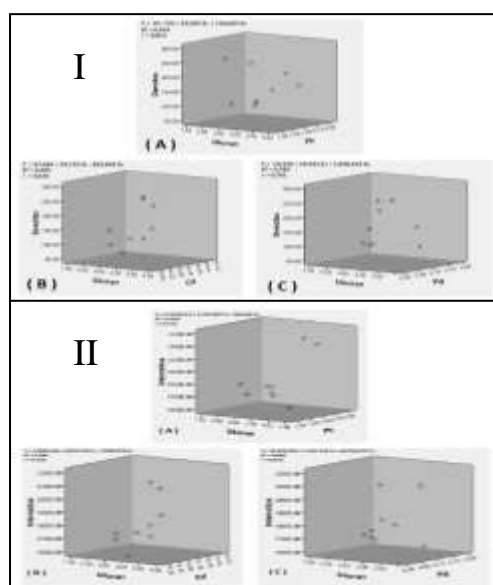
Dari hasil penelitian ditemukan bahwa nilai rata-rata densitas metallothionein pada stasiun 1 berkisar antara $88,3 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$ - $173,8 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$, pada stasiun 2 berkisar antara $206,3 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$ - $266,9 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$, dan pada stasiun 3 berkisar antara $83,5 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$ - $150,4 \times 10^{-4} MT/\mu m^2$. Hasil perhitungan intensitas MT pada stasiun 1 berkisar antara 16427 pixel - 21247 pixel, stasiun 2 berkisar antara 17908 pixel - 21337 pixel dan pada stasiun 3 berkisar antara 16025 pixel - 17058 pixel.

Melissa *et al.*, [12], menyatakan bahwa satuan pixel merupakan dasar satuan komparasi analisis kuantitatif untuk ekspresi protein dalam penggunaan imunofluorescent untuk mengenali dan sebagai pembeda warna gelap untuk metallothionein. Algoritma ini digunakan untuk mengukur ekspresi biomarker pada tingkat seluler dan subseluler. Informasi variabel melalui (AQUA score) yaitu dapat diketahui melalui intensitas pixel/pixel area dengan nilai yang disesuaikan dengan kapasitas suatu gambar sehingga dasar dari rata-rata intensitas dapat diketahui melalui evaluasi dari semua jumlah pixel yang ada pada gambar.

Hasil penelitian eksperimen yang dilakukan oleh Hertika *et al.*, [13] menunjukkan bahwa ekspresi densitas dan intensitas Metallothionein semakin meningkat pada jaringan insang dan lambung kijing Taiwan (*Anodonta woodiana*) yang dipapar dosis $PbNO_3$ pada dosis yang berbeda. Ekspresi tertinggi pada dosis pemaparan 30 ppm selanjutnya menurun pada dosis 40 ppm $PbNO_3$.

Hubungan Antara Ukuran Tiram, Kadar Logam Berat, dan Densitas dan Intensitas MT

Hasil Analisis hubungan antara Ukuran Tiram kadar logam berat di lambung tiram terhadap nilai densitas dan intensitas MT disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Hubungan Antara ukuran tiram, I(A) Pb, I(B) Cd, I(C) Hg terhadap Densitas MT, serta Hubungan Antara ukuran tiram, II(A) Pb, II(B) Cd, III(C) Hg terhadap intensitas MT dari ketiga stasiun

Gambar 7. Diatas menunjukkan hasil analisis korelasi antara ukuran dan logam berat terhadap nilai densitas MT menunjukkan nilai korelasi (r) untuk ukuran, logam berat terhadap densitas MT berturut turut menunjukkan untuk Pb nilai $r= 0,81$, Cd nilai $r= 0,620$ dan Hg= $0,761$. Lebih lanjut hasil analisis korelasi antara ukuran dan logam berat terhadap nilai intensitas MT menunjukkan nilai korelasi (r) untuk ukuran, logam berat terhadap densitas MT berturut turut menunjukkan untuk Pb nilai $r= 0,712$, Cd nilai $r= 0,762$ dan Hg= $0,919$. Hasil analisis hubungan tersebut menunjukkan bahwa ukuran tiram dan kadar logam berat Pb, Cd dan Hg terhadap densitas dan intensitas MT pada lambung *Crassostrea iredalei* pada penelitian ini tergolong kuat.

Kesimpulan dan Saran

Hasil penelitian menunjukkan kadar logam berat Pb masih dalam batas normal sedangkan Cd dan Hg di perairan pantai Talang Siring telah melampaui batas normal yang diperbolehkan. Lebih lanjut hasil evaluasi terhadap kadar logam berat Pb, Cd, dan Hg di jaringan lambung masih dalam kisaran normal bagi organisme. Hasil analisis hubungan antara Ukuran, logam berat Hg, Cd dan Pb terhadap densitas dan Intensitas MT menunjukkan adanya hubungan yang kuat ditunjukkan dengan tingginya koefisien korelasi.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Wulandari, E., E. Y. Herawati, D. Arfiati.. Kandungan Logam Berat Pb pada Air Laut Dan Tiram *Crassostrea glomerata* Sebagai Bioindikator Kualitas Perairan Prigi, Trenggalek, Jawa Timur. *Jurnal Penelitian Perikanan*. 1 (1): 10-14. 2012
- [2] Carpeno E., Giulia A., and Gloria I. Metallothionein Function And Structural Characteristics. *Jurnal Of Trace Elements In Medicine And Biology*. 21(1) : 35-39. 2007.
- [3] Nighat R. Isolation And Characterization Of Cadmium Metallothionein Gene From Local Ciliates. Thesis for Ph.D (Unpublished). Degree in Biological Sciences University of the Punjab, Lahore. p: 169. 2009
- [4] Roesijadi, G., Fowler, B.A., Purification Of Invertebrate Metallothioneins. *Meth. Enzymol*. 205: 263-275. 1991.
- [5] Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Pellerin-Massicotte, J., Auclair, J.C. Field transplanted of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci*. 52: 690-702. 1995.
- [6] Amiard J.C, C. Amiard-Triquet, S. Barka, J. Pellerin, P.S Rainbow. MT in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: pp.160-202. 2006.
- [7] Couillard Y., Peter G. C. C., Tessier A. Response of metallothionein concentrations in a freshwater bivalve (*Anodonta grandis*) along an environmental cadmium gradient. *Limnol Ocenogr*. 38(2):299-313. 1993.
- [8] Muntiha, M. Teknik pembuatan preparat histopatologi dari jaringan hewan dengan pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E). Balai Penelitian Veteriner. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti. 2001.
- [9] Larasati, Prosedur Tetap Pengecatan Imunohistokimia p53. Cancer chemoprevention research center. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM. 2010.
- [10] Carpeno, E., G. Andreani, G. Isnani. Metallothionein Functions and Structural Characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. pp : 35-39. 2007.

-
- [11] Ramos-vara, JA.,. Tecnical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42 (4):405-426. 2005
- [12] Melissa C.B.S., Aaron J., Berger B.S., Rimm D.L. Immunohistochemistry and Quantitative Analisis Of protein expression. *Arch pathol lab Med.* Vol. 130. 2006
- [13] Hertika, A.M.S., Marsoedi., Diana. A., dan Soemarno.. Density and intensity of metallothionein in gill and interior cavity of Taiwan mussels (*Anodonta woodiana*) after exposure to lead (pb) at sub-chronic level using immunohistochemical technique. *Journal of Natural Science Research.* 4 (6):58-68. 2014