

**PENGARUH LOGAM TIMBAL (Pb) TERHADAP MORTALITAS, OSMOREGULASI,
KERUSAKAN STRUKTUR INSANG DAN EKSPRESI PROTEIN IKAN NILA MERAH
*Oreochromis sp***

Nuhman¹, Ninis T.¹, Mahmiah², Wildan F.³, Farah L.³, Zahrotul K.³

¹Dosen Jurusan Perikanan, Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan, Universitas Hang Tuah Surabaya

²Dosen Jurusan Oceanografi, Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan, Universitas Hang Tuah Surabaya

³Alumni Jurusan Perikanan, Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan, Universitas Hang Tuah Surabaya

Abstract: *This study aims at analyzing the score of median lethal concentration (LC₅₀) of lead on the nilamerah fish (Oreochromis sp.), to test the influence of Pb exposure on osmoregulation, gill structure damage and protein expression of the nila merah (Oreochromis sp.). This study consists of two steps. The first step is to find out the values of median lethal concentration (LC₅₀) of lead on the nilamerah (Oreochromis sp.). The second step is to find out the influence of toxicity of lead metal exposure by giving the metal to the nila merah (Oreochromis sp.) maintained in the fresh water for 60 days. The lead concentration used is sub-lethal concentration: 0 mg Pb/L, 2 mg Pb/L, 4 mg Pb/L, 6 mg Pb/L, 8 mg Pb/L and 10 mg Pb/L. The influence of lead metal exposure observed in this observation are: (1) the mortality, (2) osmoregulation, (3) gill structure damage (necrosis and hyperplasia), and (4) Protein expression of nilamerah fish (Oreochromis sp.). The data of mortality are analyzed by Trimmed Spearman Karber (TSK) version 1.5 from EPA, the data of osmoregulation and gill structure damage (necrosis and hyperplasia) are analyzed by variant analysis with SPSS version 16, and the data of protein expression are analyzed by descriptive analysis. The result of the first step study was : (1) the values of LC₅₀ due to the exposure of Pb metal was 13.12 mg Pb/L. The result of the second step study showed that the exposure of Pb metal also caused : (2) the disturbance of osmoregulation of nilamerah fish (Oreochromis sp.) shown by the increase of osmotic pressure blood of nilamerah fish (Oreochromis sp.), (3) the gill structure damage of nilamerah fish (Oreochromis sp.) shown by the increase of cell necrosis and hyperplasia. Necrosis cells was ranged 4,04 – 14,53 percent and Hyperplasia cells was ranged 8,54 – 22,28 percent, (4) the disturbance of the protein expression of nilamerah fish (Oreochromis sp.) shown by the protein bands that showed different layer on each treatment.*

Key words: Toxicity, Lead, Osmoregulation, gills, *Oreochromis sp.*

PENDAHULUAN

Kurangnya kesadaran masyarakat akan pentingnya kelestarian lingkungan khususnya perairan, berdampak pada pencemaran perairan. Perairan menjadi tempat pembuangan limbah dari berbagai jenis industri dan limbah domestik. Pencemaran logam berat sangat berbahaya bagi lingkungan. Banyak laporan yang memberikan fakta betapa berbahayanya pencemaran lingkungan terutama oleh logam berat pada kawasan perairan, baik akibat penggunaan airnya untuk konsumsi sehari-hari maupun ketika mengkonsumsi biota yang hidup di perairan tercemar tersebut (Supriharyono 2000, Soemirat 2005,). Salah satu logam berat yang dapat mencemari perairan adalah timbal (Pb).

Timbal (Pb) merupakan logam yang dapat terakumulasi dalam jaringan organisme. Kandungannya dalam jaringan terus meningkat sesuai dengan kenaikan konsentrasi Pb dalam air dan lamanya organisme tersebut berada dalam perairan yang tercemar Pb. Hal ini disebabkan karena organisme air tidak mampu meregulasi logam berat Pb yang masuk kedalam tubuh organisme. Kadar maksimum Pb dalam air yang dapat digunakan untuk kegiatan perikanan adalah sebesar 0,03 mg/L (PP No. 82 Tahun 2001).

Salah satu biota perairan yang dapat terakumulasi oleh timbal (Pb) ialah ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*), merupakan genus ikan yang dapat hidup dalam kondisi lingkungan perairan berkualitas air jelek. Ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*) sering kali ditemukan hidup normal pada habitat-habitat dimana ikan dari jenis lain tidak dapat hidup. Ciri khas akibat gangguan perubahan kualitas dan kuantitas air adalah pengurangan populasi dan jenis ikan. Perubahan kualitas air secara mendadak akan menyebabkan kematian

Agustus, 2015

ikan secara masal. Logam berat yang dapat mencemari perairan, penting diteliti karena memicu terjadinya perubahan baku mutu di perairan tersebut dan dapat mengakibatkan kematian ikan.

Berdasarkan uraian di atas, maka penting untuk dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian logam berat (Pb) dengan konsentrasi yang berbeda terhadap mortalitas, osmoregulasi, kerusakan struktur insang dan ekspresi protein ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*).

METODE

Materi Penelitian

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*) berukuran 5-7 cm yang diperoleh dari Balai Benih Ikan Umbulan Pasuruan. Hewan uji yang digunakan harus memenuhi persyaratan hewan uji untuk uji toksisitas akut, sesuai kriteria dari EPA (1996). Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah senyawa logam timbal (II) asetat $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ (Merck) berupa bubuk dengan berat molekul sebesar 379,3 dan berat atom Pb sebesar 207,2. Selanjutnya bahan uji dibuat menjadi larutan induk timbal 1000 ppm dengan cara menimbang $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ 1,831 g yang dilarutkan dalam 100 mL akuademineral lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL, setelah itu diencerkan dengan akuades hingga tanda batas. Larutan baru dibuat dengan mengambil larutan induk $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ 1000 ppm dengan volume tertentu kemudian diencerkan dengan akuades hingga didapat larutan timbal dengan konsentrasi yang diinginkan.

Wadah uji yang digunakan dalam uji toksisitas adalah akuarium yang berisi 15 liter larutan uji dengan kepadatan 10 ekor ikan. Sebelum digunakan untuk uji toksisitas akut, wadah uji dibersihkan terlebih dahulu sesuai dengan prosedur APHA (1992). Peralatan yang digunakan adalah peralatan kualitas air seperti termometer, pH meter dan DO meter.

Metode Penelitian

Pelaksanaan Uji Toksisitas Akut

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap meliputi uji pendahuluan atau uji penentuan selang konsentrasi (*range finding test*) dan uji utama atau uji definitif.

Uji penentuan selang konsentrasi dilakukan untuk menentukan konsentrasi ambang bawah (LC_0 48 jam) yaitu konsentrasi tertinggi di mana semua hewan uji masih hidup dalam waktu 48 jam dan konsentrasi ambang atas (LC_{100} 24 jam) yaitu konsentrasi terendah dimana semua hewan uji mati dalam selang waktu 24 jam (Komisi Pestisida, 1983).

Nilai ambang bawah dan ambang atas digunakan untuk menentukan konsentrasi uji pada uji definitif. Penentuan konsentrasi uji berdasarkan nilai ambang bawah dan ambang atas dengan menggunakan rumus Komisi Pestisida (1983) :

dimana:

N = Konsentrasi ambang atas

n = Konsentrasi ambang bawah

K = Jumlah konsentrasi uji

a = Konsentrasi uji terkecil dan a, b, c, d, e = Konsentrasi uji yang dikehendaki

Percobaan dilakukan dengan metode rancangan acak lengkap dengan 3 (tiga) kali ulangan. Data mortalitas selama 96 jam dianalisa dengan menggunakan program software Trimmed Spearman Karber (TSK) versi 1.5 dari US-EPA untuk mendapatkan nilai LC_{50} (*Median Lethal Concentration*), dengan nilai-nilai intervalnya pada limit kepercayaan 95%.

Pelaksanaan Uji Dampak (Uji Pengaruh)

Berdasarkan nilai *Sub Lethal Concentration* atau nilai $< LC_{50}$ dilakukan uji dampak untuk mengetahui osmoregulasi, kerusakan struktur insang dan ekspresi protein ikan Nila Merah (*Oreochromis sp.*). Data osmoregulasi, kerusakan struktur insang (nekrosis dan hiperplasia) ditabulasikan dalam suatu tabel dan dihitung rata-rata serta standar deviasinya. Untuk mengetahui normalitas dan homogenitas digunakan uji Kolmogorov-Smirnov (Uji Distribusi), bila data berdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah. Bila uji Anova menunjukkan hasil yang signifikan (berbeda nyata atau sangat nyata) maka dilanjutkan dengan uji LSD. Sedangkan data ekspresi protein dianalisis dengan uji deskriptif atau uji perbandingan.

Data kualitas air diamati setiap 24 jam selama uji berlangsung. Penggantian media uji dilakukan tiap 48 jam. Penggantian dilakukan dengan cara mengganti larutan atau memindahkan hewan uji ke dalam wadah yang berisi media uji yang baru (Boudou and Ribeyre, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mortalitas

Hasil pengamatan uji penentuan selang konsentrasi pemaparan logam Pb pada ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* disajikan dalam Tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1: Nilai Ambang Bawah Dan Ambang Atas Logam Pb Pada Ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*

No	Ikan	Batas ambang (mg Pb/L)	
		Bawah	Atas
1	<i>Nila Merah</i>	1	10

Berdasarkan hasil nilai ambang bawah ($LC_{0.96}$ jam) dan ambang atas ($LC_{100.96}$ jam) diatas maka dapat ditentukan besarnya konsentrasi uji dengan menggunakan rumus Komisi Pestisida (1983) sehingga didapat konsentrasi sebagai berikut :

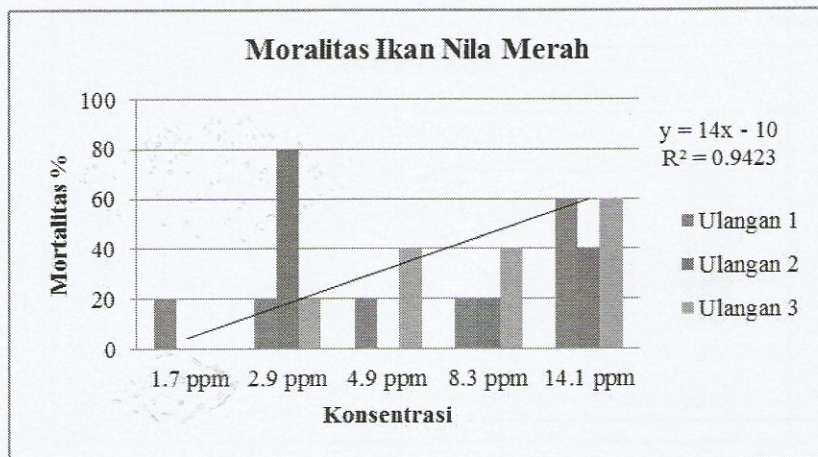
Tabel 2: Konsentrasi Pb Yang Digunakan Di Uji Toksisitas Akut Pada Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.*

Ikan	Konsentrasi Pb (mg Pb/L)				
	a	b	c	d	e
Nila Merah	1,7	2,9	4,9	8,3	14,1

Dari Tabel 2 di atas terlihat bahwa konsentrasi Pb yang digunakan dalam uji toksisitas akut akan semakin tinggi. Perbedaan konsentrasi logam Pb dalam media uji menyebabkan perbedaan jumlah mortalitas hewan uji. Data persentase mortalitas pada ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* karena pengaruh berbagai konsentrasi logam Pb disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 1.

Tabel 3: Persentase Mortalitas ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* Setelah Pemaparan 96 jam pada Berbagai Konsentrasi Logam Pb (mg Pb/L)

Konsentrasi larutan Pb (mg Pb/L)	Persentase mortalitas (%)
	<i>Nila Merah</i>
1,7	6,67
2,9	40
4,9	20
8,3	26,67
14,1	53,33



Gambar 1. Persentase Mortalitas Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.* Setelah Pemaparan 96 Jam Pada Berbagai Konsentrasi Logam Pb (mg Pb/L)

Penentuan nilai LC_{50} logam berat Pb dilakukan dengan cara menganalisis persentase mortalitas diatas dengan menggunakan program Trimmed Spearman Karber (TSK) versi 1.5 dari EPA dan didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 4: Nilai LC_{50-96} jam Logam Pb Pada ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*

Ikan	LC_{50}	Interval kepercayaan 95 %	Keterangan
Nila Merah	13,12	8,06 < x < 21,35	LC_{50} 96 jam

Dari Tabel 3 dan gambar 1 di atas terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi logam Pb yang dipaparkan pada ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* ternyata diikuti oleh mortalitas yang cenderung semakin tinggi pula. Dari perhitungan dengan menggunakan program Trimmed Spearman Karber (TSK) versi 1.5 dari EPA didapatkan nilai LC_{50-96} jam adalah 13,12 mg Pb/L.

Mortalitas (kematian) ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* diduga disebabkan oleh efek toksik logam Pb yang semakin kuat akibat penyerapan logam Pb yang tinggi dari lingkungan. Peningkatan konsentrasi logam Pb di lingkungan menyebabkan peningkatan penyerapan oleh ikan. Menurut Connell dan Miller (1995), pengaruh letal suatu bahan pencemar terhadap makhluk hidup adalah tanggapan yang terjadi pada saat zat-zat fisika atau kimia mengganggu proses sel atau subsel dalam makhluk hidup sampai suatu batas yang menyebabkan kematian secara langsung.

Ion logam masuk ke dalam sel dengan cara penetrasi ke dalam lapisan lipida. Pb merupakan logam kelas B yang terlibat dalam proses-proses fungsi enzim secara normal. Logam ini sangat reaktif terhadap ikatan ligan dengan sulfur dan nitrogen, sehingga hal ini sangat penting dalam sistem fungsi metaloenzim yang mengganggu (bersifat racun) terhadap metabolisme sel (Darmono, 2001).

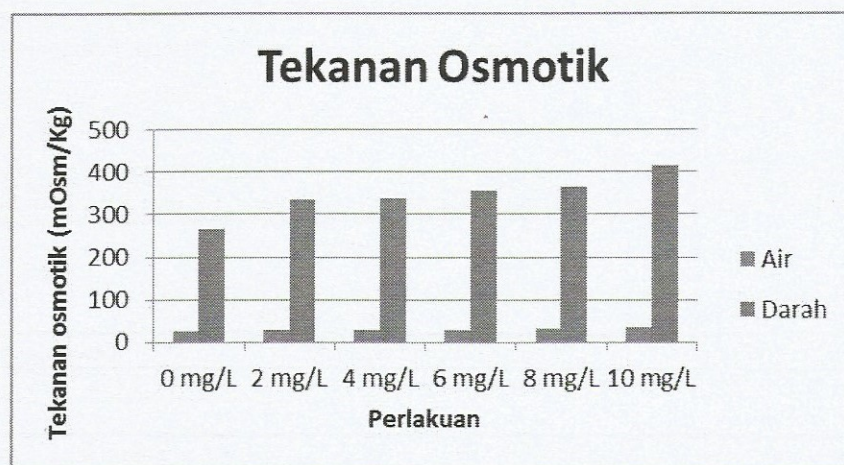
Berdasarkan kriteria toksisitas Komisi Pestisida Departemen Pertanian (1983), Nilai LC_{50-96} jam pada logam berat Pb masuk dalam kategori tinggi.

Osmoregulasi

Berdasarkan hasil nilai *Median Lethal Concentration* atau (LC_{50-96} jam) logam yaitu 13,12 mg Pb/L selanjutnya dibuat perlakuan baru yaitu perlakuan *sub lethal* sebagai berikut : 0 mg Pb/L, 2 mg Pb/L, 4 mg Pb/L, 6 mg Pb/L, 8 mg Pb/L dan 10 mg Pb/L dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh pemaparan logam Pb terhadap osmoregulasi, nekrosis, hiperplasia dan ekspresi protein ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*. Dari hasil penelitian didapatkan data sebagai berikut :

Tabel 5: Osmoregulasi ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*

Perlakuan (mg Pb/L)	Tekanan Osmotik (mOsm/Kg)	
	Air	Darah
0	27,33	266,67
2	28,67	332,67
4	28,67	337,33
6	29	355,67
8	32	366
10	34	413,67



Gambar 2. Tekanan Osmotik Darah Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.* Setelah Pemaparan 96 Jam Pada Berbagai Konsentrasi Logam Pb (mg Pb/L)

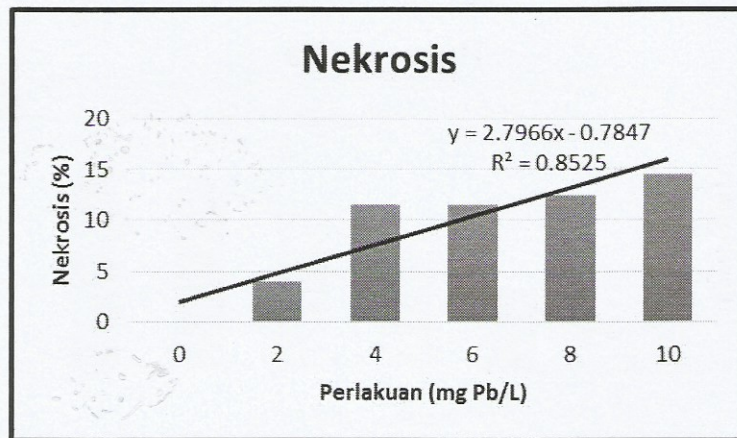
Dari tabel 5 dan gambar 2 diatas menunjukkan bahwa semakin tinggi paparan logam Pb akan semakin tinggi pula tekanan osmotik air media pemeliharaan ikan nila merah *Oreochromis sp.* Begitu juga dengan tekanan osmotik darahnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Wahyuningtyas, (2012) yang mengatakan bahwa adanya logam terlarut dalam media akan meningkatkan tekanan osmotik media sehingga dapat menghentikan perpindahan molekul-molekul pelarut ke dalam larutan melalui membran semi permeabel (proses osmosis) yang mengakibatkan tekanan osmotik darah ikan juga mengalami peningkatan.

Nekrosis

Dari hasil penelitian didapatkan data insang yang nekrosis adalah sebagai berikut :

Tabel 6: Insang Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.* Yang Mengalami Nekrosis

Perlakuan (mg Pb/L)	Nekrosis (%)
	Rata-rata
0	0
2	4,04
4	11,48
6	11,54
8	12,43
10	14,53



Gambar 3. Nekrosis Insang ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*

Penyerapan logam Pb oleh ikan dapat melalui jalur makanan maupun larutan (Furness and Rainbow, 1990). Penyerapan logam Pb dari air ke dalam tubuh dapat melalui permukaan permeabel terutama insang. Pada ikan, logam diserap melalui permukaan tubuh, misalnya kulit ari, diikuti dengan difusi melalui permukaan, misal epitelium insang, dan mungkin dilekatkan dengan ligan organik dan berikatan dengan protein internal (Bryan, 1976 dalam Connell dan Miller, 1995).

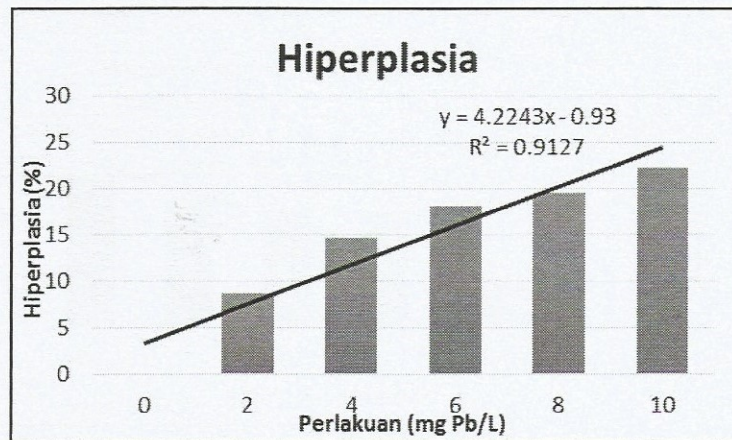
Ikan Nila Merah *Oreochromis sp.* memiliki tingkatan berbeda dalam proses akumulasi logam berat esensial dengan logam berat non esensial. Ion-ion Pb menunjukkan mekanisme toksisitas berspektrum luas, dan efektif berikatan dengan gugus fungsi SH. Senyawa organometalik yang terbentuk dari ion-ion tersebut bersifat larut dalam lemak dan mampu menembus membran biologis serta berakumulasi di dalam sel organel (Sorensen, 1991).

Hiperplasia

Dari hasil penelitian didapatkan data insang yang hiperplasia adalah sebagai berikut :

Tabel 7: Insang Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.* Yang Mengalami Hiperplasia

Perlakuan (mg Pb/L)	Hiperplasia (%)
	Rata-rata
0	0
2	8,54
4	14,69
6	18,05
8	19,57
10	22,28

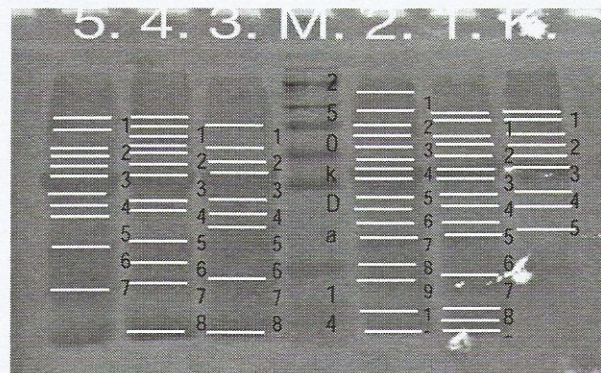


Gambar 4. Hiperplasia Insang ikan Nila Merah *Oreochromis sp.*

Pengamatan terhadap hewan uji yang terpapar logam dengan konsentrasi tinggi menunjukkan adanya kerusakan pada insang, hal ini sesuai dengan pernyataan Connell dan Miller (1995) bahwa mekanisme toksisitas letal pada uji jangka pendek misalnya 96 jam dalam kepekatan yang tinggi dalam waktu kontak yang pendek dapat merusak secara letal permukaan alat pernapasan. Epitel insang yang rusak disebabkan oleh sitoplasma sel ikan yang mengikat logam Pb sebagai ligan.

Ekspresi protein

Dari hasil penelitian didapatkan data ekspresi protein jaringan ikan Nila Merah *Oreochromis sp* adalah sebagai berikut :



Gambar 5. Ekspresi Protein Ikan Nila Merah *Oreochromis Sp.* Akibat Pemaparan Logam Pb Dengan Konsentrasi Yang Berbeda.

Darmono (2001) menyebutkan bahwa Logam Pb terlibat dalam proses-proses fungsi enzim secara normal. Beberapa enzim yang penting disekresi oleh sel-sel insang ialah enzim *carbonyc anhydrase* dan *ATPase*. *Carbonyc anhydrase* merupakan enzim yang mengandung seng (Zn) yang berperan dalam katalis CO_2 menjadi asam karbonat (HCO_3). Logam seng yang terikat enzim ini digantikan oleh molekul logam Pb, sehingga aktivitas enzimnya menjadi berkurang. Perubahan menjadi metaloenzim ini menyebabkan fungsi enzim tersebut rusak.

KESIMPULAN

1. Nilai $LC_{50-96jam}$ logam Pb pada ikan nila merah *Oreochromis sp.* adalah 13,12 mg Pb/L.
2. Peningkatan konsentrasi logam Pb mengakibatkan peningkatan tekanan osmotik air media pemeliharaan dan tekanan osmotik darah ikan nila merah *Oreochromis sp.*
3. Peningkatan konsentrasi logam Pb mengakibatkan peningkatan kejadian nekrosis dan hiperplasia insang ikan nila merah *Oreochromis sp.*
4. Peningkatan konsentrasi logam Pb mengakibatkan perbedaan ekspresi protein jaringan ikan nila merah *Oreochromis sp.*

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Menteri Pendidikan dan Kebudayaan c/q Direktur Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, atas hibah biaya penelitian yang diberikan kepada peneliti melalui skema hibah penelitian fundamental tahun 2014 - 2015

Daftar Pustaka

- Akoto, O., Bruce, T. N., Darkol, G. (2008). Heavy metals pollution profiles in streams serving the Owabi reservoir. *African Journal of Environmental Science and Technology*, Vol. 2, No. 11. pp. 354-359.
- Alifia F. dan Djawad, M.I., 2000, Kondisi Histologi Insang Dan Organ Dalam Juvenil Ikan Bandeng (*Chanos chanos* Forskall) Yang Tercemar Logam Timbal (Pb), *Science & Technology*, Vol. 1 No.2 : 51-58
- [APHA] American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1992. *Standard Methods for The Examination of Water and Waste Water*. APHA-AWWA WPCF. USA, 1134 p.
- Boudou, A. and Ribeyre, F. 2000. *Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies*, Volume II. CRC Press, Florida, 95-117 pp.
- Connell, Des W. dan G. J. Miller. 1995. *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. UI Press, Jakarta. (diterjemahkan oleh Yanti Koestoer)
- Darmono, 2001, *Lingkungan Hidup dan Pencemaran Hubungannya dengan Toksikologi Senyawa Logam*, Universitas Indonesia Press, Jakarta
- [EPA] Environmental Protection Agency. 1996. *Ecological Effects Test Guidelines*. OPPTS 850.1045: *Penaeid Acute Toxicity Test*. USEPA, US, 7 p.
- Jagoe C.H., Faivre A., Newman M.C., 1996, Morphological and Morphometric Changes in the Gills of Mosquitofish *Gambusia holbrooki* After Exposure to Mercury (II), *Aquatic Toxicology*, 34: 163-183
- Hindarti, D. 1997. *Metode Analisis Air Laut, Sedimen, dan Biota*. Buku 2. Bab XIX: Metode Uji Toksisitas. Puslitbang Oseanologi LIPI, Jakarta, hlm160-181.
- Komisi Pestisida. 1983. *Pedoman Umum Pengujian Laboratorium Toksisitas Lethal Pestisida Pada Ikan Untuk Keperluan Pendaftaran*. Dep. Pertanian. Jakarta, 19 hlm.
- Nielsen B.S., 1978, *Osmoregulation: Effect of Salinity and Heavy Metals*, Paper from the American Physiological Society Refresher Course in Environ. Physiology entitled: *Physiological Adaptations to the Environment*. Presented at the 24th Annual Fall Meeting of the APS, Rochester, New York, August 20, 1978.
- Nurchayatun, T. 2007. *Pengaruh pemberian merkuri klorida terhadap struktur mikroanatomi insang ikan mas*. Skripsi. Universitas Negeri Semarang.
- Palar H., 1994, *Pencemaran & Toksikologi Logam Berat*, Rineka Cipta Jakarta.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 207 hlm.
- WHO, 1992, Cadmium-Environ. Aspects, *Environmental Health Criteria No. 135* : 156 p.