

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Pembangunan berkembang dengan pesat mengantarkan manusia mencapai kemajuan di berbagai bidang baik bidang industri, ekonomi, pendidikan, budaya, sosial dan lain sebagainya. Namun demikian sudah sangat umum diketahui bahwa pembangunan selain memberikan manfaat, juga menimbulkan resiko yang amat besar bagi manusia apabila pembangunan tersebut tidak disertai pertimbangan-pertimbangan lingkungan, baik jangka pendek, menengah dan jangka panjang. Pembangunan yang tidak berwawasan lingkungan akan menimbulkan resiko berupa rusaknya lingkungan, terganggunya ekosistem, baik ekosistem darat, udara maupun perairan (Hadi 2005, Soemarwoto 2001, Mitchell, Setiawan dan Rahmi 2007). Rusaknya lingkungan perairan antara lain disebabkan oleh adanya pencemaran.

Pencemaran di perairan dapat terjadi karena limbah industri maupun limbah domestik dibuang ke perairan tanpa diolah terlebih dahulu, atau diolah tetapi kadar polutannya masih di atas Baku Mutu yang ditetapkan. Undang-Undang R.I. No.32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, pada pasal 1 ayat 14 disebutkan bahwa pencemaran lingkungan adalah masuk atau dimasukkannya makhluk hidup, zat, energi dan/atau komponen lain ke dalam lingkungan hidup oleh kegiatan manusia, sehingga melampaui Baku Mutu lingkungan hidup yang telah ditetapkan.

Pencemaran lingkungan perairan dapat disebabkan oleh polutan organik maupun anorganik. Polutan organik yang sering mencemari perairan antara lain DDT, PAH, pestisida, insektisida, deterjen dan limbah rumah tangga lainnya. Sedangkan polutan anorganik yang sering dijumpai di perairan misalnya logam berat Cd (Kadmium), Pb (Timbal), Hg (Merkuri), As (Arsen), Zn (seng), Cu (Tembaga), Ni (Nikel), dan Cr (Krom). Polutan logam berat tersebut sangat berbahaya apabila mencemari perairan, karena bersifat toksik, *karsinogenik*, *bioakumulatif* dan *biomagnifikasi* (Kosnett 2007, Plaa 2007, Wardhana 2004). Kadmium, Timbal, Merkuri merupakan logam berat yang sangat toksik dibandingkan logam berat lainnya.

Pencemaran oleh logam berat Cd pernah terjadi di Toyama Jepang. Peristiwa ini mengakibatkan penduduk menderita penyakit *Itai-itai (Ouch-ouch)*, yakni tulang mengalami pelunakan, kemudian menjadi rapuh dan otot mengalami kontraksi karena kehilangan sejumlah kalsium, serta menderita kelainan ginjal (Withghot and Brennan 2007, Miller 2007, Argawala 2006, Soemirat 2005). Peristiwa tersebut terjadi karena air irigasi yang digunakan untuk mengairi tanaman padi di sawah tercemar Cd. Hasil penelitian menunjukkan bahwa air irigasi tersebut mengandung Cd yang berasal dari penambangan Timah Hitam dan bijih Seng yang ada di daerah hulu sungai Jint. Akibatnya padi yang dipanen mengakumulasikan Cd. Penduduk mengkonsumsi padi tersebut selama bertahun-tahun, sehingga terjadi *biomagnifikasi* Cd pada tubuh manusia. Padi mengakumulasikan Cd sebanyak 1,6 mg/kg, namun melalui rantai makanan kandungan Cd pada tubuh manusia menjadi 11,472 mg/kg (Miller 2007, Wardhana 2004, Klaassen 2001, Donatus 2001).

Pencemaran Cd di sawah juga dialami di kabupaten Karanganyar Jawa Tengah pada tahun 2004. Kadar Cd di sawah mencapai 0,21 – 0,40 mg/kg, sementara ambang

batas Cd di tanah 0,50 mg/kg (Supriharyono 2009). Kasus ini diduga karena pabrik-pabrik yang ada di sekitar sawah membuang limbah Cd ke saluran irigasi yang digunakan untuk mengairi sawah. Paling tidak ada sekitar lima belas industri yang dicurigai sebagai penyebab terjadinya pencemaran.

Logam berat Cd, Pb dan Hg membahayakan kesehatan melalui rantai makanan. Hewan dengan mudah menyerap kadmium, timbal maupun merkuri dari makanan; dan terakumulasi dalam jaringan seperti ginjal, hati dan alat-alat reproduksi (Withgott and Brennan 2007, Plaa 2007, Kostnett 2007). Sedangkan menurut Wisnu dan Ati (2001) dan Katzung (2007), logam berat Cd, Pb dan Hg diabsorpsi dalam bentuk ion-ion Cd, Pb dan Hg terlarut. Pada lingkungan akuatik, suatu kontaminan masuk ke dalam jaringan organisme *autotrof* dengan cara absorpsi langsung. Pada ikan, kontaminan dapat masuk melintasi barier biologik yang memisahkan medium internal organisme dari lingkungan sekitarnya dengan cara absorpsi langsung maupun tidak langsung. Proses absorpsi langsung tergantung pada tempat persentuhannya. Di dalam tubuh ikan persentuhan terutama melalui insang (*branchia*) yakni pada *epithelium branchiale*. Sementara itu yang masuk secara tidak langsung melewati jalur *tropic* berlangsung melalui *mikrovili* permukaan *intestinum* (Miller 2007, Kostnett 2007, Soemirat 2005).

Kadmium (Cd), Timbal (Pb) dan Merkuri (Hg) serta logam berat lainnya bersifat *bioakumulatif*, *biomagnifikasi* (*Biological Magnification*), toksik dan *karsinogenik*; sehingga pajanan (*exposure*) logam berat di lingkungan dapat terakumulasi pada jaringan tubuh makhluk hidup yang berada di lingkungan tersebut, sehingga apabila mencapai konsentrasi toksik dapat meracuni semua komponen biotik (hewan, tumbuhan, maupun manusia) dan melalui rantai makanan terjadi pelipatgandaan kandungan bahan pencemar oleh organisme pada struktur tropik yang lebih tinggi.

Adapun sifat *karsinogenik* menyebabkan logam ini berpotensi menimbulkan kanker pada berbagai organ makhluk hidup. Polutan Cd, Pb dan Hg dapat mencemari lingkungan perairan, udara maupun tanah, namun kontaminan tersebut pada akhirnya berujung di air, maka lingkungan air menjadi perhatian tertinggi di dalam monitoring lingkungan. Di perairan sungai Cd, Pb dan Hg dapat terakumulasi di sedimen, di air maupun pada biota sungai (Withgott and Brennan 2007, Miller 207, Argawala 2006, Soemirat 2005, Wardhana, 2004).

Kaligarang merupakan salah satu sungai yang termasuk prioritas sasaran Program Kali Bersih di Propinsi Jawa Tengah. PROKASIH Kaligarang sejak 1989/1990 diikuti 10 industri, namun sejak tahun 2005 sampai sekarang diikuti 8 industri dikarenakan satu industri pindah lokasi dan satu industri lagi tidak produksi/ ditutup. Adapun delapan industri yang terkait program kali bersih di DAS Kaligarang meliputi PT. Raja Besi, PT. Alam Daya Sakti, PT. ISTW, PT. Kimia Farma, PT. Semarang Makmur, PT. Damaitec, PT. Sinar Panca Jaya dan PT. Phapros (BLH Jawa Tengah 2009). Kaligarang letaknya memanjang di sebelah barat kota Semarang, hulunya berada di gunung Ungaran dan hilirnya menyatu dengan sungai banjir kanal barat kota Semarang. Sungai tersebut di daerah Pegandan, tepatnya di Tugu Soeharto, bertemu dengan aliran sungai Kreo dan sungai Kripik. Badan Lingkungan Hidup Jawa Tengah (2010) dalam penelitiannya menemukan adanya kandungan logam berat Timbal dan Kadmium pada sedimen aliran sungai Kreo dari TPA Jatibarang Semarang, sehingga sangat dimungkinkan logam-logam berat tersebut sampai di aliran sungai Kaligarang dan mencemari air sungai tersebut.

Rapat kerja Menteri Negara KLH bekerjasama dengan departemen Dalam Negeri tanggal 14-15 Juni 1989 menetapkan Kaligarang sebagai salah satu sungai yang

termasuk prioritas sasaran Program Kali Bersih (PROKASIH) di Propinsi Jawa tengah, disamping sungai Bengawan Solo. Dalam rangka penurunan beban pencemaran limbah industri dan rumah tangga diperaian telah dirumuskan langkah tindak pencegahannya, sehingga melalui SK Gubernur KDH Tk. I Jawa Tengah No. 660.I/37/1989 tanggal 10 Agustus 1989, telah dibentuk tim Pelaksanaan Program Kali Bersih (PROKASIH) untuk Kaligarang, dan berdasarkan SK Gubernur No. 660.I/28/1990 Kaligarang diperuntukan sebagai sungai golongan B (air baku air minum) yang merupakan salah satu pendukung utama sumber air PDAM Semarang.

Sungai Kaligarang airnya digunakan sebagai sumber air baku untuk air minum Perusahaan Daerah Air Minum (PDAM) kota Semarang, dan sebelum masuk di tempat penjernihan air PDAM juga di gunakan untuk pertanian, rumah tangga dan industri. Kaligarang memberikan suplai air dominan bagi kota Semarang. Penduduk di sekitar sungai, terutama daerah hilir banyak yang memanfaatkan sebagai tempat untuk mencari ikan untuk lauk pauk sehari-hari maupun untuk di perjual belikan. Sementara itu sebagian penduduk saat ini tidak mau menggunakannya lagi untuk air minum, karena mereka takut terkena dampak toksisitas logam berat; mereka memilih menggunakan air kemasan untuk keperluan minum maupun memasak (BLHD Kota Semarang 2010).

Lingkungan sekitar Kaligarang, banyak digunakan untuk kegiatan industri antara lain industri tekstil, bahan kimia, galvanisasi, dan pabrik baja, yang kesemuanya berpotensi menghasilkan limbah Cd, Pb dan Hg. Industri-industri tersebut membuang limbahnya ke sungai Kaligarang, sehingga terjadilah kenaikan konsentrasi substansia logam berat Cd, Pb dan Hg dibadan perairan, dan memungkinkan dapat tercapainya tingkat konsentrasi toksik bagi kehidupan akuatik; sehingga berpotensi sebagai polutan berbahaya (Badan Lingkungan Hidup Jateng 2010, Choirudin dan Indrajid 2007).

Pencemaran Cd, Pb dan Hg di Kaligarang berdasarkan laporan penelitian yang sudah dilakukan, selain berasal dari industri yang ada di sekitar sungai, juga berasal dari limbah domestik dan dari TPA Jatibarang. Industri-industri tersebut membuang limbahnya ke Kaligarang, sehingga air sungai mengandung Cd, Pb maupun Hg dan biota sungai (ikan, kerang) mengakumulasi ketiga logam berat tersebut. Sedangkan menurut penelitian Badan Lingkungan Hidup Jawa Tengah (2010) dikatakan pula bahwa air Kaligarang mengandung logam berat Cd, Pb dan Hg meskipun masih memenuhi Baku Mutu. Berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air, Baku Mutu Cd, Pb dan Hg untuk air kelas I, yakni air peruntukannya sebagai air baku air minum, berturut-turut sebesar 0,01 mg/L, 0,03 mg/L dan 0,001 mg/L.

Kartini dan Danusaputro (2005) mengemukakan bahwa air Kaligarang mengandung logam berat. Berbagai jenis logam berat, seperti Besi (Fe), Kadmium (Cd), Timbal (Pb), Nikel (Ni), Tembaga (Cu) dan Merkuri (Hg) ditemukan dalam kuantitas yang bervariasi pada semua jenis sampel air yang diambil, meskipun tidak semua keberadaan logam berat melebihi Baku Mutu. Namun demikian keberadaan logam berat dikhawatirkan sewaktu-waktu dapat melebihi nilai Baku Mutu, karena kontribusi limbah masyarakat dan industri yang dibuang setiap harinya relatif tinggi. Kondisi tersebut diperparah dengan fakta bahwa intensitas kandungan logam berat dapat meningkat akibat proses akumulasi dan sulit untuk didegradasi secara alami. Terlebih dalam lima tahun terakhir tercatat pencemaran air di kota Semarang meningkat sebesar 10% setiap tahun sedangkan penanganan sampah hanya meningkat rata-rata 1% setiap tahunnya (BLHD Kota Semarang 2010).

Pencemaran logam berat pada air sungai Kaligarang yang berpotensi tinggi memerlukan penanganan yang serius dari semua pihak, seawal mungkin sebelum pencemarannya melebihi nilai Baku Mutu. Sistem deteksi agen pencemar air dapat menjadi penanda awal terjadinya pencemaran di aliran sungai. Berbagai sistem deteksi pun telah menunjukkan keberadaan maupun kuantitas agen pencemaran air dalam badan air. Namun penggunaan biomarker sebagai alat deteksi dini tingkat molekuler untuk monitoring lingkungan perairan yang terkontaminasi/tercemar logam berat yang konsentrasinya masih dibawah Baku Mutu; belum diterapkan dalam penanganan pencemaran air oleh logam berat.

Penggunaan penanda biologis/biomarker, diperlukan untuk mendeteksi sekaligus memantau keberadaan logam berat dalam badan air. Di samping itu, penggunaan penanda biologis mampu memberikan data intensitas logam berat yang terserap oleh sampel organisme serta toksisitas dan gangguan yang ditimbulkan pada sistem biologis pada kadar tertentu. Dengan kajian biomarker, pencemaran di perairan dapat dikendalikan sejak agen pencemar di perairan konsentrasinya masih rendah/masih memenuhi Baku Mutu, sehingga pencemaran yang terjadi di tingkat ekosistem dapat dicegah, karena pada tingkat sub seluler sudah ada sinyal peringatan dini terjadinya gejala pencemaran. Dengan demikian pencemaran sudah bisa ditanggulangi sejak tingkat sub seluler, sehingga tidak menimbulkan pencemaran pada tingkat ekosistem seperti yang terjadi di berbagai perairan saat ini.

Biomarker didefinisikan sebagai respon biologis terhadap pencemaran lingkungan, yang memberikan besarnya konsentrasi pajanan dan pengaruh toksik bahan pencemar. Biomarker merupakan akhir dari uji ekotoksikologi yang menunjukkan efek *subkronik* pada organisme hidup. Salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini adanya pajanan senyawa toksik; dan sebagai respon dini pada tingkat

sub seluler (molekuler, biokimia dan fisiologi) reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi makhluk hidup/spektrum biologi yang lebih tinggi Hanson (2008), Viarenggo, Lowe, Bolognesi, Fabbri (2007), Withgott and Brennan (2007), Klassen (2001), Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011). Penemuan biomarker sebagai alat deteksi pencemaran dini untuk monitoring lingkungan perairan yang terkontaminasi logam berat merupakan sumbangan bioteknologi bagi pemerintah dalam menentukan kebijakan pengelolaan dan pengendalian pencemaran di perairan terbuka (sungai, laut, tambak). Selain itu dapat pula dimanfaatkan untuk monitoring dan evaluasi pengolahan limbah pada berbagai IPAL industri yang mengandung logam berat Cd, Pb maupun Hg.

Penanda biologis atau Biomarker pada ikan dapat berfungsi sebagai alat yang berguna untuk mengevaluasi beban pencemaran di lingkungan perairan dan memberikan sinyal peringatan dini yang berhubungan dengan ancaman lingkungan yang ditimbulkan. Penanda biologis didefinisikan sebagai pengukuran spesifik yang merefleksikan adanya interaksi biologis dengan agen lingkungan misalnya Kadmium (Cd), Timbal (Pb) maupun Merkuri (Hg). Penanda biologis, selain digunakan sebagai peringatan dini, biasa pula digunakan untuk analisis resiko di bidang kesehatan lingkungan. Penggunaan biomarker untuk monitoring lingkungan merupakan sebuah metode yang memanfaatkan analisis kimia seperti halnya bioindikator. Biomarker adalah respon-respon yang diukur pada tingkat individu, yang berkisar dari pengukuran enzim dan metabolisme *xenobiotic* pada indek organ dan kondisi keseluruhan (Katzung 2007, Kostnett 2007, Plaa 2007). Monitoring lingkungan perairan dengan biomarker dapat dilakukan dengan berbagai kelompok organisme, tetapi yang paling umum adalah remis dan ikan (Viarenggo, Lowe, Bolognesi, Fabbri (2007), Hanson (2008), Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto dan Kurniati (2009).

Ikan mas merupakan ikan standar internasional uji toksisitas, sedangkan ikan nila dalam klasifikasi hewan termasuk satu kelas dengan ikan mas. Oleh karena itu kedua jenis ikan tersebut diduga mempunyai respon yang hampir sama terhadap senyawa toksik, sehingga protein pengikat logam berat (*thionein*) yang dimiliki oleh kedua jenis ikan tersebut masing-masing dapat berikatan dengan logam berat membentuk *metallothionein* yang dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan. *Metallothionein (MT)* merupakan polipeptida yang memiliki banyak ikatan *cystein (cys)* yang disandikan oleh gen, mempunyai berat molekul rendah, dan berfungsi sebagai peptida pengikat logam (*metal binding peptides*). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino *Cys* maka protein ini mengandung kelompok *thiol (sulfidril, -SH)* dalam jumlah yang besar; kelompok *thiol* ini mengikat logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, Merkuri, Tembaga, dan Kadmium Zatta (2008), Filipic, Fathur dan Vuldrag (2006).

Kadmium (Cd), Timbal (Pb) dan Merkuri (Hg) yang diserap tubuh akan diikat oleh protein dengan berat molekul rendah yang disebut *thionein* membentuk gugus kompleks protein-logam dengan nama *metallothionein* yang disintesis dalam hati. *Metallothionein* ini dipindahkan ke ginjal melalui peredaran darah. Pengikatan logam berat membentuk *metallothionein* tersebut diyakini sebagai mekanisme untuk pertahanan dan perlindungan yang mencegah logam tersebut mempengaruhi protein protein penting dalam proses metabolisme tubuh (Katzung 2007, Kostnett 2007, Plaa 2007, Soemirat 2005, Donatus 2001, Klaassen 2001). Selanjutnya juga dikatakan bahwa Cd, Pb dan Hg yang masuk ke dalam tubuh ikan akan ditransportasikan ke seluruh tubuh melalui aliran darah. Seluruh organ tubuh menyerap Cd, Pb dan Hg, namun konsentrasi tertinggi terdapat pada hati dan ginjal. Setelah pemaparan dalam kadar rendah dengan waktu yang lama Cd diakumulasikan di otot/daging ikan tersebut.

Ratningsih (2008), mengemukakan bahwa Ikan mas (*Cyprinus carpio L.*), dapat menunjukkan reaksi terhadap perubahan fisik air maupun terhadap adanya senyawa pencemar yang terlarut dalam batas konsentrasi tertentu. Selain itu ikan tersebut berperan penting dalam rantai makanan dan peka terhadap berbagai jenis zat pencemar pada perairan tawar. Dengan demikian dapat memberikan kemudahan untuk mengetahui adanya pajanan logam berat pada air sungai maupun yang terakumulasi pada tubuh ikan (Krizkova, Zitka, Adam dan Beklova 2007, Ekpo, Amayo dan Jegede 2008).

Ikan mas (*Cyprinus carpio L.*) dan nila (*Oreochromis niloticus L.*) merupakan ikan budidaya air tawar. Kedua jenis ikan tersebut hidup bebas di Kaligarang maupun dibudidayakan di Balai Benih Ikan (BBI) Ungaran. Sementara itu pengembangan berbagai aktivitas industri yang menggunakan logam berat Cd, Pb dan Hg, menyebabkan unsur ini secara langsung maupun tidak langsung mencemari lingkungan perairan sungai tempat kehidupan ikan tersebut. Hal ini dikhawatirkan kadar logam berat meningkat terus seiring waktu dan akan mencapai konsentrasi toksik sehingga mengakibatkan ikan di sungai keracunan logam berat (Cd, Pb, Hg) serta akibat yang lebih parah menimpa manusia yang mengkonsumsi ikan tersebut. Sehubungan dengan hal tersebut, maka monitoring pencemaran limbah Cd, Pb dan Hg di lingkungan perairan sungai perlu dilakukan, agar lingkungan tersebut terjaga kualitasnya, sehingga dapat mendukung semua kehidupan organisme di dalamnya (Miller 2007, Wisnu 2001).

Air Kaligarang mulai dari segmen I sampai dengan segmen VI sesuai peruntukannya termasuk air kelas I, yaitu air yang diperuntukkan sebagai sumber air baku air minum (Peraturan Gubernur Jawa Tengah Nomor 156 Tahun 2010 tentang

Peruntukan Air dan Pengelolaan Kualitas Air Sungai Garang di Provinsi Jawa Tengah, Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air). Dengan demikian adanya logam berat yang terpajan pada air sungai tersebut sangat membahayakan, meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah. Sedangkan fakta di lapangan menunjukkan bahwa Kaligarang terkontaminasi logam berat. Maka diperlukan alat deteksi dini logam berat sebagai penanda dini pencemaran logam berat. Sementara itu di lapangan belum ditemukan penanda biologis (biomarker) sebagai alat deteksi dini tersebut. Sistem deteksi agen pencemar air dapat menjadi penanda awal terjadinya pencemaran di aliran sungai. Berbagai sistem deteksi pun telah menunjukkan keberadaan maupun kuantitas agen pencemaran air dalam badan air. Namun penggunaan biomarker sebagai alat deteksi dini tingkat molekuler untuk monitoring perairan yang terkontaminasi logam berat belum diterapkan dalam penanganan pencemaran air oleh logam berat.

Berdasarkan hal-hal tersebut maka penelitian disertasi ini akan mengkaji biomarker pencemaran logam berat di perairan. Kajian biomarker pada disertasi ini sangat diperlukan untuk menemukan biomarker yang sesuai sebagai alat deteksi dini untuk monitoring pencemaran logam berat di perairan, sehingga air yang ada di ekosistem perairan tersebut dapat ditetapkan peruntukkannya/kelasnya, sebagaimana yang ditetapkan pada Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001. Selain itu dengan menggunakan biomarker sebagai alat deteksi dini memungkinkan logam berat di perairan terdeteksi sejak konsentrasinya masih rendah sehingga memudahkan pihak-pihak terkait dalam melakukan pengelolaan kualitas air, maupun melakukan pencegahan pencemaran air. Biomarker pada ikan sebagai alat monitoring pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan sudah saatnya untuk digunakan

dalam pengelolaan kualitas air di Indonesia. Sebagaimana pendapat Viarenggo, Lowe, Bolognesi, Fabbri (2007), Hanson (2008), Larsson, Forlin, Grahn, Landner (2000) dan Sandstrom, Larsson, Andersson, Appelberg (2005) bahwa penggunaan biomarker/ penanda biologis; sebagai respon biologis tingkat molekuler dari efek logam berat terhadap kehidupan biota akuatik, khususnya ikan sebagai alat monitoring pencemaran lingkungan perairan sudah saatnya digunakan sebagai upaya pencegahan pencemaran air. Alat monitoring logam berat yang ditemukan dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif alat monitoring dalam pelaksanaan Program Kali Bersih untuk melakukan pemantauan dan deteksi dini logam berat di perairan; sehingga perairan dapat ditentukan kelasnya sesuai dengan peruntukannya. Pelaksanaan PROKASIH sudah saatnya juga memantau keberadaan logam berat di perairan.

B. Perumusan Masalah

Pengembangan berbagai aktifitas industri di sekitar Kaligarang yang menggunakan logam berat Cd, Pb dan Hg menyebabkan unsur ini mencemari air sungai, meskipun kadar polutannya masih memenuhi Baku Mutu. Akibatnya ikan yang ada di perairan tersebut mengakumulasikan Cd, Pb dan Hg, dan dalam jangka panjang akibat yang lebih parah dapat dialami ikan-ikan tersebut, yaitu berupa keracunan kronik. Kadmium, Timbal dan Merkuri bersifat toksik, *karsinogenik*, *bioakumulatif* dan *biomagnifikasi* (Withgott and Brennan 2007, Miller 2007, Plaa 2007, Kosnett 2007, Soemirat 2005).

Kaligarang segmen VI, tempat berlangsungnya penelitian sesuai peruntukannya termasuk air kelas I, yaitu air yang diperuntukkan sebagai sumber air baku air minum (Peraturan Gubernur Jawa Tengah Nomor 156 Tahun 2010 tentang Peruntukan Air dan

Pengelolaan Kualitas Air sungai Garang di Provinsi Jawa Tengah). Dengan demikian adanya logam berat yang mencemari air sungai tersebut sangat membahayakan; meskipun dalam konsentrasi yang sangat rendah, karena bersama air minum logam berat akan terakumulasi sedikit demi sedikit pada tubuh sehingga dapat mencapai tingkat konsentrasi toksik. Fakta di lapangan menunjukkan bahwa lokasi penelitian di Kaligarang terkontaminasi logam berat Cd, Pb dan Hg masing-masing sebesar $0,006 \pm 0,001$ mg/L, $0,01 \pm 0,005$ mg/L dan $0,0006 \pm 0,0001$ mg/L; sedangkan Baku Mutu Cd, Pb dan Hg pada air kelas I masing-masing sebesar 0,01 mg/L, 0,3 mg/L dan 0,001 mg/L. Maka diperlukan alat monitoring logam berat sebagai penanda biologis pencemaran logam berat. Sementara itu di lapangan belum ditemukan penanda biologis (biomarker) sebagai alat deteksi dini dalam kegiatan monitoring tersebut. Sistem deteksi agen pencemar air dapat menjadi penanda awal terjadinya pencemaran di aliran sungai. Berbagai sistem deteksi pun telah menunjukkan keberadaan maupun kuantitas agen pencemaran air dalam badan air. Namun penggunaan biomarker sebagai alat deteksi dini tingkat molekuler, belum diterapkan dalam monitoring penanganan pencemaran air oleh logam berat.

Kajian biomarker pada disertasi ini bertujuan untuk menemukan biomarker yang sesuai sebagai alat monitoring ; untuk deteksi dini pencemaran logam berat di perairan sehingga perairan dapat dipantau ada tidaknya logam berat sekalipun konsentrasinya masih sangat rendah, sehingga air sungai tersebut dapat ditetapkan peruntukkannya/ kelasnya, sebagaimana yang ditetapkan pada Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. Selain itu dengan terdeteksi saat konsentrasinya masih rendah akan memudahkan pengelolaan lebih lanjut, sehingga pencemaran logam berat dapat dicegah. Maka dari

itu penelitian disertasi ini akan mengkaji tentang biomarker pada ikan sebagai alat monitoring pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan Kaligarang Semarang.

Penggunaan penanda biologis/biomarker, diperlukan untuk mendeteksi sekaligus memantau keberadaan logam berat dalam badan air. Di samping itu, penggunaan penanda biologis mampu memberikan data intensitas logam berat yang terserap oleh sampel organisme serta toksisitas dan gangguan yang ditimbulkan pada sistem biologis pada kadar tertentu. Dengan kajian biomarker, pencemaran bisa dikendalikan secara preventif, sehingga pencemaran yang terjadi di tingkat ekosistem dapat dicegah, karena pada tingkat sub seluler sudah ada sinyal peringatan dini terjadinya gejala pencemaran. Dengan demikian pencemaran sudah bisa diketahui sejak tingkat sub seluler, sehingga tidak menimbulkan pencemaran pada tingkat ekosistem seperti yang terjadi di berbagai tempat saat ini.

Biomarker merupakan respon dini tingkat molekuler, reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi makhluk hidup/spektrum biologi yang lebih tinggi. Penemuan biomarker sebagai alat deteksi pencemaran dini dalam monitoring lingkungan, merupakan sumbangan bioteknologi bagi pemerintah dalam menentukan kebijakan pengelolaan dan pengendalian pencemaran di perairan sungai. Selain itu bisa pula dimanfaatkan untuk monitoring dan evaluasi pengolahan limbah pada berbagai IPAL industri yang limbahnya mengandung logam berat Cd, Pb maupun Hg. Biomarker pada ikan sebagai alat monitoring dapat diaplikasikan di lapangan untuk monitoring logam berat di perairan dalam kegiatan Program Kali Bersih (PROKASIH); sehingga perairan dapat ditentukan kelasnya sesuai dengan peruntukannya.

Beberapa biomarker yang pernah digunakan sebagai penanda biologis adanya pencemaran antara lain adalah : *enzim glutathione reductase (GR)*, *enzim glutathione*

S-transferase (GST), enzim katalase, LSI, GSI, EROD, Hematokrit dan Hemoglobin. Adapun biomarker pada ikan yang akan dikaji dalam penelitian ini adalah : *MT* (*Metallothionein*), EROD (*Ethoxyresorufin-O-Deethylase*), LSI (*liver Somatic Index*), dan GSI (*Gonade Somatic Index*).

Berdasarkan identifikasi masalah tersebut maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut :

1. Bagaimanakah kondisi eksisting perairan Kaligarang pada saat penelitian dilakukan ?
2. Penanda Biologis (biomarker) apakah yang paling sesuai (*sensitif, spesifik, early warning, universal*) sebagai alat monitoring pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan sungai yang konsentrasi logam beratnya masih memenuhi Baku Mutu air kelas I (*Metallothionein*, EROD, LSI, atukah GSI) ?
3. Berapakah konsentrasi terendah Cd,Pb dan Hg dalam hati ikan mas dan nila yang menginduksi sintesis/munculnya biomarker *Metallothionein* paling awal ?
4. Biomarker *Metallothionein* apakah yang disintesis/ muncul paling awal sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan yang konsentrasi logam beratnya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I (*Metallothionein-Cd, Metallothionein-Pb* atukah *Metallothionein-Hg*) ?
5. Berapakah nilai BCF yang menyebabkan munculnya biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg paling awal ?
6. *Metallothionein* pada hati ikan mas atau nila yang lebih sensitif sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan sungai yang konsentrasinya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I ?

C. Orisinalitas

Penelitian tentang biomarker tingkat molekuler pada ikan sebagai alat monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg pada lingkungan perairan sungai dengan metode eksperimen lapangan menggunakan Karamba Jaring Apung (KJA) belum pernah dilakukan. Penelitian terdahulu dilakukan di IPAL industri pabrik gula; menggunakan ikan nila. Biomarker yang digunakan adalah enzim *Sorbitol Dehidrogenase* (SDH), *indeks fisiologi* seperti *Liver Somatic Index* (LSI), *Gonade Somatic Index* (GSI) dan *Condition Factor* (CF) serta *Indeks histopatologik* pada ikan nila (Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi 2011).

Penelitian di luar negeri dilakukan di IPAL, sungai, maupun di lautan; ikan yang digunakan merupakan ikan yang hidup bebas maupun ikan dari pembenihan, yakni ikan Perca dan ikan Pelangi. Penelitian terdahulu menggunakan darah untuk melihat akumulasi Cd, dan mengkaji LSI, GSI, EROD, untuk biomarker/penanda biologis; sedang pada penelitian ini menggunakan hati ikan nila dan mas untuk mempelajari biomarker MT, LSI, GSI maupun EROD sebagai alat monitoring. Ikan yang dijadikan sampel diambil dari Balai Benih Ikan Air Tawar di Ungaran yang kemudian dipelihara/dibesarkan dalam karamba jaring apung di sungai yang tercemar Cd, Pb dan Hg, yakni Kaligarang maupun di perairan yang tidak tercemar sebagai kontrol; yakni di kolam Balai Benih Ikan Ungaran. Penelitian tentang biomarker pada ikan di perairan Kaligarang maupun perairan sungai di Indonesia belum pernah dilakukan. Demikian pula penelitian tentang biomarker pada ikan mas, dan nila pada perairan sungai yang konsentrasi Cd, Pb dan Hg masih memenuhi Baku Mutu air kelas I juga belum ada laporan penelitiannya. Adapun penelitian terdahulu terkait dengan biomarker, dan terdapat laporan penelitiannya tersaji pada lampiran 1.

Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011) dalam penelitiannya tentang: *Biomonitoring of effects Following Exposure of Fish to Sugar Refinery Effluent*; mengemukakan bahwa ikan nila dapat dijadikan positif kontrol biomarker efektivitas sistem kerja IPAL PT Gunung Madu Plantation. Penelitian ini dilakukan di kolam aerasi 1,2 stabilisasi dan monitoring. Pada penelitian ini biomarker yang dikaji meliputi indeks fisiologi, analisis enzim dan histopatologi hepar. Metode penelitian menggunakan *experimental design*; dilakukan di IPAL PT. Gunung Madu (Kolam aerasi 1, 2 Stabilitas dan Monitoring). Penelitian ini hasilnya merupakan respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan.

Respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sudah saatnya dipakai untuk monitoring lingkungan, sehingga secara dini pencemaran lingkungan dapat dipantau dan dicegah. Langkah preventif dalam upaya pencegahan pencemaran jauh lebih baik dari pada secara kuratif. Sebagaimana pendapat Hanson (2008) bahwa salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini dari pengaruh *xenobiotic* secara biologis. Respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan memberikan peluang untuk melakukan langkah preventif sebagai upaya pencegahan terjadinya pencemaran lingkungan. Lebih jauh dikatakan bahwa efektivitas pengolahan limbah cair dapat dimonitor dengan menggunakan biomarker pada tingkat sub seluler seperti aktivitas enzim *Sarbitol Dihidrogenase (SDH)*, *indeks fisiologi* seperti *Liver Somatic Index (LSI)*, *Gonade Somatic Index (GSI)* dan *Condition Factor (CF)* serta *Indeks histopatologik* (Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi 2011).

Penelitian disertasi ini temanya hampir sama dengan penelitian Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto dan Kurniati (2009) dan Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011). Adapun letak perbedaannya dalam hal biomarker dan jenis ikan yang

dikaji. Pada penelitian disertasi ini dikaji ikan mas dan nila; keduanya merupakan ikan air tawar, karena perlakuannya dilakukan di sungai Kaligarang, bukan di lautan atau di air payau. Penelitian Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto dan Kurniati (2009) dan Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011) dilakukan di IPAL dan hanya menggunakan ikan Nila. Ikan mas, satu kelas dengan ikan Nila, sehingga protein pada hati kedua jenis ikan tersebut diduga dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg dengan sensitivitas yang berbeda. Biomarker yang digunakan pada penelitian di IPAL Gunung Madu Plantation meliputi: LSI, GSI, CF dan SDH, sedangkan pada penelitian ini, LSI, GSI, MT dan EROD sebagai biomarker.

Hanson (2008) mengadakan penelitian tentang biomarker di Laut Baltik, Swedia dengan judul : *“Evaluation of Long Term Biomarker Data From Perch (Perca Fluviatilis) in The Baltic Sea Suggest Increasing Exposure To Environmental Pollutants”*. Metode yang digunakan *Experimental Design*, menggunakan ikan Perch (*Perch Fluviatilis*) yang hidup bebas di laut Baltik Swedia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa di daerah yang tercemar polutan organik, gonade ikan mengecil, sehingga *Gonade Somatic Index* (GSI) menurun, sedangkan aktivitas EROD meningkat. PAH terbukti merupakan polutan yang menyebabkan menurunnya GSI dan meningkatnya aktivitas EROD. Terjadi korelasi yang signifikan antara meningkatnya konsentrasi PAH dengan menurunnya GSI dan meningkatnya aktivitas EROD. Sedangkan pada disertasi ini mengkaji aktivitas EROD sebagai biomarker pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan sungai.

Hanson and Larsson (2008^a) dalam penelitiannya tentang: *“Experiences from a Biomarkers Study on Farmed Rainbow Trout, Used for Environmental Monitoring in Swedish River”*, mengatakan bahwa meningkatnya aktivitas EROD karena

meningkatnya PAH merupakan indikasi bahwa EROD merupakan biomarker yang memberikan sinyal peringatan dini terhadap pencemaran organik. Sedangkan menurut Hanson, Guttman dan Larsson (2006) dalam penelitiannya di sungai Gota Alv, Swedia Barat, tentang: "*The effect of different holding conditions for environmental monitoring with caged Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss)*", ternyata hasil penelitian menunjukkan bahwa LSI (*Liver Somatic Index*) membesar, BMI (*Body Mass Indeks*) menurun, GST (*Glutathione S-Transferase*), GR (*Glutathione Reduktase*) terdapat melimpah, dan terjadi peningkatan EROD. Experimen dilakukan di lapangan dengan menggunakan ikan dari petani ikan dan dipelihara di sungai dengan karamba di sungai yang tercemar DDT dan PCB.

Hanson, Persson and Larsson (2008) melakukan penelitian dengan judul: "*Analyses of Perch (Perca fluviatilis) Bile Suggest Increasing Exposure to PAH and Other Pollutants in a Reference Area on The Swedish Baltic Coast*". Experimen menggunakan ikan Perca di Laut Baltic Swedia, hasil penelitian menunjukkan bahwa meningkatnya aktivitas EROD akibat pajanan polutan PAH, dapat digunakan sebagai biomaker yang memberikan sinyal peringatan dini terhadap pencemaran PAH.

Whitehead, Kuivila, Orlando, Kotelevtsev (2004) melakukan penelitian tentang : "*Genotoxicity In Native Fish Associated With Agricultural Runoff Events*". Penelitian ini tentang biomarker pada ikan *Rainbow trout* untuk monitoring limbah Pestisida di Swedia Barat, experimen di IPAL industri pestisida. Hasil penelitian menunjukkan ikan di kolam yang tercemar limbah pestisida, GSI mengecil, sedangkan aktivitas EROD meningkat. Martin and Black (1998) dan Schmitt, Whyte, Roberts, Annis (2007) dalam penelitiannya tentang Biomarker pada ikan *Rainbow trout* sebagai biomonitoring polutan di Wilayah Pertambangan, di Swedia, mengemukakan bahwa di daerah yang tercemar polutan dari penambangan mas, mengakibatkan aktivitas hepatic

Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) pada ikan terjadi peningkatan. Experimen tersebut dilakukan di sungai dekat area penambangan emas, menggunakan desain eksperimen.

Penelitian-penelitian yang dilakukan di luar negeri maupun di Indonesia tersebut, letak perbedaannya dengan penelitian disertasi ini adalah pada jenis ikan yang digunakan, besarnya konsentrasi polutan, metoda analisis, tempat/lokasi penelitian, tujuan penelitiannya serta biomarker yang ditemukan. Biomarker *metallothionein* pada penelitian ini muncul pada konsentrasi polutan yang sangat rendah (masih memenuhi nilai baku mutu); sedangkan pada penelitian sebelumnya *metallothionein* muncul pada konsentrasi logam berat yang tinggi (melebihi baku mutu air kelas I). Maka temuan disertasi ini berupa biomarker *metallothionein* sebagai alat monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, sejak perairan mengalami gejala pencemaran/terjadi kontaminasi sampai mengalami pencemaran berat. *Metallothionein* yang ditemukan bersifat sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*. Temuan berikutnya adalah jenis ikan yang paling sensitif sebagai biomarker pencemaran dini (pencemaran yang kadar polutannya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I) di perairan sungai yang terpajan logam berat Kadmium, Merkuri dan Timbal secara bersamaan. Selain itu temuan disertasi ini juga berupa konsentrasi maksimal Baku Mutu Cd, Pb dan Hg pada perairan kelas I menurut kajian biomarker, yang seyogyanya dipakai sebagai nilai Baku Mutu Kadmium, Pb dan Hg pada perairan kelas I, yakni perairan yang digunanakan sebagai sumber air baku air minum.

Dari berbagai penelitian yang di laporkan tadi, dapat diketahui bahwa temuan disertasi ini belum pernah ditemukan pada penelitian sebelumnya, sehingga originalitasnya dapat dipertanggungjawabkan. Untuk mempertegas temuan disertasi, disajikan matrik originalitas karakteristik temuan disertasi ini sebagai berikut.

Tabel 1-A
Matrik Originalitas Karakteristik Temuan Disertasi

Peneliti	Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011)	Hanson, Forlin, Larsson (2008)	Chandrasekera, Pathiratne and Pathiratne (2008)	Nur Kusuma Dewi (2012)
Judul	Biomonitoring of effects Following Exposure of Fish to Sugar Refinery Effluent	Evaluation of Long Term Biomarker Data From Perch (<i>Perca Fluviatilis</i>) in The Baltic Sea Suggest Increasing Exposure To Environmental Pollutants	Effects of water borne Cadmium on biomarker enzymes and <i>metallothioneins</i> in Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	Biomarker Pada Ikan Sebagai Alat Monitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium, Timbal dan Merkuri di Perairan Kaligarang Semarang.
Lokasi Penelitian	IPAL pabrik gula PT. Gunung Madu Plantation Lampung, Indonesia	Laut Baltik Swedia	Laboratorium Department of Zoology, Faculty of Science, University of Kelaniya, Kelaniya Srilanka	1) Sungai Kaligarang bagian hilir (Segmen 6) , kurang lebih 200 m dari sumber air baku PDAM Jl Kelud Raya, Petompon, Gajahmungkur Kota Semarang, Jawa Tengah, Indonesia, yang terkontaminasi Cd, Pb dan Hg. (lokasi perlakuan) 2) BBI Ungaran yang tidak terkontaminasi Cd, Pb dan Hg. (lokasi kontrol)
Metode Penelitian	Eksperimen di IPAL pabrik gula PT Gunung Madu (Kolam Aerasi 1, 2, Stabilisasi dan Monitoring	Eksperimen, menggunakan ikan <i>Perch</i> yang hidup bebas di laut Baltik, Swedia, yang tercemar polutan organik.(PCB dan PAH)	<ul style="list-style-type: none"> • Eksperimen di laboratorium • Sampel : Ikan nila • Pemeliharaan ikan di dalam akuarium, pada kelompok perlakuan mengandung kadmium (Cd^{2+}) dengan konsentrasi 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.1 dan 1 mg/L selama 28 hari. Konsentrasi kadmium yang digunakan adalah konsentrasi sub lethal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Eksperimen di lapangan menggunakan ikan dari BBI yang dipelihara di KJA dan Penelitian lapangan menggunakan ikan yang hidup bebas/asli dari sungai • Sampel : Ikan nila dan Ikan mas • Kelompok perlakuan : Sampel Ikan dari BBI dipelihara di sungai kaligarang menggunakan Karamba Jaring Apung (KJA). Konsentrasi logam Cd, Pb dan Hg di sungai Kaligarang masing-masing 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L. • Kelompok kontrol : Sampel Ikan dari BBI yang dipelihara di Balai Benih Ikan Ungaran tanpa logam berat Cd, Pb dan Hg.

	<ul style="list-style-type: none"> • Biomarker yang digunakan: Enzim Sorbitol Dehidrogenase, LSI, GSI, CF dan indeks histopatologik 	<ul style="list-style-type: none"> • Biomarker yang digunakan: GSI, dan EROD 	<ul style="list-style-type: none"> • Biomarker yang diteliti : EROD, GST dan ChE dan MT 	<ul style="list-style-type: none"> • Biomarker yang digunakan untuk mengetahui adanya pencemaran logam berat : EROD, LSI, GSI, dan <i>Metallothionein</i>.
Hasil Penelitian	<ul style="list-style-type: none"> • Ikan Nila Efektif sebagai positif kontrol untuk Biomarker pada sistem kerja IPAL pabrik gula PT Gunung Madu. • Enzim Sorbitol Dehidrogenase (SDH) dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran limbah pabrik gula 	<ul style="list-style-type: none"> - Berkurangnya indeks somatic (GSI). - Gonade pada ikan Perch di lingkungan yang tercemar Nampak mengecil. - Meningkatnya aktivitas hepatic Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) 	<p>Konsentrasi $Cd^{2+} \leq 0,001$ mg/L tidak memberikan efek terhadap EROD, GST, ChE dan MT. Sedangkan kadar ≥ 0.1 mg/L Cd^{2+} secara signifikan menurunkan aktivitas EROD (41-55%); dan meningkatkan kadar MT (<i>metallothionein</i>)</p> <p>Konsentrasi 1 mg/L Cd^{2+} menurunkan aktivitas EROD 24-32% dan ChE 33-35%. MT nila meningkat 2-26 kali lipat sesuai konsentrasi dan lama pajanan.</p>	<p>Pada kelompok perlakuan MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg muncul, sedang pada kelompok kontrol tidak muncul. MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing sebagai penanda pencemaran Cd, Pb dan Hg. MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing muncul pada konsentrasi Cd, Pb dan Hg terendah di hati sebesar 0,00018 mg/kg, 0,00023 mg/kg dan 0,00090 mg/kg dan konsentrasi Cd, Pb dan Hg di air sungai masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L</p>
Karakteristik Temuan	<p>Enzim <i>Sorbitol Dehydrogenase</i> (SDH), <i>indeks fisiologi</i> seperti <i>Liver Somatic Index</i> (LSI), <i>Gonade Somatic Index</i> (GSI) dan <i>Condition Factor</i> (CF) serta <i>Indeks histopatologik</i> pada ikan nila dapat dijadikan sebagai biomarker pencemaran limbah pabrik gula.</p>	<p>EROD sensitif terhadap paparan senyawa organik</p>	<ul style="list-style-type: none"> • EROD dan ChE pada ikan nila berfungsi sebagai biomarker enzim ; untuk penanda biologis polutan organik di perairan • MT pada <i>Nila tilapia</i> merupakan biomarker yang sensitif sebagai penanda biologis adanya tingkat cemaran kadmium yang tinggi yang keberadaannya di air akuarium sebagai polutan tunggal. 	<p>Biomarker <i>Metallothionein</i> (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) pada ikan mas dan ikan nila masing-masing dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb, Hg di perairan mulai konsentrasi rendah (konsentrasi yang masih sesuai dengan baku mutu air kelas I), sehingga MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing dapat digunakan sebagai alat monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, sejak masih berupa gejala pencemaran/kontaminasi . <i>Metallothionein</i> (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) yang ditemukan bersifat sensitif, spesifik, <i>early warning</i>, dan universal sebagai alat monitoring kontaminasi Cd, Pb, Hg yang berada di air sungai secara bersamaan.</p>

Dengan demikian temuan (*novelty*) disertasi ini berupa parameter baru di bidang toksikologi yakni *Lowest Induction Concentration* (LIC). Parameter ini nilainya jauh dibawah nilai ambang batas (NAB) Cd, Pb dan Hg pada ikan sebagai bahan pangan. Parameter LIC dalam satuan μ /kg sedang NAB dalam satuan mg/kg. Oleh karena itu sudah saatnya dilakukan revisi pada NAB yang digunakan sekarang mengacu pada nilai LIC. *Lowest induction Concentration* (LIC) dapat direkomendasikan sebagai parameter toksikologi baru sebagai acuan penentuan NAB Cd, Pb dan Hg pada ikan yang berlaku sekarang. Biomarker *Metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) sudah dapat disintesis/muncul pada LIC (*Lowest Induction Concentration*). Logam berat Cd, Pb dan Hg dalam konsentrasi sangat rendah mampu menginduksi protein (*thionein*) membentuk *metallothioenein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg).

Temuan (*novelty*) berikutnya dari disertasi ini adalah biomarker *Metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) pada ikan mas dan ikan nila masing-masing dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb, Hg di perairan mulai konsentrasi rendah (konsentrasi yang masih sesuai dengan baku mutu air kelas I), sehingga MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing dapat digunakan sebagai alat monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, sejak masih berupa gejala pencemaran/kontaminasi. *Metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) yang ditemukan bersifat sensitif, spesifik, *early warning*, dan universal sebagai alat monitoring kontaminasi Cd, Pb, Hg yang berada di air sungai secara bersamaan.

D. Tujuan Penelitian

D.1. Tujuan Umum

Mempelajari biomarker : LSI, GSI, EROD, dan *Metallothionein* sebagai penanda biologis tingkat molekuler pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg yang konsentrasinya di perairan masih memenuhi Baku Mutu air kelas I; sebagai alat monitoring.

D.2. Tujuan Khusus

1. Mengevaluasi kondisi eksisting kualitas perairan kaligarang secara deskriptif pada saat penelitian dilakukan
2. Menemukan biomarker yang paling sesuai (sensitif, spesifik, *early warning dan universal*) sebagai penanda biologis pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan sungai yang konsentrasi logam beratnya masih memenuhi Baku Mutu air kelas I (*Metallothionein*, EROD, LSI, ataukah GSI); sebagai alat monitoring.
3. Menentukan konsentrasi terendah Cd, Pb dan Hg dalam hati ikan mas dan nilai yang menginduksi sintesis/munculnya biomarker *Metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) paling awal.
4. Menemukan biomarker *Metallothionein* yang disintesis/muncul paling awal sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan yang konsentrasi logam beratnya masih memenuhi Baku Mutu air kelas I (*Metallothionein-Cd, Metallothionein-Pb* ataukah *Metallothionein-Hg*).
5. Menentukan nilai BCF yang menyebabkan munculnya biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg paling awal.

6. Menentukan *Metallothionein* yang sensitif sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan sungai dengan konsentrasi masih memenuhi Baku Mutu (MT ikan mas atau MT ikan nila).

E. Manfaat Penelitian

Metallothionein (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) sebagai biomarker yang paling sesuai untuk penanda biologis pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan sungai yang konsentrasi polutannya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I, temuan ini dapat dijadikan sebagai penanda biologis yang sensitif, spesifik, early warning dan universal yang dapat diaplikasikan di lapangan sebagai alat deteksi dini dalam monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan maupun pada ikan, sehingga dapat ditentukan langkah pengelolaan dan pencegahan pencemaran lingkungan perairan. *Metallothionein* sebagai alat monitoring, penerapannya di lapangan dilakukan dengan menggunakan ikan yang hidup bebas di perairan yang tercemar logam berat. Jenis ikan yang digunakan tidak harus ikan mas atau nila, namun dapat menggunakan jenis ikan apapun yang mudah di dapat di perairan tersebut; yang umurnya sudah dewasa/siap panen; kemudian diambil hatinya dan dilakukan isolasi *metallothionein* serta analisis HPLC untuk melihat munculnya MT. Alat monitoring ini dapat digunakan pada kegiatan monitoring logam berat di sungai yang dilakukan oleh instansi terkait yang menangani Program Kali Bersih (PROKASIH) secara nasional

Besarnya konsentrasi Cd, Pb dan Hg di perairan yang menginduksi sintesis/munculnya biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg paling awal; hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai masukan bagi pemerintah/pihak-pihak terkait sebagai bahan pertimbangan dalam menentukan kebijakan di lapangan, untuk

menetapkan baku mutu logam berat pada air baku air minum maupun untuk menetapkan kelas air sesuai peruntukannya sebagaimana yang tercantum dalam Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001. Perairan yang mengandung logam berat agar dikategorikan sebagai air kelas II, yakni perairan yang peruntukannya untuk rekreasi.

Metallothionein yang ditemukan ini juga bermanfaat untuk direkomendasikan sebagai biomarker yang seyogyanya dipakai sebagai penanda biologis untuk monitoring pengolahan limbah Cd, Pb dan Hg di IPAL yang mengolah limbah logam berat Cd, Pb maupun Hg.

Manfaat yang lain adalah memberikan masukan pada masyarakat bahwa ikan yang hidup di sungai Kaligarang maupun di perairan lain yang mengandung logam berat, tidak layak untuk dikonsumsi. Sedangkan air sungai tersebut tidak layak untuk air minum karena logam berat yang terlarut di air maupun terakumulasi pada tubuh ikan tadi melalui rantai makanan atau bersama air minum dapat terakumulasi pada tubuh manusia sehingga mencapai konsentrasi toksik dan membahayakan kesehatan.

Manfaat bagi ilmu pengetahuan adalah memberikan informasi bahwa induksi sintesis *metallothionein* sudah terjadi mulai konsentrasi rendah pada setiap jenis logam berat baik Cd, Pb maupun Hg yang ketiganya bercampur larut bersama dalam perairan; sehingga dapat direkomendasikan suatu parameter toksikologi baru yang selama ini belum pernah ada yakni *Lowest Induction Concentration (LIC)*. Biomarker *metallothionein* bersifat sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Pencemaran Air

Air merupakan kebutuhan pokok bagi kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya di bumi ini. Sesuai dengan kegunaannya, air dipakai sebagai air minum, air untuk mandi dan mencuci, air untuk pengairan pertanian, air untuk kolam perikanan, air untuk memelihara hewan ternak, air untuk sanitasi dan air untuk transportasi baik disungai maupun dilaut. Selain itu air juga diperlukan untuk meningkatkan kualitas hidup manusia, yaitu untuk menunjang kegiatan industri dan teknologi. Kegiatan industri dan teknologi tidak dapat terlepas dari kebutuhan akan air. Dalam kegiatan industri dan teknologi, air digunakan antara lain sebagai air proses, air pendingin, air ketel uap penggerak turbin, dan air sanitasi (Wardhana 2004, Argawala 2006, Miller 2007).

Pada kegiatan industri dan teknologi, air yang telah digunakan (air limbah industri) tidak diperbolehkan langsung dibuang ke lingkungan karena dapat menyebabkan pencemaran. Air tersebut harus diolah terlebih dahulu agar kualitasnya sesuai dengan Baku Mutu air yang telah ditetapkan. Dengan demikian air limbah industri harus mengalami proses daur ulang sehingga dapat digunakan lagi atau dibuang kembali ke lingkungan tanpa menyebabkan pencemaran. Proses daur ulang air limbah industri atau *Water Treatment Recycle Process* adalah salah satu syarat yang harus dilakukan oleh industri yang berwawasan lingkungan (Argawala 2006, Miller 2007, Withgott and Brennan 2007, Wardhana 2004).

Dengan demikian apabila semua kegiatan industri dan teknologi memperhatikan dan melaksanakan pengolahan air limbah industri sesuai ketentuan dan masyarakat umum juga tidak membuang limbah secara sembarangan maka masalah pencemaran air sebenarnya tidak perlu dikhawatirkan. Namun dalam kenyataannya masih banyak industri atau suatu pusat kegiatan kerja yang membuang limbahnya ke lingkungan melalui sungai, danau atau langsung ke laut. Pembuangan air limbah secara langsung ke lingkungan perairan inilah yang menjadi penyebab utama terjadinya pencemaran air (Argawala 2006, Withgott and Brennan 2007, Miller 2007, Wardhana 2004).

Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 32 tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, pasal 1 ayat 14 menyebutkan bahwa pencemaran adalah masuk atau dimasukkannya makhluk hidup, zat, energi, dan/atau komponen lain ke dalam lingkungan hidup oleh kegiatan manusia sehingga melampaui Baku Mutu lingkungan hidup yang telah ditetapkan.

Adapun untuk menentukan bahwa suatu perairan tidak sesuai lagi dengan peruntukannya, ditetapkan standar yang disebut Baku Mutu untuk air sungai. Baku Mutu adalah ukuran batas atau kadar makhluk hidup, zat, energi atau komponen yang ada atau harus ada dan atau unsur pencemar yang ditenggang keberadaannya dalam air. Berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air Dan Pengendalian Pencemaran Air, klasifikasi mutu air digolongkan ke dalam 4 kelas sesuai peruntukannya yakni sebagai berikut :

- a. Air kelas I, air yang peruntukannya dapat digunakan untuk air baku air minum dan atau peruntukkan lain yang mempersyaratkan mutu air yang sama dengan kegunaan tersebut.

- b. Air kelas II, air yang peruntukkannya dapat digunakan untuk prasarana/sarana rekreasi air, pembudidayaan ikan air tawar, peternakan, air untuk mengairi pertanaman, dan atau peruntukkan lain yang mempersyaratkan mutu air yang sama dengan kegunaan tersebut.
- c. Air Kelas III, air yang peruntukkannya dapat digunakan untuk pembudidayaan ikan air tawar, peternakan, air untuk mengairi pertanaman, dan atau peruntukkan lain yang mempersyaratkan mutu air yang sama dengan kegunaan tersebut.
- d. Air kelas IV, air yang peruntukkannya dapat digunakan untuk mengairi pertanaman dan atau peruntukkan lain yang mempersyaratkan mutu air yang sama dengan kegunaan tersebut.

B. Biondikator Pencemaran Air

Indikator atau tanda bahwa air lingkungan telah tercemar adalah adanya perubahan atau tanda yang dapat diamati melalui adanya perubahan suhu air, adanya perubahan pH atau konsentrasi ion Hidrogen, adanya perubahan warna, bau dan rasa air, timbulnya endapan, koloidal, bahan terlarut, adanya mikroorganisme dan meningkatnya radioaktivitas air lingkungan. Adanya tanda atau perubahan tersebut menunjukkan bahwa air telah tercemar. Klaassen (2001), Wardhana (2004) dan Miller (2007), mengemukakan bahwa organisme yang keadaannya dapat memberikan respon perubahan yang diakibatkan perubahan lingkungan disebut sebagai indikator biologi (bioindikator).

Bioindikator yang ada pada jalur air dan mungkin akan sampai pada manusia adalah: Phytoplankton, zooplankton, kerang, udang dan ikan. Menurut Conell (2001),

Withgott and Brennan (2007) pernyataan spesies indikator telah digunakan dalam cara yang berbeda, yakni: pertama untuk memberikan spesies tertentu yang diadaptasikan secara selektif terhadap suatu keadaan pencemaran tertentu, misalnya daerah tercemar berat dan daerah bersih. Dengan demikian adanya spesies tertentu ini dapat digunakan untuk mencirikan adanya keadaan pencemaran, sehingga disebut spesies indikator ekologis. Kedua adalah organisme yang mengakumulasi bahan kimia yang berada dalam lingkungan. Analisis kimia spesies ini kemudian mencirikan adanya zat kimia dalam lingkungan secara lebih efektif dari pada analisis suatu sampel lingkungan, misalnya air, sehingga disebut spesies monitor kimiawi.

Plaa (2007) dan Argawala (2006) mengatakan bahwa dalam memonitor pencemaran logam, analisis biota air sangat penting artinya daripada analisis air itu sendiri, karena kandungan logam berat dalam biota air biasanya akan bertambah dari waktu ke waktu karena sifat logam yang *bioakumulasi* dan *biomagnifikasi* sehingga biota air sangat baik digunakan sebagai indikator biologi (bioindikator) adanya pencemaran logam berat di perairan.

Hellawell (2000) dan Klaassen (2001) mengemukakan sifat-sifat yang harus dimiliki oleh suatu organisme yang dapat digunakan sebagai bioindikator pencemaran logam di perairan, adalah sebagai berikut :

1. Spesies-spesies harus mengakumulasi polutan tanpa mengakibatkan kematian pada konsentrasi yang terpajan dalam lingkungannya
2. Semua individu-individu dari spesies indikator harus menunjukkan korelasi sederhana yang sama antara kandungan residu mereka dan konsentrasi polutan rata-rata dalam air disekelilingnya, atau lapisan-lapisan (endapan) dasar makanan atau semua lokasi.

3. Organisme harus menetap untuk memastikan bahwa temuan dapat mencirikan daerah yang dipelajari.
4. Spesies-spesies yang hidupnya lama lebih diinginkan karena mereka memungkinkan diambil sampel untuk beberapa tahun jika diperlukan.
5. Spesies harus terdapat banyak sekali sepanjang area studi dan lebih disukai yang mempunyai distribusi tersebar luas untuk memudahkan perbandingan diantara area-area.
6. Spesies-spesies harus mempunyai ukuran yang cukup sehingga memberikan jaringan-jaringan yang memadai untuk dianalisis. Sifat ini menolong dalam hal pembedahan bila dilakukan study akumulasi dalam organ-organ khusus.
7. Spesies-spesies harus mudah diperoleh dan kuat untuk sampai di laboratorium.

Ikan merupakan organisme yang memiliki sifat-sifat tersebut, oleh karena itu ikan merupakan organisme perairan yang sangat representatif untuk menduga pencemaran perairan. Ikan merupakan bioindikator yang baik untuk pencemaran logam berat di perairan. Kekhawatiran utama terhadap beberapa logam berat adalah pengaruhnya yang bersifat akumulatif. Pemajanan berulang-ulang pada kadar yang rendah dapat terakumulasi pada jaringan ikan dengan kadar yang jauh lebih tinggi (Plaa, 2007). Disamping kemampuan untuk mengakumulasikan, peningkatan kadar zat toksik dalam tubuh organisme meningkat pada tingkat tropik yang lebih tinggi (*biomagnifikasi*) (Kostnet, 2007, Klaassen 2001, Katzung 2007).

C. Biomarker/Penanda Biologis pada Ikan Sebagai Alat Monitoring

Kualitas lingkungan perairan dapat diketahui berdasarkan perubahan dalam sistem atau parameter biologi yang terpilih, pendekatan ini dikenal dengan istilah

biomonitoring. Biomonitoring adalah cabang dari monitoring lingkungan yang mengacu pada penggunaan organisme hidup, yang digunakan sebagai pendugaan residu bahan pencemar dalam jaringan organisme sampai pendugaan akhir pengaruh biologi spesifik. Bentuk atau tipe biomonitoring dapat dikembangkan berdasarkan perubahan karakteristik secara biokimia, fisiologi, morfologi atau tingkah laku organisme, disamping berdasarkan cara konvensional seperti struktur komunitas yang meliputi kemelimpahan dan indeks keanekaragaman (Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri 2007, Wardhana 2004, Klaassen 2001).

Konsep yang terbaru dalam biomonitoring dikenal dengan istilah biomarker. Biomarker di definisikan sebagai respon secara biologi terhadap pencemaran lingkungan yang memberikan besarnya pajanan dan pengaruh toksik bahan pencemar. Biomarker merupakan akhir dari uji ekotoksikologi yang menunjukkan efek pada organisme hidup. Salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini, dari pengaruh secara biologi; dan biomarker dipercaya sebagai respon pada sub seluler (molekuler, biokimia dan fisiologi) reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi makhluk hidup/spektrum biologi yang lebih tinggi (Hanson, Forlin, Larsson 2008).

Penanda biologis atau biomarker di dalam ikan dapat berfungsi sebagai alat yang berguna untuk mengevaluasi beban pencemaran di lingkungan perairan dan menerima sinyal peringatan dini yang berhubungan dengan ancaman lingkungan yang baru. Penanda biologis didefinisikan sebagai pengukuran spesifik yang merefleksikan adanya interaksi biologis dengan agen lingkungan misalnya Cd, Pb maupun Hg; Penanda biologis biasa digunakan untuk analisis resiko di bidang kesehatan lingkungan

(Henna Rya Sunoko, 2007). Penggunaan biomarker untuk monitoring lingkungan merupakan sebuah metode yang memanfaatkan analisis kimia seperti halnya bioindikator. Biomarker adalah respon-respon yang diukur pada tingkat individu, yang berkisar dari pengukuran enzim dan metabolisme *xenobiotic* pada indek organ dan kondisi keseluruhan. Monitoring lingkungan perairan dengan biomarker dapat dilakukan dengan berbagai kelompok organisme, tetapi yang paling umum adalah remis dan ikan Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri (2007), Plaa 2007).

Biomarker pada ikan telah digunakan untuk meneliti wilayah tercemar di luar negeri sejak tahun 1970. Adapun contoh-contoh sumber polusi yang diteliti adalah pabrik bubur kayu/pulp mills Larsson, Forlin, Lindesjoo, Sandstrom (2002), Larsson, Forlin, Grahn, Landner (2000), penanganan limbah kotoran Jessica, Robert, Frederic, Arnaud (2007), wilayah pertambangan Schmitt, Whyte, Roberts, Annis (2007), pestisida yang mencemari tanah pertanian Whitehead, Kuivila, Orlando, Kotelevtsev (2004) dan polusi dari wilayah perkotaan Hanson, Gutman, Larsson (2006), Linderoth, Hansson, Liewenborg, Sundberg (2006), Webb, Gagnon, Rose (2005). Kebanyakan kontaminan pada akhirnya berujung di air, maka lingkungan air menjadi perhatian tertinggi di dalam monitoring lingkungan (Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri 2007). Penelitian tentang biomarker sebagaimana disebutkan tadi, menggunakan ikan *Rainbow trout*/ikan pelangi.

Adapun biomarker yang pernah digunakan dan interpretasinya disajikan dalam Tabel 1-B halaman berikut ini; Larsson, Forlin, Grahn, Landner (2000) dan Sandstrom, Larsson, Andersson, Appelberg (2005).

Tabel 1-B

Biomarker dan Interpretasinya

No	Biomarker	Interpretasi
1	Faktor kondisi (CF) dan indeks massa tubuh (BMI)	Gangguan metabolisme dan status pemberian makanan
2	<i>Liver Somatic Index</i> (LSI)	Mencerminkan status metabolisme. Ukuran hati yang semakin besar menunjukkan aktifitas metabolisme yang tinggi. Ukuran hati yang kecil dapat disebabkan oleh kekurangan makanan
3	<i>Gonade Somatic Index</i> (GSI)	GSI yang turun (kecil) menunjukkan kesuburan yang rendah, mungkin disebabkan oleh berkurangnya alokasi energi untuk reproduksi.
4	<i>Ethoxyresorufin-O-deethylase</i> (EROD)	Mengukur aktifitas <i>detoksifikasi</i> . EROD yang meningkat menunjukkan adanya pajanan polutan organik
5	<i>Glutathione reductase</i> (GR), <i>Glutathione S-transferase</i> (GST) dan <i>catalase</i>	<i>Enzim antioksidan</i> yang menunjukkan tekanan oksidatif dan pajanan terhadap radikal oksigen.
6	Metabolit PAH di dalam insang	Menunjukkan adanya pajanan PAH
7	Kelebihan relatif sel darah putih (<i>lympocytes</i> , <i>thrombocytes</i>)	Menunjukkan dampak pada sistem pertahanan kekebalan.
8	Glukosa darah dan laktat di dalam plasma darah	Menunjukkan gangguan metabolisme tetapi perubahan juga bisa disebabkan oleh tekanan sampling.
9	<i>Hematocrit</i> (HT) dan <i>Hemoglobin</i> (Hb)	Mencerminkan oksigen yang membawa daya muat dalam darah. Nilai yang rendah dapat disebabkan karena kerusakan insang atau osmoregulasi yang cacat, nilai yang tinggi menunjukkan naiknya permintaan oksigen atau tekanan yang akut.
10	<i>Metallothionein</i> (MT)	Protein yang mengikat logam. Munculnya MT menunjukkan adanya pajanan logam tertentu.
11	Ion plasma darah (Cl, Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺)	Perubahan ion plasma dapat menunjukkan osmoregulasi atau ion regulasi yang terganggu, kerusakan ginjal, kerusakan insang atau kerusakan usus.

Sumber : (Larsson 2000 dan Sandstrom 2005)

Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011) dalam penelitiannya tentang “*Biomonitoring of Effect Following Exposure of Fish to Sugar Refinery Effluent*” ternyata ikan nila dapat dijadikan positif kontrol biomarker efektivitas sistem kerja IPAL PT Gunung Madu Plantation. Penelitian ini dilakukan di kolam aerasi 1, 2 stabilisasi dan monitoring. Pada penelitian ini biomarker yang dikaji meliputi indeks fisiologi, analisis enzim dan histopatologi hepar. Metode penelitian menggunakan *experimental design*; dilakukan di IPAL PT. Gunung Madu (Kolam aerasi 1, 2 Stabilitas dan Monitoring). Penelitian ini hasilnya merupakan respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan.

Respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sudah saatnya dipakai untuk monitoring lingkungan, sehingga secara dini pencemaran lingkungan dapat dicegah/dimonitor. Langkah preventif dalam upaya pencegahan pencemaran jauh lebih baik dari pada secara kuratif. Sebagaimana pendapat Hanson (2008) bahwa salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini dari pengaruh *xenobiotic* secara biologis. Respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan memberikan peluang untuk melakukan langkah preventif sebagai upaya pencegahan akan terjadinya pencemaran lingkungan. Lebih jauh dikatakan bahwa efektivitas pengolahan limbah cair pada pabrik gula dapat dimonitor dengan menggunakan biomarker pada tingkat sub seluler seperti aktivitas enzim *Sarbitol Dihidrogenase* (SDH), *indeks fisiologi* seperti *Liver Somatic Index* (LSI), *Gonade Somatic Index* (GSI) dan *Condition Factor* (CF) serta *Indeks histopatologik* (Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto. dan Kurniati 2009 dan Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi 2011).

Hasil penelitian Hanson, Guttman dan Larsson (2006) di sungai Gota Alv, Swedia Barat, menunjukkan bahwa LSI (*Liver Somatic Index*) membesar, BMI (*Body Mass Index*) menurun, GST (*Glutathione S-Transferase*), GR (*Glutathione Reduktase*) terdapat melimpah, dan terjadi peningkatan EROD. Penelitian ini dilakukan di lapangan dengan menggunakan ikan dari petani ikan dan dipelihara di sungai dengan karamba, di sungai yang tercemar DDT dan PCB. Hanson and Larsson (2007) melakukan penelitian di Sungai Gota Alv dan Danau Delsjon. Penelitian ini termasuk tipe *experimental design*, di lakukan di laboratorium, menggunakan ikan *Rainbow trout*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa makanan berpengaruh terhadap respon biologis ikan, baik BMI, LSI, EROD and kerja enzim katalase.

C.1. *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD)

Ethoxyresorufin-O-diethylase (EROD) adalah enzim yang digunakan sebagai indikator yang sensitif terhadap adanya pajanan senyawa organik antropogenik seperti Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) dan senyawa lainnya dengan struktur konfigurasi planar halogen. Menurut Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) EROD telah diaplikasikan secara luas untuk mendeteksi adanya pencemaran senyawa organik pada ikan, disamping *glutathione S-transferase* (GST), dan *cholinesterases* (ChE fraksi). Cytochrome P-450 1A (CYP1A) dapat menginduksi *monooxygenase* yang dapat diketahui dengan menggunakan biomarker EROD. Biomarker tersebut telah banyak digunakan sebagai indikator yang sensitif terhadap pajanan kontaminan senyawa organik antropogenik, seperti Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) dan *polychlorinated biphenyls* (PCBs) dan dioxin (Van der Oost, Beyer dan Vermeulan 2003; Sandstrom, Larsson Andersson dan Appelberg 2005; Hanson, Guttman dan

Larsson 2006; Hanson dan Larsson, 2007; Hanson, Persson dan Larsson 2008; Hanson, 2008).

Aktivitas enzim *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD) secara umum digunakan sebagai biomarker terhadap adanya pencemaran senyawa organik organoklorin (seperti PCB, PCBs, PAH_s dan PAH). Aktivitas EROD dikategorikan sebagai *biomarker of exposure*, yaitu biomarker yang langsung dapat terdeteksi karena adanya pajanan. Menurut Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) *biomarker of exposure* dikategorikan sebagai biomarker untuk pengukuran substansi oksigen, substansi oksigen metabolit dan interaksi antara substansi oksigen dengan molekul target. Hal tersebut didukung oleh beberapa peneliti antara lain Larsson, Forlin, Grahn dan Landner, (2000) dan Sandstrom, Larsson Andersson dan Appelberg (2005) dalam Hanson (2008) yang memberikan interpretasi bahwa aktivitas EROD digunakan untuk pengukuran aktivitas detoksifikasi adanya pajanan senyawa organik. Namun demikian, menurut hasil penelitian Ueng, Liu, Lai dan Meng (1996) disampaikan bahwa suntikan ikan nila dengan CdCl₂ sebesar 2 mg/kg secara in vivo secara laboratorik tidak berpengaruh pada aktivitas EROD atau sistem sitokrom P-450. Dalam studi ini, pajanan kadmium sebesar 0,001-0,01 mg/L memiliki efek yang sangat tidak signifikan pada aktivitas EROD hati.

Hanson and Larsson (2008^a), hasil penelitiannya menunjukkan bahwa aktivitas EROD karena meningkatnya PAH dapat dijadikan biomarker yang memberikan sinyal peringatan dini terhadap pencemaran organik. Sedangkan Hanson, Persson dan Larsson (2008) melakukan penelitian eksperimen menggunakan ikan Perca di Laut Baltic Swedia, hasil penelitian menunjukkan bahwa meningkatnya aktivitas EROD akibat

pajanan polutan PAH, dapat digunakan sebagai biomaker yang memberikan sinyal peringatan dini terhadap pencemaran PAH.

Hanson and Larsson (2008^b), di Swedia Selatan melakukan penelitian dengan judul:” *Biomarker Analysis in Fish Suggest Exposure to Pollutants in Urban Area With a Landfill*”. Eksperimen menggunakan ikan *Rainbow trout* dan *Brown trout*; air diambil dari area yang terkontaminasi air *leachate* dari *landfill*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai aktivitas EROD pada ikan *Rainbow trout* dan ikan *Brown trout* masing-masing sebesar 13,1 pmol/min/mg protein dan 61,3 pmol/min/mg protein pada lokasi 1 dan 94,2 pmol/min/mg protein serta 296 pmol/min/mg protein pada lokasi 2.

Larsson, Forlin, Lindesjoo, Sandstrom (2002) melakukan penelitian di Swedia. Eksperimen dilakukan di IPAL industri Pulp, dengan hasil bahwa EROD merupakan biomarker yang memberikan sinyal peringatan dini terhadap pencemaran. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas EROD meningkat.

Whitehead, Kuivila, Orlando, Kotelevtsev (2004) melakukan penelitian pada IPAL industri pestisida. Penelitian ini tentang biomarker pada ikan *Rainbow trout* untuk monitoring limbah Pestisida di Swedia Barat. Hasil penelitian menunjukkan ikan di kolam yang tercemar limbah pestisida GSI mengecil, sedangkan aktivitas EROD meningkat. Martin & Black (1998) dan Schmitt, Whyte, Roberts, Annis (2007) dalam penelitiannya tentang Biomarker pada ikan *Rainbow trout* sebagai biomonitoring polutan di wilayah pertambangan di Swedia, mengemukakan bahwa di daerah yang tercemar polutan dari penambangan mas, mengakibatkan aktivitas hepatic *Ethoxyresorufin-O-Deethylase* (EROD) pada ikan terjadi peningkatan dari 26,7 pmol/min/mg protein menjadi 31,19 pmol/min/mg protein. Penelitian tersebut dilakukan di sungai dekat area penambangan emas, menggunakan desain eksperimen.

Hasil penelitian Hansson (2008) tentang biomarker EROD pada ikan Brown trout (*Salmo trutta*) yang terpajan oleh polutan pada sedimen di laut menunjukkan adanya peningkatan aktivitas EROD yang signifikan; yakni dari 9,1 pmol/min/mg protein pada pajanan PAH dosis rendah menjadi 15,3 pmol/min/mg protein pada pajanan PAH dosis tinggi. Demikian pula pada larva *Rainbow trout* yang dipajan oleh ekstrak dari sedimen laut yang disuntikan dalam telur yang baru dibuahi terdapat peningkatan aktivitas EROD yang signifikan pula. Aktivitas EROD tersebut disebabkan oleh Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) yang terdapat dalam sedimen maupun yang disuntikan pada ikan *Rainbow trout*.

Biotransformasi PAH pada ikan dapat diukur dengan bantuan biomarker aktivitas EROD dan metabolit PAH. Sebuah hubungan yang jelas telah diamati antara aktivitas EROD (CYP1A1) dan pajanan PAH pada ikan *Oreochromis mossambicus* (Shailaja dan Rodrigues 2001, Ueng, Liu, Lai dan Meng 1996, Shailaja dan D'Silva 2003, Chen, Chou Liu, Liang Shih dan Ting Lee 2001). Dalam penelitian ini, induksi EROD pada *Oreochromis mossambicus* tampak jelas pada pajanan konsentrasi sangat rendah dari penyulingan limbah yang mengandung PAH. Ikan yang terpajan oleh limbah penyulingan yang telah diencerkan 1:1000 menunjukkan aktivitas EROD tiga kali lipat lebih tinggi (signifikansi > 95%) dibandingkan dengan kelompok kontrol ikan di air bersih, sedangkan pada ikan yang terpajan limbah penyulingan dengan pengenceran 1:100 aktivitas EROD sebesar 1,3 kali lipat dari ikan kontrol (Shailaja dan Rodrigues, 2001).

C.2. *Liver Somatic Index (LSI) dan Gonade Somatic Index (GSI)*

Liver Somatic Index (LSI) telah digunakan secara luas untuk menentukan status fisiologi pada ikan. Penelitian Everaarts (2006) menyatakan bahwa *Liver Somatic*

Index dapat digunakan sebagai parameter fisiologi. Telah dilakukan pengukuran LSI ikan air tawar yang dikumpulkan dari sungai yang terkontaminasi dengan *polychlorinated biphenyls* (PCB) dan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) di Timur Tennessee dan dari muara serta perairan laut yang terkontaminasi dengan PAH dan kadmium di perairan Mississippi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Liver Somatic Index* (LSI) pada ikan dari sungai yang tercemar adalah lebih rendah dibandingkan ikan yang bebas cemaran. Pengukuran respons biologis sangat berharga untuk menunjukkan perbedaan kualitas lingkungan yang dinyatakan baik secara molekuler maupun fisiologis.

Arnold, B.S., Jagoe, CH, Gross, T.S., Howerth, EW, Reinert, R.E. (2000) dan Arnold, Pluta dan Braunbeck (1995) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kontaminasi merkuri merupakan perhatian utama di Amerika Serikat bagian Tenggara, tetapi hanya sedikit yang diketahui tentang efek pajanan dengan konsentrasi rendah pada kesehatan dan reproduksi ikan. Untuk menguji efek pajanan terhadap reproduksi, maka menggunakan ikan nila yang diimplan kapsul secara intraperitoneal dengan dosis yang mengandung 0,1 mg (dosis rendah) dan 1,0 mg (dosis tinggi) CH_3HgCl_2 , serta dirancang untuk dapat larut selama 180 hari. Setelah 6 bulan, darah dikumpulkan untuk analisis hormon, dan jaringan lain untuk histopatologi dan analisis Hg. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan antara nilai *Liver somatic index* (LSI) dan *Gonad-somatic index* (GSI) kelompok yang terpajan merkuri dengan dosis rendah dengan kelompok yang terpajan merkuri dengan dosis tinggi. Namun, pemeriksaan histologi menunjukkan bahwa ikan betina yang terpajan Hg terjadi peningkatan kerusakan folikel, sehingga folikel pecah, atau mengalami peradangan. Ikan jantan yang terpajan Hg cenderung mengalami penurunan spermatogenesis, atrofi tubulus seminiferus. Hasil

ini menunjukkan bahwa konsentrasi metil merkuri lingkungan dapat mengganggu fungsi endokrin dan berpotensi merusak reproduksi pada ikan.

Penelitian tentang efek fisiologis pajanan PAH terhadap LSI telah sering digunakan sebagai biomarker untuk memeriksa ikan yang terpajan oleh kontaminan lingkungan. Nilai LSI umumnya meningkat pada vertebrata yang mengalami induksi mikrosomal hepatic P-450 untuk mendetoksifikasi senyawa organik. Nilai LSI ikan *Oreochromis mossambicus* yang terpajan oleh limbah organik (PAH) menunjukkan peningkatan 15,5% dibanding nilai LSI pada kontrol (Shailaja dan Rodrigues, 2001). Selain itu, studi sebelumnya telah menunjukkan terjadinya kerusakan hepatoseluler sublethal terkait dengan kematian sel pada ikan yang terpajan. Penelitian ini menunjukkan bahwa pajanan PAH dapat menyebabkan kerusakan fisiologis. Setelah pemulihan dengan menempatkan ikan di air bersih selama 7 hari pemulihan, tren penurunan di LSI terus berlanjut.

Adapun variasi konsentrasi merkuri di hati tidak ditemukan pada studi sebelumnya, literatur yang sudah diterbitkan hanya melaporkan tentang konsentrasi merkuri dalam tubuh ikan. Hal ini barangkali mencerminkan keengganan untuk mengeksplorasi pengaruh penggunaan merkuri terhadap jaringan hati. Penelitian sebelumnya hanya digunakan jaringan otot/daging ikan untuk memantau adanya pajanan merkuri; atau mungkin telah ada peneliti sebelumnya yang telah mengeksplorasi namun tidak menemukan hasil yang memuaskan sesuai dengan tujuan mereka; atau mengalami kegagalan sehingga tidak dipublikasikan. Meskipun demikian, peran penting biomarker LSI, seperti yang telah diuraikan di atas, dalam dinamika dan absorpsi logam pada jaringan ikan berpotensi untuk dipertimbangkan agar dapat digunakan sebagai pemantauan pajanan merkuri (Shailaja dan D'Silva, 2003).

Konsentrasi merkuri pada hati ikan akibat perbedaan musim tidak mencerminkan adanya perbedaan konsentrasi merkuri yang terakumulasi dalam hati ikan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berat hati pada ikan mengalami peningkatan dalam ukuran yang relatif besar terhadap berat tubuh ikan antara musim semi dan musim panas, tetapi konsentrasi total merkuri hati adalah sama. Hal ini menunjukkan bahwa nilai LSI tergantung pada variasi musim. Hasil dari penelitian ini menyatakan bahwa *liver somatic index* (LSI) secara signifikan lebih tinggi pada ikan yang hidup di musim panas dibandingkan ikan lain yang hidup di perairan beriklim sedang dan musim dingin. Kecenderungan nilai LSI mengikuti suhu air sesuai musim di lokasi perairan, laut bebas maupun muara. Nilai LSI dari ikan yang hidup di perairan pesisir dari utara-timur Skotlandia pada bulan Pebruari sampai Maret dan suhu 34° C adalah sama dengan nilai LSI ikan yang hidup di Muara Forth pada bulan Agustus sampai September pada suhu 12-15° C. Peningkatan nilai LSI yang terjadi barangkali karena kombinasi dari peningkatan jumlah hepatosit, dan pengendapan lipid dan glikogen dalam hati selama periode intensif konsumsi pakan setelah pemijahan. (Shailaja dan Rodrigues, 2001).

Penelitian lain mengatakan bahwa selama periode musim dingin dan kondisi pakan yang buruk maka lipid dan glikogen sebagai cadangan makanan digunakan/dimobilisasi dan untuk perkembangan gonade, dan hal ini berpengaruh terhadap nilai LSI. Dengan demikian, siklus musim dan kebiasaan makan dari ikan memiliki efek penting terhadap ukuran hati. Secara umum, ikan benthik cenderung menyimpan lemak di hati daripada dalam jaringan otot. Variasi musim yang berpengaruh terhadap kadar lipid pada ikan pada umumnya bertepatan dengan perubahan suhu lingkungan, juga berhubungan dengan perubahan dalam ketersediaan makanan.

Perubahan musim yang mempengaruhi ukuran hati juga terkait pada reproduksi *Zoarces viviparus*. Dalam studi tentang metabolisme lipid pada *Z. viviparous* betina dari Perairan Denmark, terjadi peningkatan lipid di hati selama musim panas dan nilai LSI relative rendah pada musim panas. *Liver Somatic Index* (LSI) mencapai ukuran maximum sebelum inisiasi dari vitellogenesis, atau produksi kuning telur untuk mengembangkan oosit dalam ovarium, hati dan berat badan tetap tinggi selama pertumbuhan vitellogenic. Penurunan lipid pada hati ikan berhubungan dengan penurunan yang besar di tingkat vitellogenin dan tingkat serum lipid. Penurunan kadar lipid bertepatan dengan penurunan LSI selama musim gugur dan musim dingin- (Shailaja dan Rodrigues, 2001).

Nilai maksimum LSI dicapai pada ikan di Denmark pada bulan Juni, dan tetap cukup konstan pada sekitar 3% dari berat badan hingga Agustus. Selama sisa tahun, nilai LSI adalah antara 1 dan 2%, Meskipun mekanisme penyerapan merkuri anorganik dan organik masih diperdebatkan, namun perlu diketahui bahwa konsentrasi merkuri dalam hati tergantung pada suatu jenis protein yang ada di dalam hati, yaitu *metallothionein*. Dengan demikian, kemungkinan variasi musim hanya berpengaruh terbatas pada konsentrasi total merkuri di hati organism. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan musim yang berhubungan dengan kadar lipid tidak sesuai dengan peningkatan merkuri dalam hati. Dengan demikian lipid tidak mungkin memainkan peran dalam penyimpanan merkuri dalam hati. (Shailaja dan Rodrigues, 2001).

Oleh karena itu, nilai LSI bervariasi di beberapa musim, barangkali berhubungan dengan konsumsi pakan selama musim di suatu negara dan masa reproduksi. Demikian pula, rata-rata konsentrasi merkuri di dalam hati ikan 3x lebih tinggi di musim dingin daripada di musim panas. Perbedaan tersebut terkait terutama pada nilai LSI, karena

perubahan konsentrasi merkuri dalam hati. LSI ikan Cod telah terbukti bervariasi antara 2 dan 4% dari berat badan dari musim dingin ke musim panas. Hal ini barangkali karena konsentrasi merkuri dalam hati ikan Cod tergantung pada variasi musim, bahkan di lingkungan relatif tidak terkontaminasi oleh merkuri.

Gonade Somatic Index (GSI) atau indeks kematangan gonade adalah perbandingan antara berat gonade dengan berat tubuh ikan. Untuk mengetahui perubahan yang terjadi dalam gonade tersebut secara kuantitatif. Dapat dinyatakan dengan suatu indeks yang dinamakan Indeks Kematangan Gonade, atau IKG. Indeks ini dinamakan juga *Gonade Somatic Index* (GSI) yaitu suatu nilai hasil perbandingan berat gonade dengan berat tubuh ikan termasuk gonade dikalikan dengan 100 (seratus).

Perubahan yang terjadi pada gonade secara kuantitatif dapat diketahui dari GSI. Sejalan dengan perkembangan kematangan, berat gonade semakin bertambah dan menurun bila ada gangguan metabolisme. Tahap kematangan adalah perkembangan sel telur menjadi semakin besar, berisi kuning telur dan akan diovulasikan pada ikan yang telah dewasa. Proses pematangan gonade pada ikan yang telah dewasa dan induk sebenarnya terjadi mulai dalam masa oosit muda. Perkembangan gonade pada ikan betina umumnya disebut dengan istilah perkembangan ovarium, mempunyai tingkat perkembangan sejak masa pertumbuhan hingga masa reproduksi yang dapat dikategorikan kedalam beberapa tahap. Jumlah tahapan tersebut bervariasi bergantung kepada spesies maupun peneliti yang mengamati perkembangan ovarium tersebut. Pengamatan kematangan gonade dilakukan dengan dua cara, yang *pertama* cara histologi dilakukan di laboratorium, *kedua*; cara pengamatan morfologi yang dapat dilakukan di laboratorium dan dapat dilakukan di lapangan. Dari penelitian secara histologi akan diketahui anatomi perkembangan gonade menjadi lebih jelas dan

mendetail. Sedangkan hasil pengamatan secara morfologi tidak akan sedetail cara histologi, namun cara morfologi ini banyak dilakukan para peneliti (Effendi, 2002). Morfologi gonade dan warnanya digunakan untuk membedakan tingkat kematangan. Hal tersebut bermanfaat untuk menentukan masa memijah secara umum dan menentukan langkah lanjut untuk pengelolaannya.

Gonade Somatic Index (GSI) yang mengalami penurunan atau rendah menunjukkan tingkat kesuburan ikan juga rendah, hal ini kemungkinan karena berkurangnya alokasi energi untuk reproduksi (Larsson 2000, Sandstrom 2005). Hanson, Forlin, Larsson (2008) mengadakan penelitian tentang biomarker di Laut Baltik, Swedia dengan judul : “*Evaluation of Long Term Biomarker Data From Perch (Perca Fluviatilis) in The Baltic Sea Suggest Increasing Exposure To Environmental Pollutants*”. Hasil penelitian menunjukkan bahwa di daerah yang tercemar polutan organik, gonade ikan mengecil, sehingga *Gonade Somatic Index* (GSI) berkurang, sedangkan aktivitas EROD meningkat. PAH terbukti merupakan polutan yang menyebabkan berkurangnya GSI dan meningkatnya aktivitas EROD. Terjadi korelasi yang signifikan antara meningkatnya konsentrasi PAH dengan menurunnya GSI dan meningkatnya aktivitas EROD.

C.3. *Metallothionein*

Metallothionein adalah sejenis protein non-enzim yang mengandung ikatan logam baik logam esensial maupun non esensial. *Metallothionein* ditemukan pertama kali pada tahun 1957 oleh Margoshes dan Valle. Keduanya melakukan identifikasi terhadap unsur yang bertanggung jawab terhadap mekanisme akumulasi kadmium secara alami

pada jaringan korteks ginjal kuda. Unsur tersebut diketahui kemudian terdiri dari logam kadmium dan protein (*thionein*) yang berikatan membentuk suatu struktur kompleks *metallothionein* (Carpene, Andreani dan Isani 2007). Selain kadmium, *metallothionein* juga dapat berikatan dengan logam lain seperti Seng, Nikel, Timbal dan Tembaga. *Metallothionein* umumnya dapat berikatan dengan semua jenis logam. Meskipun demikian, interaksi *metallothionein* dengan golongan logam berat umumnya mendapat perhatian lebih terkait dengan toksisitas yang ditimbulkan.

Metallothionein (MT) merupakan materi yang termasuk dalam golongan persenyawaan protein atau polipeptida. Vasak dan Meloni dalam *Metallothionein in Biochemistry and Pathology* mendefinisikan *metallothionein* adalah “*a superfamily of low molecular-mass cysteine and metal-rich proteins or polypeptides conserved through evolution and present in all eukaryotes and certain prokaryotes*” (Zatta 2008). Interaksi antara logam dan protein tersebut akan membentuk gugus-gugus spesifik yang disebut *metal-thiolate clusters*. Sejauh ini, *metallothionein* merupakan satu-satunya senyawa biologis yang berinteraksi dengan logam secara alami. Dengan demikian, *metallothionein* memegang peranan penting dalam pengelolaan mekanisme metabolisme dan transisi seluler materi logam didalam tubuh, terutama ion-ion logam berat (Binz 2000).

Jenis logam dan asam amino pembentuk *metallothionein* yang bervariasi menuntut adanya penggolongan secara ilmiah. Secara umum, *metallothionein* memiliki struktur dasar berupa unsur logam dan asam amino penyusun badan proteinnya. Berat molekul *metallothionein* pada mamalia adalah 6000-7000 Da, dengan struktur *metallothionein* mengandung 60-68 residu asam amino tanpa asam amino aromatik. Dua puluh asam amino diantaranya merupakan asam amino *Sistein (Cys)* yang mengikat

7 ion logam ekuivalen maupun bivalen pada setiap molekul *metallothionein*. Sejauh ini *metallothionein* ikan *teleostei* diketahui memiliki 60-61 residu asam amino. Semua asam amino *Sistein* berada dalam keadaan tereduksi dan terkoordinasi dengan ion logam melalui ikatan *mercaptida*, sehingga menimbulkan sifat khusus *spektroskopik* gugus *metalthiolate*. Berdasarkan rekomendasi *The Committe of the Nomenclature of Metallothionein*, segala macam protein atau polipeptida dengan struktur interaksi dan fungsi menyerupai *metallothionein* seperti yang terdapat pada mamalia dapat diklasifikasikan sebagai *metallothionein* (Binz, 2000).

Metallothionein (MT) merupakan polipeptida yang memiliki banyak ikatan *cystein (cys)* yang disandikan oleh gen, memiliki berat molekul yang rendah, dan berfungsi sebagai peptida pengikat logam (*metal binding peptides*). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino *Cys* maka protein ini mengandung kelompok *thiol (sulfidril, -SH)* dalam jumlah yang besar. Kelompok *thiol* mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, merkuri, tembaga, dan kadmium. Residu *Sulfidril* dari *Cys* mampu mengikat logam dimana satu ion logam diikat oleh tiga residu $-SH$ atau satu ion logam dengan 2 residu $-SH$. Koordinasi pengikatan dari setiap ion logam melalui residu $-SH$ yang ada pada *Cys*, membentuk struktur *tetrahedral tetrathiolate* (Zatta, 2008).

Kandungan asam amino *Sistein* tinggi berdampak pada besarnya jumlah molekul sulfhidril ($-SH$ atau "thiol) dalam *metallothionein*. Kelompok molekul tersebut dapat mengikat logam berat dengan sangat kuat dan efisien. Ion logam yang terdapat dalam *metallothionein* dapat berupa ion logam maupun logam berat, baik esensial maupun non esensial. Keberadaan ion logam dalam gugus-gugus *metallothionein* dapat mengalami proses dimerisasi oksidatif. Ikatan *metallothionein* yang terbentuk memberikan

kestabilan termodinamika yang tinggi. Di sisi lain, struktur *metallothionein* memiliki kestabilan kinetika yang sangat rendah. Dengan demikian, *metallothionein* dapat mengikat ion logam dengan sangat kuat, tetapi peluang pertukaran ikatan-ikatan antara ion logam dan protein pun cukup besar (Zangger, Gong, Gulin dan James 2001).

Keberadaan *metallothionein* memiliki setidaknya dua fungsi utama, yaitu membersihkan materi radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh dan didetoksifikasi logam untuk mencapai keadaan homeostasis (Carpene, Andreani, dan Isani 2007). Kemampuan tersebut secara signifikan terkait dengan proses detoksifikasi logam berat dalam tubuh organisme yang mensekresi *metallothionein* (Hall 2002). Ekspresi *metallothionein* menunjukkan adanya paparan logam tertentu (Larsson, Grahn, Landner dan Lindesjoo 2000, Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg 2005, Hanson 2008). Salah satu logam berat yang dapat berikatan dengan *metallothionein* adalah kadmium (Cd). Metabolisme logam berat di dalam tubuh organisme merupakan faktor utama yang menentukan toksisitas zat tersebut. Kadmium dan *metallothionein* (*Cd-thionein*) akan bereaksi secara antagonis.

Metallothionein merupakan golongan protein yang selalu dikaitkan dengan logam berat. Pada dasarnya, *metallothionein* dapat terbentuk dari *thionein* yang berikatan dengan segala macam logam baik logam esensial maupun non esensial/logam berat. Namun, kemampuan tersebut secara signifikan terkait dengan proses detoksifikasi logam berat dalam tubuh organisme yang mensekresi *metallothionein* (Hall 2002). Salah satu logam berat yang dapat berikatan dengan *thionein* membentuk *metallothionein* adalah kadmium (Cd). Metabolisme logam berat di dalam tubuh organisme merupakan faktor utama yang menentukan toksisitas zat tersebut. Kadmium dan *metallothionein* (*Cd-thionein*) akan bereaksi secara antagonis. Palar (2008)

menjelaskan bahwa reaksi antagonis secara toksikologi adalah proses atau peristiwa pengurangan atau bahkan penghapusan toksisitas suatu zat atau senyawa toksik. Dengan demikian, kompleks senyawa *Cd-thionein* yang terbentuk akan dapat menurunkan toksisitas logam kadmium (Binz 2000, Carpene, Andreani dan Isani 2007). Berbagai jenis logam dan logam berat mampu berkompetisi pada ikatan logam dalam *metallothionein*. Keadaan tersebut memberikan keuntungan dalam mekanisme distribusi berbagai jenis logam bagi sistem biologis tubuh organisme. Dalam berbagai penelitian, diketahui bahwa terjadi kompetisi antar logam berat untuk berikatan membentuk *metallothionein*. Aravind dan Prasad (2005) menegaskan bahwa induksi logam berat esensial Seng pada sistem biologis berperan penting dalam melawan toksisitas logam berat non-esensial Kadmium.

Pada hewan, logam akan terikat pada residu *cys* dalam formasi logam-*cys* (*thiolate*) dengan cara pertukaran ion logam misalnya ion Zn tergantikan dengan ion Cu, Cd, atau Hg (Duncan dan Stillman 2006). Menurut Zangger, Gong, Gulin dan James (2001), MT mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan logam dapat berlangsung dengan mudah karena ikatan MT terhadap logam memiliki stabilitas termodinamik yang tinggi dan stabilitas kinetik yang rendah. Dengan kata lain MT yang mengikat logam Cd dapat dengan mudah mengalami pertukaran ikatan dengan logam yang lain bila terjadi gangguan keseimbangan termodinamik dan keseimbangan kinetik. Selain berfungsi untuk detoksifikasi logam berat, berbagai fungsi seluler MT adalah untuk pengaturan homeostasis logam esensial, perlindungan terhadap radiasi dan kerusakan oksidatif, dan kontrol seluler (Hall, 2002). Penerapan ekspresi *metallothionein* pada ikan telah dapat memberikan informasi terkait sistem deteksi pencemaran logam berat secara biologis (Bae, Nam, Park, Park.K. 2005, Brammel dan Wigginton 2010,

Montaser, Magdy, Samir dan Gamal 2010). *Metallothionein* merupakan protein yang berfungsi untuk mendetoksifikasi logam dan untuk menjaga homeostasis logam di dalam sel (Cobbett and Goldbrough 2002).

Metallothionein (MT) dapat berfungsi sebagai biomarker untuk monitoring adanya pajanan dan toksisitas logam di perairan laut, juga memiliki peran penting dan unik dalam homeostasis logam esensial (misalnya seng dan tembaga) dan detoksifikasi logam beracun (misalnya kadmium dan merkuri). Ekspresi MT umumnya meningkat dengan adanya pajanan logam Zn, Cu, Cd, Hg dan Ag (Viarengo, Burlando, Ceratto, dan Panfoli 2000). Toksisitas selular bisa terjadi jika kecepatan masuknya logam ke dalam sel melebihi kecepatan sintesis *metallothionein*. Program pemantauan (biomonitoring) perairan untuk mengetahui adanya pajanan logam sering menggunakan organisme yang berasal dari lingkungan perairan asin, seperti laut, mura dan zona pasang surut (Legras, Mouneyrac, Amiard, dan Rainbow 2000).

Hasil Penelitian Sonne, Aspholm, Dietz, dan Andersen (2009) yang berjudul : “*A study of metal concentrations and metallothionein binding capacity in liver, kidney and brain tissues of three Arctic seal species*” menyatakan bahwa konsentrasi merkuri, tembaga, kadmium dan seng dalam hati, ginjal dan jaringan otak pada spesies di lautan Greenland Barat dikaitkan dengan adanya protein intraselular yang mengikat logam yaitu *metallothionein* (MT) sebagai tanda adanya pajanan logam berat yang bersifat toksik. MT dengan kemampuannya mengikat logam berat dapat digunakan sebagai penanda adanya pajanan logam berat yang berpotensi racun di lautan arktik.

Carpene, Andreani dan Isani (2007) dalam penelitiannya yang berjudul “*Metallothionein functions and structural characteristics*” menyatakan bahwa MT terutama berperan dalam detoksifikasi dan homeostasis logam di dalam tubuh

organisme. MT dianggap sebagai protein yang terlibat dalam detoksifikasi logam baik esensial maupun non esensial. Berbagai jenis *metallothionein* telah ditemukan mulai dari spesies jamur hingga mamalia.

Hasil Penelitian Montaser, Magdy, Samir dan Gamal (2010) menunjukkan bahwa MT dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat di pantai Laut Merah Jeddah, dengan pengamatan histopatologik pada hati dan insang ikan. Penelitian ini dilakukan mengingat masalah pencemaran logam dianggap sebagai salah satu permasalahan yang paling serius bagi kesehatan manusia pada abad ke dua puluh satu, utamanya pada manusia yang mengkonsumsi ikan dari laut Merah. Sehingga memerlukan upaya khusus dan intens pada semua tingkat baik individu, kelompok, nasional dan internasional. Tujuan penelitian ini untuk memeriksa tingkat pencemaran logam berat di daerah-daerah tertentu di dekat pantai laut di Jeddah dengan melihat histopatologi insang dan hati pada ikan *Sleek unicorn* yang terpajan oleh logam berat, serta analisis molekuler ekspresi *metallothionein* sebagai biomarker.

Keberadaan *metallothionein* memiliki setidaknya dua fungsi utama, yaitu membersihkan materi radikal bebas yang terdapat didalam tubuh dan detoksifikasi logam untuk mencapai keadaan *homeostasis* (Carpene, Andreani dan Isani 2007). Ekspresi *metallothionein* menunjukkan adanya pajanan logam tertentu (Larsson, Forlin, Grahn dan Landner 2000 dan Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg 2005, Hanson 2008). Adapun salah satu fungsi *metallothionein* adalah sebagai detoksifikasi logam untuk mencapai keadaan *homeostasis*, sehingga adanya *metallothionein* menyebabkan organisme menjadi resisten terhadap pajanan logam berat dan menyebabkan toksisitas dari logam berat berkurang (Carpene, Andreani dan Isani 2007; Cobbet & Goldbrough 2002; Hall, 2002),

Berbagai penelitian menyatakan bahwa MT berperan sebagai biomarker pada pencemaran lingkungan oleh logam berat yang mempengaruhi fisiologi pada hewan yang hidup bebas di alam (Knapen, Reynders, Bervoets dan Verheyen 2007). Secara umum telah diterima bahwa MT memainkan peran penting dalam detoksifikasi ion logam berat seperti kadmium karena MT akan mengikat 7 mol kadmium atau seng dalam tubuh (Klassen, Liu dan Choudhuri 1999, Geffard, Amiard-Triquet, Amiard dan Mouneyrac 2001). *Metallothionein* juga memiliki peran penting sebagai buffer dalam sel yang dapat mengikat logam seperti Cu dan Zn (Marr, Lipton, Cacela dan Hansen 1996). Ada hubungan positif antara MT dan polutan logam berat. Kontaminan logam berat dapat mengakibatkan kerusakan sistemik suatu organisme dan mengakibatkan kelebihan produksi MT (Ringwood, Hoguet, Keppler dan Gielazyn 2004). Banyak spesies mensintesis *metallothionein* dan dapat dilakukan uji toksisitas logam melalui pengukuran *metallothionein*. Berdasarkan hasil pengukuran *metallothionein*, ikan dan kerang menunjukkan tingkat akumulasi logam kadmium yang tinggi dibandingkan biota air lainnya (Regoli, Pellegrini, Winston dan Gorbi 2002 and Kavun, Shulkin dan Khristoforova 2002). Ekspresi dan peran MT pada ikan sebagian besar telah banyak dipelajari pada organ-organ yang memainkan peran sentral dalam penyerapan dan akumulasi logam seperti hati, ginjal dan insang (Van Campenhout, Infante, Adams dan Blust 2004).

Deteksi dan penilaian dampak polutan terhadap sumber daya hayati telah meningkatkan penelitian tentang peringatan dini menggunakan penanda biologis seperti *metallothionein* (MT) akibat pajanan logam. Chaabouni, (2011) melaporkan adanya penggunaan *metallothionein* sebagai biomarker untuk penilaian kualitas lingkungan di Teluk Gabes. Spesies ikan dan kerang digunakan sebagai biomarker pencemaran. Dalam

spesies ini, induksi MT oleh logam-logam penting seperti Cu dan Zn dan non-esensial logam seperti Cd menunjukkan potensi penggunaan protein sebagai biomarker.

Peran *metallothionein* sebagai protein yang terlibat dalam metabolisme logam sangat diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan dan fungsi organisme. *Metallothionein* adalah reservoir dari logam seperti seng dan tembaga (Cu dan Zn). *Metallothionein* menyediakan makro molekul yang membutuhkan seng dan tembaga sebagai mikro elemen organisme. *Metallothionein* juga mengembalikan fungsi yang tepat untuk ikatan protein-logam yang sebelumnya tidak aktif dan menjadi aktif setelah berikatan dengan logam (fungsi logam sebagai kofaktor enzim). Sebagai contoh, protein yang kehilangan kemampuannya untuk mengikat pajanan kadmium, kemampuan mereka akan pulih kembali setelah terjadi ikatan seng-*metallothionein* (ZnMT). Dengan demikian *metallothionein* terlibat dalam pertukaran seng-kadmium (Plaa 2007, Klaassen 2001).

Fungsi lain dari *metallothionein* adalah keterlibatannya sebagai antioksidan tubuh. Molekul MT yang memiliki sejumlah besar kelompok *thiolic* dengan sifat *nukleofilik* membuat MT mampu mengikat tidak hanya logam tetapi juga radikal bebas. Hal ini merupakan cara *metallothionein* untuk melindungi sel dari senyawa mematikan. Distribusi MT dalam sel memungkinkan mereka untuk melindungi semua kelompok sel terhadap bahaya tersebut (Campagne, Thibodeux, Van Bruggen dan Cairns 2000). Dengan demikian biomarker MT selain dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran logam, juga berperan sebagai detoksifikasi logam dalam tubuh (Carajaville, Bebianno, Blasco, dan Porte 2000;. Downs, Dillon, Fauth dan Woodley 2001; Petrovic, Ozretic, Krajinovic-Ozretic dan Bobinac 2001; Blaise, Gagn'e, Pellerin

dan Hansen 2002 ; Gagn'e, Blaise, Aoyama dan Luo 2002;. Ch`evre, Gagn'e, Gagnon dan Blaise 2003;. Domouthsidou, Dailianis, Kaloyianni dan Dimitriadis 2004).

Banyak penelitian telah menunjukkan induksi MT oleh logam pada vertebrata dan invertebrata, sebagai akibat terjadinya pencemaran logam (English dan Storey, 2003; Mosleh, Paris, Arnoult dan Couderchet 2004). Hal ini merupakan awal penggunaan MT sebagai biomarker pencemaran logam yang terjadi di alam. Diantara faktor-faktor perancu yang secara tidak langsung mempengaruhi konsentrasi MT, adalah suhu dan pH (Serafim, Company, Bebianno dan Langston 2002) dan serta salinitas (Leung, Svavarsson, Crane dan Morrirt 2002). Hal lainnya terkait dengan karakteristik dari individu, terutama ukuran dan umur (Leung dan Furness, 2001; Leung, Morgan, Svavarsson dan Furness 2001;. Serafim, Company, Bebianno dan Langston 2002;. Bebianno, Cravo, Miguel dan Morais 2003). Selain itu, faktor perancu dapat berupa efek oksigen terlarut/DO (Cotou, Vagias, Rapti dan Roussis 2001; Dragun, Raspor, Ivankovic dan Pavicic 2004;. Raspor, Dragun, Ivankovic dan Pavicic 2004).

D. Toksisitas Logam Berat Kadmium, Timbal dan Merkuri Terhadap Organisme

Toksisitas adalah kemampuan molekul suatu bahan kimia atau senyawa untuk menimbulkan kerusakan pada saat mengenai bagian tubuh atau permukaan yang peka terhadapnya (Katzung 2007, Klaassen 2001, Soemirat 2005). Lebih lanjut dikatakan bahwa tolok ukur pengujian efek bahan pencemar yang dianggap paling tepat adalah derajat toksisitas dengan metode *bioassay*. Suatu bahan pencemar yang berupa zat kimia murni, toksin, atau mungkin berupa limbah, diperlakukan pada hewan uji tertentu.

Perlakuan ini dapat diberikan melalui oral, suntikan sub kutan atau sentuhan terhadap seluruh tubuh hewan uji.

Efek suatu substansi toksik ditentukan oleh faktor lamanya waktu pendedahan dan besarnya konsentrasi. Klaassen (2001), Kosnett (2007) dan Plaa (2007) mengemukakan bahwa berdasarkan atas lamanya waktu pendedahan suatu *toksikan*, pola *toksisitas* dibedakan atas :

1. Akut, yakni pendedahan dalam waktu yang singkat ;
2. Kronis, yakni pendedahan dalam waktu yang lama

Toksisitas logam dapat bersifat akut dan kronis selain tergantung pada lamanya pajanan, juga dikarenakan oleh tinggi rendahnya dosis pajanan. Pada toksisitas akut, dosis pajanan tinggi dan terpajan dalam waktu yang singkat, sedangkan toksisitas kronis, dosis pajanan rendah dan waktu pajanan lama (Kosnett 2007, Soemirat 2005, Klaassen 2001)

Menurut Rand (2000), Soemirat (2005) dan Klaassen (2001), efek toksik suatu zat pada pengujian *bioassay* dibedakan menjadi :

1. Akut : bila tanggapan organisme terhadap suatu rangsang bersifat berat dan cepat, biasanya dalam waktu 4 hari untuk ikan dan organisme akuatik lainnya;
2. Subakut : bila tanggapan organisme terhadap suatu rangsang bersifat kurang berat dibandingkan dengan akut, timbul dalam waktu lebih lama dan dapat menjadi kronis;
3. Kronis : bila tanggapan organisme terhadap rangsang bersifat ringan, berlangsung dalam waktu yang panjang, sampai 1/10 atau lebih dari masa hidupnya;
4. Letal : bila tanggapan organisme terhadap rangsang bersifat langsung berupa kematian;

5. Subletal : bila tanggapan organisme terhadap rangsang tidak langsung berupa kematian.

Kajian mengenai efek sub kronik toksikan terhadap ikan, menurut Katzung (2007), Wardhana (2004), dan Supriharyono (2009) dapat menggunakan beberapa tolok ukur antara lain :

1. Mempelajari mengenai perubahan-perubahan sifat-sifat biologik yang terpenting, misalnya : pola serta kecepatan pertumbuhan; kemampuan fertilisasi serta perkembangan telur;
2. Mempelajari mengenai gangguan-gangguan fungsi (*patofisiologik*) misalnya studi *hematologik*, pengukuran derajat metabolik, studi mengenai aktivitas imunologik dan enzimatik,
3. Mempelajari perubahan-perubahan *patomorfologik* yang meliputi semua perubahan yang menyangkut morfologi ikan dari bentuk-bentuk eksternal sampai ke perubahan *histologik* dan *sitologik*.

Kadmium (Cd) mempunyai daya toksik yang luas. Kadmium yang termakan dapat menyebabkan *nausea*, *salivasi*, muntah, diare dan sakit perut. Inhalasi kadmium oksida dapat menyebabkan radang saluran pernapasan dan edema paru-paru (Soemirat 2005, Wardhana 2004, Dreisbach 2000, Bernard and Lauwerys 2001, Galt, Scheidig F, Siestrup, C.G, 2006). Dikatakannya pula bahwa penyakit yang dijumpai akibat terserap Cd dalam jumlah besar adalah : peradangan pada *gastrointestinal*, kerusakan ginjal dan hati. Keracunan yang akut dan fatal akibat terserap debu-debu Cd dapat mengakibatkan peradangan *epitel* dan *edema* pada paru-paru. Keracunan yang kronik dapat mengakibatkan rusaknya syaraf penciuman, batuk-batuk, berat badan menurun dan *anemia*.

Ion Cd^{2+} pada konsentrasi yang rendah tidak toksik, tetapi bila terakumulasi pada tingkat tertentu dapat meracuni hewan atau manusia melewati rantai makanan (Miller 2007, Withgott and Brennan 2007). Dikatakannya pula bahwa pada konsentrasi yang tinggi Cd toksik untuk tumbuhan, dan menyebabkan *klorosis* pada daun, dan disertai dengan menurunnya laju *fotosintesis*, juga menghambat respirasi dan transport elektron pada *mitokandria*.

Logam berat Cd mudah *diabsorpsi* dalam bentuk garam Cd terlarut. Di lingkungan akuatik, suatu kontaminan masuk dalam jaringan organisme yang bersifat *autotrof* dengan cara *absorpsi* langsung. Pada ikan kontaminan dapat langsung masuk ke dalam tubuh dengan melewati barier biologik yang memisahkan medium internal organisme dari lingkungan sekitarnya dengan cara *absorpsi* baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Proses *absorpsi* langsung tergantung tempat persentuhannya, dan pada ikan terutama melalui *epithelium branchiale*. Sedangkan yang masuk secara tidak langsung (*trophic*) berlangsung melalui *mikrovili* permukaan *intestinum* (Supriharyono 2009, Soemirat 2005, Boudou, Scauld and [Desmazes. 2000](#), Mailman 2002).

Withgott and Brennan (2007), Wardhana (2004) dan Connell (2002) mengatakan bahwa proses perpindahan langsung suatu senyawa toksik dari air ke makhluk hidup disebut sebagai *biokonsentrasi*. Dengan demikian perpindahan *toksikan* dari air ke biota air tingkat tropik rendah, dari air ke biota air tingkat tropik lebih tinggi dan dari air menuju ke pemakan-pemakan penyaring di dalam lingkungan perairan digambarkan sebagai *biokonsentrasi* sedangkan perpindahan suatu senyawa toksik melalui rantai makanan ke suatu makhluk hidup disebut *biomagnifikasi*. Dengan demikian perpindahan senyawa toksik dari biota air tingkat tropik rendah ke biota air tingkat

tropik lebih tinggi dalam lingkungan perairan dapat digambarkan sebagai *biomagnifikasi*. Plaa (2007) dan Soemirat (2005) mengatakan bahwa suatu zat yang mempunyai waktu paruh biologik yang sangat panjang diberikan pada organisme dalam jangka waktu lama (secara kronis), pada kadar subletalnya akan mengakibatkan terjadinya akumulasi/biokonsentrasi pada organisme tersebut. Kadmium mempunyai waktu paruh biologik yang sangat panjang pada manusia yakni 10 – 30 tahun. Biokonsentrasi logam berat kadmium, dapat ditemukan pada makhluk hidup seperti ganggang, krustacea, molusca dan vertebrata, dan dengan terjadinya *biomagnifikasi* mengakibatkan biokonsentrasi Cd pada ikan paling besar. Apabila peningkatan akumulasi pada setiap mata rantai makanan 15 kali, maka akumulasi yang terdapat pada tubuh ikan merupakan proses penggandaan secara biologik (Sunu 2001, Wardhana 2004). Ikan menempati posisi puncak dalam piramida makanan. Pada ekosistem perairan ikan bertindak sebagai *herbivor* dan *karnivor* pada tingkat tropik yang berbeda dalam piramida makanan. Pada piramida makanan ini tingkat dasar ditempati kelompok tumbuhan hijau antara lain *algae*, *flagellata* dan bakteri *fotosintetis*, pada bagian tengah ditempat *herbivor* lain yaitu kelompok moluska, larva insekta dan ikan. Akhirnya tingkat tropik bagian atas diduduki oleh *karnivora* terutama ikan (Miller 2007, Argawala 2006, Hellawell 2000).

Kadmium merupakan logam berat yang secara normal terdapat pada tanah dan air dalam kadar rendah. Kadmium berasal dari beberapa sumber yaitu, sumber alami, pertambangan dan industri. Pada lapisan litosfir, kadmium terdapat dalam bentuk kadmium sulfid. Sedangkan di biosfir secara alami berasal dari aktivitas gunung berapi, getah tanaman, hutan yang terbakar dan debu serta batu-batuan yang terbawa oleh angin. Gunung berapi merupakan sumber kadmium terbesar secara alami. Dari

pertambangan, kadmium tidak ditambang secara tersendiri tetapi merupakan bahan ikutan dari pengolahan tambang dan produksi timah hitam (Pb), Seng (Zn), Kuprum (Cu), batu bara dan minyak (Klaassen 2001, Soemirat 2005, Supriharyono 2009, Miller 2007, Plaa 2007).

Di berbagai industri Cd dipakai sebagai komponen pelapis/pencampur logam, patri aluminium, pembuatan klise, amalgama dalam kedok teran gigi, pemrosesan foto berwarna, pewarna porselin, industri gelas, industri keramik, sebagai foto konduktor, sebagai foto elektrik, sebagai bahan pencampur pigmen, sebagai campuran pupuk fosfat, sabun, tekstil, kertas, karet, tinta cetak, kembang api, anthelminthes bagi babi dan ayam, obat syphilis dan TBC (Wardhana 2004, Watts 2000, Kosnett 2007).

Kadmium merupakan salah satu logam berat yang bersifat toksik yang tersebar luas di lingkungan perairan (Withgott and Brennan 2007, Ward 2001). Hewan dengan mudah menyerap kadmium dari makanan dan terakumulasi dalam jaringan seperti ginjal, hati dan alat-alat reproduksi (Miller 2007, Supriharyono 2009, Kosnett 2007). Kadmium terdapat dalam air limbah dalam berbagai bentuk yakni : terlarut, tidak terlarut, anorganik, organik, tereduksi, teroksidasi, terpresipitasi, terabsorpsi. Dikemukakan pula bahwa Kadmium yang dipancarkan dari kendaraan bermotor ke dalam atmosfer dapat terakumulasi pada tumbuh-tumbuhan. Kelarutan garam kadmium sangat bervariasi, dengan garam halogen, sulfat dan nitrat larut dalam air (Supriharyono 2009, Wardhana 2004, Watts 2000, Hammond and Beliles 2001, Ravera, 2001).

Klaassen (2001) dan Miller (2007) mengemukakan bahwa akumulasi Cd pada hati dan ginjal ikan lebih besar dari pada yang terakumulasi pada ototnya. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya pengaruh sejenis *metallothionein* yang dijumpai lebih besar terdapat pada hati dan ginjal dari pada ototnya. Menurut Plaa (2007) dan Soemirat

(2005) timbulnya efek toksik di dalam tubuh suatu jenis organisme oleh pengaruh suatu zat tergantung pada jumlah adanya zat tersebut pada bagian yang rentan di dalam tubuh. Miller (2007) dan Kosnett (2007) mengatakan bahwa logam berat dapat terakumulasi dalam jaringan tubuh ikan terutama pada insang, hati dan ginjal, daging atau otot serta tulang. Lebih lanjut dikatakan bahwa akibat penambahan logam berat selain dapat berpengaruh terhadap kematian ikan juga menyebabkan kerusakan pada jaringan tubuh.

Pencemaran lingkungan oleh logam berat Cd pernah terjadi di Toyama Jepang, bertambahnya konsentrasi Cd dalam air irigasi dan makanan menyebabkan penyakit yang tidak dapat disembuhkan, yang dikenal dengan nama penyakit *Itai-itai (Ouch-Ouch)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa air irigasi tersebut mengandung Cd yang berasal dari penambangan timah hitam dan seng yang ada di daerah hulu sungai Jintsh. Air irigasi digunakan untuk mengairi tanaman padi di sawah, sehingga padi yang dipanen mengakumulasi Cd. Penduduk bertahun-tahun makan beras yang berasal dari padi yang mengakumulasi Cd tersebut, maka terjadi *biomagnifikasi* Cd pada tubuh manusia. Akumulasi Cd pada padi 1,6 ppm, namun setelah dimakan manusia kandungan Cd pada tubuh (lewat analisis tulang rusuk) menjadi 11,472 ppm, sehingga menimbulkan penyakit *Itai-itai*; yakni otot-otot mengalami kontraksi karena kehilangan sejumlah kalsium, tulang mengalami pelunakan, kemudian menjadi rapuh dan terjadi kerusakan ginjal (Kosnett 2007, Wardhana 2004, Connell 2001, Soemirat 2005, Klaassen 2001). Peristiwa pencemaran Cd di sawah juga dialami di kabupaten Karanganyar Jawa Tengah pada tahun 2004. Kadar Cd di sawah mencapai 0,21 – 0,40 mg/kg, sementara ambang batas Cd di tanah 0,50 mg/kg (Supriharyono 2009).

Timbal (Pb) merupakan *xenobiotic*, yakni zat asing bagi tubuh yang dapat menyebabkan gangguan kesehatan pada syaraf, ginjal, hati, sistem reproduksi dan

tulang. Toksisitas akan terjadi pada pemajanan Pb dosis rendah dan berlangsung lama, yang bersal dari lingkungan air maupun udara (Plaa 2007, Kosnett 2007, Katzung 2007, Klaassen 2001). Dikatakan pula bahwa Pb dapat masuk ke dalam tubuh melalui saluran nafas, saluran cerna maupun melalui permukaan kulit, dan akan terikat pada eritrosit, kemudian terdistribusi dan terakumulasi pada sumsum tulang, otak, hati, ginjal, otot, gonade dan tulang. Pada lingkungan industri Timbal banyak digunakan dalam produksi aki, aloi logam, solder, kaca dan keramik.

Timbal (Pb) dapat terakumulasi pada tubuh dalam waktu yang lama (sub kronik). Logam berat Pb yang masuk ke dalam tubuh pada umumnya merupakan zat yang lipofilik, yakni mempunyai cirri-ciri: persisten, non-degradable/ tidak terdegradasi, atau seandainya terdegradasi maka residunya dapat jauh lebih toksik disbanding zat asalnya. Pb anorganik yang kurang toksik dengan adanya bakteri di alam akan diubah menjadi Pb organik (*Tetra Ethyl Lead* atau *Tetra Methyl Lead*) yang jauh lebih toksik, sehingga dalam pemaparan dosis rendah, dengan sifat lipofilik yang dimilikinya zat tersebut dapat menembus membran sel, terakumulasi sedikit demi sedikit dalam tubuh makhluk hidup dan berikatan dengan protein (*thionein*) membentuk *metallothionein* untuk didetoksifikasi (Kosnett 2007, Klaassen 2001, Plaa 2007, Withgott and Brennan 2007).

Merkuri (Hg) di perairan masuk ke dalam tubuh makhluk hidup terutama melalui air (minuman) dan bahan makanan; sisanya akan masuk secara difusi atau perembesan lewat jaringan dan melalui pernafasan (insang). Merkuri anorganik di perairan akan mengalami metilasi oleh bakteri anaerob sebagai *methyl* merkuri dan membebaskannya ke perairan. Merkuri yang dapat diakumulasi oleh ikan adalah berbentuk *methyl* merkuri. *Methyl* merkuri yang terbentuk, bersifat tidak stabil sehingga

mudah dipindahkan ke dalam perairan yang kemudian masuk ke hewan maupun tumbuhan air dan mengalami akumulasi. (Kosnett 2007, Plaa 2007, Soemirat 2005, Klaassen 2001).

Miller (2007) dan Withgott and Brennan (2007) mengatakan bahwa sebagian mikroorganisme tidak terpengaruh oleh merkuri dan hasil sampingannya; bakteri nitrogen dalam tanah membutuhkan level 100 ppm untuk membuatnya terinfeksi. Dikatakan pula bahwa hewan cenderung mengakumulasi merkuri dari makanannya; ikan dapat mengakumulasi konsentrasi merkuri 300 kali lebih tinggi dari merkuri yang terdapat dalam air tempat mereka hidup; efek toksik merkuri pada ikan dapat mengakibatkan kerusakan pada insang, hati dan ginjal.

Banyak sedikitnya merkuri yang terakumulasi pada tubuh ikan tergantung dari ukuran, umur dan kondisi ikan. Distribusi dan akumulasi logam tersebut sangat berbeda-beda untuk organisme air. Hal ini tergantung pada spesies, konsentrasi logam dalam air, fase pertumbuhan dan kemampuan untuk pindah tempat. Akumulasi merkuri di dalam tubuh hewan air terjadi karena kecepatan pengambilan merkuri (*uptake rate*) oleh organisme air lebih cepat di bandingkan dengan proses ekskresinya (Kosnett 2007, Plaa 2007, Soemirat 2005).

Merkuri merupakan logam yang terlibat dalam proses enzimatik, terikat dengan protein (*ligan binding*). Ikatan merkuri dengan protein jaringan membentuk senyawa *metallothionein*. *Metallothionein* merupakan protein aditif yang berperan dalam proses *homeostatis* organisme dalam mentolelir logam berat. Senyawa-senyawa kimia yang telah berikatan dengan protein dan membentuk *metallothionein* tersebut akan dibawa oleh darah (Klaassen 2001, Kosnett 2007, Soemirat 2005). Senyawa Merkuri yang masuk bersama makanan, akan masuk ke dalam alur pencernaan, setelah mengalami

absorpsi di usus, senyawa merkuri akan dibawa ke hati oleh vena porta hepatic. Selanjutnya di dalam hati senyawa merkuri mengalami metilasi lambat menjadi CH_3Hg^+ , dan kemudian akan masuk ke dalam darah dan akan teroksidasi sempurna menjadi merkuri bivalensi (Hg^{2+}). Bersama peredaran darah, yang masuk ke hati akan mengalami metabolisme, terdegradasi dan melepaskan Hg^{2+} , sehingga dapat menghambat enzim proteolitik dan menyebabkan kerusakan sel (Plaa 2007, Kosnett 2007, Klaassen 2001). Merkuri yang masuk ke dalam hati akan terbagi dua; sebagian akan terakumulasi pada hati, sedangkan sebagian lainnya akan dikirim ke empedu. Dalam kantong empedu, akan dirombak menjadi senyawa merkuri anorganik yang kemudian akan dikirim lewat darah ke ginjal, dimana sebagian akan terakumulasi pada ginjal dan sebagian lagi dibuang bersama urin (Connel 2001).

Hati merupakan kelenjar tubuh yang paling besar dan memiliki multifungsi kompleks. Pada sel hati terdapat banyak reikulum endoplasma kasar dan retikulum endoplasma halus, hal ini menunjukkan bahwa hati mempunyai peran dalam metabolisme. Retikulum endoplasma (RE) merupakan tempat sejumlah enzim dalam sel. Enzim yang banyak terdapat dalam retikulum endoplasma adalah sitokrom P-450. Logam merkuri dapat sampai ke saluran pencernaan selain melalui makanan, juga dapat terjadi melalui air yang mengandung logam merkuri. Setelah melewati sistem pencernaan, logam merkuri masuk ke peredaran darah dan menuju ke organ tubuh (Miller 2007, Hanson 2008, Kosnett 2007).

Hati memiliki beberapa fungsi, antara lain detoksifikasi, yaitu hati bertanggung jawab atas biotransformasi zat-zat berbahaya menjadi zat-zat yang tidak berbahaya yang kemudian diekskresi oleh ginjal. Suatu toksikan dalam hati akan dinaktifkan oleh enzim-enzim di dalam hati, tapi apabila toksikan berikatan secara terus-menerus, kemungkinan

enzim di dalam hati akan menjadi jenuh (enzim tidak mampu mendetoksifikasi toksikan lagi), sehingga terjadi penurunan aktifitas metabolisme dalam hati. Hal ini akan menyebabkan proses detoksifikasi tidak efektif lagi, maka senyawa metabolit akan dapat bereaksi dengan unsur sel dan hal tersebut dapat menyebabkan kematian sel. Fungsi yang lain adalah pembentukan dan ekskresi empedu, metabolisme garam empedu, metabolisme karbohidrat, sintesis protein metabolisme dan penyimpanan lemak (Klaassen 2001, Soemirat 2005).

Hati sangat rentan terhadap pengaruh berbagai zat kimia dan sering menjadi organ sasaran utama dari efek racun zat kimia. Oleh karena itu, hati merupakan organ tubuh yang paling sering mengalami kerusakan. Menurut Kosnett (2007), Miller (2007) dan Withgott and Brennan (2007) hal ini disebabkan sebagian besar toksikan yang masuk ke dalam tubuh setelah diserap oleh usus halus dibawa ke hati oleh Vena porta hati. Oleh karena itu maka dapat dipahami bahwa hati merupakan organ yang mudah terkena efek toksik senyawa asing. Hal tersebut dapat terjadi karena :

- 1) Senyawa kimia yang diberikan secara oral akan diabsorpsi dari saluran cerna ke dalam hati melalui vena porta sehingga dapat meracuni hati;
- 2) Senyawa kimia yang dimetabolisme di dalam hati diekskresikan ke dalam empedu dan kembali lagi ke duodenal:
- 3) Senyawa asing yang dimetabolisme di dalam hati sebagian dilokalisasi di dalam hati.

Dengan demikian hati merupakan organ yang banyak berhubungan dengan senyawa kimia sehingga mudah terkena efek toksik (Katzung 2007, Klaassen 2001, Kosnett 2007, Plaa 2007, Soemirat 2005).

E. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Toksisitas Cd,Pb dan Hg Terhadap Organisme Akuatik

Toksisitas suatu substansi terhadap organisme dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan yaitu : suhu, pH, salinitas, DO dan alkalinitas.

E.1. Suhu

Suhu adalah suatu faktor fisik lingkungan yang bekerja bukan mempengaruhi reaksi senyawa logam berat di lingkungan perairan, melainkan mempengaruhi aktivitas mikro biota air terhadap logam berat tersebut (Argawala 2006, Babich and Stotzky 2001). Lebih lanjut dikatakan bahwa toleransi ikan terhadap temperatur berbeda-beda tergantung pada jenis spesies, stadium pertumbuhan, aklimasi, DO, jenis dan tingkat pencemaran, lamanya lingkungan terkena panas dan musim.

Suhu air sungai yang relatif tinggi biasanya ditandai dengan munculnya ikan dan hewan air lainnya ke permukaan untuk mendapatkan oksigen. Ikan yang berada di dalam air yang suhunya tinggi akan meningkat kecepatan respirasinya, sehingga menurunkan jumlah oksigen yang terlarut di air, dan dapat mengakibatkan matinya ikan maupun hewan air lainnya (Withgott 2007, Sunu 2001, Supriharyono 2009). Berubahnya temperatur baik naik maupun turun yang berlangsung secara mendadak sering kali bersifat letal bagi organisme perairan, terutama ikan, yang sering disebut sebagai guncangan temperatur (*“thermal shock”*). Akibat lebih lanjut adalah terjadinya perubahan-perubahan ekologi serta kekacauan ekosistem lingkungan perairan yang bersangkutan (Miller 2007).

Menurut Wardhana (2004) efek-efek merugikan akibat kenaikan suhu adalah :

- a. Guncangan temperatur;

- b. Meningkatnya kepekaan organisme akuatik terhadap parasit, penyakit serta toksin-toksin kimia;
- c. Menurunnya kadar oksigen perairan, sementara kenaikan suhu akan menaikkan pula kebutuhan organisme akan oksigen;
- d. Meningkatnya derajat eutrofikasi, sebab kenaikan suhu dan penurunan kandungan oksigen akan memungkinkan berkembangnya ganggang hijau, biru yang tidak diinginkan tumbuh dengan leluasa;
- e. Menurunnya daya tahan hidup ikan-ikan muda yang mempunyai toleransi suhu yang lebih rendah;
- f. Terganggunya rantai makanan oleh hilangnya satu atau berbagai spesies kunci, terutama plankton, pada tingkat trophik rendah pada rantai makanan;
- g. Perubahan komposisi spesies ke arah spesies yang tidak diinginkan.

E.2. pH (Derajat Keasaman)

Pengaruh pH terhadap toksisitas bagi mikroorganisme menunjukkan bahwa toksisitasnya meningkat sejalan dengan kenaikan pH. Kenyataan ini diduga merupakan akibat menurunnya kompetisi antara ion Cd, Pb maupun Hg dengan ion-ion hidrogen dengan naiknya pH larutan (Babich and Stotzky 2001, Argawala 2006).

Ikan dapat menyesuaikan diri dengan perubahan-perubahan pH perairan yang masih dalam batas normal toleransinya; tetapi ikan akan memilih suatu perairan yang mempunyai pH paling sesuai bagi kehidupannya jika ada kesempatan untuk memilih (Supriharyono 2009, Miller 2007, Leidy 2000). Batas toleransi organisme akuatik adalah di antara pH 5-9, maka jika ada polutan yang mengganggu sistem buffer perairan tersebut akan dapat menimbulkan gangguan yang serius bagi organisme akuatik.

E.3. DO (Oksigen Terlarut)

Oksigen terlarut (*dissolved oxygen*) merupakan parameter mutu air yang sangat penting, karena nilai oksigen terlarut dapat menunjukkan tingkat pencemaran di perairan atau tingkat pengolahan air limbah. Besarnya nilai oksigen terlarut dalam suatu perairan akan menentukan kesesuaian kualitas air sebagai sumber untuk kehidupan (Sunu 2001). Banyaknya oksigen terlarut menunjukkan kemampuan badan perairan di dalam mola kadar minimal oksigen (Leidy 2000). Oksigen terlarut dalam air dapat berasal dari atmosfer, atau proses *fotosintesis* tumbuhan air. Jumlah oksigen terlarut dalam air tergantung pada suhu, tekanan atmosfer dan kadar mineral dalam air (Argawala 2006, Miller 2007).

Pada lingkungan perairan yang tidak tercemar, kadar minimum DO sebesar 5 ppm sudah cukup untuk mendukung beberapa aktivitas kehidupan yang normal seperti pertumbuhan juvenil, fecunditas, bertelur dan kelangsungan hidup bagi beberapa spesies ikan (Supriharyono 2009, Argawala 2006, Wardhana, 2004). Sedangkan banyak sedikitnya oksigen yang dikonsumsi organisme tergantung dari jenis, stadium, dan aktivitas dari organisme tersebut.

E.4. Alkalinitas

Alkalinitas menggambarkan kandungan basa. Pada perairan yang tercemar nilai alkalinitas menggambarkan basa dan hidroksil. Sedangkan pada perairan yang alami dan normal nilai alkalinitas terutama menggambarkan nilai kebasaaan dari karbonat dan bikarbonat. Nilai alkalinitas yang memenuhi syarat untuk budidaya ikan antara 20-300 mg/l (Sunu 2001, Argawala 2006). Nilai alkalinitas lebih besar dari 500 mg/l

menunjukkan bahwa perairan memiliki produktivitas rendah, 200-500 mg/l perairan produktif, 50-200 mg/l produktivitas sedang, 10-50 mg/l perairan kurang produktif dan 0-10 mg/l tidak dapat dimanfaatkan (Supriharyono, 2009).

BAB III

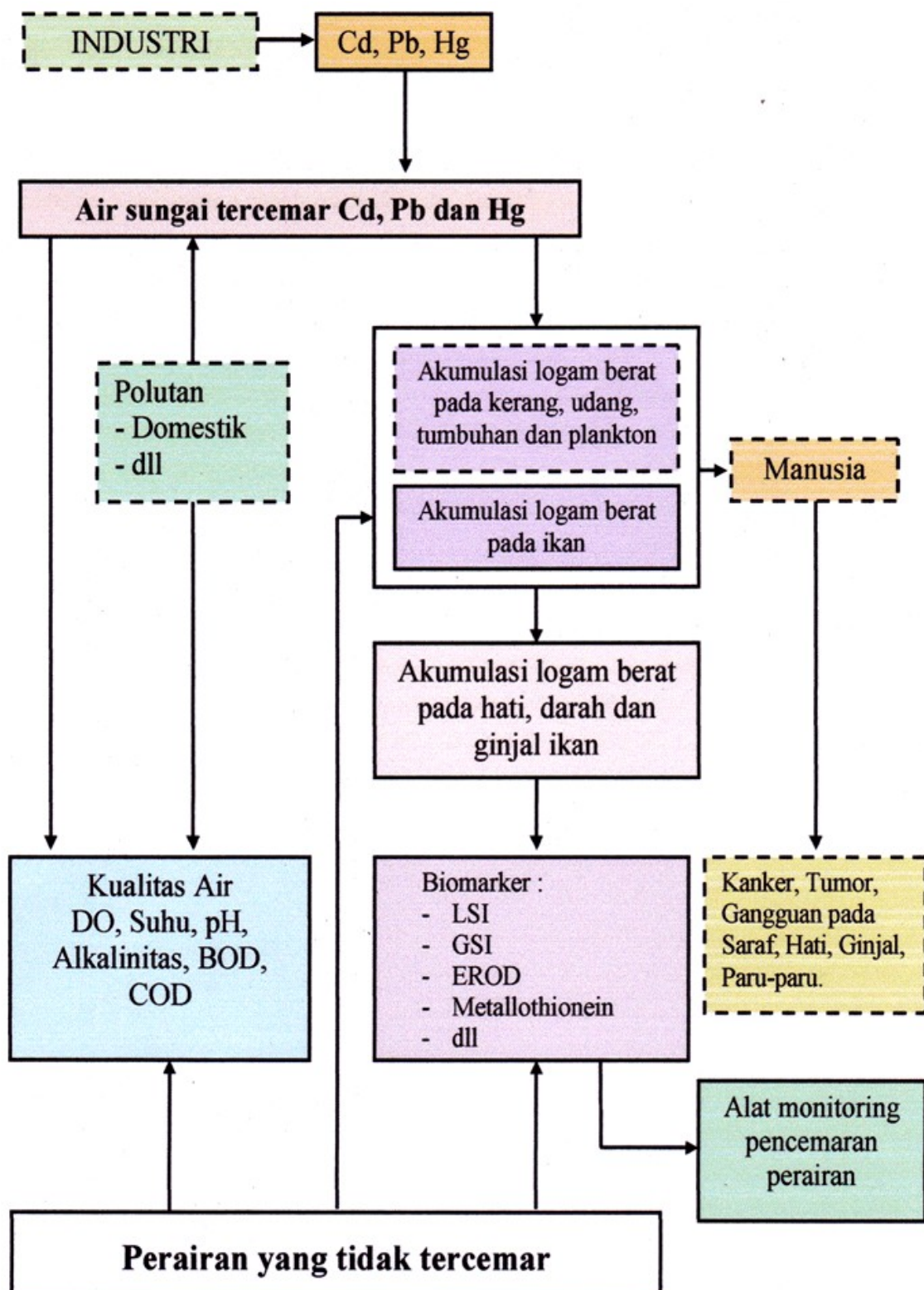
KERANGKA TEORI KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

A. Kerangka Teori

Berdasarkan tinjauan pustaka pada disertasi ini dapat dibuat kerangka teori seperti yang tersaji pada gambar 1. Pada kerangka teori tersebut dapat dilihat bahwa logam berat (Cd, Pb dan Hg) yang berasal dari buangan limbah industri masuk ke perairan sungai. Logam berat Cd, Pb dan Hg yang bersifat toksik terpajan pada air sungai kemudian logam berat tersebut masuk ke dalam tubuh ikan dan terakumulasi pada jaringan hati. Besarnya akumulasi tergantung kemampuan jaringan dalam mengabsorpsi logam berat Cd, Pb dan Hg. Kemampuan jaringan dalam mengabsorpsi atau menjerab logam berat yang terlarut dalam air sungai dikenal dengan istilah *Bioconcentration Factor* (BCF). Konsentrasi Cd, Pb dan Hg di hati pada kadar tertentu berikatan dengan *thionein* membentuk *metallothionein*; mempengaruhi aktivitas EROD, LSI maupun GSI.

Logam berat Cd, Pb dan Hg bersifat toksik, *karsinogenik*, *bioakumulatif* dan *biomagnifikasi*. Ketiga logam ini masuk ke tubuh ikan dengan cara absorpsi langsung maupun tidak langsung. Proses absorpsi langsung tergantung pada tempat persentuhannya. Di dalam tubuh ikan persentuhan melalui insang (*branchia*) yakni pada *epithelium branchiale*. Sementara itu yang masuk secara tidak langsung melewati jalur *tropic* berlangsung melalui *mikrovili* permukaan *intestinum*. Pada penelitian ini

konsentrasi Cd, Pb dan Hg di air sungai masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L. Dengan demikian masih memenuhi Baku Mutu air kelas I, yakni air yang digunakan sebagai air baku air minum. (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air).

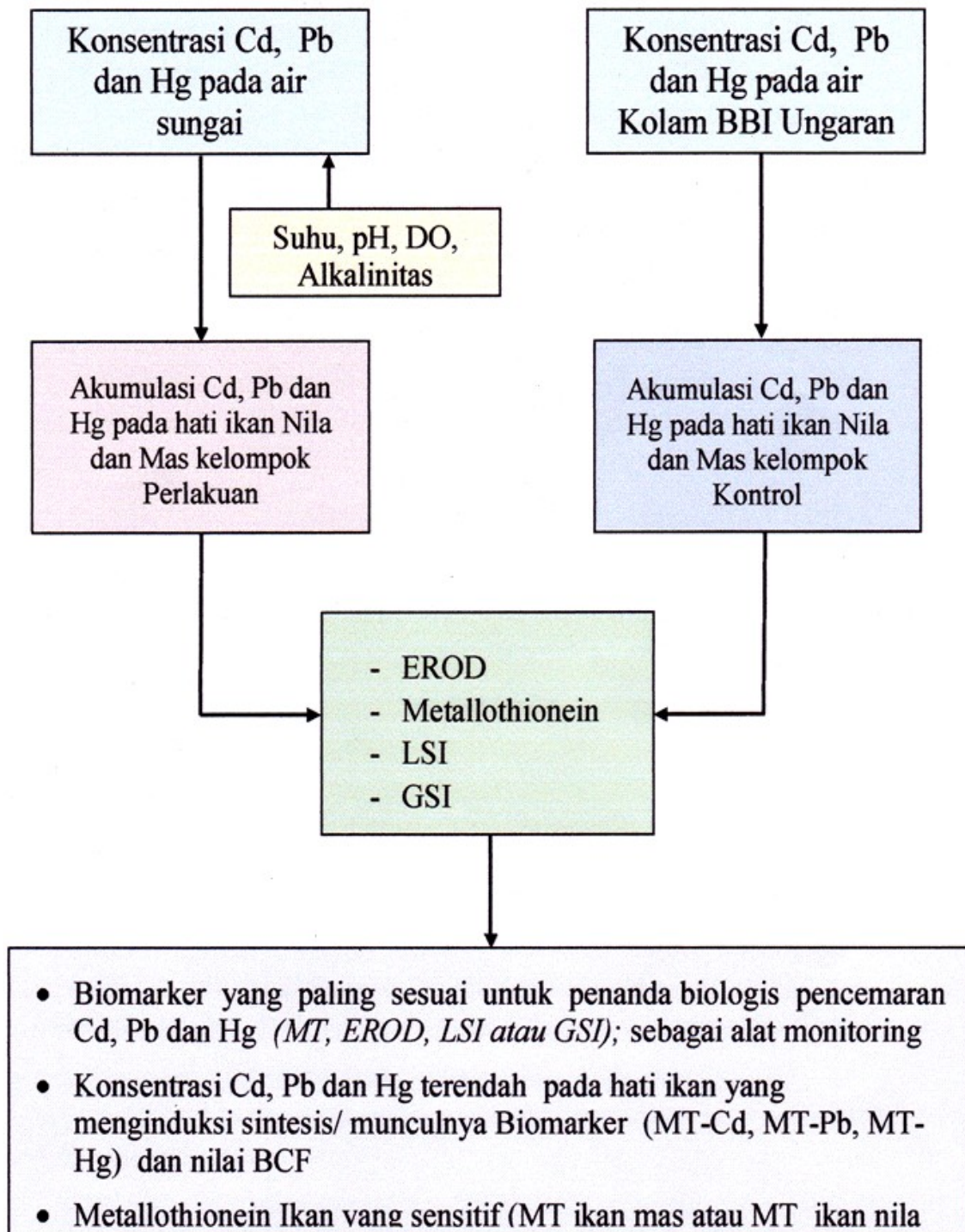


Gambar 1 : Diagram Alir Kerangka Teoritis

B. Kerangka Konsep

Kerangka konsep penelitian disertasi tersaji pada gambar 2. Pada kerangka konsep terlihat variabel-variabel yang diamati dan diukur selama penelitian, yakni meliputi : variabel bebas, variabel terikat dan variabel pra kondisi. Variabel bebas meliputi konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada air sungai dan kadar Cd, Pb dan Hg di hati serta nilai BCF. Variabel tergantung meliputi konsentrasi Cd, Pb dan Hg di hati maupun biomarker *metallothionein*, EROD, LSI dan GSI. Sedangkan variabel pra kondisi terdiri dari suhu, pH dan DO, yakni variabel yang langsung berpengaruh pada kehidupan ikan dan aktivitas metabolismenya.

Dari berbagai variabel yang dikaji akan ditemukan biomarker yang paling sesuai (sensitif, spesifik, *early warning dan universal*) untuk penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg. Diantara biomarker MT, EROD, LSI dan GSI akan ditentukan salah satu diantara ke empat biomarker tersebut yang sesuai sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, untuk monitoring logam berat Cd, Pb dan Hg yang keberadaannya di perairan terlarut di air secara bersamaan. Selain itu akan ditentukan *metallothionein* pada tubuh ikan apakah yang sensitif sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg yang konsentrasinya di perairan masih memenuhi Baku Mutu air kelas I sesuai Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air.



Gambar 2 : Diagram Alir Kerangka Konsep Suhu, pH, DO, Alkalinitas

C. Hipotesis

Bertitik tolak dari tinjauan pustaka di atas dan dihubungkan dengan permasalahan yang timbul, dapat disusun hipotesis sebagai berikut.

C.1. Hipotesis Mayor

Biomarker pada ikan (LSI, GSI, EROD, MT) dapat digunakan sebagai penanda biologis untuk monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di lingkungan perairan yang konsentrasinya masih memenuhi Baku Mutu air kelas I.

C.2. Hipotesis Minor

1. *Metallothionein* merupakan biomarker yang paling sesuai (sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*) sebagai penanda biologis pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan sungai yang konsentrasi logam beratnya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I, dibandingkan EROD, LSI dan GSI sebagai alat monitoring.
2. Besarnya konsentrasi Cd, Pb dan Hg terendah di dalam hati ikan mas dan nila yang menginduksi sintesis/ munculnya biomarker (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) paling awal mempunyai nilai yang berbeda.
3. MT-Cd merupakan penanda biologis yang muncul paling awal sebagai biomarker pencemaran Cd, diikuti MT-Pb sebagai biomarker pencemaran Pb dan MT-Hg sebagai biomarker pencemaran Hg.
4. Besarnya nilai BCF yang menyebabkan munculnya biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg paling awal pada ikan nila dan ikan mas mempunyai nilai yang berbeda.
5. *Metallothionein* pada hati ikan mas sensitif sebagai biomarker pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan yang konsentrasinya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I

BAB IV

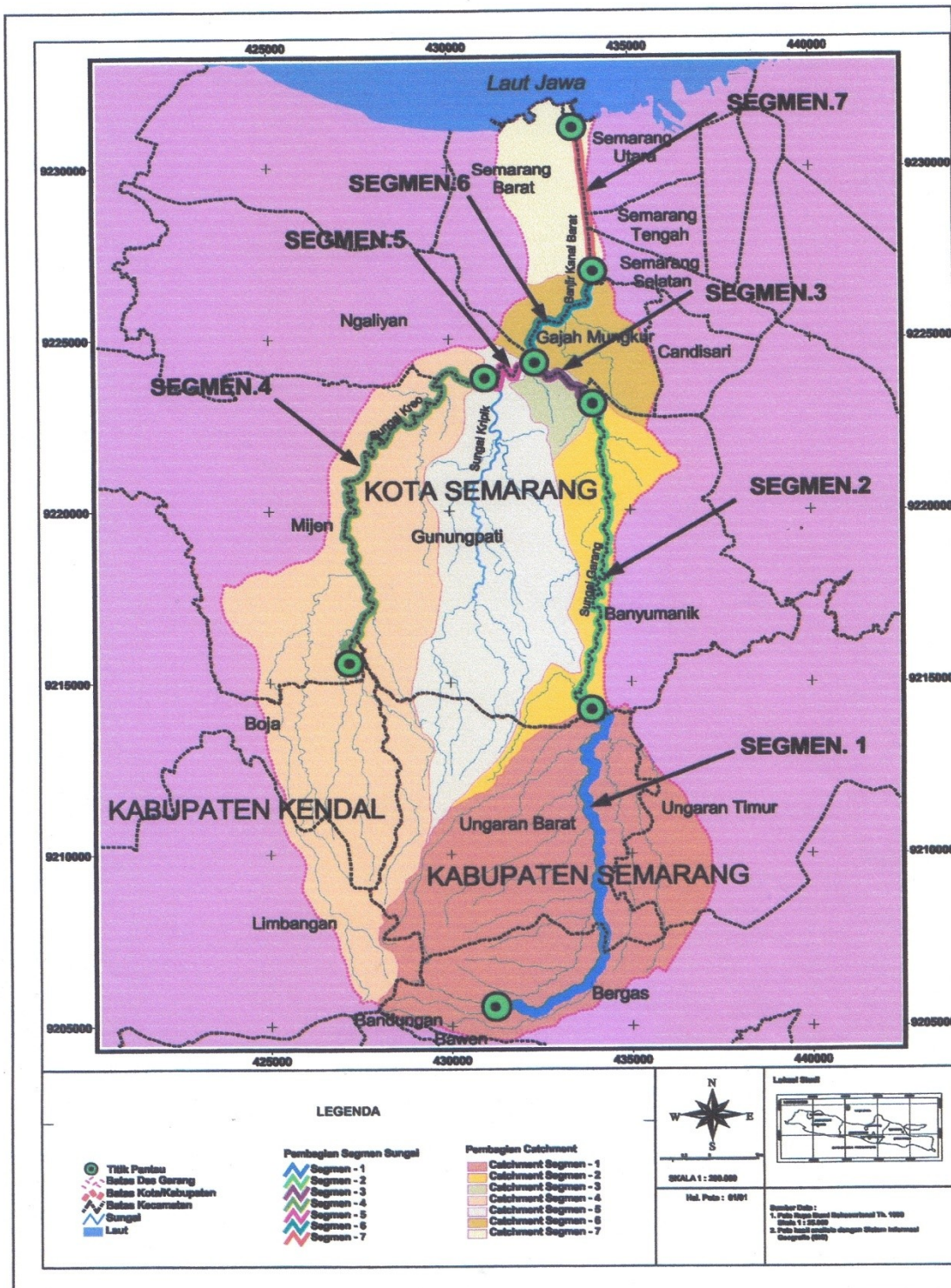
METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di sungai Kaligarang bagian Hilir, segmen 6 (Gambar 3). Lokasi ini digunakan untuk penempatan Karamba Jaring Apung (KJA). Bagian hilir segmen 6 dipilih untuk perlakuan karena lokasinya paling memungkinkan untuk budidaya ikan menggunakan karamba. Lokasi ini airnya relatif tenang, arus air tidak begitu besar, tempat penduduk sekitar mencari ikan, dan merupakan tempat bertemunya limbah pabrik-pabrik yang berdiri di sepanjang sungai, sehingga air sungai mengandung limbah dengan kadar Cd, Pb dan Hg yang memungkinkan untuk penelitian. Rerata kadar Cd, Pb dan Hg di tempat ini, pada saat penelitian dimulai dan selama penelitian berlangsung masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L, sehingga masih memenuhi nilai Baku Mutu Cd, Pb dan Hg untuk air sungai kelas I. Baku Mutu Cd, Pb dan Hg untuk air sungai kelas I masing-masing adalah 0,01 mg/L, 0,03 mg/L dan 0,001 mg/L.

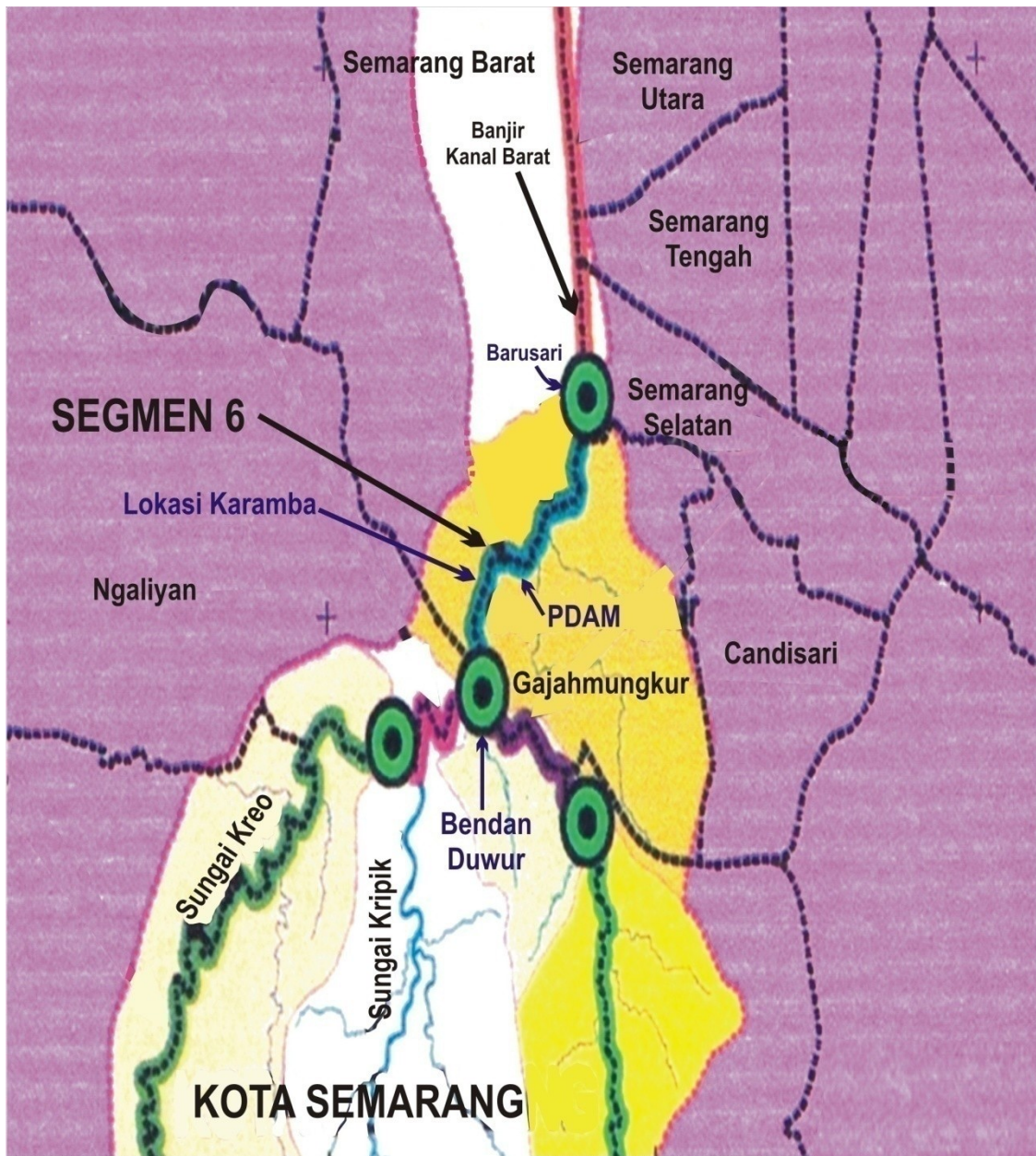
Adapun untuk kontrol, tempatnya di Kolam Balai Benih Ikan di Ungaran Kabupaten Semarang (lampiran 16). Kadar Cd, Pb dan Hg di air pada kolam ini masing-masing sebesar 0 mg/L. Ikan yang digunakan untuk eksperimen ada 2 macam yakni ikan mas (*Cyprinus carpio* L.), dan ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.). Benih ikan untuk penelitian diambil dari kolam Balai Benih Ikan (BBI) Ungaran. Kolam pembenihan dan kolam kontrol berada pada petak kolam yang berbeda. Penelitian dilakukan pada musim peralihan, antara musim kemarau dan penghujan. Laboratorium yang digunakan sebagai tempat analisis sampel meliputi, Laboratorium Kimia UGM Yogyakarta, dan Laboratorium Kesehatan Lingkungan Semarang, Laboratorium BPPT Serpong, Laboratorium Biologi UNNES dan Laboratorium Fakultas Farmasi UNWAHAS.

PETA SEGMENT SUNGAI GARANG



Sumber : Peraturan Gubernur Jawa Tengah No. 156 Tahun 2010, tanggal 14 Desember 2010

Gambar 3 : Peta Segment Kaligarang



SKALA 1 : 200.000

KETERANGAN :

1. Segmen 6 terletak di Kelurahan Petompon Kecamatan Gajahmungkur
2. Lokasi Karamba terletak \pm 200 m dari sumber air yang diambil PDAM
3. Segmen 6 memanjang dari Bendang Duwur sampai Plered (Kelurahan Barusari)

B. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian *Experimental Design*, dengan rancangan *Pre Test and Post Test Control Group Design* (Verschuren and Doorewaard 2005, Steel and Torrie 2000, Sastroasmoro dan Ismael 2008). Dengan desain ini biomarker/penanda biologis yang muncul pada ikan setelah eksperimen akan dibandingkan antara kelompok kontrol (ikan yang dibesarkan dengan KJA di kolam BBI, dengan kelompok perlakuan yakni ikan yang di dibesarkan dengan KJA di Kaligarang bagian Hilir segmen 6. Konsentrasi Cd, Pb dan Hg di air sungai pada kelompok perlakuan masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L, sedangkan pada kelompok kontrol kadar Cd,Pb dan Hg di air kolam masing-masing 0 mg/L, pada masing-masing karamba dipelihara 100 ekor ikan. Dua karamba di Kaligarang Hilir/segmen 6, masing-masing digunakan untuk memelihara ikan mas dan ikan nila (lampiran 16). Demikian pula di lokasi kontrol/ BBI Ungaran, juga dipelihara ikan mas dan nila masing-masing 100 ekor dengan KJA yang berbeda (lampiran 16). Ikan yang digunakan berumur 2,5 bulan, usia ikan yang umumnya mulai ditebarkan dalam karamba dan posisi dasar karamba berada 1m di atas dasar sungai (1m di atas sedimen).

Sebelum penelitian eksperimen dilakukan terlebih dahulu dilakukan penelitian eksplorasi sebagai penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan dilakukan uji *repeatability*/ulangan pengukuran dan *reproducibility*/ketepatan penggunaan metode, yang tujuannya adalah; *repeatability* untuk menguji ketelitian alat (*accuracy*), dan *reproducibility* untuk melihat ketepatan (*precision*) metode yang digunakan. Uji pendahuluan ini dilakukan pada ikan yang diambil langsung dari sungai Kaligarang bagian hilir maupun dari BBI, dengan menggunakan ikan yang usianya siap dipanen (4 bulan). Dengan dilakukannya kedua uji tersebut, maka tidak diperlukan adanya ulangan/replikasi dalam desain penelitiannya. Selain rancangan eksperimen, penelitian

ini juga menggunakan rancangan penelitian eksplorasi sebagai penelitian pendahuluan. Dengan demikian penelitian eksperimen tersebut dilakukan setelah dilakukan penelitian pendahuluan/penelitian eksplorasi. Pada penelitian pendahuluan sampel ikan langsung diambil dari habitat masing-masing, yakni Kaligarang segmen 6 dan kolam BBI Ungaran. Ikan dari Kaligarang sebagai sampel perairan yang terpajan logam berat, dan sampel ikan dari BBI mewakili perairan bebas polutan logam berat. Ikan yang diambil ikan yang berusia 4 bulan atau siap dipanen.

C. Populasi dan Sampel

Populasi penelitian ini terdiri dari 300 ekor ikan mas dan ikan 300 ekor ikan nila hasil pembenihan di Balai Benih Ikan Ungaran. Populasi ikan di kolam pembenihan BBI Ungaran mempunyai umur, berat dan panjang tubuh yang relatif sama (umur 2,5 bulan, berat dan panjang tubuh masing-masing 19 gr dan 8 cm). Untuk sampel masing-masing jenis ikan diambil 100 ekor, dengan teknik *Random Sampling*. Dipilih teknik *Random Sampling* karena karakteristik populasi penelitian relatif homogen (populasi ikan merupakan hasil pembenihan sehingga umur, berat dan panjang tubuh relatif sama). Dengan pengambilan sampel secara *Random*, setiap anggota populasi diberi kesempatan yang sama untuk menjadi sampel, sehingga dapat diperoleh sampel yang betul-betul mewakili/menggambarkan kondisi populasi yang sebenarnya, sehingga hasil penelitian tidak bias.

Adapun cara pengambilan sampel, diawali dengan mengambil 200 ekor ikan mas dari 300 ekor benih ikan mas secara acak/ *Random*. Kemudian dibagi dua kelompok secara random pula, masing-masing sebagai sampel kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, sehingga sampel untuk kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan masing-masing berjumlah 100 ekor ikan mas. Penentuan sampel untuk ikan

nila dilakukan dengan cara yang sama, dari 300 ekor populasi ikan nila yang ada di kolam BBI yang berlainan.

Sebelum penentuan sampel terlebih dahulu dilakukan uji laboratorium, untuk memastikan sampel ikan tidak mengakumulasikan Cd, Pb dan Hg. Sampel ikan yang digunakan untuk penelitian dibesarkan di kolam BBI Ungaran sebagai kontrol maupun di Kaligarang Hilir sebagai lokasi eksperimen, menggunakan KJA. Ikan yang digunakan umurnya 2,5 bulan panjang tubuh 8 cm dan berat 19 gr, yakni ikan yang biasa dipakai sebagai benih ikan yang ditebarkan dalam KJA. Ikan tersebut dibesarkan di Karamba lokasi penelitian; dan dilakukan *time series*, setiap satu minggu sekali dianalisis kandungan MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg di hati pada ikan mas dan nila kelompok perlakuan yang dipelihara dengan KJA di Kaligarang maupun ikan mas dan nila kelompok kontrol yang dipelihara dengan KJA di kolam BBI Ungaran, sampai terjadi induksi sintesis/munculnya *metallothionein*. Pada minggu terakhir dimana *metallothionein* muncul, juga dilakukan pemeriksaan EROD, LSI dan GSI pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Jumlah ikan yang diambil dalam setiap minggu sebanyak 5 ekor untuk masing-masing jenis ikan baik ikan perlakuan maupun kontrol. Menurut WHO (1993), sampel penelitian sebanyak 5 ekor. Maka pada penelitian ini digunakan 5 ekor ikan mas dan 5 ekor ikan nila sebagai sampel, pada setiap kali analisis menggunakan HPLC maupun analisis spektrofotometer serta penghitungan LSI dan GSI sehingga untuk kelompok kontrol dan kelompok perlakuan digunakan 60 ekor ikan nila dan 60 ekor ikan mas sebagai sampel. Pada masing-masing karamba dipelihara 100 ekor ikan sebagai cadangan kalau ada yang mati atau sakit.

D. Variabel Penelitian

D.1. Nama Variabel

D.1.1. Variabel Bebas/Independent

- Kadar Cd, Pb dan Hg pada air sungai Kaligarang bagian Hilir lokasi penelitian
- Kadar Cd,Pb dan Hg pada hati ikan nila dan mas kelompok perlakuan
- Kadar Cd, Pb dan Hg pada hati ikan nila dan mas kelompok kontrol
- Kadar Cd, Pb dan Hg pada air kolam BBI/ lokasi kontrol

D.1.2. Variabel Terikat/Dependent/Tergantung

- Biomarker *MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg* pada ikan mas dan nila kelompok Kontrol
- Biomarker *MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg* pada ikan mas dan nila kelompok perlakuan
- Kadar Cd, Pb dan Hg pada hati ikan nila dan mas kelompok kontrol
- Kadar Cd,Pb dan Hg pada hati ikan nila dan mas kelompok perlakuan
- Biomarker (LSI, GSI, EROD) pada ikan mas dan nila kelompok kontrol
- Biomarker (LSI, GSI, EROD) pada ikan mas dan nila kelompok perlakuan
- Nilai BCF pada ikan mas dan nila kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

D.1.3. Variabel Penyerta (Variabel Pra Kondisi)

- pH, Suhu, DO di Kaligarang bagian Hilir

D.2. Definisi Operasional Variabel

Definisi operasional variabel bebas, variabel tergantung dan variabel penyerta dapat dilihat pada matrik yang tertera pada tabel 2 halaman berikut ini.

Tabel 2
Matrik Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Cara Pengukuran/ Pengumpulan Data	Skala Variabel	Satuan Variabel	Rentang Nilai Variabel
1	Variabel Bebas :				
	Cd di air sungai	Diukur dengan AAS pada λ 326,1 nm dengan lampu AAS untuk Cd	Rasio	mg/L	0,01 mg/L *
	Pb di air sungai	Diukur dengan AAS pada λ 405,8 nm dengan lampu AAS untuk Pb	Rasio	mg/L	0,03 mg/L *
	Hg di air sungai	Diukur dengan AAS pada λ 253,7 nm dengan lampu AAS untuk Hg	Rasio	mg/L	0,001 mg/L *
	Cd di air BBI	Diukur dengan AAS pada λ 326,1 nm dengan lampu AAS untuk Cd	Rasio	mg/L	0,01 mg/L *
	Pb di air BBI	Diukur dengan AAS pada λ 405,8 nm dengan lampu AAS untuk Pb	Rasio	mg/L	0,03 mg/L *
	Hg di air BBI	Diukur dengan AAS pada λ 253,7 nm dengan lampu AAS untuk Hg	Rasio	mg/L	0,001 mg/L *
2	Variabel Tergantung :				
	Munculnya Biomarker MT-Cd	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	Menit	3,1 – 3,152**
	Munculnya Biomarker MT-Pb	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Pb)	Rasio	Menit	11,239 – 11,490**
	Munculnya Biomarker MT-Hg	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Hg)	Rasio	Menit	7,217– 7,693**
	Kadar Cd di hati Ikan Mas	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Pb di hati Ikan Mas	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Hg di hati Ikan Mas	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Cd di hati Ikan Nila	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Pb di hati Ikan Nila	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Hg di hati Ikan Nila	HPLC (Analisis sampel hati dan larutan standar Cd)	Rasio	mg/kg	-
	EROD	Analisis enzim dengan spektrofotometer pada λ 572 nm	Rasio	p mol/mg	-
	GSI	Analisis Indeks Fisiologi	Rasio	-	-
	LSI	Analisis Indeks Fisiologi	Rasio	-	-
3	Variabel Pra Kondisi :				
	Kadar Cd pada ikan	Diukur dengan AAS pada λ 326,1 nm dengan lampu AAS untuk Cd	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Pb pada ikan	Diukur dengan AAS pada λ 405,8 nm dengan lampu AAS untuk Pb	Rasio	mg/kg	-
	Kadar Hg pada ikan	Diukur dengan AAS pada λ 253,7 nm dengan lampu AAS untuk Hg	Rasio	mg/kg	-
	pH	pH meter	Rasio	-	6 – 9***
	Suhu	Thermometer	Rasio	$^{\circ}$ C	26 $^{\circ}$ – 27 $^{\circ}$ C***
	DO	DO-Kit	Rasio	mg/L	3 – 6 mg/L ***

Keterangan :

*) dan ***) : Nilai Baku Mutu Cd, Pb dan Hg pada air kelas I dan Kelas III menurut Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air

**) : *Retention Time* larutan Cd standar, Pb standar dan Hg standar hasil analisis HPLC

Definisi operasional variabel selengkapnya disjikan pada lampiran 15.

D.3. Definisi Konseptual Variabel

Lingkungan perairan sungai Kaligarang yang dimaksud dalam penelitian ini adalah segmen 6 (sesuai dengan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 dan Peraturan Gubernur Jawa Tengah Nomor 23 Tahun 2010). Pajanan logam yang diukur disungai Kaligarang diutamakan adalah logam berat, yaitu Cd, Pb dan Hg. Dengan demikian adanya logam-logam yang lain di sungai Kaligarang tidak disertakan dalam penelitian ini. Definisi konseptual dari masing-masing variabel adalah sebagai berikut :

D.3.1. Variabel Bebas/Independen

Variabel bebas terdiri dari konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada air sungai Kaligarang segmen 6 maupun dari air kolam BBI Ungaran. Konsentrasi Cd, Pb dan Hg perairan : adalah kadar Cd, Pb dan Hg pada air sungai Kaligarang segmen 6 maupun kadar Cd, Pb dan Hg di air kolam BBI Ungaran pada saat penelitian akan dilakukan, sesuai hasil analisis Flame AAS.

D.3.2. Variabel Terikat/Dependen

1. MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg: *metallothionein* yang diisolasi dari organ hati melalui preparasi sampel dan muncul pada alat HPLC.
2. Konsentrasi Cd, Pb dan Hg di hati ikan : nilai yang diperoleh dari analisis HPLC pada sampel yang dibandingkan dengan larutan standar, yang memunculkan biomarker paling awal.
3. *Liver Somatic Index* (LSI) : nilai LSI ditentukan dari organ hati, merupakan perbandingan antara berat hati ikan dengan berat tubuh ikan dikali 100.

4. *Gonade Somatic Index* (GSI) : nilai GSI ditentukan dari organ gonade, merupakan perbandingan antara berat gonade ikan dengan berat tubuh ikan dikali 100.
5. Ethoxyresorufin-O-diethylase (EROD) : adalah aktivitas enzim yang ditentukan dari organ hati.
6. Bioconcentration Factor (BCF) : nilai BCF ditentukan dari organ hati, merupakan perbandingan antara besarnya konsentrasi logam berat yang terakumulasi dalam organ dengan besarnya konsentrasi logam berat di perairan.

D.3.3. Variabel Penyerta (Variabel Pra Kondisi)

Variabel penyerta terdiri dari variabel-variabel pra kondisi yang kemungkinan akan mempengaruhi toksisitas dan munculnya MT, mengingat variabel tersebut berpotensi mempengaruhi kehidupan dan metabolisme ikan. Variabel ini meliputi suhu, pH, DO, dan alkalinitas perairan. Dalam penelitian ini variabel tersebut masih dalam kisaran yang layak bagi kehidupan ikan, sehingga demikian variabel ini tidak berpengaruh terhadap variabel tergantung/dependent variabel. Dengan demikian validitas data dapat dipertanggungjawabkan sehingga hasil penelitian tidak bias.

E. Materi Penelitian

Materi penelitian, meliputi :

- Sampel hati ikan mas dan nila digunakan untuk menentukan kadar Cd, Pb, Hg dan MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg pada hati masing-masing ikan tersebut serta EROD, baik ikan dari balai benih (Ikan kelompok kontrol) dan kelompok perlakuan, maupun ikan yang langsung diambil dari Kaligarang. Namun demikian, ikan yang langsung diambil dari Kaligarang tidak diperiksa LSI, GSI dan EROD nya, namun hanya diperiksa munculnya MT-Cd saja sebagai uji pendahuluan.

- Sampel air digunakan untuk mengukur kadar Cd, Pb dan Hg di perairan Hulu, Tengah, Hilir dan Kontrol serta lokasi penempatan karamba untuk perlakuan. Selain itu juga untuk mengukur pH, Suhu, DO, kesadahan dan alkalinitas.
- Sampel *gonade* untuk menentukan GSI, dan Sampel Hati untuk menentukan LSI, ikan mas dan nila, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

F. Teknik Pengumpulan Data

Data Primer, diperoleh melalui penelitian eksperimen menggunakan KJA, di daerah hilir segmen 6 dan lokasi kontrol. Data Primer meliputi : Kadar Cd di hati ikan mas dan nila kelompok perlakuan dan kontrol, GSI ikan mas dan nila kontrol dan perlakuan, LSI ikan mas dan nila kontrol dan perlakuan, berat hati dan berat tubuh serta berat gonade ikan mas dan nila kontrol dan perlakuan, EROD dan *MT (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg)* ikan mas dan nila kontrol dan perlakuan, kadar Cd, Pb dan Hg di air lokasi perlakuan dan kontrol. Selain itu data primer juga diperoleh melalui penelitian pendahuluan, yakni meliputi *MT-Cd* ikan yang diambil langsung dari sungai Kaligarang bagian Hilir dan BBI Ungaran serta kadar Cd di air sungai Kaligarang segmen 6 maupun BBI Ungaran. Sedangkan data sekunder diperoleh melalui studi pustaka dari berbagai literatur yang relevan/mendukung, yakni jurnal, buku teks, laporan penelitian dan Disertasi.

F.1. Langkah Pengumpulan Data Primer

Adapun langkah-langkah pengumpulan data primer dimulai dengan penelitian pendahuluan menggunakan ikan umur 4 bulan yakni usia siap panen, dengan langkah

sebagai berikut. Langkah pertama ikan yang hidup bebas di Kaligarang diambil sampelnya dengan teknik *Random Sampling*, kemudian diambil hatinya, dan dilakukan preparasi sampel hati dengan preparasi khusus untuk isolasi *metallothionein*, kemudian diperiksa ada tidaknya *metallothionein* pengikat Cd, menggunakan alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Sebagai kontrol diambil sampel ikan dengan teknik *Random Sampling*, dari perairan yang tidak tercemar yakni dari Balai Benih Ikan Air Tawar di Ungaran. Sampel dianalisis sama seperti sampel ikan dari sungai Kaligarang. Hasil analisis HPLC sampel hati ikan dari Kaligarang dibandingkan dengan sampel ikan dari Balai Benih Ikan untuk menentukan ada tidaknya *metallothionein* pengikat Cd. Pada tahap ini juga dilakukan analisis konsentrasi Cd, Pb dan Hg di air Kaligarang segmen 6 maupun air kolam BBI ungaran.

Pada penelitian pendahuluan dilakukan uji *repeatability*/ulangan pengukuran dan *reproducibility*/ketepatan penggunaan metode, yang tujuannya adalah; *repeatability* untuk menguji ketelitian (*accuracy*) alat yang dipakai dan *reproducibility* untuk melihat ketepatan (*precision*) metode yang digunakan; sehingga data penelitian dapat dijamin validitasnya dan hasil penelitian tidak bias. Kedua uji tersebut dilakukan melalui aplikasi lapangan, sekaligus sebagai uji pendahuluan. Uji pendahuluan ini dilakukan pada ikan yang diambil langsung dari sungai Kaligarang bagian hilir maupun dari BBI, dengan menggunakan ikan yang usianya siap dipanen (4 bulan). Dengan dilakukannya kedua uji tersebut, maka tidak diperlukan adanya ulangan/replikasi dalam desain penelitiannya. Pada uji pendahuluan ini analisis HPLC untuk mengetahui *Retention Time* yang menunjukkan induksi sintesis muncul tidaknya *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) dilakukan di beberapa laboratorium, yakni Serpong, UGM dan Unwahas. Hasil uji di tiga tempat tersebut menunjukkan kesamaan, yakni pada sampel

dari BBI Ungaran tidak muncul MT dan sampel dari Kaligarang muncul MT pada kisaran *Retention Time* yang hampir sama. Maka dari itu diyakini bahwa metode maupun alat yang digunakan sudah tepat, sehingga data penelitian dapat dijamin validitasnya, sehingga hasil penelitian tidak bias.

Setelah dilakukan penelitian pendahuluan, selanjutnya dilakukan penelitian eksperimen menggunakan KJA untuk perlakuan dan kontrol, dengan menggunakan ikan umur 2,5 bulan. Penelitian dilakukan dengan *time series* pada kedua kelompok penelitian baik kelompok kontrol dan kelompok perlakuan; setiap satu setengah bulan sekali dilakukan analisis menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatografi*) untuk mengetahui munculnya *Metallothionein-Cd*, *Metallothionein-Pb* dan *Metallothionein-Hg*; di hati selama 7 bulan pada ikan mas dan nila kontrol maupun perlakuan, untuk mengetahui munculnya biomarker yang paling awal dan untuk mengetahui besarnya kadar logam berat di hati ikan yang memunculkan biomarker paling awal tersebut. Analisis HPLC menunjukkan bahwa pada satu setengah bulan pertama (umur ikan 4 bulan), ikan kelompok perlakuan sudah muncul *Metallothionein* (Cd, Pb dan Hg), maka dilakukan eksperimen ulang, dengan *time series* dilakukan per minggu selama enam minggu/satu setengah bulan menggunakan KJA. Hal ini dilakukan dengan pertimbangan pada penelitian pendahuluan dengan menggunakan ikan umur 4 bulan, ternyata biomarker *metallothionein* sudah muncul. Eksperimen ulang tersebut tujuannya untuk memastikan pada minggu ke berapa sesungguhnya *metallothionein* muncul. Hal ini penting, untuk menjamin validitas data tentang kapan munculnya biomarker *metallothionein*, sehingga hasil penelitian tidak bias. Dengan demikian berdasarkan eksperimen ulang tersebut akan dapat dipastikan kapan sesungguhnya MT muncul, apakah MT muncul sebelum minggu ke enam ataukah pada minggu ke enam seperti halnya yang terjadi pada uji sebelumnya.

Sebelum analisis HPLC terlebih dahulu dilakukan preparasi khusus untuk isolasi *metallothionein* yang terdapat pada hati ikan (Chassaigne dan Lobinski 1999 dimodifikasi). Isolasi *metallothionein* dilakukan dengan cara sampel hati ikan sebanyak 5 gram *dithawing* pada suhu 4°C selanjutnya dipotong-potong dan dihomogenisasi dengan Tris HCl pH 8,1 dengan perbandingan 2 : 1 (10 ml Tris HCl : 5 gram sampel) menggunakan mortar. Kemudian disentrifuse (fungsinya untuk memisahkan *debris* dan enzim *metallothioneinnya*) dengan kecepatan 10000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil kemudian disentrifuse dengan kecepatan 110000 g selama 60 menit pada suhu 4°C, diperoleh hasil Isolasi yang mengandung *metallothionein*. Hasil isolasi dari sampel hati ikan kemudian dianalisis dengan HPLC, untuk melihat ada tidaknya *metallothionein* pengikat Cd, Pb dan Hg. Adapun caranya dengan melakukan analisis larutan Cd standar menggunakan HPLC. Apabila pada analisis sampel menghasilkan *Retention Time* yang nilainya sama dengan interval nilai *Retention Time* larutan Cd standar yakni antara (3,1-3,152) menit berarti *metallothionein*-Cd terdapat pada sampel tersebut. Kalau nilai *Retention Time* sampel di luar interval nilai *Retention Time* larutan Cd standar berarti sampel tidak mengandung *metallothionein*-Cd (*MT-Cd*) tetapi mengandung *metallothionein* lainnya (Giarrocco, Bruce, Matthew 1997). Demikian pula untuk menentukan *MT-Pb* dan *MT-Hg* dilakukan dengan cara yang sama yakni dengan analisis Pb standar dan Hg standar untuk melihat RT larutan standar Pb maupun Hg. Setelah uji pendahuluan kemudian dilakukan uji eksperimen. Sampel hasil uji eksperimen (kelompok kontrol dan kelompok eksperimen), dianalisis seperti halnya sampel penelitian pendahuluan menggunakan HPLC untuk menentukan ada tidaknya *Metallothionein*-Cd, *Metallothionein*-Pb dan *Metallothionein*-Hg serta kadar Cd, Pb maupun Hg di hati ikan nila dan mas.

F.2. Langkah Uji Eksperimen

Adapun langkah-langkah uji eksperimen untuk menemukan Biomarker *Metallothionein* dapat dikemukakan sebagai berikut :

- Penentuan sampel ikan

Sebelum penentuan sampel penelitian, diambil 5 ekor ikan mas dan ikan nila dari BBI Ungaran, dianalisis dengan HPLC dan Flame AAS untuk memastikan bahwa sampel tidak mengakumulasi logam berat Cd, Pb dan Hg. Setelah sampel dipastikan tidak mengandung Cd, Pb dan Hg selanjutnya diambil sampel ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dan ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.), masing-masing sebanyak 100 ekor. Keseluruhan benih sampel diambil dari kolam di Balai Benih Ikan Ungaran Kabupaten Semarang. Umur benih sampel yang diambil di awal penelitian adalah 2,5 bulan, panjang tubuh 8 cm dan berat tubuh 19 gram. Ikan mas dan nila masing-masing diambil 200 ekor, selanjutnya dengan secara random dibagi dalam 2 kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, masing-masing 100 ekor. Sampel ikan kelompok kontrol dipelihara dengan KJA di kolam Balai Benih Ikan Ungaran Kabupaten Semarang. Sedangkan sampel ikan kelompok perlakuan dipelihara di KJA di bagian hilir sungai Kaligarang (Kaligarang segmen 6). Uji kadar logam berat pada sampel air dilakukan untuk mengetahui keberadaan polutan logam berat di air pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, terutama kadar Cd, Pb dan Hg.

- Pengambilan sampel ikan dari KJA

Sampel ikan mas dan nila kelompok kontrol diambil dari KJA pada kolam di Balai Benih Ikan Ungaran, sedangkan sampel kelompok perlakuan adalah ikan mas dan nila yang diambil dari KJA di bagian hilir sungai Kaligarang. Pengambilan sampel

kedua kelompok dilakukan setelah satu setengah bulan ikan berada dalam kondisi perlakuan, sehingga umur ikan genap 4 bulan. Hal tersebut dimaksudkan agar jika terdapat paparan logam berat sudah dapat diserap oleh tubuh ikan untuk menginduksi munculnya *metallothionein*. Pada uji pendahuluan ikan dengan usia 4 bulan yang hidup pada perairan terpajan logam berat sudah muncul *MT-Cd*.

- Pembedahan ikan mas dan nila untuk dilakukan isolasi *metallothionein*

Pembedahan sampel ikan dilakukan untuk mengambil organ hati dan gonade dengan langkah seperti yang terdapat pada lampiran 12. Selanjutnya dilakukan prosedur isolasi *metallothionein* yang diadopsi dari penelitian (Chassaigne dan Lobinski. 1999). Langkah pertama, 5 gram sampel hati ikan dilunakkan dengan teknik *thawing* pada suhu 4°C. Setelah lunak, sampel hati dipotong-potong, dihaluskan menggunakan mortal dan dihomogenisasi dengan larutan Tris-HCl pH 8,1 dengan perbandingan 2:1 (10 ml Tris-HCl : 5 gram sampel hati). Sentrifugasi dilakukan pada sampel hati dengan kecepatan 10.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 110.000 g selama 60 menit pada suhu 4°C. Hasil isolasi berupa sampel yang mengandung *metallothionein*.

- Analisis ekspresi *metallothionein*

Hasil isolasi *metallothionein* selanjutnya dianalisis menggunakan alat *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC) untuk melihat adanya ekspresi *metallothionein* pada hati ikan akibat efek toksik logam berat Cd, Pb dan Hg yang mencemari air sungai. Proses analisis larutan sampel hati ikan kelompok kontrol dan perlakuan serta analisis larutan standar Cd, Pb dan Hg dilakukan dengan menggunakan *EZ Chrom Elite Jasco HPLC System* (UV2070-PU2080-LCnet II/ADC), dengan panjang gelombang 254 nm; fase diam (kolom *symetryshield RP 18*, biasa disebut C-18) diameter 3,5 mikrometer dengan panjang kolom 4,5 kali

150 mm; dan fase gerak asetonitril: tris buffer HCl pH 8,1 = 40: 60 (v/v). Langkah analisis secara rinci ada pada lampiran 12.

- Analisis EROD, dan penentuan LSI, GSI serta BCF

- Prosedur Pemeriksaan Aktifitas EROD (Klotz, Stegeman and Walsh, 1984)

Prosedur pemeriksaan aktivitas EROD dilakukan dengan langkah sebagai berikut. Ikan dibedah, kemudian liver ikan diambil, lalu ditimbang, selanjutnya liver dimasukkan dalam *microtube* dan dihancurkan. Setelah liver benar-benar hancur kemudian ditambahkan 1 ml larutan *buffer* EROD, dicampur dan didiamkan sampai liver mengendap. Selanjutnya larutan dalam *microtube* tersebut diambil dan dimasukkan dalam kuvet spektrofotometer. Larutan dibaca pada panjang gelombang 572 nm, suhu 30°C untuk mengetahui aktivitas EROD pada sampel, dengan cara membaca serapan yang tertera pada spektrofotometer (angka yang muncul menunjukkan besarnya nilai aktivitas EROD dalam satuan pmol/min/mg protein). Adapun larutan *Buffer* EROD terdiri dari 100 mM buffer NaH₂PO₄ pH 7.6, 1.15% KCl, 2 µM 7-ethoxyresorufin, dan 0.5 mM Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH). Adapun langkah pemeriksaan EROD secara rinci terdapat dalam lampiran 12.

- Prosedur Pengukuran *Liver Somatic Index* (LSI)

Langkah yang dilakukan dalam pengukuran LSI adalah sebagai berikut . Pertama kali sampel ikan ditimbang berat tubuhnya, maupun berat liver/ hati. Kemudian dilakukan penghitungan LSI, dengan rumus sebagai berikut:

$$LSI = \frac{\text{Berat hati ikan}}{\text{Berat tubuh ikan}} \times 100$$

Adapun langkah penentuan LSI secara rinci teradapat pada lampiran 12.

- Prosedur Pengukuran *Gonad Somatic Index* (GSI)

Pengukuran GSI dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut :

Langkah yang dilakukan dalam pengukuran GSI adalah sebagai berikut .

Pertama kali sampel ikan ditimbang berat tubuh, maupun berat gonade. Kemudian dilakukan penghitungan nilai GSI, dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{GSI} = \frac{\text{Berat gonade ikan}}{\text{Berat tubuh ikan}} \times 100$$

Adapun langkah penentuan GSI secara rinci terdapat pada lampiran 12.

- Prosedur Pengukuran Bioconcentration Factor (BCF) (*)

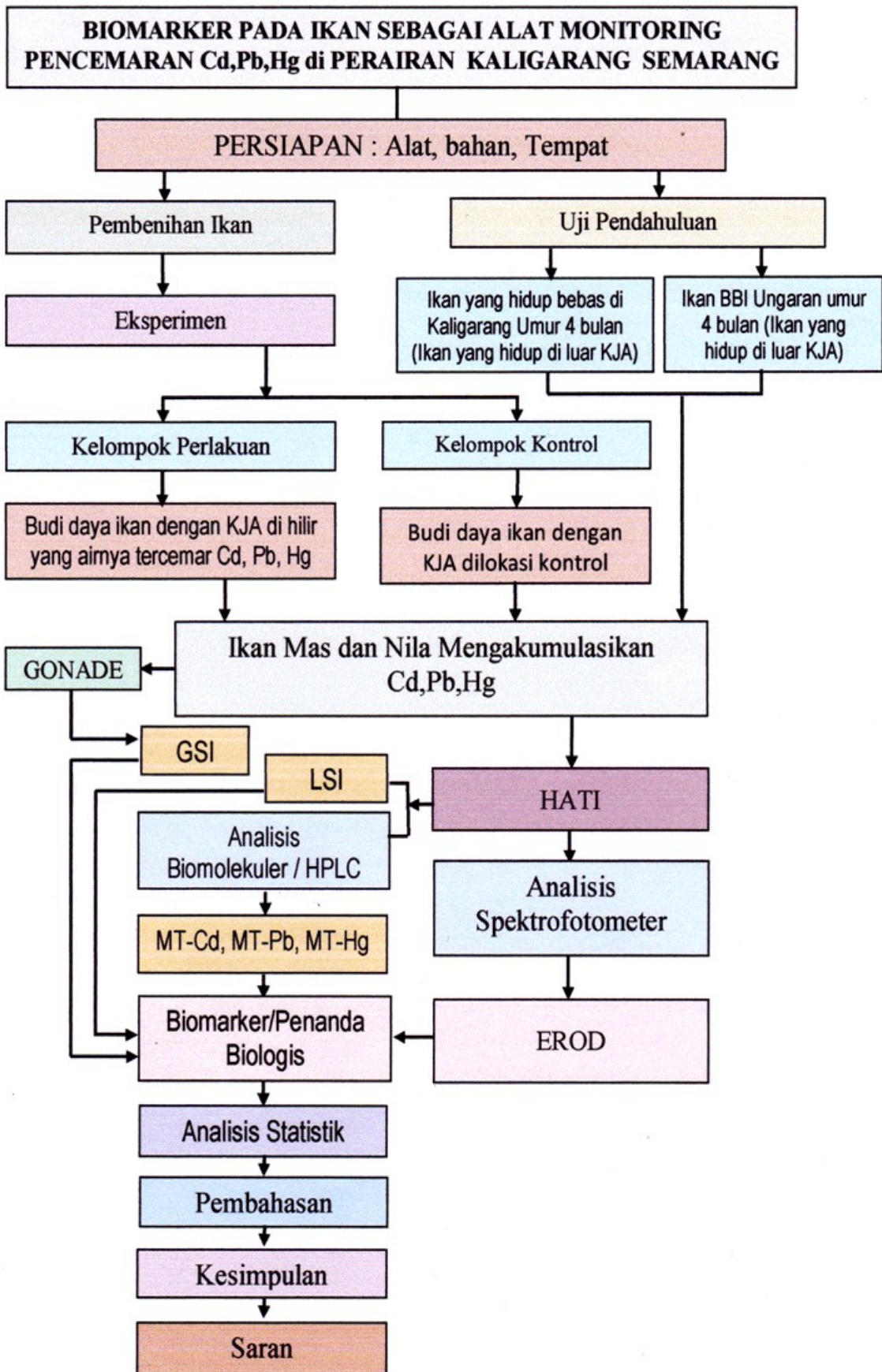
Langkah-langkah yang dilakukan dalam pengukuran BCF adalah sebagai berikut. Hati ikan mas dan ikan nila dianalisis menggunakan HPLC untuk mengetahui kadar Cd, Pb dan Hg di hati yang menyebabkan munculnya MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg. Selanjutnya dilakukan penghitungan nilai BCF yaitu perbandingan antara konsentrasi/kadar Cd, Pb dan Hg pada organ hati dengan konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada perairan dengan rumus :

$$\text{BCF} = \frac{\text{Konsentrasi logam di hati}}{\text{Konsentrasi logam di perairan}}$$

Adapun langkah penentuan BCF secara rinci terdapat pada lampiran 12.

Keterangan (*) : BCF diukur hanya pada saat awal penelitian sehingga belum mencapai jenuh (*steady state*).

Adapun langkah-langkah penelitian biomarker pada ikan sebagai alat monitoring pencemaran logam berat di perairan tadi secara ringkas dapat dilihat pada bagan alir halaman berikut ini.



Gambar 4 : Diagram Alir Langkah-langkah Penelitian.

G. Analisis Data

Data penelitian kemudian dianalisis secara deskriptif dan statistik. Adapun analisis secara rinci sebagai berikut.

G.1. Analisis Statistik Deskriptif

Analisis deskriptif digunakan untuk menganalisis data penelitian eksplorasi pada uji pendahuluan dan variabel prakondisi. Analisis tersebut digunakan untuk membandingkan *Retention Time* (RT) larutan standar (Cd, Pb dan Hg) dengan RT sampel hasil analisis menggunakan HPLC, sehingga dapat diketahui muncul tidaknya MT.

G.2. Analisis Uji Statistik

Analisis statistik digunakan untuk menganalisis data penelitian eksperimen dengan menggunakan KJA. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 17 untuk menentukan biomarker yang paling sesuai/paling sensitif sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg di Kaligarang yang kadar logam beratnya di air sungai masih memenuhi Nilai Baku Mutu (MT, EROD, LSI ataukah GSI); maupun nilai BCF yang memunculkan MT. Selain itu digunakan pula untuk menentukan biomarkernya MT pada hati ikan mas atau ikan nila yang paling sensitif sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg di Kaligarang. Adapun langkah analisis uji statistik dilakukan sebagai berikut.

G.2.1. Analisis Statistik Awal

Analisis awal dilakukan untuk mendukung dan menentukan langkah analisis statistik lebih lanjut. Adapun langkah yang dilakukan pada analisis statistik awal adalah sebagai berikut.

G.2.1.1. Penghitungan nilai rerata (mean) untuk penyajian data

Data hasil penelitian ini memiliki range yang berbeda antara kelompok satu dengan yang lainnya. Penghitungan nilai rerata dilakukan untuk mengetahui besarnya nilai rerata pada masing-masing kelompok, sehingga pengujian lebih lanjut dapat dilakukan.

G.2.1.2. Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan sebelum analisis statistik uji hipotesis. Uji ini dilakukan untuk mengetahui normalitas sebaran data dari nilai-nilai variabelnya. Uji normalitas sebaran data dilakukan dengan uji statistik *Kolmogorov-Smirnov*, dengan kriteria nilai kemaknan $(p) > 0,05$.

G.2.2. Analisis Statistik Akhir

Setelah dilakukan analisis statistik awal kemudian dilakukan analisis statistik akhir, dengan menggunakan uji beda dan analisis Probit. Uji beda yang digunakan meliputi: Uji parametrik *One Sample T-Test*, *Independent Sample T-Test* dan Uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, dan uji non parametrik *Mann-Whitney*.

G.2.2.1 Uji parametrik One Sample T-Test

Uji parametrik *One Sample T-Test*, digunakan untuk analisis karena sebaran data yang ada adalah normal. Uji ini digunakan untuk membedakan nilai konsentrasi

masing-masing logam berat dalam satu kelompok. Uji ini dilakukan untuk melihat perbedaan kadar logam berat (Cd, Pb dan Hg) pada masing-masing ikan.

G.2.2.2. Uji parametrik Independent Sample T-Test

Uji parametrik Independent Sample *T-Test*, digunakan untuk analisis karena sebaran data yang ada adalah normal. Uji beda ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata kadar logam berat pada ikan kelompok perlakuan dengan ikan kelompok kontrol maupun perbedaan rerata nilai EROD, LSI dan GSI pada ikan kelompok kontrol dan kelompok perlakuan

G.2.2.3. Uji non parametrik *Kruskal-Wallis*

Uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, digunakan untuk analisis karena sebaran data yang ada tidak normal dan membandingkan tiga variabel, yaitu konsentrasi Cd, Pb dan Hg. Uji beda ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata kadar masing-masing logam (logam Cd, Pb dan Hg) pada ikan mas dan ikan nila.

G.2.2.4. Uji non parametrik *Mann-Whitney*

Uji non parametrik *Mann-Whitney*, digunakan untuk analisis karena sebaran data yang ada tidak normal dan membandingkan dua variabel, yaitu *metallothionein* ikan mas dan *metallothionein* ikan nila. Uji beda ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata konsentrasi logam berat pada ikan mas dan ikan nila yang memunculkan MT.

G.2.2.5. Analisis Probit

Analisis Probit merupakan analisis regresi dengan menggunakan transformasi natural log untuk konsentrasi. Dengan analisis ini dapat diketahui konsentrasi variabel

bebas yang dapat menimbulkan efek. Analisis ini biasa dilakukan di bidang farmasi dan kesehatan untuk mengetahui dosis efektif dari suatu zat kimia atau obat. Dalam penelitian ini analisis probit dilakukan untuk mengetahui kadar terendah dari logam berat Cd, Pb dan Hg pada hati ikan yang menyebabkan munculnya penanda biologis (biomarker) paling awal. Dengan demikian dapat diketahui nilai kadar NOEL (*No Observed Effect Level*) logam Cd, Pb dan Hg, serta nilai kadar Cd, Pb dan Hg yang mulai menunjukkan efek (menyebabkan munculnya biomarker paling awal). Melalui analisis Probit, variabel penanda biologis yang muncul terlebih dahulu pada kadar Cd, Pb dan Hg yang terendah dapat diketahui (Diadopsi dari Henna Rya Sunoko 2007, Finney 2009).

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN BAHASAN

A. Hasil Penelitian

A.1. Kondisi Lingkungan Daerah Penelitian

A.1.1. Kondisi Geografi

Sungai Kaligarang membentang dari daerah Ungaran, tepatnya desa Gebugan, Kecamatan Bergas, Kabupaten Semarang, sampai dam Simongan Semarang, tepatnya di kelurahan Barusari Kecamatan Semarang Selatan, Kota Semarang. Sungai tersebut terletak pada 6° 59' 32" Lintang Selatan sampai 07° 11' 16" Lintang Selatan dan 110° 22' 38" Bujur Timur sampai 110° 24' 10" Bujur Timur. Aliran sungai ini berhulu dari Sungai Gung yang berasal dari daerah Ungaran. Akhir dari aliran Kaligarang adalah sungai Banjirkanal barat yang terbentang dari dam Simongan dan bermuara ke laut Jawa. Debit aliran rata-rata Kaligarang berkisar antara 3,25 m³/det hingga 12,34 m³/det (Pergub. Jateng. No. 156 Tahun 2001 tentang Peruntukan Air dan Pengelolaan Kualitas Air Sungai Garang di Provinsi Jawa Tengah).

Kaligarang bagian hulu merupakan daerah perbukitan yang terdiri dari lahan pertanian, perkebunan, permukiman dan industri. Sedangkan bagian hilir sungai merupakan daerah padat hunian dan industri, serta tempat pemancingan ikan untuk dikonsumsi. Selain itu air sungai bagian hilir digunakan sebagai sumber air baku untuk air minum oleh PDAM kota Semarang. Letak Kaligarang yang dikelilingi oleh pabrik/industri dan permukiman penduduk maka memungkinkan sungai tersebut untuk membuang limbah, baik limbah pabrik ataupun limbah rumah tangga, tak terkecuali limbah logam berat (Cd,Pb , Hg dan lain-lain).

A.1.2. Kondisi Perairan

Hasil penelitian di lapangan tentang pengukuran kualitas fisiko kimia air sungai Kaligarang dari hilir ke hulu berturut-turut tersaji pada tabel 3.

Tabel 3

Hasil Pengukuran Kualitas Fisikokimia Air Kaligarang

Parameter	Hasil Pengukuran								Baku Mutu Air Kelas I (PP No. 82/2001)	Baku Mutu Air Kelas III (PP No. 82/2001)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Suhu (°C)	27,7	27,8	27,7	28,0	28,0	28,0	27,8	28,0	Suhu Udara ± 3	Suhu Udara ± 3
pH	7,89	7,06	7,68	7,62	7,49	7,62	7,53	7,75	6 – 9	6 – 9
DO mg/L	7,48	5,02	7,12	5,66	5,15	5,29	7,02	4,91	6	3
Cd (mg/L)	0,03	0,014	0,005	0,003	0,004	0,006	0,015	0,018	0,01	0,01
Pb (mg/L)	0,019	0,012	0,018	0,023	0,015	0,010	0,012	0,024	0,03	0,03
Hg (mg/L)	0,0005	0,0006	0,0004	0,0006	0,0006	0,0006	0,0004	0,0005	0,001	0,002

Keterangan :

1. Air sungai menerima limbah dari daerah Semarang/daerah hulu
2. Air sungai menerima limbah industri baja “ Raja Besi” dan daerah hulu
3. Air sungai menerima limbah daerah Kaligarang atas/hulu-tengah
4. Air sungai menerima limbah Kreo dan Kaligarang atas/hulu-tengah
5. Air sungai tempat pembuangan limbah industri keramik/ubin dan Kimia Farma
6. Air sungai tempat pembuangan limbah ISTW (Industri Baja dan Seng)
7. Air Kaligarang yang digunakan sebagai sumber air baku air minum PDAM Tirto Moedal jalan Kelud Raya
8. Air sungai tempat pembuangan limbah industri: kayu lapis “Semarang Makmur”; tekstil “DamaiteX” dan “Panca Jaya “ dan industri obat “Phapros”

Kualitas fisikokimia air Kaligarang, yakni suhu, oksigen terlarut, pH, masih memenuhi syarat untuk budidaya ikan; berdasarkan Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. Namun demikian tidak layak untuk budidaya ikan maupun sebagai air baku air minum, karena dapat mengakibatkan terjadinya akumulasi Cd, Pb dan Hg pada ikan-ikan yang hidup di perairan tersebut maupun pada manusia yang memanfaatkan air tadi sebagai air minum. Hal ini disebabkan dalam jangka waktu lama ikan dapat mengakumulasi Cd, Pb dan Hg yang ada pada perairan tersebut. Demikian pula manusia yang minum air Kaligarang dalam jangka lama akan mengakumulasi Cd, Pb dan Hg sehingga memungkinkan tercapainya tingkat konsentrasi toksik, dan menimbulkan keracunan, bahkan mungkin kematian. Sifat *karsinogenik* Cd, Pb dan Hg yang masuk ke tubuh manusia bersama air minum berpotensi menimbulkan kanker pada manusia.

Suhu perairan Kaligarang bervariasi antara 26,0 – 27,5°C. Suhu sangat berperan dalam proses metabolisme tubuh ikan. Secara umum peningkatan suhu dapat menurunkan daya tahan tubuh ikan terhadap racun. Hal ini sesuai dengan pendapat dari Miller (2007) dan Argawala (2006) bahwa akumulasi Cd pada tubuh ikan selain dipengaruhi oleh faktor fisiologis ikan dan sifat fisika kimia logam berat tersebut, juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu perairan.

pH perairan Kaligarang antara 6 – 7 berarti air sungai tersebut derajat keasamannya normal. Klaassen (2001), Argawala (2006) dan Plaa (2007) mengatakan bahwa pada kondisi perairan yang bersifat asam, ion-ion logam berat dibebaskan ke dalam perairan terutama ion Cd^{++} , Pb^{++} dan Hg^{++} yang bersifat iritan dan toksik terhadap biota perairan termasuk ikan-ikan yang hidup di dalamnya. Sebaliknya jika pH meningkat sampai pH 8,5-11, dalam keadaan demikian yang bersifat toksik adalah Cd,

Pb dan Hg yang terlarut diperairan. Dengan demikian pada penelitian ini pH perairan Kaligarang tidak berpengaruh terhadap kehidupan ikan, namun sifat toksik Cd, Pb dan Hg di perairan sangat berpengaruh terhadap kehidupan ikan.

Alkalinitas di lokasi penelitian sebesar 300 mg/l; sedangkan nilai alkalinitas yang memenuhi syarat untuk budidaya ikan antara 250-300 mg/l (Sunu 2001, Argawala 2006). Nilai alkalinitas lebih besar dari 500 mg/l menunjukkan bahwa perairan memiliki produktivitas rendah, 200-500 mg/l perairan produktif, 50-200 mg/l produktivitas sedang, 10-50 mg/l perairan kurang produktif dan 0-10 mg/l tidak dapat dimanfaatkan (Supriharyono, 2009). Dengan demikian nilai alkalinitas pada lokasi penelitian masih memenuhi syarat untuk kehidupan ikan, sehingga munculnya biomarker semata-mata karena sifat toksisik dari Cd, Pb dan Hg.

Rapat kerja Menteri Negara KLH bekerjasama dengan departemen Dalam Negeri tanggal 14-15 Juni 1989 menetapkan Kaligarang sebagai salah satu sungai yang termasuk prioritas sasaran Program Kali Bersih (PROKASIH) di Propinsi Jawa tengah, disamping sungai Bengawan Solo. Dalam rangka pencegahan penurunan beban pencemaran limbah industri dan rumah tangga diperairan telah dirumuskan langkah tindak pencegahannya, sehingga melalui SK Gubernur KDH Tk. I Jawa Tengah No. 660.I/37/1989 tanggal 10 Agustus 1989, telah dibentuk tim Pelaksanaan Program Kali Bersih (PROKASIH) untuk Kaligarang, dan berdasarkan SK Gubernur No. 660.I/28/1990 Kaligarang diperuntukan sebagai sungai golongan B (air baku air minum) yang merupakan salah satu pendukung utama sumber air PDAM Semarang.

PROKASIH Kaligarang sejak 1989/1990 diikuti 10 industri, namun pada tahun 1991/1992 diikuti 9 industri dikarenakan satu industri pindah lokasi. Adapun kesembilan industri yang terkait program kali bersih di DAS Kaligarang dapat dilihat pada tabel

berikut ini. Tabel 4 menyajikan sembilan industri yang terkait dalam Program PROKASIH Kaligarang Semarang.

Tabel 4
Delapan Industri yang terkait dalam Program PROKASIH
Kaligarang Semarang

No	Nama Perusahaan	Jenis Produksi
2	PT. Raja Besi	Galvanis
3	PT. Alam Daya Sakti	Ubin
4	PT. ISTW	Galvanis
5	PT. Kimia Farma	Farmasi
6	PT. Semarang Makmur	Pelapisan
7	PT. Damaitex	Tekstil
8	PT. Sinar Panca Jaya	Tekstil
9	PT. Phapros	Farmasi

Sumber : *Badan Lingkungan Hidup Jawa Tengah, 2009*

Hasil penelitian di Kaligarang menunjukkan bagian hulu sungai mempunyai kesadahan 153 mg/l, bagian hilir sungai 106 mg/l. Di lingkungan perairan yang sadah logam berkurang toksisitasnya terhadap ikan, karena logam-logam bebas akan terikat dengan anion kalsium pada suatu kondisi kesadahannya. Argawala (2006) mengatakan bahwa komponen air sadah yang mengatur toksisitas Cd, Pb dan Hg adalah Calsium; sedangkan nilai kesadahan yang memenuhi syarat untuk kehidupan ikan berkisar antara 150 – 300 mg/l. Miller (2007) serta Laws (2000) mengemukakan bahwa efek racun Cd, Pb dan Hg berhubungan dengan tingkat kesadahan air. Peningkatan kesadahan dapat mengurangi toksisitas Cd, Pb dan Hg terhadap ikan, yang terlihat dengan menurunnya

mortalitas pada peningkatan kesadahan. Hal ini diduga karena adanya peranan kesadahan terhadap pengikatan dan pengendapan Cd.

Kecerahan air Kaligarang berkisar antara 12 - 25 cm. Kecerahan tertinggi diperoleh pada hulu dan terendah pada hilir. Kecerahan bagian hulu relatif tinggi karena pada bagian hulu belum terganggu, sehingga air masih bersih dengan dasar sungai berupa pasir dan kerikil. Pengambilan sampel pada penelitian ini dilakukan pada waktu bulan Mei dengan curah hujan relatif tinggi, sehingga tingginya kekeruhan pada bagian hilir yang mempunyai substrat dasar berupa lumpur dan pasir disebabkan adanya erosi dan masuknya partikel tanah dan bahan-bahan terlarut lainnya. Miller (2007) mengatakan bahwa kekeruhan di sungai tidak sama sepanjang tahun, air akan sangat keruh pada musim penghujan karena aliran maksimum tertinggi terjadi pada saat aliran air maksimal atau pada waktu musim penghujan. Selain berpengaruh terhadap kekeruhan curah hujan yang tinggi juga berpengaruh terhadap pengenceran Cd yang ada pada perairan sungai.

Dari hasil pengukuran kecepatan arus Kaligarang di dapat hasil kecepatan arus antara 1,5 – 5 m/det. Kecepatan arus di daerah Petompon relatif lambat dibandingkan dengan kecepatan arus daerah sebelumnya. Hal ini disebabkan karena perairan pada bagian hilir tersebut relatif landai dibandingkan dengan stasiun-stasiun sebelumnya. Oleh karena itu bagian hilir sangat memungkinkan untuk budidaya ikan menggunakan karamba jaring apung. Daerah Ungaran mempunyai ketinggian tempat 335 m dpl dengan kemiringan 14 – 41 % mempunyai perbedaan arus dengan daerah hilir yang mempunyai ketinggian 9 dpl dengan kemiringan 0 – 3% (BLH 2010). Menurut Witghott and Brennan (2007) kecepatan arus pada daerah dataran tinggi cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan dataran rendah.

Oksigen terlarut yang ada pada perairan Kaligarang berkisar antara 4,91 – 7,48 mg/L. kandungan O₂ terlarut dalam suatu perairan mempengaruhi daya tahan organisme akuatik terhadap pengaruh letal suatu kontaminan. Rendahnya Cd pada daerah hulu dikarenakan tingginya kecepatan aliran dan turbulensi sehingga akan meningkatkan oksigenase yang dapat menekan tingkat pencemaran yang terjadi. Oksigen terlarut dibutuhkan untuk melakukan purifikasi dengan cara mengoksidasi bahan organik.

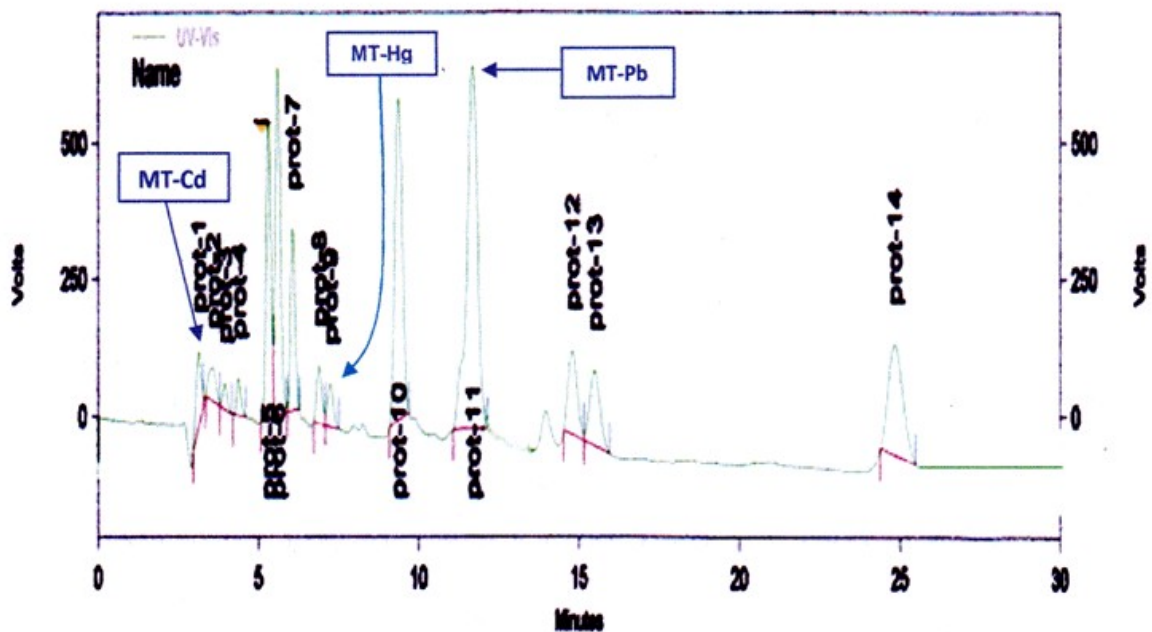
Kisaran nilai kualitas fisikokimia air Kaligarang yang diperoleh dalam pengukuran selama penelitian, yang tersaji pada tabel 4, apabila dibandingkan dengan nilai Baku Mutu parameter kualitas fisikokimia perairan untuk kehidupan ikan ternyata kualitas fisikokimia air uji pada umumnya masih berada dalam kisaran yang layak bagi kehidupan ikan menurut (Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air). Dengan demikian dalam penelitian ini kualitas air uji secara umum tidak mempengaruhi toksisitas, sehingga munculnya biomarker pada ikan semata-mata akibat sifat toksik Cd, Pb maupun Hg.

A.2. Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan merupakan salah satu tahapan untuk memperoleh capaian tujuan penelitian yang telah disebutkan terdahulu. Penelitian tersebut dilakukan untuk menguji ketepatan penggunaan alat, sensitifitas alat maupun ketepatan metode yang digunakan dalam penelitian (uji *repeatibility*/ulangan pengukuran dan *reproducibility*/ketepatan penggunaan metode). *Repeatibility* untuk menguji ketelitiannya (*accuracy*) dan *reproducibility* untuk melihat ketepatan (*precision*). Hal ini penting untuk menjaga validitas data penelitian sehingga hasil penelitian tidak bias.

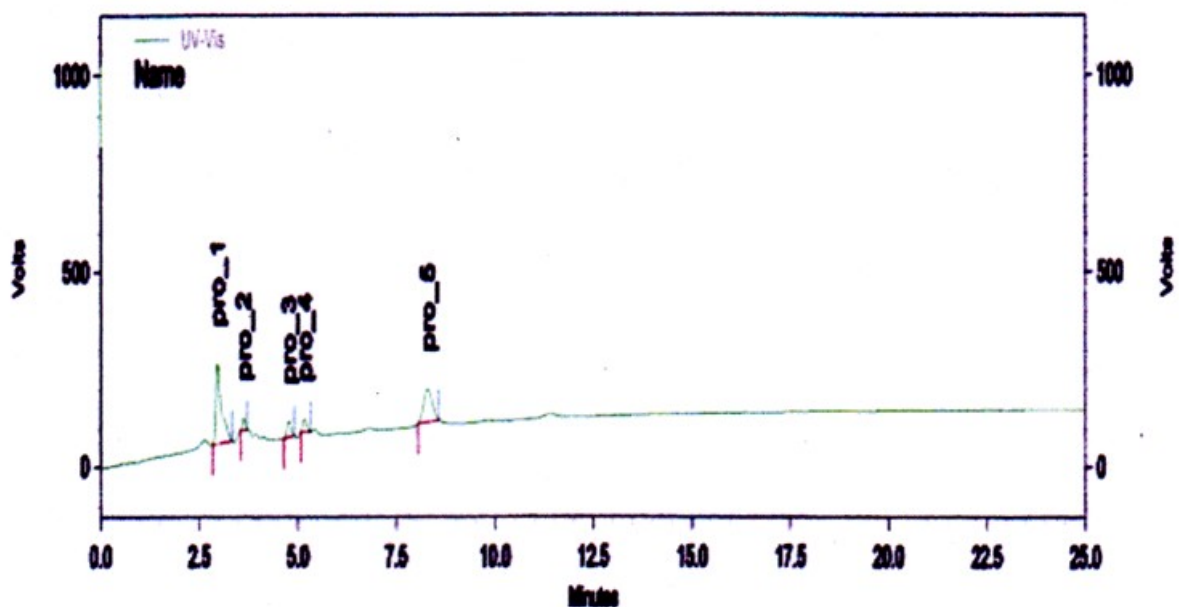
Pelaksanaan uji pendahuluan dilakukan melalui aplikasi lapangan, yaitu menggunakan ikan yang hidup bebas di Kaligarang hilir/segmen 6 dan dari kolam BBI Ungaran. Ikan dari Kaligarang maupun dari BBI Ungaran akan dianalisis menggunakan HPLC untuk melihat ketepatan penggunaan alat dan sensitifitasnya serta ketepatan penggunaan metode, apakah HPLC merupakan alat yang sensitif untuk menemukan biomarker pencemaran logam berat di Kaligarang yang kadarnya masih memenuhi Baku Mutu. Selain itu juga untuk melihat apakah metode yang digunakan dalam analisis HPLC ini sudah tepat untuk menemukan biomarker tersebut.

Hasil analisis HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) terhadap sampel hati ikan nila yang diambil dari sungai Kaligarang ditemukan adanya *metallothionein*; sebagaimana disajikan pada gambar 5 berikut ini.



Gambar 5. Hasil Analisis HPLC terhadap *metallothionein* pada hati ikan nila Kaligarang

Gambar 5 menunjukkan bahwa pada hati ikan nila yang sudah dipreparasi dengan isolasi *metallothionein*; pada analisis HPLC menunjukkan adanya *metallothionein*-Cd (MT-Cd), MT-Pb dan MT-Hg. Hal tersebut didasarkan pada nilai *Retention Time* (RT) larutan Cd standar, Pb standar maupun Hg standar dan RT larutan sampel hasil analisis HPLC. Apabila RT larutan sampel nilainya berada pada interval RT larutan standar, maka sampel tersebut mengandung *metallothionein* (MT). Hasil analisis HPLC menunjukkan bahwa RT larutan Cd standar (3,1–3,152) menit sedang RT sampel sebesar 3,143 menit. Nilai RT sampel 3,143 menit berada pada interval nilai RT Cd standar (3,1–3,152) menit, dengan demikian hati ikan nila yang berasal dari Kaligarang mengandung MT-Cd. Adapun sampel yang diambil BBI Ungaran RT sampel tidak ada yang memenuhi interval RT larutan Cd standar, Pb standard an Hg standar; dengan demikian hati ikan nila dari BBI Ungaran tidak mengandung MT-Cd (Gambar 6).



Gambar 6. Hasil Analisis HPLC *Metallothionein* Pada Hati Ikan Nila Dari Balai Benih Ikan Ungaran

Adapun *Retention Time* (RT) larutan Pb standar sebesar (11,233-11,490) menit sedangkan larutan sampel sebesar 11,412 menit. *Retention Time* (RT) larutan Hg standar sebesar (7,217-7,693) menit dan RT larutan sampel sebesar 7,431 menit. Dengan demikian berarti sampel hati ikan yang berasal dari Kaligarang muncul MT-Pb dan MT-Hg (gambar 5). Hal ini berbeda dengan sampel ikan yang berasal dari BBI Ungaran; nilai RT sampel tidak ada yang memenuhi interval nilai RT Pb standar dan Hg standar, sehingga sampel hati ikan dari BBI tidak muncul MT-Pb maupun MT-Hg (gambar 6). Dengan demikian munculnya *metallothionein* pada hati ikan dapat digunakan sebagai penanda biologis (biomarker) pencemaran Cd, Pb maupun Hg di perairan yang konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg masih memenuhi Baku Mutu air kelas I yakni air yang digunakan sebagai sumber air baku air minum, sesuai Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 82 Tahun 2001 tentang pengelolaan kualitas air dan pengendalian pencemaran air. Biomarker *metallothionein* hanya muncul pada perairan yang terpajan logam berat (Cd, Pb dan Hg).

Hasil analisis Flame AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*), air sungai Kaligarang hilir tempat lokasi penelitian mengandung Cd, Pb dan Hg masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L sedangkan air dari Balai Benih Ikan kadar Cd, Pb dan Hg di air kolam masing-masing sebesar 0 mg/L.

A.3. Hasil Penelitian Biomarker Pencemaran Logam Berat

Menggunakan KJA

Penelitian biomarker pencemaran logam berat menggunakan KJA yang dilakukan dalam penelitian disertasi ini adalah merupakan penelitian tahap lanjut setelah dilakukan penelitian pendahuluan. Adapun hasil penelitiannya adalah sebagai berikut :

A.3.1. Akumulasi Logam berat di Hati dan Munculnya Biomarker

Metallothionein

Data yang diperoleh selama perlakuan menggunakan Karamba Jaring Apung (KJA) di Kaligarang, berdasarkan analisis HPLC menunjukkan bahwa biomarker *Metallothionein-Cd*, *Metallothionein-Pb* dan *Metallothionein-Hg* muncul pada ikan mas dan ikan nila pada minggu ke-6. Pada kelompok kontrol, baik ikan nila maupun mas tidak muncul *metallothionein* Cd (MT-Cd), MT-Pb, maupun MT-Hg. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata nilai akumulasi Cd pada hati ikan nila yang menginduksi munculnya *metallothionein-Cd* (MT-Cd) adalah sebesar $(0,000407 \pm 0,000028)$ mg/kg. Sedangkan pada ikan mas rerata nilai akumulasi Cd adalah sebesar $(0,000307 \pm 0,000038)$ mg/kg. Besarnya akumulasi logam Cd pada hati ikan mas dan ikan nila di perairan yang terpajan logam berat disajikan pada tabel 5.

Tabel 5
Akumulasi Logam Berat Cd pada Hati Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis ikan	Ulangan	Kadar (mg/kg)	Mean (mg/kg)	SD (mg/kg)
Ikan nila	1	0,004010	0,000407	0,000028
	2	0,002516		
	3	0,002649		
	4	0,002122		
	5	0,009051		
Ikan mas	1	0,000990	0,000307	0,000038
	2	0,000157		
	3	0,000092		
	4	0,000162		
	5	0,000136		

Rerata nilai akumulasi logam Pb pada hati ikan nila yang menginduksi munculnya *metallothionein-Pb* (MT-Pb) adalah sebesar $(0,000812 \pm 0,000092)$ mg/kg. Sedangkan pada hati ikan mas rerata nilai akumulasi Pb adalah sebesar $(0,000269 \pm 0,000026)$ mg/kg. Besarnya akumulasi logam Pb pada hati ikan mas dan ikan nila di perairan yang terpajan logam berat disajikan pada tabel 6.

Tabel 6

Akumulasi Logam Berat Pb pada Hati Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis ikan	Ulangan	Nilai (mg/kg)	Mean (mg/kg)	SD (mg/kg)
Ikan nila	1	0,000016	0,000812	0,000092
	2	0,002250		
	3	0,001060		
	4	0,000712		
	5	0,000024		
Ikan mas	1	0,000724	0,000269	0,000026
	2	0,000282		
	3	0,000089		
	4	0,000102		
	5	0,000146		

Rerata nilai akumulasi logam Hg pada hati ikan nila yang menginduksi munculnya *metallothionein-Hg* (MT-Hg) adalah sebesar $(0,000575 \pm 0,000021)$ mg/kg. Sedangkan pada hati ikan mas rerata nilai akumulasi Hg adalah sebesar $(0,000349 \pm 0,000030)$ mg/kg. Besarnya akumulasi logam Hg pada hati ikan mas dan ikan nila di perairan yang terpajan logam berat disajikan pada tabel 7.

Tabel 7

Akumulasi Logam Berat Hg pada Hati Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis ikan	Ulangan	Nilai (mg/kg)	Mean (mg/kg)	SD (mg/kg)
Ikan nila	1	0,000362	0,000575	0,000021
	2	0,000432		
	3	0,000626		
	4	0,000920		
	5	0,000538		
Ikan mas	1	0,000894	0,000349	0,000030
	2	0,000231		
	3	0,000252		
	4	0,000229		
	5	0,000139		

MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg muncul pada ikan mas dan ikan nila yang hidup di perairan yang tercemar logam berat Cd, Pb dan Hg. Sedangkan ikan yang hidup di perairan tidak tercemar logam berat Cd, Pb dan Hg tidak muncul MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg. Hal ini diperkuat dengan analisis Flame AAS, bahwa pada lokasi kontrol kadar Cd 0 mg/L, kadar Pb 0 mg/L dan kadar Hg 0 mg/L. Sedangkan pada lokasi perlakuan kadar Cd $(0,006 \pm 0,001)$ mg/L, Pb $(0,010 \pm 0,005)$ mg/L, dan kadar Hg $(0,0006 \pm 0,0001)$ mg/L.

Berdasarkan hasil penelitian terhadap ikan mas dan ikan nila dengan perlakuan Jaring Apung di sungai Kaligarang yang tercemar logam berat kadmium, timbal dan merkuri setelah 6 minggu perlakuan, maka setelah dilakukan analisis menggunakan HPLC pada akumulasi Cd, Pb dan Hg di hati ikan mas dan ikan nila muncul biomarker *metallothionein Cd*, *metallothionein Pb* dan *metallothionein Hg*. Sedangkan pada ikan mas dan ikan nila yang hidup di perairan tanpa pajanan logam berat (Balai Benih Ikan) tidak ditemukan *metallothionein*. Hasil analisis uji Normalitas akumulasi pada ikan mas dan ikan nila yang terpajan kadmium, timbal dan merkuri disajikan pada tabel 8. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 8
Hasil Uji Normalitas Data Akumulasi Logam Berat
pada Ikan Mas dan Ikan Nila

Variabel	Kolmogorov-Smirnov Signifikansi/Kemaknaan (p)
Cd ikan mas	0,268
Pb ikan mas	0,828
Hg ikan mas	0,330
Cd ikan nila	0,729
Pb ikan nila	0,985
Hg ikan nila	0,982

Data konsentrasi Cd, Pb dan Hg ikan mas dan nila masing-masing berdistribusi normal, $p > 0,05$

Hasil yang diperoleh dari data konsentrasi kadmium, timbal dan merkuri pada hati ikan mas dan ikan nila menunjukkan bahwa semua variabel berdistribusi normal nilai kemaknaan/signifikansi ($p > 0,05$). Sehingga selanjutnya digunakan analisis parametrik *One Sample T-Test*.

Uji statistik *One Sample T-Test* dilakukan untuk pengujian perbedaan data akumulasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan mas dan ikan nila. Hasil pengujian data penelitian menggunakan uji *One sample T-Test* disajikan pada tabel 9.

Tabel 9
Hasil Uji One Sample T-Test Data Variabel Penelitian

Variabel	Signifikansi/Kemaknaan (p)
Cd ikan mas	0,147
Pb ikan mas	0,087
Hg ikan mas	0,064
Cd ikan nila	0,034*
Pb ikan nila	0,120
Hg ikan nila	0,004*

* Terdapat perbedaan yang signifikan, $p < 0,05$

Uji *One Sample T-Test* nilai akumulasi Cd pada hati ikan mas menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,147$ ($p > 0,05$), sedangkan pada ikan nila nilai signifikansi sebesar $p = 0,034$ ($p < 0,05$). Uji *One sample T-Test* nilai akumulasi Pb pada hati ikan mas menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,087$ ($p > 0,05$) yang ternyata lebih besar dari 0,05. Demikian pula berdasarkan uji *One sampel T-Test* nilai akumulasi Pb pada hati ikan nila menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,120$ ($p > 0,05$). Sedangkan uji *One sample T-Test* nilai akumulasi Hg pada hati ikan mas menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,064$ ($p > 0,05$). Adapun uji *One sampel T-Test* nilai akumulasi Hg pada hati ikan nila menghasilkan nilai signifikansi sebesar $p = 0,004$ ($p < 0,05$). Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 6.

Hasil uji normalitas untuk parameter logam berat menunjukkan bahwa nilai signifikansinya adalah sebesar 0,009 (Lampiran 6). Jika dilihat dari nilai signifikansi yang lebih kecil dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa uji normalitas parameter logam berat berdistribusi tidak normal (Sig 0,009). Dengan demikian maka uji beda dilakukan dengan menggunakan statistik non parametrik yaitu Uji *Kruskal Wallis*. Hasil uji *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,213. Jika dilihat dari nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa uji beda parameter logam berat (Cd, Pb dan Hg) tidak berbeda nyata; masing-masing logam berat dapat menyebabkan munculnya biomarker *metallothionein*.

Analisis Probit digunakan untuk mengetahui nilai terendah konsentrasi kadmium, timbal dan merkuri yang telah memunculkan adanya *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Berdasarkan analisis Probit menunjukkan bahwa pada konsentrasi kadmium sebesar 0,00018 mg/kg pada ikan mas dan 0,00023 mg/kg pada ikan nila telah muncul MT-Cd. Demikian pula analisis Probit untuk menunjukkan konsentrasi terendah timbal yang memunculkan adanya MT-Pb. Pada konsentrasi terendah 0,00025 mg/kg pada ikan mas dan 0,00028 mg/kg pada ikan nila telah muncul MT-Pb. Munculnya MT-Hg pada konsentrasi Hg terendah sebesar 0,00090 mg/kg pada ikan mas dan 0,00102 mg/kg pada ikan nila. (Lampiran 11).

A.3.2 Nilai Bioconcentration Factor (BCF)

Besarnya kemampuan untuk mengakumulasi logam berat di lingkungan perairan yang terpajan oleh logam berat diekspresikan secara numerik menggunakan *bioconcentration factor* (BCF), yang dapat diukur secara laboratoris, dan dianggap sebagai parameter kuantitatif untuk mengindikasikan resiko potensial ekotoksikologi zat tersebut (Van der Oost, Beyer dan Vermeulan 2003). Nilai BCF dihitung berdasarkan

perbandingan antara besarnya konsentrasi logam berat yang terakumulasi dalam jaringan dengan besarnya konsentrasi logam berat di perairan. Rerata nilai BCF logam berat Cd pada ikan nila adalah sebesar 0,678267 L/kg. Sedangkan pada ikan mas adalah sebesar 0,051233 L/kg. Besarnya *bioconcentration factor* (BCF) logam berat Cd pada ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 10.

Tabel 10

Nilai *Bioconcentration Factor* (BCF) Logam Berat Cd

Jenis ikan	Ulangan	Nilai (L/kg)	Mean (L/kg)	SD (L/kg)
Ikan nila	1	0,668333	0,678267	0,047902
	2	0,419333		
	3	0,441500		
	4	0,353667		
	5	1,508500		
Ikan mas	1	0,165000	0,051233	0,006376
	2	0,026167		
	3	0,015333		
	4	0,027000		
	5	0,022667		

Besarnya *bioconcentration factor* (BCF) logam berat Pb pada ikan nila adalah sebesar 0,081211 L/kg dan ikan mas adalah sebesar 0,026880 L/kg. Nilai *bioconcentration factor* (BCF) logam berat Pb pada ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 11 halaman berikut ini.

Tabel 11
Nilai *Bioconcentration Factor* (BCF) Logam Berat Pb

Jenis ikan	Ulangan	Nilai (L/kg)	Mean (L/kg)	SD (L/kg)
Ikan nila	1	0,001597	0,081211	0,003211
	2	0,224965		
	3	0,105989		
	4	0,071152		
	5	0,002350		
Ikan mas	1	0,072444	0,026880	0,002659
	2	0,028224		
	3	0,008923		
	4	0,010179		
	5	0,014631		

Besarnya *bioconcentration factor* (BCF) logam berat Hg pada ikan nila adalah sebesar 0,959096 L/kg dan ikan mas sebesar 0,581857 L/kg. Nilai *bioconcentration factor* (BCF) logam berat Hg pada ikan nila dan ikan mas disajikan pada tabel 12.

Tabel 12
Nilai *Bioconcentration Factor* (BCF) Logam Berat Hg

Jenis ikan	Ulangan	Nilai (L/kg)	Mean (L/kg)	SD (L/kg)
Ikan nila	1	0,602802	0,959096	0,036246
	2	0,719383		
	3	1,043427		
	4	1,533598		
	5	0,896270		
Ikan mas	1	1,489995	0,581857	0,051281
	2	0,385432		
	3	0,419942		
	4	0,382067		
	5	0,231852		

Analisis statistik BCF digunakan untuk mengetahui nilai kemampuan absorpsi jaringan terhadap pajanan logam berat. Dalam hal ini, untuk mengetahui nilai *Bioconcentration Factor* (BCF) akumulasi logam kadmium, timbal dan merkuri akibat pajanan logam berat di hati terhadap munculnya *metallothionein*. Berdasarkan analisis statistik BCF logam kadmium, menunjukkan bahwa munculnya MT-Cd pada ikan nila adalah sebesar 0,678267 L/kg, sedangkan pada ikan mas adalah sebesar 0,051233 L/kg. Demikian pula analisis statistik untuk menunjukkan kemampuan menjerap logam timbal. Nilai BCF timbal yang memunculkan adanya MT-Pb pada ikan nila sebesar 0,081211 L/kg, sedangkan pada ikan mas sebesar 0,026880 L/kg. Adapun nilai BCF Hg yang memunculkan MT-Hg pada ikan nila sebesar 0,959096 L/kg dan pada ikan mas sebesar 0,581857 L/kg. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 8 dan ringkasan hasil analisis statistik tersaji pada tabel 13.

Tabel 13

Nilai BCF Cd, Pb dan Hg pada Ikan Mas dan Nila

Variabel	Nilai BCF (L/kg)	SD
Cd Nila	0,678267	0,047902
Cd Mas	0,051233	0,006376
Pb Nila	0,081211	0,003211
Pb Mas	0,026880	0,002659
Hg Nila	0,959096	0,036246
Hg Mas	0,581857	0,051281

A.3.3 Biomarker *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD)

Rerata nilai aktivitas EROD pada ikan nila kelompok perlakuan (ikan yang hidup di perairan Kaligarang, dengan pajanan logam berat Cd, Pb dan Hg) adalah sebesar $(0,494 \pm 0,041)$ pmol/min/mg protein. Sedangkan rerata nilai aktivitas EROD kelompok kontrol (Ikan yang dipelihara di Balai Benih Ikan/tidak terpajan logam berat) adalah sebesar $(2,075 \pm 0,471)$ pmol/min/mg protein. Rerata nilai aktivitas EROD pada ikan mas kelompok perlakuan sebesar $(0,497 \pm 0,023)$ pmol/min/mg protein dan kelompok kontrol sebesar $(1,774 \pm 0,226)$ pmol/min/mg protein. Besarnya aktivitas EROD pada ikan nila dan ikan mas baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan disajikan pada tabel 14.

Tabel 14
Aktivitas EROD pada Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis ikan	Ikan ke-	Kontrol (pmol/min/mg protein)				Perlakuan (pmol/min/mg protein)			
		Ulangan		Rerata	Standar Deviasi	Ulangan		Rerata	Standar Deviasi
		1	2			1	2		
Nila	1	1,887	1,891	2,075	0,471	0,369	0,266	0,494	0,041
	2	1,795	1,745			0,256	0,226		
	3	1,787	1,695			0,193	0,225		
	4	2,100	1,973			0,913	0,821		
	5	2,949	2,936			0,372	0,306		
Mas	1	1,498	1,473	1,774	0,226	0,393	0,919	0,497	0,023
	2	1,712	1,628			0,432	0,263		
	3	2,211	2,035			0,334	0,942		
	4	1,753	1,769			0,336	0,455		
	5	1,834	1,827			0,438	0,458		

Ethoxyresorufin-0-diethylase (EROD) adalah enzim yang digunakan sebagai indikator yang sensitif terhadap adanya paparan senyawa organik antropogenik seperti Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAHs dan PAH) dan senyawa lainnya dengan struktur konfigurasi planar halogen. Hasil uji normalitas aktivitas EROD ikan nila dan ikan mas yang diperlakukan pada Jaring Apung di perairan Kaligarang yang tercemar logam berat dan ikan yang berasal dari Balai benih Ikan (kontrol) disajikan pada tabel 15. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 15

Hasil Uji Normalitas Data Variabel Penelitian Aktivitas EROD

Variabel	Kolmogorov-Smirnov Kemaknaan (p)
Ikan mas	0,026
Ikan nila	0,105

Data Aktivitas EROD pada ikan mas berdistribusi tidak normal $p < 0,05$

Data Aktivitas EROD pada ikan nila berdistribusi normal $p > 0,05$

Hasil yang diperoleh dari data biomarker EROD pada hati ikan mas berdistribusi tidak normal ($p < 0,05$). Sehingga untuk mengetahui perbedaan rerata aktivitas EROD pada ikan mas kelompok kontrol dan kelompok perlakuan digunakan analisis non parametrik uji *Mann Whitney*. Sedangkan data aktivitas EROD pada ikan nila berdistribusi normal ($p > 0,05$). Sehingga selanjutnya akan digunakan analisis parametrik *One sample T-Test*.

Berdasarkan hasil uji normalitas data, maka data EROD ikan mas berdistribusi tidak normal. Sehingga digunakan uji *Mann Whitney* untuk melihat perbedaan nilai EROD antara kelompok kontrol dan perlakuan pada ikan mas. Sedangkan pada ikan nila hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data EROD ikan nila berdistribusi normal,

sehingga digunakan uji *T-Test* untuk menentukan perbedaan nilai EROD ikan nila antara kontrol dan perlakuan. Perbedaan nilai EROD ikan mas antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan disajikan pada tabel 16. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 16

Uji Mann Whitney Aktivitas EROD pada Ikan Mas

Variabel	Kontrol (pmol/min/mg protein)	Perlakuan (pmol/min/mg protein)	Sig
Ikan Mas			0,000*
Mean rank	30,50	10,50	
Sum of Rank	610	210	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Berdasarkan uji Mann Whitney menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai aktivitas EROD antara kelompok kontrol dan perlakuan pada ikan mas. Mean rank kelompok perlakuan lebih kecil daripada kelompok perlakuan, dengan demikian adanya pajanan logam berat menyebabkan nilai EROD menurun. Adapun perbedaan nilai aktivitas EROD ikan nila antara kelompok kontrol dan perlakuan disajikan pada tabel 17.

Tabel 17

Uji T-Tes Aktivitas EROD pada Ikan Nila

Variabel	Kontrol (pmol/min/mg protein)	Perlakuan (pmol/min/mg protein)	Sig
Ikan Nila			0,000*
Rerata	2,075	0,494	
SD	0,471	0,041	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Berdasarkan uji *T-Test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nilai aktivitas EROD antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada ikan nila. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pajanan logam berat pada kelompok perlakuan berpengaruh terhadap nilai aktivitas EROD pada ikan nila. Aktivitas EROD menurun pada kelompok perlakuan. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan aktivitas EROD antara ikan mas dan ikan nila digunakan uji *Mann Whitney* yang disajikan pada tabel 18. Perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 9.

Tabel 18

Uji Mann Whitney Aktivitas EROD antara Ikan Mas dan Ikan Nila

Variabel	EROD Ikan Mas ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	EROD Ikan Nila ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Sig
Jenis Ikan			0,149
Mean rank	23,18	17,83	
Sum of Rank	463,50	356,50	

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan $p > 0,05$

Berdasarkan uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa nilai signifikansi sebesar 0,149 ($p > 0,05$) maka tidak terdapat perbedaan yang bermakna nilai aktivitas EROD ikan mas dan ikan nila. Namun demikian mean rank ikan nila lebih kecil daripada ikan mas. Dengan demikian ikan nila dan ikan mas mempunyai sensitifitas yang sama terhadap nilai aktivitas EROD.

A.3.4 Biomarker *Liver Somatic Index (LSI)*

Liver Somatic Index (LSI) adalah perbandingan antara berat hati dengan berat tubuh ikan dikalikan 100 (seratus). Besarnya *Liver Somatic Index (LSI)* pada ikan

nila kelompok perlakuan sebesar $(2,244 \pm 0,348)$ dan kelompok kontrol sebesar $(2,612 \pm 0,451)$.

Sedangkan besarnya LSI pada ikan mas kelompok perlakuan adalah sebesar $(1,930 \pm 0,186)$ dan kelompok kontrol sebesar $(2,756 \pm 0,230)$. Data nilai LSI ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 19. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 19

Nilai *Liver Somatic Index* (LSI) pada Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis	Ulangan	Nilai	Mean	SD		
		Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	
Ikan Nila	1	2,00	1,75	2,612	2,244	0,451
	2	2,26	2,00			
	3	2,90	2,47			
	4	2,90	2,50			
	5	3,00	2,50			
Ikan Mas	1	2,58	1,74	2,756	1,930	0,230
	2	2,61	1,74			
	3	2,92	2,17			
	4	2,59	2,00			
	5	3,08	2,00			

Hasil uji normalitas data LSI disajikan pada tabel 20, sedangkan hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 20

Hasil Uji Normalitas LSI

Variabel	Kolmogorov-Smirnov Kemaknaan (p)
Ikan mas	0,863
Ikan nila	0,947

Data LSI pada ikan mas berdistribusi normal $p > 0,05$

Data LSI pada ikan nila berdistribusi normal $p > 0,05$

Jika di lihat dari nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa data LSI ikan nila dan ikan mas berdistribusi normal. Hal ini menandakan bahwa untuk uji beda nilai LSI dilakukan dengan menggunakan statistik parametrik yaitu *Independent T-Test*.

Berdasarkan hasil uji normalitas data, maka data LSI ikan mas dan ikan nila berdistribusi normal. Sehingga untuk melihat perbedaan nilai LSI antara ikan mas dan ikan nila digunakan uji *independent T-Test*. Besarnya nilai LSI Kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan nila disajikan pada tabel 21. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 21

Uji Independent *T-Test* nilai LSI Ikan Nila

Kelompok	Mean	SD	Sig
Kontrol	2,612	0,451	0,187
Perlakuan	2,244	0,348	

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan $p > 0,05$

Hasil uji beda besarnya nilai LSI kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan nila menunjukkan bahwa nilai signifikansi adalah sebesar 0,187 ($p > 0,05$), maka tidak terdapat perbedaan signifikan besarnya nilai LSI ikan nila kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Meskipun nilai rerata LSI kelompok perlakuan lebih rendah dari pada LSI kelompok kontrol.

Hasil uji *independent T-Test* LSI kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan mas disajikan pada tabel 22. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 22
Uji Independent *T-Test* nilai LSI Ikan Mas

Kelompok	Mean	SD	Sig
Kontrol	2,756	0,230	0,000*
Perlakuan	1,930	0,186	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Hasil uji beda besarnya nilai LSI kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan mas menunjukkan bahwa nilai signifikansi adalah sebesar 0,000 ($p < 0,01$), maka terdapat perbedaan nyata besarnya nilai LSI ikan mas kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Meskipun nilai rerata LSI kelompok perlakuan lebih rendah dari pada LSI kelompok kontrol.

Hasil uji beda nilai LSI ikan nila dan ikan mas menunjukkan bahwa nilai signifikansi adalah sebesar 0,001 ($p < 0,01$) maka terdapat perbedaan nyata besarnya nilai LSI ikan mas dan ikan nila. Meskipun rerata nilai LSI ikan mas lebih rendah daripada ikan nila. Hal ini mengandung arti bahwa penurunan nilai LSI pada Ikan mas lebih tinggi dibandingkan dengan ikan nila. Uji *Independent T-Test* besarnya nilai LSI pada ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 23. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 23
Uji Independent *T-Test* nilai LSI ikan Mas dan Ikan Nila

Variabel	Mean	SD	Sig
Ikan Mas	0,370	0,111	0,001*

Ikan Nila	0,824	0,180
-----------	-------	-------

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

A.3.5 Biomarker *Gonade Somatic Index* (GSI)

Gonade Somatic Index (GSI) adalah perbandingan antara berat gonade dengan berat tubuh ikan dikalikan 100 (seratus). Besarnya *Gonade Somatic Index* (GSI) ikan nila pada kelompok kontrol adalah ($0,230 \pm 0,028$) dan kelompok perlakuan sebesar ($0,136 \pm 0,026$). Sedangkan besarnya GSI ikan mas pada kelompok kontrol adalah sebesar ($0,268 \pm 0,051$) dan pada kelompok perlakuan sebesar ($0,160 \pm 0,039$). Data nilai GSI ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 24. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 24

Nilai *Gonade Somatic Index* (GSI) pada Ikan Nila dan Ikan Mas

Jenis	Ulangan	Nilai		SD		
		Kontrol	Perlakuan	Kontrol	Perlakuan	
Ikan Nila	1	0,23	0,15	0,230	0,136	0,028
	2	0,23	0,13			
	3	0,23	0,13			
	4	0,19	0,10			
	5	0,27	0,17			
Ikan Mas	1	0,33	0,22	0,268	0,160	0,051
	2	0,26	0,13			
	3	0,29	0,17			
	4	0,19	0,12			

5	0,27	0,16
---	------	------

Hasil uji normalitas data GSI disajikan pada tabel 25. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 11.

Tabel 25

Hasil Uji Normalitas GSI

Variabel	Kolmogorov-Smirnov Kemaknaan (p)
Ikan mas	0,989
Ikan nila	0,817

Data GSI pada ikan mas dan nila berdistribusi normal $p > 0,05$

Jika dilihat dari nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa GSI ikan nila dan ikan mas berdistribusi normal. Oleh karena itu maka uji beda nilai GSI dilakukan dengan menggunakan statistik parametrik yaitu *Independent T-Test*.

Berdasarkan hasil uji normalitas data, maka data GSI ikan mas dan ikan nila berdistribusi normal. Sehingga untuk melihat perbedaan nilai GSI antara ikan mas dan ikan nila digunakan uji *Independent T-Test*. Hasil uji *Independent T-Test* GSI kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan nila disajikan pada tabel 26. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 26

Uji Independent T-Test nilai GSI Ikan Nila

Kelompok	Mean	SD	Sig
Kontrol	0,230	0,028	0,001*
Perlakuan	0,136	0,026	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Hasil uji beda nilai GSI ikan nila antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan bahwa nilai signifikansi adalah sebesar 0,001 ($p < 0,01$) maka nilai GSI ikan nila pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan berbeda signifikan. Adapun rerata nilai GSI ikan nila pada kelompok perlakuan lebih rendah dari nilai GSI kelompok kontrol.

Sedangkan hasil uji beda nilai GSI ikan mas antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,006 ($p < 0,01$) maka terdapat perbedaan nyata besarnya nilai GSI ikan mas pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Meskipun rerata nilai GSI ikan mas pada kelompok perlakuan lebih rendah dari GSI kelompok kontrol. Hasil uji *Independent T-Test* besarnya nilai GSI kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada ikan mas disajikan pada tabel 27. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 27

Uji *Independent T-Test* nilai GSI Ikan Mas

Kelompok	Mean	SD	Sig
Kontrol	0,268	0,051	0,006*
Perlakuan	0,160	0,039	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Berdasarkan hasil uji normalitas data, maka data GSI ikan mas dan ikan nila berdistribusi normal. Sehingga untuk melihat perbedaan besarnya nilai GSI antara ikan mas dan ikan nila digunakan uji *Independent T-Test*. Hasil uji *Independent T-Test* nilai GSI antara ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 28 halaman berikut ini. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 10.

Tabel 28

Uji *Independent T-Test* nilai GSI Ikan Mas dan Ikan Nila

Variabel	Mean	SD	Sig
Ikan Mas	0,092	0,008	0,145
Ikan Nila	0,110	0,024	

Tidak terdapat perbedaan yang sangat signifikan, $p > 0,01$

Hasil uji beda nilai GSI ikan nila dan ikan mas menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,145 ($p > 0,05$) maka tidak ada perbedaan nyata antara GSI ikan mas dengan ikan nila. Namun demikian nilai rerata GSI Ikan mas lebih rendah dari pada GSI Ikan nila,

A.3.6 Akumulasi Cd, Pb dan Hg pada Hati Ikan dan Metallothionein

Ikan yang Sensitif sebagai Biomarker

Uji signifikansi perbedaan akumulasi logam berat pada hati ikan antara ikan mas dan ikan nila menggunakan uji *Mann-Whitney Test*. Hasil pengujian data penelitian perbedaan akumulasi logam berat pada hati ikan mas dan ikan nila disajikan pada tabel 29. Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel 29

Uji signifikansi *Mann-Whitney Test*

Variabel	Rerata (mg/kg)	SD (mg/kg)	Sig
Ikan Mas	0,000308	0,000030	0,006*
Ikan Nila	0,001819	0,000231	

* Terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p < 0,01$

Berdasarkan uji signifikansi data penelitian diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara akumulasi logam berat pada hati ikan mas dan ikan nila. Rerata akumulasi logam berat pada ikan mas lebih kecil dari pada ikan nila. Analisis regresi Probit digunakan untuk menentukan *metallothionein* ikan yang sensitif sebagai biomarker pencemaran logam berat di air sungai Kaligarang yang kadarnya masih memenuhi nilai Baku Mutu. Ikan mas dengan konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg di hati masing-masing sebesar 0,00018 mg/kg, 0,00025 mg/kg dan 0,00090 mg/kg sudah memunculkan biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Sedangkan ikan nila pada konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg di hati masing-masing sebesar 0,00023 mg/kg, 0,00028 mg/kg dan 0,00102 mg/kg sudah memunculkan biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Adapun hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada lampiran 11.

A.4. Pembuktian Hipotesis

Pembuktian hipotesis dari masing-masing variabel penelitian diuraikan sebagai berikut :

A.4.1. Akumulasi Cd, Pb dan Hg pada Hati Ikan yang memunculkan biomarker (MT, EROD, LSI dan GSI).

Pajanan logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan berpengaruh terhadap konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan mas dan ikan nila. Adanya akumulasi Cd, Pb dan Hg di hati akan menginduksi sintesis *metallothionein*. Oleh karena itu setelah dilakukan analisis menggunakan HPLC pada akumulasi Cd, Pb dan Hg di hati ikan mas dan ikan nila muncul biomarker *metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg*. Sedangkan pada ikan mas dan ikan nila yang hidup di perairan yang tidak terpajan logam berat (BBI) tidak ditemukan *metallothionein*.

Nilai aktivitas EROD menurun apabila ada pajanan logam berat. Nilai aktivitas EROD kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol, baik pada ikan mas maupun ikan nila, dengan perbedaan yang signifikan baik pada ikan mas maupun nila ($p = 0,000$; $p < 0,01$). Dengan demikian aktivitas EROD dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat. Namun aktivitas EROD tidak dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat secara spesifik, aktivitas EROD hanya dapat digunakan sebagai biomarker logam berat secara umum; tidak dapat sebagai penanda pencemaran Cd, Pb, Hg secara sendiri-sendiri.

LSI dan GSI dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat secara umum; adanya pajanan logam berat mengakibatkan nilai LSI dan GSI pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol dengan perbedaan yang signifikan (LSI mas, $p = 0,000$; $p < 0,01$ dan GSI nila $p = 0,001$; $p < 0,01$; GSI mas $p = 0,006$; $p < 0,01$) kecuali pada LSI ikan nila tidak signifikan ($p = 0,187$; $p > 0,05$) Namun LSI dan GSI sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor non polutan seperti penyakit, musim, dan tingkat nutrisi maka LSI dan GSI tidak dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat karena banyak variabel perancunya dan tidak dapat digunakan sebagai biomarker logam berat secara spesifik. Dengan demikian *metallothionein* merupakan penanda biologis yang paling sesuai sebagai alat monitoring pencemaran

logam berat di perairan, karena bersifat sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*; maka hipotesis nomor 1 terbukti.

A.4.2. Akumulasi logam berat Cd, Pb dan Hg pada hati ikan terhadap sintesis *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg)

Berdasarkan uji regresi Probit, nilai konsentrasi terendah Cd yang dapat menginduksi munculnya MT-Cd pertama kali pada ikan mas dan nila masing-masing sebesar 0,00018 mg/kg dan 0,00023 mg/kg; nilai konsentrasi terendah Pb yang menginduksi munculnya MT-Pb pertama kali pada ikan mas dan nila masing-masing sebesar 0,00025 mg/kg dan 0,00028 mg/kg; sedangkan nilai konsentrasi terendah Hg yang menginduksi munculnya MT-Hg pertama kali adalah sebesar 0,00090 mg/kg pada ikan mas dan 0,00102 mg/kg pada ikan nila. Berdasarkan nilai rerata terlihat bahwa MT-Cd muncul pada konsentrasi Cd yang lebih rendah dari konsentrasi Pb dan Hg. Dengan kata lain Cd lebih cepat menginduksi terbentuknya MT-Cd daripada Pb dan Hg dalam menginduksi sintesis MT-Pb dan MT-Hg. Oleh karena itu MT-Cd muncul lebih dahulu meskipun pada konsentrasi Cd di hati yang paling rendah dibanding konsentrasi Pb dan Hg, maka hipotesis nomor 2 dan 3 terbukti.

A.4.3. Akumulasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan dan nilai BCF yang memunculkan MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg

Hasil uji statistik nilai BCF logam kadmium menunjukkan bahwa munculnya MT-Cd pada ikan nila adalah sebesar 0,678267 L/kg, sedangkan pada ikan mas adalah sebesar 0,051233 L/kg. Demikian pula analisis statistik untuk menunjukkan

kemampuan menjerap logam timbal. Nilai BCF timbal yang memunculkan adanya MT-Pb pada ikan nila sebesar 0,081211 L/kg, sedangkan pada ikan mas sebesar 0,026880 L/kg. Adapun nilai BCF Hg yang memunculkan MT-Hg pada ikan nila sebesar 0,959096 L/kg dan pada ikan mas sebesar 0,581857 L/kg. Nilai BCF Cd, Pb dan Hg pada ikan mas masing-masing lebih kecil daripada ikan nila. Dengan demikian besarnya rerata nilai BCF yang menyebabkan munculnya biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg paling awal pada ikan nila dan ikan mas mempunyai nilai yang berbeda, maka hipotesis no.4 terbukti.

A.4.4. Akumulasi logam berat pada hati ikan mas dan nila yang menginduksi munculnya *Metallothionein*

Hasil uji statistik terhadap akumulasi logam berat pada ikan mas dan ikan nila diperoleh signifikansi sebesar 0,006. Hal ini menunjukkan bahwa nilai signifikansi hasil uji lebih kecil dari 0,01 sehingga dapat dikatakan bahwa uji beda terhadap ikan mas dan ikan nila menunjukkan adanya perbedaan nyata akumulasi logam berat pada ikan mas dan ikan nila yang menyebabkan munculnya biomarker *metallothionein*. Berdasarkan nilai rerata terlihat bahwa ikan mas memiliki rerata konsentrasi logam berat yang lebih rendah dari pada ikan nila, hal ini berarti *metallothionein* pada hati ikan mas lebih sensitif dibandingkan dengan ikan nila. Menggunakan uji *Mann-Whitney* terhadap konsentrasi logam berat pada hati ikan mas dan ikan nila didapatkan perbedaan yang sangat signifikan ($p = 0,006$; $p < 0,01$). Hal ini diperkuat dengan analisis probit. Pada uji regresi probit konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada ikan nila masing-masing sebesar 0,00023 mg/kg, 0,00028 mg/kg dan 0,00102 mg/kg sudah menginduksi munculnya biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Sedangkan pada ikan mas dengan konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg di hati masing-masing sebesar 0,00018

mg/kg, 0,00025 mg/kg dan 0,00090 mg/kg sudah menginduksi munculnya biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Hal ini menunjukkan bahwa *metallothionein* ikan mas muncul pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan ikan nila. Dengan kata lain pada ikan mas akumulasi logam berat di hati lebih rendah sudah dapat menginduksi munculnya biomarker *metallothionein* dibandingkan dengan ikan nila. Oleh karena itu *metallothionein* pada hati ikan mas lebih sensitif daripada ikan nila; dengan demikian hipotesis nomor 5 terbukti.

B. Bahasan

B.1. Penelitian Pendahuluan

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pada hati ikan nila yang berasal dari sungai Kaligarang dengan kandungan Cd di air sebesar 0,006 mg/L ditemukan adanya *metallothionein-Cd*. Munculnya *metallothionein* dapat terdeteksi menggunakan alat *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) pada sampel hati ikan yang berasal dari sungai Kaligarang. Sedangkan pada hati ikan nila yang diperoleh dari Balai Benih Ikan tidak ditemukan adanya *metallothionein*. Sebagaimana kita ketahui *metallothionein* merupakan protein (*thionein*) pengikat logam (*metal-binding protein*) yang berperan dalam proses pengikatan ataupun pengekapan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Hanson, 2008).

Hasil tersebut sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya tentang penggunaan HPLC. Chassaigne dan Lobinski (1999) melakukan penelitian penggunaan HPLC untuk deteksi *metallothionein*, berjudul "*Rapid analysis for cadmium metallothionein complexes by HPLC using microparticulate stationary phases*". Hasil penelitiannya menyatakan bahwa untuk studi *metallothionein* disarankan untuk

menggunakan HPLC dengan fase diam dan fase bergerak. Keuntungannya adalah dapat mendeteksi ukuran molekul yang paling kecil, dan efektif yaitu dapat mengurangi waktu analisis pemisahan 20 kali lipat dibanding dengan tanpa menggunakan HPLC, karena HPLC menggunakan detektor yang sangat sensitif.

Hasil Penelitian Chandrasekera dan Pathiratne (2008) dengan judul “*Effects of water borne cadmium on biomarker enzymes and metallothioneins in Nile tilapia, Oreochromis niloticus*” menyatakan bahwa dalam menentukan *metallothionein* pada jaringan hati ikan nila yang tercemar oleh kadmium digunakan HPLC Brdicka.

Kovarova, Kizek, Adam, dan Danka (2009) dalam penelitiannya menyatakan bahwa untuk deteksi *metallothionein* dapat dilakukan dengan berbagai metode antara lain analisis spektrometri, HPLC, elektroforesis kapiler dan elektrokimia serta voltametri Brdicka dengan perbedaan pulse. Dalam penelitiannya ingin melihat pengaruh kadmium klorida dalam air terhadap jaringan otot, hati dan ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). Sedangkan Van Campenhout, Infante, Adams dan Blust (2004) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa untuk pemisahan dan deteksi *metalloprotein* digunakan analisis HPLC dari Shimadzu (Kyoto, Jepang).

Dengan demikian hasil penelitian pendahuluan menunjukkan adanya kesesuaian alat maupun metode yang digunakan untuk melihat munculnya *metallothionein*. HPLC dapat mendeteksi *metallothionein* dalam sampel hati ikan yang hidup di sungai Kaligarang dengan konsentrasi Cd, Pb dan Hg di perairan yang masih memenuhi nilai Baku Mutu Cd, Pb dan Hg pada air kelas I, dengan nilai Baku Mutu masing-masing sebesar 0,01 mg/L, 0,03 mg/L dan 0,001 mg/L. Dengan kata lain, konsentrasi Cd, Pb dan Hg di perairan yang masih memenuhi nilai Baku Mutu dapat terdeteksi oleh biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg pada hati ikan menggunakan alat HPLC. Hal ini

menunjukkan prosedur isolasi *metallothionein*, penggunaan HPLC untuk mendeteksi *metallothionein* dan rancangan perlakuan serta metode yang digunakan dalam penelitian pendahuluan, memadai untuk mencapai tujuan penelitian. Hal ini menunjukkan bahwa ketelitian penggunaan alat maupun ketepatan penggunaan metode penelitian sudah terpenuhi, sehingga data penelitian yang diperoleh dapat dipertanggungjawabkan validitasnya; dan hasil penelitian tidak bias. Maka untuk uji perlakuan sebagai uji lanjut akan digunakan metode dan alat yang sama dengan penelitian pendahuluan.

Ikan yang hidup di sungai Kaligarang, pada hatinya mengandung *metallothionein-Cd*, karena air Kaligarang tercemar/mengandung Cd yang terakumulasi pada hati ikan, sedangkan air pada Balai Benih Ikan tidak mengandung Cd, sehingga hati ikan tidak mengakumulasi Cd, oleh karena itu MT-Cd tidak muncul. Jadi *metallothionein-Cd* hanya muncul pada ikan yang hidup di perairan yang tercemar kadmium (Cd). Dengan demikian *metallothionein-Cd* merupakan biomarker/penanda biologis pencemaran logam berat Cd. Demikian pula MT-Pb sebagai biomarker pencemaran logam berat Pb dan MT Hg sebagai biomarker pencemaran logam berat Hg.

Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing berfungsi sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg yang dapat digunakan untuk monitoring lingkungan perairan yang tercemar Cd, Pb dan Hg. Penemuan ini merupakan penanda biologis tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sehingga dapat digunakan sebagai alat deteksi dini tingkat biomolekuler terhadap pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan. Sebagaimana dikatakan oleh Hanson (2008), Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg (2005), Zangger, Gong, Gulin dan James (2001) dan Carpene, Andreani dan Isani (2007) bahwa *metallothionein* dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat 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 (*thionein*) yang membentuk *metallothionein* tersebut. Biomarker merupakan akhir dari uji ekotoksikologi yang menunjukkan efek pada organisme hidup. Salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini, dari suatu pengaruh senyawa toksik secara biologi; dan biomarker sebagai respon pada tingkat sub seluler (molekuler, biokimia dan fisiologi); reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi makhluk hidup/*spektrum* biologi yang lebih tinggi.

Respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sudah saatnya dipakai untuk monitoring lingkungan, sehingga secara dini pencemaran lingkungan dapat dicegah ataupun dipantau serta dikendalikan. Langkah preventif dalam upaya pencegahan pencemaran jauh lebih baik dari pada secara kuratif. Sebagaimana pendapat Montaser, Magdy, Samir dan Gamal (2010), Hanson (2008) dan Tugiyono, Nurcahyani, Supriyanto and Hadi (2011) bahwa salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini dari pengaruh *xenobiotic* secara biologis. Respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan memberikan peluang untuk melakukan langkah preventif sebagai upaya pencegahan akan terjadinya pencemaran lingkungan.

Kualitas lingkungan perairan dapat diketahui berdasarkan perubahan dalam sistem atau parameter biologi yang terpilih, pendekatan ini dikenal dengan istilah biomonitoring. Biomonitoring adalah cabang dari monitoring lingkungan yang mengacu pada penggunaan organisme hidup, yang digunakan sebagai pendugaan residu bahan pencemar dalam jaringan organisme sampai pendugaan akhir pengaruh biologi spesifik. Bentuk atau tipe biomonitoring dapat dikembangkan berdasarkan perubahan

karakteristik secara biokimia, fisiologi, morfologi atau tingkah laku organisme, disamping berdasarkan cara konvensional seperti struktur komunitas yang meliputi kelimpahan dan indeks keanekaragaman (Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri 2007, Wardhana 2004).

B.2. Biomarker Pencemaran Logam Berat (Cd, Pb dan Hg) di Perairan

Penelitian disertasi ini mengkaji biomarker EROD, LSI, GSI dan MT, sebagai penanda biologis dalam melakukan monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan Kaligarang. Biomarker tersebut masing-masing dikaji satu persatu, sehingga dapat ditemukan biomarker yang paling sesuai untuk penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg yang konsentrasinya di perairan Kaligarang masih memenuhi nilai Baku Mutu.

Dalam pembahasan ini, biomarker yang dikaji sebagai alat monitoring pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di lingkungan perairan Kaligarang adalah EROD, LSI, GSI, dan *metallothionein*. Masing-masing biomarker dikaji sesuai tidaknya sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, sehingga dapat ditemukan biomarker apakah yang paling sesuai (EROD, LSI, GSI ataukah *metallothionein*).

B.2.1. Biomarker EROD

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata nilai aktivitas EROD pada ikan nila kelompok perlakuan (kelompok ikan yang terpajan logam berat Cd, Pb dan Hg) sebesar $(0,494 \pm 0,041)$ pmol/min/mg protein berbeda signifikan ($p = 0,000$; $P < 0,05$) dengan nilai aktivitas EROD ikan nila kelompok kontrol (kelompok ikan nila yang hidup di Balai Benih Ikan Air Tawar dan tidak terpajan oleh Cd, Pb dan Hg) dengan nilai

aktivitas EROD sebesar $(2,075 \pm 0,471)$ pmol/min/mg protein. Nilai rerata EROD ikan nila pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada nilai rerata aktivitas EROD pada ikan nila kelompok kontrol. Sedangkan nilai aktivitas EROD pada ikan mas kelompok perlakuan sebesar $(0,497 \pm 0,023)$ pmol/min/mg protein berbeda signifikan ($p = 0,000$; $p < 0,05$) dengan ikan mas kelompok kontrol dengan nilai aktivitas EROD sebesar $(1,774 \pm 0,226)$ pmol/min/mg protein. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pajanan logam berat mengakibatkan rendahnya aktivitas EROD, baik pada ikan nila maupun ikan mas. Nilai rerata aktivitas EROD pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol, dikarenakan adanya pajanan logam berat. Rendahnya aktivitas EROD pada ikan mas dan nila kelompok yang terpajan logam berat dibanding kelompok yang tidak terpajan logam berat tersebut kemungkinan terjadi karena adanya pajanan logam berat Cd, Pb dan Hg dengan afinitas yang tinggi terhadap unsur S menyebabkan logam berat tersebut memutuskan ikatan belerang pada enzim, sehingga enzim menjadi tidak aktif, dan mengakibatkan nilai aktivitas EROD rendah.

Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) menyatakan bahwa EROD telah diaplikasikan secara luas untuk mendeteksi adanya pencemaran senyawa organik pada ikan, disamping *glutathione S-transferase* (GST), dan *cholinesterases* (ChE fraksi). Cytochrome P-450 1A (CYP1A) dapat menginduksi *monooxygenase* yang dapat diketahui dengan menggunakan biomarker EROD. Biomarker tersebut telah banyak digunakan sebagai indikator yang sensitif terhadap pajanan kontaminan senyawa organik antropogenik, seperti Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) dan *polychlorinated biphenyls* (PCBs) dan dioxin (Van der Oost, Beyer dan Vermeulan 2003; Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg 2005; Hanson, Guttman dan Larsson 2006; Hanson dan Larsson, 2007; Hanson, Persson dan Larsson 2008; Hanson, 2008).

Berbagai hasil penelitian yang menggunakan EROD sebagai biomarker terhadap pajanan logam berat di perairan, menunjukkan bahwa aktivitas enzim *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD) secara umum sering digunakan sebagai biomarker terhadap adanya pencemaran senyawa organik organoklorin (seperti PCB, PCBs, PAH, dan PAHs). Aktivitas EROD dikategorikan sebagai *biomarker of exposure*, yaitu biomarker yang langsung dapat terdeteksi karena adanya pajanan. Menurut Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) *biomarker of exposure* dikategorikan sebagai biomarker untuk pengukuran substansi oksigen, substansi oksigen metabolit dan interaksi antara substansi oksigen dengan molekul target. Hal tersebut didukung oleh beberapa peneliti antara lain Larsson, Forlin, Grahn dan Landner (2000) dan Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg (2005) dalam Hanson (2008) yang memberikan interpretasi bahwa aktivitas EROD digunakan untuk pengukuran aktivitas detoksifikasi adanya pajanan senyawa organik. Namun demikian, menurut hasil penelitian Ueng, Liu, Lai, dan Meng (1996) disampaikan bahwa suntikan ikan nila dengan CdCl₂ sebesar 2 mg/kg secara *in vivo* tidak berpengaruh pada aktivitas EROD atau sistem sitokrom P-450. Dalam studi ini, pajanan kadmium sebesar 0,001-0,01 mg/L memiliki efek yang sangat tidak signifikan pada aktivitas EROD hati.

Berdasarkan hasil penelitian dan kajian berbagai penelitian sebelumnya, EROD dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran senyawa organik dan logam berat. Namun secara statistik dinyatakan bahwa pengaruh logam berat terhadap EROD sangat tidak signifikan. Sedangkan hasil penelitian disertasi ini EROD dapat digunakan sebagai biomarker logam berat secara umum, namun tidak spesifik untuk jenis logam beratnya. Namun demikian hasil penelitian ini rancu karena di sungai Kaligarang tentunya juga ada polutan bahan organik dari berbagai limbah domestik. Dengan

demikian aktivitas EROD tersebut terjadi karena adanya senyawa organik ataukah karena logam berat hal ini tidak dapat dipastikan. Namun dengan mengacu hasil penelitian di laboratorium yang dilakukan Ueng, Liu, Lai, dan Meng (1996) yang menyatakan bahwa pajanan Cd menimbulkan efek yang sangat tidak signifikan terhadap aktivitas EROD maka hasil penelitian ini lebih condong menyatakan bahwa EROD lebih sesuai untuk biomarker pencemaran senyawa organik dibanding sebagai biomarker pencemaran logam berat. Meskipun dalam lingkungan Pb dan Hg berbentuk Pb dan Hg organik yaitu pada methyl-Hg dan methyl-Pb sebagai hidrolisis dari metabolisme bakteri di lingkungan, namun EROD tidak dapat digunakan sebagai biomarker logam berat organik, EROD hanya dapat digunakan sebagai biomarker senyawa organik antropogenik seperti PAH dan PCB.

Hal tersebut diperkuat oleh hasil penelitian Chandrashekera dan Pathiratne (2008) bahwa konsentrasi MT hati ikan yang terkena pajanan Cd^{2+} meningkat 2-26 kali lipat tergantung pada konsentrasi dan durasi pajanan. Oleh karena itu MT hati ikan nila adalah biomarker sensitif untuk menunjukkan adanya pajanan logam berat. Pajanan Cd^{2+} yang terus menerus pada ikan di bawah $\leq 0,01$ mg/L tidak mempunyai efek yang sangat signifikan pada EROD hati, GST hati dan otak serta aktivitas fraksi ChE otot, sedangkan pajanan $Cd^{2+} \geq 0,1$ mg/L menimbulkan depresi yang sangat signifikan pada aktivitas EROD hati (41-55%).

Biotransformasi PAH pada ikan dapat diukur dengan bantuan biomarker aktivitas EROD dan metabolit PAH. Sebuah hubungan yang jelas telah diamati antara aktivitas EROD (CYP1A1) dan pajanan PAH pada ikan *Oreochromis mossambicus* (Shailaja dan Rodrigues 2001, Ueng, Liu, Lai dan Meng 1996, Shailaja dan D'Silva 2003, Chen, Chou Liu, Liang Shih dan Ting Lee 2001). Dalam penelitian ini, induksi

EROD pada *Oreocromis mossambicus* tampak jelas pada pajanan konsentrasi sangat rendah dari penyulingan limbah yang mengandung PAH. Ikan yang terpajan oleh limbah penyulingan yang telah diencerkan 1:1000 menunjukkan aktivitas EROD tiga kali lipat lebih tinggi (signifikansi > 95%) dibandingkan dengan kelompok kontrol ikan di air bersih, sedangkan pada ikan yang terpajan limbah penyulingan dengan pengenceran 1:100 aktivitas EROD sebesar 1,3 kali lipat dari ikan kontrol (Shailaja dan Rodrigues, 2001).

Biomarker tersebut telah banyak digunakan sebagai indikator yang sensitif terhadap pajanan kontaminan senyawa organik antropogenik, seperti Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH) dan *polychlorinated biphenyls* (PCBs) dan dioxin (Van der Oost, Beyer dan Vermeulan 2003; Sandstrom, Larsson Andersson dan Appelberg 2005; Hanson, Guttman dan Larsson 2006; Hanson dan Larsson 2007; Hanson, Persson dan Larsson 2008; Hanson, 2008).

Kenyataan yang terjadi di lingkungan, suatu perairan dapat mengalami pencemaran oleh berbagai macam jenis logam berat, baik secara bersamaan maupun pencemaran tunggal/hanya satu jenis logam berat. Dengan demikian memerlukan biomarker yang dapat sebagai penanda biologis pencemaran logam berat secara spesifik, yakni biomarker pencemaran Cd, biomarker pencemaran Pb maupun pencemaran logam berat yang lain. Biomarker EROD yang hanya dapat sebagai penanda biologis logam berat secara umum tidak dapat digunakan di lingkungan yang tercemar oleh berbagai jenis logam berat, sedangkan dalam monitoring lingkungan perlu mengetahui logam berat jenis apakah sesungguhnya yang menjadi polutannya. Hal ini penting untuk menentukan kebijakan pengelolaan perairan yang tercemari oleh logam berat tertentu sehingga perairan tersebut bisa terjaga kualitasnya. Oleh karena itu

perlu mengkaji biomarker lain yang sesuai untuk digunakan sebagai alat monitoring lingkungan yang tercemar oleh berbagai macam logam berat. Maka dari itu, dalam disertasi ini mengkaji lebih lanjut tentang kemungkinan penggunaan LSI, GSI dan *Metallothionein* sebagai biomarker pencemaran lingkungan oleh logam berat untuk menemukan biomarker yang paling sesuai sebagai alat deteksi dini dalam melakukan monitoring lingkungan.

B.2.2. Biomarker *Liver Somatic Index (LSI)*

Berdasarkan hasil penelitian disertasi ini menunjukkan bahwa rerata nilai LSI pada ikan nila kelompok perlakuan adalah sebesar $(2,244 \pm 0,348)$ dan pada ikan nila kelompok kontrol sebesar $(2,612 \pm 0,451)$. Sedangkan besarnya rerata nilai LSI pada ikan mas kelompok perlakuan adalah sebesar $(1,930 \pm 0,186)$ dan pada ikan mas kelompok kontrol sebesar $(2,756 \pm 0,230)$.

Berdasarkan uji statistik tidak terdapat perbedaan yang signifikan besarnya rerata nilai LSI ikan nila kelompok perlakuan dengan ikan nila pada kelompok kontrol ($p = 0,187$; $p > 0,05$), sedangkan rerata nilai LSI pada ikan mas kelompok perlakuan berbeda signifikan dengan ikan mas kelompok kontrol ($p = 0,000$; $p < 0,01$). Hal ini dikarenakan ikan mas lebih sensitif terhadap senyawa toksik. Sebagaimana pendapat Ossana, Bettina, Alfredo (2009) bahwa *Cyprinus carpio* L. (ikan mas) adalah spesies yang digunakan sebagai organisme uji dalam bioassay toksisitas karena memiliki respon fisiologis terhadap keberadaan kontaminan lebih sensitif dibanding spesies ikan yang lainnya. De Conto Cinier, Petit, Faure dan Garin (1999) menyatakan hal yang sama bahwa ikan mas segera memberikan respon fisiologis terhadap pajanan logam berat. Oleh karena itu, mengingat spesies ini sensitif terhadap pajanan logam berat maka

mudah disesuaikan dengan kondisi laboratorium untuk penelitian eksperimental. Berdasarkan catatan nilai morfometrik menunjukkan bahwa waktu pemaparan logam segera mempengaruhi terjadinya stres pada ikan mas, sehingga adanya dampak toksisitas pada ikan mas segera diketahui. Dengan demikian pajanan logam berat pada *Cyprinus carpio* menyebabkan *akut subletal*, meskipun waktu pemaparan relatif singkat (lima hari) (Ossana, Bettina, Alfredo 2009).

Besarnya LSI baik pada ikan nila dan ikan mas kelompok perlakuan lebih rendah dibanding pada ikan nila dan ikan mas kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pajanan logam berat mengakibatkan rerata nilai *Liver Somatic Index* (LSI) rendah. Rendahnya nilai LSI kemungkinan terjadi ketika perairan tercemar oleh logam berat, selanjutnya logam-logam berat tersebut diserap melalui membran *epitel*, terutama insang, dan melalui darah dibawa ke hati sehingga mengakibatkan akumulasi logam berat di hati; disamping itu akumulasi logam berat di hati akan mengakibatkan gangguan fungsi enzim karena adanya ikatan logam berat dengan gugus *sulfhidril* (-SH) pada enzim, sehingga mengganggu metabolisme tubuh dan mengakibatkan berat hati ikan menjadi rendah sehingga nilai LSI menurun/rendah (Soemirat, 2005; Katzung, 2004). Mengingat logam berat bersifat toksik dan karsinogenik, maka akumulasi logam berat pada hati akan merusak jaringan hati, sehingga hati ikan pada awalnya akan mengalami pembengkakan (*hepatomegali*), namun lama kelamaan apabila tingkat kerusakan semakin parah karena akumulasi logam berat dihati semakin besar maka hati akan mengalami *nekrosis* maupun *sirosis* (Marina dan Martinez 2007; Pantung, Helander dan Cheevaporna 2008). Hati yang mengalami sirosis ukurannya makin mengecil/mengalami penyusutan. Ukuran hati yang kecil akan mengakibatkan berat hati menjadi rendah sehingga nilai LSI rendah/menurun.

Pembengkakan sel hati bersifat reversibel sehingga apabila pajanan senyawa toksik tidak berlanjut maka sel dapat kembali normal. Namun apabila pajanan logam berat berlangsung lama maka sel tidak dapat mentolerir kerusakan yang diakibatkan oleh pajanan logam berat tersebut. Azis dan Ghazaly 2006; Marina dan Martinez 2007, mengemukakan bahwa dengan terpajannya logam berat maka menyebabkan terjadinya pembengkakan hepatosit sebagai akibat langsung dari zat toksik yang berpengaruh langsung pada mekanisme transport ion. Kematian sel yang terus berlanjut akan menyebabkan terjadinya *nekrosis*. Adanya *nekrosis* menyebabkan respon peradangan pada jaringan yang masih hidup disekitar daerah *nekrosis*. Respon peradangan ini bertujuan untuk pemulihan jaringan serta menekan agen penyebab *nekrosis*. Apabila zat toksik terpajan terus-menerus maka akan menyebabkan sel kehilangan kemampuan dalam regenerasi sehingga akan memicu terjadinya *fibrosis*. Jika fibrosis meluas ke semua bagian hati maka akan terjadi *sclerosis* (pemadatan/pengecilan organ hati) yang menyebabkan kegagalan fungsi hati. Hal ini dikarenakan terjadinya hipertensi *vena porta hepatica* yang dapat mengganggu aliran darah sehingga akan menghambat suplai nutrien dan pertukaran oksigen.

Larsson, Forlin, Grahn dan Landner (2000) dan Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg (2005) menyatakan bahwa *Liver Somatic Index* (LSI) merupakan biomarker yang menandakan status pakan dan metabolisme. Besarnya ukuran hati mengindikasikan tingginya aktivitas metabolisme sedangkan kecilnya ukuran hati dapat disebabkan oleh kekurangan makanan. Menurut Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) *Liver Somatic Index* (LSI) menurun secara signifikan apabila terkena pajanan polutan organik, seperti OCPs, *Polychlorine Biphenyls* (PCBs) dan Polisiklik Aromatik

Hidrokarbon (PAH). Penurunan ini kemungkinan disebabkan pengaruh keterbatasan makanan atau jika konsumsi makanan berkurang dan faktor stres.

Berdasarkan kajian tersebut maka penurunan LSI pada hasil penelitian disertasi ini kemungkinan disebabkan oleh kekurangan makanan atau kemungkinan akibat pajanan logam berat di perairan. Pendapat lain dikemukakan oleh Hanson and Larson (2008^b), Larson, Forlin, Grahn dan Landner (2000), Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg (2005) yang menyatakan bahwa LSI sangat tidak sensitif digunakan sebagai biomarker logam berat, karena terjadinya perubahan nilai LSI sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor non polutan seperti musim, penyakit dan tingkat nutrisi. Dengan demikian LSI sangat rancu bila digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat, sehingga validitasnya tidak bisa diandalkan. Maka dalam kajian disertasi ini LSI tidak sesuai digunakan untuk biomarker pencemaran logam berat di perairan. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian tentang biomarker pencemaran logam berat di perairan yang lebih sesuai. Dalam disertasi ini selanjutnya akan dikaji mengenai *Gonade Somatic Index* (GSI).

B.2.3. Biomarker *Gonade Somatic Index* (GSI)

Gonade Somatic Index (GSI) ikan nila pada kelompok kontrol memiliki rerata nilai sebesar $(0,230 \pm 0,028)$ dan kelompok perlakuan sebesar $(0,136 \pm 0,026)$. Sedangkan rerata nilai GSI ikan mas pada kelompok kontrol adalah sebesar $(0,268 \pm 0,051)$ dan pada kelompok perlakuan sebesar $(0,160 \pm 0,039)$. Hasil uji beda nilai GSI ikan nila kelompok kontrol dan kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p = 0,001$; $p < 0,01$). Sedangkan hasil uji beda nilai GSI ikan mas kelompok

kontrol dan kelompok perlakuan juga menunjukkan perbedaan signifikan ($p = 0,006$; $p < 0,01$).

Nilai GSI pada ikan mas dan ikan nila kelompok perlakuan lebih rendah dibanding kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa pajanan logam berat berpengaruh terhadap nilai GSI. Pajanan logam berat mengakibatkan nilai GSI lebih kecil dibanding dengan kelompok ikan yang tidak terpajan logam berat. Rendahnya nilai GSI akibat pajanan logam berat kemungkinan terjadi ketika logam berat mencemari perairan, selanjutnya logam berat tersebut akan diserap melalui membran epitel, terutama insang, dan melalui darah dibawa ke organ-organ seperti hati, gonade, ginjal, otot, dan kulit. Hal ini akan mengakibatkan akumulasi logam berat di organ-organ tersebut. Akumulasi logam berat pada gonade akan mengakibatkan kerusakan jaringan gonade karena logam berat bersifat toksik, *karsinogenik* dan iritatif. Akibatnya gonade mengalami degenerasi, ukuran kecil dan nilai GSI rendah serta mempengaruhi kemampuan reproduksi, sehingga kesuburannya rendah (Larsson, Forlin, Grahn 2000; Sandstrom, Larsson, Andersson 2005). Menurut Van der Oost, Beyer dan Vermeulan (2003) nilai GSI termasuk dalam kelompok *biomarkers of effect*, yaitu biomarker yang berhubungan dengan pengukuran pengaruh polutan pencemaran terhadap kesehatan. Hal ini berbeda dengan EROD yang termasuk dalam *biomarker of exposure*.

Namun pendapat Siah, [Pellerin](#), [Amiard](#) dan [Pelletier](#) (2003) menyatakan bahwa adanya polutan organik seperti tributynil (TBT) di perairan, dapat menghambat kematangan seksual, menyebabkan gonade yang berukuran kecil sehingga nilai GSI rendah. Demikian juga dengan pendapat Hanson, Persson dan Larsson (2008) menyatakan bahwa polutan organik seperti PCBs dan PAH di perairan mengakibatkan mengecilnya ukuran gonade ikan perch (*Perca fluviatilis*) yang mengakibatkan nilai

GSI menurun. Oleh karena itu, GSI tidak sesuai sebagai biomarker pencemaran logam berat di perairan, karena adanya kerancuan jenis polutan apakah sesungguhnya yang menyebabkan rendahnya nilai GSI, logam berat ataukah senyawa organik. Sehingga validitas GSI sebagai biomarker pencemaran logam berat tidak dapat diandalkan. Selain itu GSI hanya dapat menunjukkan efek pajanan logam berat secara umum yang terdapat di Kaligarang, tidak dapat menunjukkan efek setiap jenis logam berat yang keberadaannya di Kaligarang terpajan secara bersamaan.

Biomarker EROD, GSI, LSI tidak spesifik, tidak dapat sebagai penanda setiap jenis logam, hanya dapat sebagai penanda pencemaran logam berat secara umum. Untuk monitoring lingkungan harus diketahui secara spesifik jenis logam beratnya (Cd, Pb ataukah Hg) sehingga dapat dirunut asal polutan dari mana, dari industri atau dari rumah tangga, jika dari industri, industri apa, mengapa mencemari lingkungan, apakah industri tersebut tidak mempunyai IPAL, ataukah IPAL nya tidak efektif, apakah karena tidak adanya kesadaran lingkungan. Dengan cara demikian akan menentukan langkah pengelolaan lingkungan lebih lanjut.

Maka dalam kajian disertasi ini, GSI tidak sesuai digunakan untuk biomarker pencemaran logam berat di perairan yang terpajan oleh berbagai jenis logam berat maupun berbagai polutan organik maupun anorganik yang terpajan di perairan secara bersamaan. Oleh karena itu, perlu dilakukan kajian tentang biomarker yang paling sesuai sebagai penanda biologis pencemaran logam berat di perairan. Oleh karena itu, selanjutnya akan dikaji mengenai biomarker *metallothionein* (MT).

B.2.4 Biomarker Metallothionein

Berdasarkan beberapa kajian sebelumnya, dimana EROD, LSI dan GSI tidak sesuai digunakan untuk biomarker pencemaran logam berat, maka selanjutnya dikaji penggunaan *metallothionein* sebagai biomarker pencemaran logam berat di perairan. Kajian ini meliputi ; (1) *Metallothionein* sebagai biomarker yang paling sesuai untuk penanda biologis pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan; (2) Munculnya *Metallothionein* paling awal; (3) Konsentrasi logam berat yang dapat menginduksi munculnya biomarker *metallothionein*. Beberapa hal yang akan dibahas meliputi: biomarker *metallothionein* apakah dapat digunakan sebagai penanda biologis pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan, konsentrasi terendah logam berat yang menyebabkan munculnya MT-Cd, MT-Hg, MT-Pb, dan *metallothionein* yang pertama kali muncul (MT-Cd, MT-Hg ataukah MT-Pb) serta biomarker *metallothionein* sesuai tidaknya sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan.

Hasil penelitian disertasi ini menunjukkan bahwa pada hati ikan nila dan ikan mas dengan perlakuan Karamba Jaring Apung di sungai Kaligarang yang tercemar logam berat (Cd, Pb dan Hg), setelah dilakukan preparasi dengan isolasi *metallothionein* kemudian dianalisis menggunakan HPLC muncul biomarker *metallothionein*. Sedangkan pada ikan mas dan ikan nila yang tidak terpajan Cd, Pb dan Hg (Balai Benih Ikan) hasil analisis menggunakan HPLC tidak muncul adanya *metallothionein*. Hal ini menunjukkan bahwa *metallothionein* dapat digunakan sebagai penanda biologis adanya pajanan logam berat.

Munculnya *metallothionein* tersebut terjadi karena adanya logam berat yang berikatan dengan protein berat molekul rendah yaitu *thionein* membentuk gugus kompleks protein-logam yang disebut *metallothionein*. Hasil penelitian disertasi ini sesuai dengan hasil penelitian eksplorasi pada uji pendahuluan yang dilakukan

sebelumnya, yaitu bahwa ikan yang diambil langsung dari perairan bebas (tanpa karamba jaring apung) di Kaligarang yang terpajan Cd setelah hati ikan dipreparasi dengan isolasi *metallothionein*, kemudian dilakukan analisis menggunakan HPLC muncul *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Sedangkan pada ikan yang diambil langsung dari kolam Balai Benih Ikan yang tidak terpajan oleh logam berat tidak muncul *metallothionein*.

Hasil penelitian menunjukkan adanya *Metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein Hg* ditemukan pada hati ikan mas dan ikan nila yang hidup di Kaligarang, sedangkan pada ikan mas dan ikan nila yang berasal dari Balai Benih Ikan Air Tawar tidak ditemukan *metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg*. Hal ini disebabkan oleh adanya akumulasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan mas dan ikan nila yang berasal dari Kaligarang, dan tidak adanya akumulasi Cd, Pb maupun Hg pada hati ikan mas dan ikan nila dari Balai Benih Ikan Air Tawar. Hasil penelitian ini diperkuat oleh hasil Flame AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*); bahwa pada air sungai Kaligarang mengandung Cd, Pb dan Hg dan air pada Balai Benih ikan Air Tawar tidak mengandung Cd, Pb dan Hg. Kadar Cd, Pb dan Hg di sungai Kaligarang masing-masing berturut-turut sebesar $(0,006 \pm 0,001)$ mg/L, $(0,01 \pm 0,005)$ mg/L dan $(0,0006 \pm 0,0001)$ mg/L, sedangkan kadar Cd, Pb dan Hg di Balai Benih Ikan Air Tawar masing-masing 0 mg/L.

Adanya *metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg* tersebut terjadi karena *metallothionein* terbentuk dari *thionein* yang merupakan protein pengikat logam (*metal binding protein*) yang berperan dalam proses pengikatan atau penyekapan logam berat Cd, Pb dan Hg di dalam jaringan hati ikan mas dan ikan nila. Setelah logam Cd, Pb dan Hg terikat oleh protein (*thionein*), maka logam tersebut akan

menginduksi sintesis/terbentuknya *metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg*. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *metallothionein-Cd* merupakan hasil ikatan antara protein (*thionein*) dengan logam Cd, *metallothionein-Pb* merupakan hasil ikatan antara protein (*thionein*) dengan logam Pb dan *metallothionein-Hg* adalah hasil ikatan antara *thionein* dengan logam Hg. Dengan demikian *metallothionein-Cd*, berbeda dengan *metallothionein-Hg*, dan berbeda pula dengan *metallothionein Pb*, karena *thionein* penyusunnya berikatan dengan masing-masing jenis logam secara spesifik, membentuk *metallothionein* yang spesifik pula sesuai jenis logamnya.

Hasil penelitian disertasi ini menunjukkan bahwa rerata konsentrasi Cd yang terakumulasi pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein-Cd* adalah sebesar $(0,004070 \pm 0,000287)$ mg/kg. Adapun rerata konsentrasi Pb yang terakumulasi pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein-Pb* sebesar $(0,000812 \pm 0,000092)$ mg/kg. Sedangkan rerata konsentrasi Hg yang terakumulasi pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein-Hg* adalah sebesar $(0,000575 \pm 0,000021)$ mg/kg. Sedangkan pada ikan mas rerata konsentrasi Cd, Pb dan Hg yang terakumulasi pada hati dan menginduksi sintesis/munculnya MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg masing-masing berturut-turut sebesar $(0,000307 \pm 0,000038)$ mg/kg, $(0,000569 \pm 0,000026)$ mg/kg, dan $(0,000449 \pm 0,000030)$ mg/kg.

Berdasarkan uji statistik diketahui bahwa rerata konsentrasi Cd yang terakumulasi pada hati masing-masing ikan mas yang dijadikan sampel tidak berbeda signifikan $p = 0,147$ ($p > 0,05$). Rerata konsentrasi Cd pada hati ikan mas yang menginduksi sintesis/ munculnya MT-Cd adalah sebesar $(0,000092 - 0,000990)$ mg/kg. Adapun rerata konsentrasi Pb pada hati masing-masing ikan mas yang dijadikan sampel

juga tidak berbeda signifikan $p = 0,087$ ($p > 0,05$). Rerata konsentrasi Pb pada hati ikan mas yang menginduksi sintesis/munculnya MT-Pb adalah sebesar (0,000089 - 0,000724) mg/kg. Konsentrasi Hg pada hati masing-masing hati ikan mas yang dijadikan sampel tidak berbeda signifikan $p = 0,064$ ($p > 0,05$). Rerata konsentrasi Hg pada hati ikan mas yang menginduksi sintesis/ munculnya MT-Hg ikan mas adalah sebesar 0,000139-0,000894 mg/kg.

Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa rerata konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan mas yang menyebabkan munculnya *metallothionein* berkisar pada rerata nilai konsentrasi yang relatif sama. Artinya rerata konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan mas memiliki kemampuan menginduksi yang relatif sama untuk menyebabkan munculnya biomarker *metallothionein*.

Adapun konsentrasi Cd pada masing-masing sampel hati ikan nila berbeda signifikan $p = 0,03$ ($p < 0,05$). Rerata konsentrasi Cd pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/ munculnya MT-Cd ikan nila adalah sebesar 0,002122 mg/kg. Sedangkan konsentrasi Pb pada masing-masing sampel hati ikan nila tidak berbeda signifikan $p = 0,120$ ($p > 0,05$). Rerata konsentrasi Pb hati ikan nila yang menginduksi munculnya MT-Pb adalah sebesar (0,000016-0,002250) mg/kg. Adapun konsentrasi Hg pada masing-masing sampel hati ikan nila terdapat perbedaan yang sangat signifikan $p = 0,004$ ($p < 0,01$). Rerata konsentrasi Hg pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya MT-Hg ikan nila adalah sebesar 0,000362 mg/kg.

Dari data tersebut dapat dikatakan bahwa rerata konsentrasi logam Cd dan Hg pada masing-masing sampel hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein* mempunyai rerata nilai konsentrasi yang berbeda. Artinya rerata konsentrasi Cd dan Hg pada ikan nila memiliki kemampuan menginduksi sintesis/

munculnya biomarker *metallothionein* yang tidak sama. Sedangkan rerata konsentrasi logam Pb pada hati ikan nila yang menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein* berkisar pada rerata nilai konsentrasi yang relatif sama.

Untuk mendukung pernyataan bahwa semua logam berat (Cd, Pb dan Hg) dapat berikatan dengan suatu protein (*thionein*) dan menginduksi terbentuknya *metallothionein* dilakukan uji beda terhadap rerata konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg pada ikan mas dan ikan nila. Ternyata dihasilkan nilai signifikansi sebesar 0,213 ($p > 0,005$), berarti rerata konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg tidak berbeda signifikan. Artinya konsentrasi logam berat memberi pengaruh yang sama terhadap induksi sintesis/ munculnya *metallothionein*. Dengan demikian berarti semua logam baik Cd, Pb maupun Hg dapat menginduksi terbentuknya *metallothionein*.

Analisis Probit digunakan untuk mengetahui nilai terendah konsentrasi kadmium, timbal dan merkuri yang telah menginduksi sintesis/munculnya *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Berdasarkan analisis Probit menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah kadmium sebesar 0,00018 mg/kg pada ikan mas dan 0,00023 mg/kg pada ikan nila telah menginduksi sintesis/munculnya MT-Cd. Analisis Probit untuk menunjukkan konsentrasi terendah timbal yang menginduksi sintesis/munculnya adanya MT-Pb, pada konsentrasi terendah 0,00025 mg/kg pada ikan mas dan 0,00028 pada ikan nila telah menginduksi sintesis/ munculnya MT-Pb. Sedangkan induksi sintesis/munculnya MT-Hg terjadi pada konsentrasi Hg terendah sebesar 0,00090 mg/kg pada ikan mas dan 0,00102 pada ikan nila.

Berdasarkan analisis Probit tersebut berarti konsentrasi terendah induksi sintesis/munculnya *metallothionein* untuk masing-masing logam berat adalah sebagai berikut : konsentrasi Cd terendah yang telah menginduksi sintesis/munculnya MT-Cd

sebesar 0,00018 mg/kg, konsentrasi Pb terendah yang mulai menginduksi sintesis munculnya MT-Pb sebesar 0,00025 mg/kg, dan konsentrasi Hg terendah yang mulai menginduksi sintesis/munculnya MT Hg sebesar 0,00090 mg/kg. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *metallothionien* yang muncul pertama kali adalah MT-Cd diikuti MT-Hg dan MT-Pb.

Soemirat (2005) dan Katzung (2004) menyatakan bahwa pengikatan logam berat membentuk *metallothionein* tersebut diyakini sebagai mekanisme untuk pertahanan dan perlindungan yang mencegah logam tersebut mempengaruhi protein protein lain yang penting dalam proses metabolisme tubuh. Dengan kata lain logam-logam berat tersebut dapat menginduksi sintesis *metallothionein*. *Metallothionein* mampu mengikat logam berat dan dapat digunakan sebagai penanda adanya pajanan logam berat yang berpotensi racun (Sonne, Aspholm, Dietz, Andersen, 2009; Montaser, Magdy, Samir dan Gamal 2010).

Sedangkan Ueng, Liu, Lai dan Meng (1996) melaporkan bahwa pemberian intraperitoneal tunggal CdCl₂ pada 3, 4, dan 10 mg/kg menghasilkan peningkatan 12-13 kali lipat MT hati ikan. Induksi maksimum MT nila dengan konsentrasi 2 mg/kg CdCl₂ dan MT tidak meningkat secara proporsional dengan dosis lebih besar dari 2 mg/kg. Pemberian dosis tinggi kadmium menyebabkan kadmium seluler berlebihan yang pada gilirannya akan menurunkan induksi MT. *Metallothionein* (MT) ini ternyata melindungi enzim *monooxygenases mikrosoma* dari dampak buruk pajanan logam.

Penelitian Nur Kusuma Dewi, Purwanto dan Henna Rya Sunoko (2010) yang dibiayai oleh Hibah Doktor DP2M Dirjen Dikti dengan judul "*Biomarker Pada Ikan Sebagai Biomonitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium di Perairan Kaligarang Semarang*" menghasilkan temuan bahwa biomarker *Metallothionein-Cd* pada hati ikan yang terpajan kadmium di perairan Kaligarang, dapat digunakan sebagai penanda

biologis adanya pencemaran kadmium di perairan Kaligarang Semarang. Temuan tersebut merupakan respon dini tingkat molekuler yang dapat dijadikan sebagai peringatan dini terjadinya pencemaran Cd di perairan. Respon dini pada tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sudah saatnya digunakan untuk monitoring lingkungan, sehingga secara dini pencemaran lingkungan dapat dicegah dan dipantau.

Metallothionein (MT) merupakan polipeptida yang memiliki banyak ikatan *cystein (cys)* yang disandikan oleh gen, memiliki berat molekul yang rendah, dan berfungsi sebagai peptida pengikat logam (*metal binding peptides*). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino *Cys* maka protein ini mengandung kelompok *thiol (sulfidril, -SH)* dalam jumlah yang besar. Kelompok *thiol* mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien, termasuk zink, merkuri, tembaga dan kadmium. Residu *Sulfidril* dari *Cys* mampu mengikat logam dimana satu ion logam diikat oleh tiga residu $-SH$ atau satu ion logam dengan 2 residu $-SH$. Koordinasi pengikatan dari setiap ion logam melalui residu $-SH$ yang ada pada *Cys*, membentuk struktur tetrahedral tetrathiolate (Zatta, 2008).

Metallothionein (MT) merupakan materi yang termasuk dalam golongan persenyawaan protein atau polipeptida. Interaksi antara logam dan protein tersebut akan membentuk gugus-gugus spesifik yang disebut *metal-thiolat clusters*. Sejauh ini *metallothionein* merupakan satu-satunya senyawa biologis yang berinteraksi dengan logam secara alami. Dengan demikian, *metallothionein* memegang peranan penting dalam pengelolaan mekanisme metabolisme dan transisi seluler materi logam di dalam tubuh (Binz, Kagi, 2000). Ion logam yang berikatan dengan *metallothionein* dapat berupa ion logam maupun logam berat, baik esensial maupun non esensial (Geffard, Amiard-Triquet, Amiard dan Mouneyrac 2001). *Metallothionein* mengikat ion logam dengan sangat kuat, tetapi peluang pertukaran ikatan antara ion logam dan protein pun cukup besar. Dengan kata lain MT yang mengikat logam berat Cd dapat dengan mudah mengalami pertukaran ikatan dengan logam Zn, Cu, Hg maupun Pb (Zangger, Gong, Gulin dan James 2001).

Menurut penelitian terdahulu, ekspresi *metallothionein* menunjukkan adanya pajanan logam tertentu (Larsson, Forlin, Grahn dan Landner 2000 dan Sandstrom, Larsson, Andersson dan Appelberg 2005, Hanson 2008). Pada hewan, logam akan terikat pada residu *cys* dalam formasi logam-*cys* (*thiolate*) dengan cara pertukaran ion logam misalnya ion Zn tergantikan dengan ion Cu, Cd, atau Hg (Duncan, Stillman 2006). Hasil penelitian ini didukung oleh hasil penelitian Chandrasheker, Pathiratne dan Pathiratne (2008) yang mengatakan bahwa sintesis *metallothionein* karena terinduksi oleh adanya pajanan logam kadmium sebesar $\geq 0,005$ mg/L pada ikan nila, *Oreochromis niloticus*. Setelah perairan terpajan kadmium secara signifikan di jaringan hati konsentrasi MT-Cd menjadi lebih tinggi. Penelitian Linderoth, Hansson, Liewenborg dan Sundberg (2006) menunjukkan bahwa Cd menginduksi sintesis *metallothionein* dan bertindak dalam jaringan sebagai perlindungan seluler terhadap toksisitas logam.

Metallothionein-Cd, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg* ditemukan pada hati ikan dari sungai Kaligarang yang terpajan oleh logam berat Cd, Pb dan Hg pada konsentrasi logam di perairan yang masih memenuhi nilai Baku Mutu. Dengan kata lain meskipun konsentrasi pajanan logam berat masih memenuhi nilai Baku Mutu, namun *metallothionein* di dalam hati ikan sebagai protein pengikat logam berat telah ditemukan. Biomarker MT-Cd, MT-Pb, dan MT-Hg, merupakan penanda biologis tingkat molekuler, sebagai alat deteksi dini dalam melakukan biomonitoring logam berat Cd, Pb dan Hg di lingkungan perairan.

Berdasarkan berbagai kajian terhadap penelitian tentang peran *metallothionein* sebagai biomarker pencemaran logam berat, maka *metallothionein* dapat digunakan sebagai biomonitoring pencemaran logam berat pada perairan bebas seperti sungai,

teluk dan laut (Chaabaoui, Marchkreki, Hamza 2011; Montaser, Magdy, Samir 2010; Arkhipchuk dan Garanko 2005); yang terjadi di dalam tubuh organisme vetebrata maupun invertebrata (Chaabouni, Marchkreki, Hamza 2011; Isani, Andreani, Kindt 2000; Barka, Pavillon, Amiard 2001; Berthet, Mouneyrac, Perez 2005; Miles, Hawksworth, Beattie dan Rodilla 2000; Cosson, 2000; Syring, Hoexum, Brouwer 2000; Brouwer, Syring 2002; Butler dan Roesijadi, 2001; Tanguy dan Moraga, 2001, Ceratto, Dondero, Loo dan Burlando, 2002, Park, Chung, Kim 2002; Simes, Bebianno, Moura 2003; Lieb, 2003).

Berdasarkan berbagai kajian terhadap hasil penelitian disertasi ini dan penelitian lain yang terkait biomarker *metallothionein*, maka *metallothionein* yang ditemukan pada ikan mas dan ikan nila yang terpajan logam berat Cd, Pb dan Hg dari perairan Kaligarang Semarang, dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat. *Metallothionein* yang ditemukan sebagai biomarker mempunyai sifat spesifik, sensitif, *universal dan early warning*.

Metallothionein sebagai biomarker bersifat spesifik artinya *metallothionein* dapat untuk penanda adanya pajanan setiap jenis logam berat. Logam berat tertentu akan diikat oleh protein dan membentuk *metallothionein* tertentu. *Metallothionein-Cd* merupakan ikatan antara protein (*thionein*) dengan logam berat Cd, sedangkan *metallothionein-Pb* merupakan ikatan antara protein (*thionein*) dengan logam berat Pb, begitu juga *metallothionein-Hg* merupakan ikatan antara *thionein* dengan logam berat Hg. *Metallothionein* dapat mengikat logam dengan sangat kuat namun pertukaran ikatan logam dapat berlangsung dengan mudah. Dengan kata lain *metallothionein* yang mengikat logam Cd dapat dengan mudah mengalami pertukaran ikatan dengan logam Zn, Cu, Hg maupun Pb ataupun yang lain.

Metallothionein selain bersifat spesifik, juga bersifat sensitif sebagai biomarker. Adanya pajanan logam berat Cd, Pb dan Hg yang kadarnya masih memenuhi nilai Baku Mutu sudah dapat menginduksi sintesis *metallothionein* dalam jaringan hati sehingga muncul *metallothionein*. *Metallothionein* yang terbentuk berfungsi sebagai detoksifikasi terhadap logam berat. Dengan kata lain apabila terjadi pajanan logam berat yang memiliki afinitas tinggi terhadap *thioenin* maka logam tersebut memiliki kemampuan yang tinggi dalam menginduksi *metallothioenin*, sehingga akan segera membentuk *metallothionein* dan logam tersebut akan segera terdetoksifikasi. Akibatnya tidak terjadi akumulasi logam pada tubuh yang berpotensi melebihi Baku Mutu.

Metallothionein merupakan biomarker yang bersifat *universal*. *Metallothionein* tidak hanya dapat digunakan sebagai biomarker pada penelitian skala laboratorium, tetapi juga dapat digunakan di perairan bebas seperti laut baltik, laut antartika, laut merah Jeddah, dan sungai Kaligarang Semarang. Disamping itu dapat digunakan untuk deteksi logam berat yang terakumulasi pada organ tubuh ikan maupun yang terpajan di perairan. Dengan demikian biomarker *metallothionein* yang ditemukan pada penelitian di Kaligarang (air tawar) berpeluang untuk diterapkan di perairan lainnya (lautan, air payau maupun IPAL yang limbahnya mengandung logam berat).

Metallothionein juga merupakan biomarker (penanda biologis) untuk peringatan dini (*early warning*) terhadap pajanan logam berat (Cd, Pb dan Hg) sejak tingkat sub seluler, reaksi awal sebelum respon terjadi pada tingkatan organisasi (spektrum) biologi yang lebih tinggi. Dengan demikian terjadinya pencemaran di tingkat sub seluler sudah dapat diketahui, sehingga pencemaran di tingkat ekosistem dapat dicegah atau tidak akan terjadi. Oleh karena itu biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb, dan MT-Hg) yang ditemukan merupakan respon dini tingkat molekuler yang berguna sebagai tanda

peringatan dini tingkat sub seluler, sebagai penanda biologis dalam melakukan monitoring logam berat Cd, Pb dan Hg di lingkungan perairan maupun di tingkat sub seluler pada organisme. Sebagaimana pendapat Hanson (2008) bahwa salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini dari pengaruh *xenobiotic* secara biologis. Respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan memberikan peluang untuk melakukan langkah preventif sebagai upaya pencegahan akan terjadinya pencemaran lingkungan yang lebih besar.

Berdasarkan pembahasan peran biomarker sebagai biomonitoring pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan Kaligarang. Maka dapat dikatakan bahwa nilai aktivitas EROD tidak dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat, karena biomarker EROD hanya dapat digunakan sebagai penanda biologis senyawa logam berat secara umum, tidak spesifik untuk jenis logam tertentu. EROD spesifik sebagai biomarker pencemaran polutan senyawa organik seperti PAH, PAHs, PCB, dan PCBs. Adapun, LSI dan GSI dapat digunakan sebagai biomarker logam berat secara umum, tidak spesifik untuk jenis logam tertentu dan dipengaruhi faktor-faktor non polutan seperti penyakit, musim dan tingkat nutrisi. Oleh karena itu validitas LSI dan GSI sebagai biomarker logam berat tidak bisa diandalkan sebagai biomarker pencemaran logam berat.

Metallothionein berikatan secara spesifik dengan logam tertentu, baik esensial (Zn dan Cu) maupun non-esensial (Cd, Pb dan Hg) sehingga terbentuk *metallothionein-Cd*, *metallothionein-Pb* dan *metallothionein-Hg*. *Metallothionein-Cd* merupakan hasil ikatan antara *thionein* dengan logam Cd, *metallothionein-Pb* merupakan hasil ikatan antara *thionein* dengan logam Pb, *metallothionein-Hg* merupakan hasil ikatan antara *thionein* dengan logam Hg. Dengan demikian *Metallothionein* merupakan penanda biologis yang paling sesuai sebagai biomarker tingkat molekuler dalam monitoring

pencemaran logam berat di perairan sekalipun perairan tersebut konsentrasi pencemaran logam beratnya masih memenuhi nilai Baku Mutu, dan keberadaan logam berat (Cd, Pb dan Hg) larut di air sungai bercampur jadi satu seperti yang terjadi di perairan Kaligarang. Oleh karena itu kajian penelitian disertasi ini menyatakan bahwa *metallothionein* merupakan biomarker pencemaran logam berat. Dengan demikian dari ke empat biomarker yang dikaji, hanya *metallothionein* saja yang merupakan biomarker yang paling sesuai sebagai alat monitoring pencemaran logam berat di perairan sejak terjadi kontaminasi/konsentrasi rendah (masih memenuhi Baku Mutu air kelas I) yang keberadaan logam beratnya (Cd, Pb dan Hg) larut di air sungai secara bersamaan/bercampur jadi satu sebagai multi polutan.

B.2.5. Nilai BCF Cd, Pb dan Hg Dan Munculnya Biomarker

Metallothionein

Pada penelitian ini nilai rerata BCF masih sangat rendah. Nilai BCF dikatakan rendah bila lebih kecil dari 100 L/kg; sedangkan nilai BCF dikategorikan sedang bila nilainya antara 100-250 L/kg dan BCF tinggi bila lebih besar dari 300 L/kg (Van der Oost, Beyer, Vermeulan 2003). Oleh karena itu pada penelitian ini kemampuan jaringan menyerap logam berat memang masih sangat rendah/belum mencapai nilai BCF yang sesungguhnya/belum mencapai *steady state*. Hal ini diduga karena lama penelitian yang relatif pendek, sehingga absorpsi Cd, Pb dan Hg belum mencapai jenuh. Pada nilai BCF yang masih sangat rendah biomarker MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg sudah muncul; hal ini menunjukkan bahwa *metallothionein* bersifat sensitif; dengan demikian mendukung hasil penelitian tentang konsentrasi terendah Cd, Pb dan Hg yang menyebabkan munculnya *metallothionein*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata kemampuan ikan mas untuk mengakumulasi logam berat Cd di hati adalah sebesar 0,051233 L/kg, Pb sebesar 0,026880 L/kg dan Hg sebesar 0,581857 L/kg. Sedangkan rerata kemampuan ikan nila untuk mengakumulasi logam berat Cd di hati adalah sebesar 0,678267 L/kg, Pb sebesar 0,081211 L/kg dan Hg sebesar 0,959096 L/kg. Hal ini menunjukkan bahwa ikan mas dan nila masing-masing dapat menyerap logam Cd, Pb dan Hg yang terdapat di Kaligarang dan mengakumulasikannya di dalam jaringan tubuh. Oleh karena itu berdasarkan nilai BCF pada ikan mas dan ikan nila mengindikasikan bahwa paparan logam berat Cd, Pb dan Hg berpotensi menimbulkan resiko adanya toksisitas logam berat yang berasal dari perairan Kaligarang.

Berdasarkan analisis statistik tersebut, nilai BCF yang memunculkan MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg pada ikan mas dan ikan nila masing-masing mempunyai nilai yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya kesamaan hasil dengan analisis statistik tentang konsentrasi terendah yang menyebabkan munculnya MT-Cd. Kemampuan menyerap/ mengakumulasi pada logam Cd rendah tetapi kemampuan menginduksi terbentuknya *metallothionein-Cd* tinggi dibanding logam Hg yang menginduksi terbentuknya MT-Hg. Pada logam Hg memiliki kemampuan menginduksi terbentuknya *metallothionein* kecil, sehingga meskipun kemampuan menyerapnya besar dan banyak logam Hg yang diserap serta diakumulasi, namun MT-Hg tidak segera muncul, karena logam Hg tidak segera menginduksi protein *thionein* untuk membentuk *metallothionein (MT-Hg)*. Berbeda dengan logam Cd yang memiliki kemampuan menyerap kecil, tetapi kemampuan menginduksi terbentuknya *metallothionein* besar, maka MT-Cd segera muncul/muncul paling awal (meskipun akumulasi baru sedikit, Cd segera menginduksi *thionein* sehingga terbentuk MT-Cd).

Sebagaimana hasil penelitian berikut yang menyatakan bahwa semua logam dapat menginduksi pembentukan *metallothionein*, tetapi Zn memiliki pengaruh yang lebih potensial dibanding Ni dan Ag. Induksi Cd dan Hg terhadap pembentukan *metallothionein* lebih tinggi tergantung pada kondisi pajanan (Amiard, Barka, Pellerin dan Rainbow 2006). Hal ini berkaitan dengan kemampuan afinitas elektron dari masing-masing logam untuk berikatan dengan *thionein* dan membentuk *metallothionein* (Legras, Mouneyrac, Amiard 2000; Brown, Galloway, Lowe 2004), juga tergantung pada lama pajanan dan konsentrasi polutan (Mouneyrac, Amiard, Cottier 2002; Barka, Pavillon, Amiard 2001; Del Ramo, Torreblanca, Martinez 1995; Bebiano, Nott, Langston 2000; Hamza-Chaffai, Amiard, Pellerin dan Joux 2000; Geffard 2001; G'eret 2000; Brown, Galloway, Lowe, 2004). Logam berat Cd memiliki afinitas yang tinggi dibanding Hg dan Pb dalam membentuk suatu ikatan baru. Dengan demikian kemampuan menginduksi terbentuknya *metallothionein* pada logam Cd juga tinggi. Kemampuan menginduksi yang tinggi menyebabkan munculnya *metallothionein* lebih awal. Semakin besar nilai BCF, maka semakin besar pula konsentrasi polutan yang terakumulasi pada organisme (Ossana, Bettina, Alfredo 2009). Namun akumulasi tinggi tidak selalu menyebabkan munculnya *metallothionein* lebih awal. Karena terbentuknya *metallothionein* tergantung kemampuan menginduksi yang dimiliki oleh setiap logam. Adanya akumulasi dan kemampuan menginduksi yang tinggi akan menyebabkan munculnya *metallothionein* lebih awal. Meskipun ada akumulasi apabila logam yang terakumulasi tidak memiliki kemampuan menginduksi yang tinggi maka *metallothionein* tidak segera muncul.

Adanya akumulasi logam berat Cd, Pb dan Hg pada hati ikan pada penelitian ini menentukan nilai *Bioconcentration Factor* (BCF) yaitu besarnya kemampuan untuk

mengakumulasi logam berat di hati oleh organisme dari lingkungan perairan yang terpajan oleh logam berat. *Bioconcentration Factor* dapat ditentukan secara laboratorik, dan dianggap sebagai parameter kuantitatif untuk mengindikasikan resiko potensial ekotoksikologi zat tersebut (Van der Oost, Beyer, Vermeulan 2003). Withgott and Brennan (2007) dan Wardhana (2004) mengatakan bahwa proses perpindahan langsung suatu senyawa toksik dari air ke makhluk hidup disebut sebagai *biokonsentrasi*. Biokonsentrasi logam berat kadmium, dapat ditemukan pada makhluk hidup seperti ganggang, krustacea, molusca dan vertebrata, dan dengan terjadinya *biomagnifikasi* mengakibatkan biokonsentrasi Cd pada ikan paling besar. Apabila peningkatan akumulasi pada setiap mata rantai makanan 15 kali, maka akumulasi yang terdapat pada tubuh ikan merupakan proses penggandaan secara biologik (Sunu 2001, Wardhana 2004, Plaa 2007, Klaassen 2001).

Oleh karena itu dengan ditemukannya *metallothionein* sebagai respon dini tingkat molekuler pada ikan mas dan ikan nila di perairan Kaligarang, perlu peninjauan kembali terhadap nilai Baku Mutu logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan Kelas I yang ditetapkan pada Peraturan Pemerintah R.I. Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. Adapun Baku Mutu Cd, Pb dan Hg di perairan Kelas I, sesuai ketentuan tersebut masing masing sebesar 0,01 mg/L; 0,03 mg/L dan 0,001 mg/L. Hasil penelitian disertasi ini menunjukkan bahwa dalam konsentrasi Cd (0,006 mg/L), Pb (0,01 mg/L) dan Hg (0,0006 mg/L) di perairan sudah mengakibatkan induksi sintesis/ munculnya *metallothionein* baik MT-Cd, MT-Pb maupun MT-Hg di hati. Dengan demikian nilai maksimal Baku Mutu air kelas I yang ditetapkan pada Peraturan Pemerintah R.I. Nomor 82 Tahun 2001 Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air, yang menjadi acuan sekarang ini

seyogyanya direvisi masing-masing menjadi lebih kecil dari 0,006 mg/L untuk Cd, dan 0,01 mg/L untuk Pb serta 0,0006 mg/L untuk Hg. Pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan hendaknya sudah harus diwaspadai mulai konsentrasi Cd, Pb dan Hg masing-masing sebesar 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L. Demikian pula akumulasi Cd, Pb dan Hg pada hati ikan sudah harus diwaspadai sejak konsentrasi 0,00018 mg/kg untuk Cd; 0,00025 mg/kg untuk Pb dan 0,00090 mg/kg untuk Hg.

Selain itu nilai Baku Mutu yang selama ini digunakan di Indonesia, hendaknya ditambah dengan tipe ekosistem perairannya; misalnya air tenang atau air dengan arus deras, air dengan arus sedang. Sehingga setiap ekosistem perairan tadi, meskipun kelas airnya sama, namun Baku Mutu masing-masing ekosistem berbeda, sesuai dengan kondisi perairannya (perairan arus deras, arus sedang ataukah perairan tenang). Dengan demikian nilai Baku Mutu logam berat Cd pada perairan yang airnya mengalir deras akan berbeda dengan Baku Mutu Cd pada perairan yang airnya tenang dan arus sedang; masing-masing mempunyai nilai sendiri-sendiri, mengingat kecepatan arus akan mempengaruhi besarnya akumulasi logam berat pada perairan, yang akhirnya diduga akan mempengaruhi besarnya logam berat yang terakumulasi di tubuh ikan.

Biomarker *metallothionein* pada ikan telah dapat memberikan informasi terkait sistem deteksi pencemaran logam berat secara biologis (Bae, Nam, Park dan Park K. 2005; Brammel dan Wigginton 2010; Montaser, Magdy, Samir dan Gamal 2010). *Metallothionein* merupakan protein yang berfungsi untuk mendetoksifikasi logam dan untuk menjaga *homeostasis* logam di dalam sel. Fungsi *homesotasis* adalah mengurangi pengaruh beracun dari pajanan logam berat yang masuk ke dalam tubuh organisme melalui pembentukan *metalloenzyme*, yaitu *metallothionein* yang berikatan dengan enzim (Cobbett and Goldbrough 2002). Selain itu peran *metallothionein* dalam

organisme sangat bermacam-macam, antara lain *metallothionein* berperan dalam metabolisme logam dan sangat diperlukan untuk pertumbuhan, perkembangan dan fungsi fisiologis suatu organisme. *Metallothionein* dapat diibaratkan sebagai tempat penyimpanan ion seng dan tembaga (Cu dan Zn) terkait ketersediaan mikromineral Zn dan Cu yang dibutuhkan oleh organisme hidup (Viarenggo, Nott 1993; Roesijadi 2002, Philcox, Tilley, Coyle 1994).

Metallothionein berfungsi untuk mengembalikan ikatan enzim dengan logam dan menjadikan enzim yang semula tidak aktif menjadi aktif. Sebagai contoh, protein enzim yang pada awalnya kehilangan kemampuan fisiologi sebagai akibat dari pajanan logam kadmium, kemampuannya muncul kembali setelah berikatan dengan *metallothionein* seng (MT-Zn). Dengan kata lain *metallothionein* terlibat dalam pertukaran logam seng-kadmium. Oleh karena itu *metallothionein* tidak hanya mengikat logam yang berlebihan di dalam sel organisme, tetapi juga mengembalikan kemampuan fungsi protein enzim tidak aktif menjadi aktif. *Metallothionein* juga memiliki peran lain termasuk perlindungan terhadap radiasi pengion dan sebagai pertahanan/antioksidan (Viarenggo, Burlando, Ceratto 2000;. Cavaletto, Ghezzi, Burlando 2002;. Correia, Livingstone, Costa 2002;. Rodriguez-Ortega, Alhama, Funes, 2002; Cai, Satoh, Tohyama, 1999).

B.2.6. Metallothionein Pada Ikan Mas dan Ikan Nila sebagai

Biomarker Pencemaran Cd, Pb dan Hg

Pada bahasan berikut ini akan dikaji mengenai ikan yang mempunyai *metallothionein* sensitif sebagai biomarker pencemaran logam berat, Cd, Pb dan Hg di perairan yang konsentrasinya masih memenuhi Baku Mutu.

Berdasarkan hasil penelitian disertasi ini menunjukkan bahwa rerata nilai akumulasi logam berat pada hati ikan nila yang memunculkan *metallothionein* sebesar $(0,001819 \pm 0,000231)$ mg/kg dan pada ikan mas sebesar $(0,000308 \pm 0,000030)$ mg/kg. Sedangkan hasil uji statistik *Mann-Whitney* terhadap akumulasi logam berat pada ikan mas dan ikan nila diperoleh signifikansi sebesar $p = 0,006$ ($p < 0,01$). Dengan demikian berarti signifikansi hasil uji lebih kecil dari 0,01 sehingga dapat dikatakan bahwa uji beda terhadap ikan mas dan ikan nila menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan akumulasi logam berat pada ikan mas dan ikan nila. Berdasarkan nilai rerata terlihat bahwa ikan mas memiliki rerata konsentrasi logam berat yang memunculkan MT lebih rendah dari ikan nila. Dengan demikian berarti *metallothionein* ikan mas lebih sensitif dibandingkan dengan ikan nila. Hal ini diperkuat dengan analisis Probit; pada uji regresi probit konsentrasi Cd, Pb dan Hg pada ikan nila masing-masing sebesar 0,00023 mg/kg, 0,00028 mg/kg dan 0,00102 mg/kg sudah memunculkan biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Sedangkan pada ikan mas dengan konsentrasi logam berat Cd, Pb dan Hg di hati masing-masing sebesar 0,00018 mg/kg, 0,00025 mg/kg dan 0,00090 mg/kg sudah memunculkan biomarker *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg). Hal ini menunjukkan bahwa *metallothionein* ikan mas muncul pada konsentrasi yang lebih rendah dibandingkan ikan nila. Dengan kata lain pada ikan mas konsentrasi logam berat di hati lebih rendah sudah dapat menginduksi munculnya biomarker *metallothionein* dibandingkan dengan ikan nila. Oleh karena itu *metallothionein* pada hati ikan mas lebih sensitif daripada ikan nila. Hal tersebut didukung pula oleh hasil analisis statistik untuk nilai BCF. Pada ikan mas nilai BCF yang memunculkan MT lebih rendah daripada nilai BCF pada ikan nila, dengan demikian *metallothionein* ikan mas lebih sensitif daripada ikan nila.

Berdasarkan kajian penelitian ditemukan bahwa munculnya MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg pada ikan mas terjadi pada konsentrasi Cd, Pb dan Hg yang lebih rendah daripada ikan nila. Hal ini kemungkinan terjadi karena tubuh ikan mas lebih sensitif terhadap pajanan logam berat, sehingga bila ada pajanan logam berat sedikit saja akan segera terjadi reaksi induksi sintesis *metallothionein* dibanding dengan tubuh ikan nila. Ikan sebagai organisme yang berada di lingkungan perairan pasti terkontaminasi oleh polutan yang mencemari lingkungan perairan. Populasi ikan yang berada di lingkungan perairan tersebut dapat terkontaminasi baik oleh kontaminan campuran kompleks antropogenik termasuk polutan organik maupun an organik (seperti logam berat). Ikan nila (*Oreochromis niloticus* L.) dan *Cyprinus carpio* L. (ikan mas) sesuai kultur budaya biasa dikonsumsi manusia sebagai bahan pangan dan merupakan suatu spesies yang cocok untuk pengujian polutan yang memberikan dampak khususnya di perairan mengingat ikan nila dan mas banyak terdapat di alam, jumlahnya melimpah dan terdistribusi luas di daerah tropis.

Ossana, Bettina, Alfredo (2009) menyatakan bahwa *Cyprinus carpio* L. (ikan mas) adalah spesies yang digunakan sebagai organisme uji dalam bioassay toksisitas karena memiliki respon fisiologis terhadap keberadaan kontaminan lebih sensitif dibanding spesies ikan yang lainnya. De Conto Cinier, Petit, Faure dan Garin (1999) menyatakan hal yang sama bahwa ikan mas segera memberikan respon fisiologis terhadap pajanan logam berat. Oleh karena itu, mengingat spesies ini sensitif terhadap pajanan logam berat maka mudah disesuaikan dengan kondisi laboratorium untuk penelitian eksperimental. Berdasarkan catatan nilai morfometrik menunjukkan bahwa waktu pemaparan logam segera mempengaruhi terjadinya stres pada ikan mas, sehingga adanya dampak toksisitas pada ikan mas segera diketahui. Dengan demikian pajanan

logam berat pada *Cyprinus carpio* menyebabkan *akut subletal*, meskipun waktu pemaparan relatif singkat (lima hari) (Ossana, Bettina, Alfredo 2009).

Metallothionein ditemukan pada konsentrasi logam berat di perairan Kaligarang yang masih memenuhi Baku Mutu dan pada akumulasi logam berat yang rendah pada hati ikan mas dan nila. Sehingga dapat dikatakan bahwa *metallothionein* lebih dahulu muncul pada ikan mas dengan konsentrasi logam berat yang lebih rendah daripada ikan nila. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa *metallothionein* ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) lebih sensitif terhadap pajanan logam berat dibanding ikan nila. Penemuan *metallothionein* ini merupakan respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan, sehingga dapat digunakan sebagai alat deteksi dini tingkat biomolekuler terhadap pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan. Penelitian ini menunjukkan bahwa *metallothionein* pada hati ikan mas merupakan biomarker sensitif yang mengindikasikan adanya pajanan kadmium, timbal dan merkuri di perairan. Dengan demikian biomarker *metallothionein* yang ditemukan pada hati ikan mas dapat digunakan sebagai biomonitoring lingkungan perairan yang pada prinsipnya dapat digunakan sebagai pencegahan preventif pencemaran lingkungan perairan oleh logam berat.

Perbedaan penelitian disertasi ini dengan penelitian-penelitian lain adalah bahwa peneliti ingin menemukan biomarker paling sesuai (sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*) sebagai penanda biologis pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg yang konsentrasinya di perairan masih memenuhi Baku Mutu air kelas I. Berdasarkan hasil penelitian dan analisis regresi Probit menunjukkan bahwa biomarker *metallothionein* merupakan penanda biologis yang paling sesuai sebagai penanda biologis adanya pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg dibandingkan biomarker

EROD, LSI, GSI sebagai penanda biologis pada perairan sungai yang terpajan Cd, Pb dan Hg dengan konsentrasi masih memenuhi Baku Mutu (Cd = 0,006 mg/L, Pb = 0,01 mg/L dan Hg = 0,0006 mg/L). Hal tersebut didukung oleh berbagai hasil penelitian yang dilakukan oleh peneliti lain baik nasional maupun internasional. Dengan demikian penggunaan biomarker untuk penanda biologis dari suatu polutan hendaknya disesuaikan dengan jenis polutannya, EROD untuk polutan organik, MT untuk polutan logam berat (an organik). *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD) dan *metallothionein* masing-masing memberikan indikasi yang sensitif terhadap pajanan polutan yang berbeda. *Ethoxyresorufin-O-diethylase* (EROD) sensitif terhadap pajanan senyawa organik, sedangkan *metallothionein* sensitif untuk pajanan logam berat.

Berdasarkan hal tersebut maka aktivitas EROD tidak dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat. LSI dan GSI dapat digunakan sebagai biomarker fisiologi, tetapi tidak dapat digunakan sebagai biomarker pencemaran logam berat, mengingat nilai LSI dan GSI sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor non polutan seperti penyakit, musim, dan tingkat nutrisi. *Metallothionein* merupakan penanda biologis yang paling sesuai sebagai biomarker tingkat molekuler dalam monitoring pencemaran logam berat di perairan. Dengan demikian *metallothionein* merupakan biomarker yang paling sesuai untuk deteksi dini logam berat di perairan. Hasil penelitian ini didukung oleh hasil penelitian Hanson (2008), Linderoth, Hansson, Liewenborg (2006), Sandstrom, Larsson, Andersson (2005) dan Larson, Forlin, Grahn (2000) bahwa salah satu fungsi dari biomarker adalah sebagai tanda peringatan dini (*early warning*) dari pengaruh *xenobiotic* secara biologis, yang bersifat spesifik, dan *universal*. Respon dini tingkat molekuler terhadap kualitas lingkungan memberikan peluang untuk melakukan langkah preventif sebagai upaya pencegahan akan terjadinya pencemaran lingkungan baik pencemaran ringan, sedang ataupun berat.

Pada akhirnya justifikasi dari penelitian disertasi ini adalah bahwa *metallothionein* (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) merupakan biomarker yang paling sesuai untuk penanda biologis pencemaran logam berat (Cd, Pb dan Hg) di perairan sungai yang konsentrasi polutannya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I, dibandingkan biomarker EROD, LSI maupun GSI. *Metallothionein* yang ditemukan ini dapat dijadikan sebagai penanda biologis yang paling sensitif, sehingga biomarker ini dapat diaplikasikan di lapangan sebagai alat deteksi dini dalam monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan maupun pada ikan, sehingga dapat ditentukan langkah pengelolaan dan pencegahan pencemaran lingkungan perairan. Biomarker *metallothionein* ini dapat digunakan pula sebagai alat deteksi dini dalam monitoring dan evaluasi pengolahan limbah logam berat di IPAL industri yang limbahnya mengandung logam berat Cd, Pb dan Hg. *Metallothionein* yang ditemukan pada hati ikan mas dan nila tersebut bersifat sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*.

Penggunaan penanda biologis/biomarker, *metallothionein* diperlukan untuk mendeteksi sekaligus memantau keberadaan logam berat dalam badan air. Di samping itu, penggunaan penanda biologis mampu memberikan data intensitas logam berat yang terserap oleh sampel organisme serta toksisitas dan gangguan yang ditimbulkan pada sistem biologis pada kadar tertentu. Dengan kajian biomarker, pencemaran di perairan bisa dikendalikan, sejak agen pencemar di perairan konsentrasinya masih rendah/masih memenuhi Baku Mutu, sehingga pencemaran yang terjadi di tingkat ekosistem dapat dicegah, karena pada tingkat sub seluler sudah ada sinyal peringatan dini terjadinya gejala pencemaran. Dengan demikian pencemaran sudah bisa ditanggulangi sejak tingkat sub seluler, sehingga tidak menimbulkan pencemaran pada tingkat ekosistem seperti yang terjadi di berbagai perairan saat ini.

Biomarker *metallothionein* yang ditemukan pada disertasi ini sangat diperlukan sebagai alat deteksi dini dalam monitoring pencemaran logam berat di perairan, sehingga air yang ada di ekosistem perairan tersebut dapat ditetapkan peruntukkannya/kelasnya, sebagaimana yang ditetapkan pada Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air. Biomarker *metallothionein* pada ikan sebagai alat monitoring pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan sudah saatnya untuk digunakan dalam pengelolaan kualitas air di Indonesia. Sebagaimana pendapat Viarengo, Lowe, Bolognesi, Fabbri (2007), Hanson (2008), Larsson, Forlin, Grahn, Landner (2000) dan Sandstrom, Larsson, Andersson, Appelberg (2005) bahwa penggunaan biomarker/ penanda biologis; sebagai respon biologis tingkat molekuler dari efek logam berat terhadap kehidupan biota akuatik, khususnya ikan sebagai alat monitoring pencemaran lingkungan perairan sudah saatnya digunakan sebagai upaya pencegahan pencemaran di perairan.

Penelitian biomarker menggunakan ikan mas dan nila hanyalah sebuah contoh yang penerapannya di lapangan sebagai alat monitoring dapat menggunakan ikan jenis apapun yang hidup di perairan yang akan dipantau pencemaran logam beratnya. Ikan yang dijadikan sampel dipilih yang umurnya sudah dewasa/siap panen, sehingga sudah cukup lama (kurang lebih 6 minggu) terpajan/terpapar logam berat di perairan tempat hidupnya. Sampel ikan diambil hatinya kemudian dipreparasi untuk isolasi *metallothionein*, dan dianalisis menggunakan HPLC untuk menentukan ada tidaknya induksi sintesis *metallothioein* pada hati. Selain hati dapat pula menggunakan ginjal, apabila ginjalnya tidak terlalu kecil sebagaimana ginjal ikan mas dan nila dalam penelitian ini. Ginjal yang terlalu kecil tidak mencukupi berat minimal sampel yang dipreparasi untuk isolasi *metallothionein* sebelum analisis HPLC.

B.3. Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian lapangan di perairan Kaligarang, sehingga sulit untuk membuat variasi konsentrasi seperti halnya bila penelitian dilakukan pada skala laboratorium. Oleh karena itu kadar logam berat (Cd, Pb dan Hg) yang terakumulasi pada hati ikan tergantung pada konsentrasi logam berat yang secara alami mencemari perairan tersebut.

Penelitian ini hanya mengukur logam berat di air sungai, tanpa memperhitungkan kandungan logam berat pada sedimen di dasar perairan. Namun demikian validitas penelitian tetap terjaga; karena dengan memakai Karamba Jaring Apung ikan hanya berenang-renang di air dalam karamba, dan tidak dapat berenang sampai menyentuh sedimen, mengingat posisi dasar karamba berada pada ketinggian 1m diatas dasar sungai (1m di atas sedimen). Dengan demikian logam berat yang masuk ke tubuh ikan hanya berasal dari logam berat yang terlarut di air sungai dan sedimen halus yang ada di air saja, sedangkan logam berat yang ada di sedimen dasar sungai tidak ikut terabsorpsi. Adapun kandungan Cd, Pb dan Hg pada sedimen masing-masing sebesar 0,01 mg/kg; 0,15 mg/kg dan 0,009 mg/kg. (BLHD Kota Semarang, 2010).

Penelitian ini terbatas hanya menggunakan dua jenis ikan, sementara di lapangan begitu banyak species-species ikan yang lain. Namun karena di Balai Benih Ikan tidak ada ikan-ikan air tawar yang lain sebagaimana dijumpai di sungai-sungai maka untuk keperluan penelitian eksperimen hanya dapat menggunakan ikan mas dan ikan nila. Sedangkan ikan mas dan ikan nila merupakan ikan yang mempunyai nilai ekonomis dan merupakan ikan konsumsi sehari-hari bagi masyarakat.

BAB VI

KESIMPULAN DAN REKOMENDASI

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Kualitas perairan Kaligarang lokasi penelitian masih memenuhi baku mutu air kelas I. Air sungai terkontaminasi logam berat Cd, Pb dan Hg masing-masing sebesar $(0,006 \pm 0,001)$ mg/l, $(0,01 \pm 0,005)$ mg/l dan $(0,0006 \pm 0,0001)$ mg/l.
2. *Metallothionein* merupakan biomarker yang paling sesuai sebagai penanda biologis kontaminasi/pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan dengan konsentrasi logam berat masih memenuhi nilai Baku Mutu, sedangkan EROD, LSI dan GSI tidak sesuai untuk biomarker logam berat Cd, Pb dan Hg. Biomarker *metallothionein* bersifat sensitif, spesifik, *early warning* dan *universal*; sebagai alat monitoring pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan yang larut di air secara bersamaan dan bercampur jadi satu.
3. Besarnya konsentrasi terendah logam berat Cd, Pb dan Hg dalam hati ikan yang dapat menginduksi sintesis *metallothionein* sehingga menyebabkan munculnya biomarker *metallothionein* paling awal berdasarkan uji regresi linear Probit berturut-turut masing-masing sebesar 0,18 $\mu\text{g/kg}$; 0,25 $\mu\text{g/kg}$; dan 0,90 $\mu\text{g/kg}$, untuk ikan mas dan 0,23 $\mu\text{g/kg}$; 0,28 $\mu\text{g/kg}$; dan 1,02 $\mu\text{g/kg}$ untuk ikan nila. Dengan demikian dapat ditemukan suatu parameter toksikologi baru yaitu *Lowest Induction Concentration (LIC)*.

4. *Metallothionein-Cd* merupakan biomarker (penanda biologis) yang muncul paling awal sebagai biomarker pencemaran Cd, dan diikuti berturut-turut oleh munculnya MT-Pb sebagai biomarker pencemaran Pb, serta MT-Hg sebagai biomarker pencemaran Hg di perairan.
5. Besarnya nilai BCF pada logam berat Cd yang menyebabkan munculnya biomarker *metallothionein-Cd* paling awal, berdasarkan analisis statistik masing-masing sebesar 0,0678267 L/kg pada ikan nila dan 0,051233 L/kg pada ikan mas; sedangkan MT-Pb muncul pada nilai BCF sebesar 0,081211 L/kg pada ikan nila dan 0,026880 L/Kg pada ikan mas. Adapun MT-Hg muncul pertama kali pada nilai BCF sebesar 0,959096 L/kg pada ikan nila dan 0,581857 L/kg pada ikan mas. Nilai BCF yang diperoleh menggambarkan BCF yang belum mencapai jenuh (*steady state*).
6. *Metallothionein* pada hati ikan mas lebih sensitif dibanding ikan nila sebagai biomarker pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan sungai yang konsentrasinya masih memenuhi nilai Baku Mutu air kelas I.

B. Rekomendasi

B.1. Rekomendasi Bagi Pemerintah

1. Biomarker/penanda biologis yang ditemukan (MT-Cd, MT-Pb dan MT-Hg) pada hati ikan mas hendaknya dijadikan alat deteksi pencemaran dini yang dapat diaplikasikan dilapangan untuk mendeteksi secara dini adanya pencemaran Cd, Pb dan Hg di perairan sungai maupun pada IPAL industri yang menghasilkan limbah Cd, Pb dan Hg sebagai upaya pencegahan pencemaran di perairan. Teknologi ini diharapkan menjadi masukan bagi pemerintah terkait sebagai salah satu alternatif model monitoring lingkungan perairan. Dalam aplikasinya di lapangan dapat

menggunakan ikan jenis apapun yang langsung diambil pada perairan yang akan dipantau logam beratnya, usia dewasa siap panen.

2. Pencemaran logam berat Cd, Pb dan Hg di perairan hendaknya sudah harus diwaspadai mulai konsentrasi 0,006 mg/L untuk Cd; 0,01 mg/L untuk Pb dan 0,0006 mg/L untuk Hg. Demikian pula akumulasi Cd, Pb dan Hg di hati ikan sudah harus diwaspadai pula mulai konsentrasi Cd, Pb dan Hg masing-masing 0,18 µg/kg, 0,25 µg/kg dan 0,90 µg/kg. Dengan demikian sudah saatnya dilakukan revisi pada nilai baku mutu logam berat secara nasional mengacu pada hasil penelitian ini. Sedangkan revisi NAB logam berat Cd, Pb dan Hg pada ikan juga sudah saatnya dilakukan dengan mengacu pada nilai LIC.
3. Penelitian dengan menggunakan media sungai Kaligarang hanyalah sebuah contoh; yang hasilnya berpeluang untuk dapat diterapkan pada perairan yang lain. Biomarker MT pada ikan sebagai penanda biologis pencemaran dini seyogyanya di jadikan sebagai *early warning* untuk menentukan nilai Baku Mutu logam berat secara nasional sehingga perlu ada revisi pada Peraturan Pemerintah yang menetapkan Baku Mutu yang berlaku sekarang dengan peraturan yang baru yang mengacu pada temuan disertasi ini, yakni Baku Mutu Cd, Pb dan Hg diturunkan dari masing-masing sebesar 0,01 mg/L, 0,03 mg/L dan 0,001 mg/L menjadi lebih kecil dari 0,006 mg/L, 0,01 mg/L dan 0,0006 mg/L.
4. Air Kaligarang sebagai sumber air baku air minum PDAM hendaknya dalam proses pengolahan air minum dilakukan pengikatan logam berat sampai benar-benar bersih sebelum didistribusikan ke masyarakat, sehingga air minum yang dikonsumsi tidak membahayakan kesehatan masyarakat. Andaikan pengikatan logam berat tidak dapat membersihkan logam berat sampai benar-benar bersih maka hendaknya air tersebut hanya dapat digunakan untuk mencuci dan mandi.

5. Dengan penemuan LIC dan biomarker *metallothionein* maka dapat direkomendasikan : 1) **Internasional** ; LIC sebagai acuan untuk menetapkan kembali NAB Cd, Pb dan Hg pada ikan standar WHO yang berlaku sekarang (*World Health Organization Rapid Assessment of sources of Air, Water and Land pollution, 1982*), 2). **Nasional** ; sebagai acuan revisi Nilai Baku Mutu Cd, Pb, Hg di perairan dalam PP 82 Tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air, serta sebagai acuan peninjauan kembali Peraturan Menteri Kesehatan No. 492 Menkes/Per/IV/2010, Tentang Persyaratan Kualitas Air Minum dan 3). **Regional**; sebagai acuan untuk menetapkan kelas air sesuai peruntukannya (kelas 1, 2, 3 atau 4) dalam Peraturan Gubernur Jawa tengah No 156 Tahun 2010 tentang Peruntukkan Air dan Pengelolaan Kualitas Air Sungai Garang, dan sekaligus menunjang pelaksanaan PROKASIH Jawa Tengah.

B.2. Rekomendasi Bagi Masyarakat

1. Masyarakat yang biasa mengambil ikan-ikan Kaligarang untuk dikonsumsi maupun diperjual belikan hendaknya menghentikan kegiatannya karena ikan-ikan tersebut mengakumulasi logam berat. Perairan-perairan lainnya yang mengandung logam berat (sungai, teluk, danau) hendaknya jangan digunakan sebagai sumber air minum tanpa proses pengikatan logam berat; dan ikan yang hidup di dalamnya jangan dikonsumsi sebagai lauk pauk sehari-hari; mengingat logam berat bersifat *bioakumulasi*, *biomagnifikasi*, toksik dan *karsinogenik* sehingga dapat berdampak buruk bagi kesehatan masyarakat. Logam berat yang terlarut di air maupun terakumulasi pada tubuh ikan melalui rantai makanan atau bersama air minum dapat terakumulasi pada tubuh manusia sehingga mencapai konsentrasi toksik dan membahayakan kesehatan. Ikan-ikan yang dikonsumsi hendaknya diberi label untuk

menunjukkan apakah ikan tersebut berasal dari perairan yang mengandung logam berat, sehingga konsumen mengetahui aman atau tidak apabila dikonsumsi.

2. Ikan yang diharapkan akan lebih banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia karena kandungan proteinnya yang tinggi sehingga akan meningkatkan kecerdasan, jangan sampai menjadi malapetaka bagi konsumen di kemudian hari; oleh karena itu masyarakat harus selektif dalam mengonsumsi ikan-ikan di perairan bebas karena perairan bebas rawan terkontaminasi logam berat dari buangan industri maupun limbah rumah tangga. Untuk konsumsi sehari-hari lebih baik menggunakan ikan yang dibudidayakan di kolam yang airnya bersih dari kontaminasi logam berat. Konsumsi ikan seyogyanya diambil dagingnya saja, sedangkan insang, hati dan ginjal serta organ dalamnya jangan ikut dimakan.

B.3. Rekomendasi Bagi Peneliti

1. Penelitian biomarker pada hati ikan sebagai alat monitoring dapat dilanjutkan dengan melakukan penelitian dengan time series yang lebih lama/diperpanjang sampai absorpsi logam berat mencapai jenuh (*steady state*) sehingga dapat diketahui nilai BCF yang telah mencapai *steady state*. Dengan demikian apabila di perairan terdapat polutan sebesar X mg/l akan dapat diprediksi besarnya konsentrasi polutan yang terakumulasi pada tubuh ikan tanpa melakukan pembedahan.
2. Penelitian tentang *metallothionein* pada ikan sebagai alat monitoring dapat dilanjutkan dengan penelitian biomarker *metallothionein* pada tanaman air, misalnya Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms), Kangkung air, Kiyambang maupun tanaman air lainnya yang hidup di perairan tercemar logam berat sebagai alat monitoring.
3. Penelitian sejenis dapat dilakukan di dasar perairan (pada sedimen) dengan mengkaji biomarker *metallothionein* pada kerang sebagai alat monitoring sedimen sungai.

4. Penelitian sejenis dapat dilanjutkan dengan menggunakan analisis HPLC pada sampel dan dilanjutkan dengan larutan *metallothionein* standar apabila di perairan hanya terdapat polutan tunggal dan akan mengetahui konsentrasi *metallothionein* sebagai biomarker logam berat secara umum, tanpa ingin tahu jenis logam beratnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiard J.C., Amiard T.C, Barka S., Pellerin J, Rainbow P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76:160–202
- Aravind P. and Prasad M.N.V. 2005. Zinc mediated protection to the conformation of carbonic anhydrase in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum L.* *Plant Science*, 169: 245-254
- Argawala, S.P. 2006. *Environmental Studies*. Narosa Publishing House PVT. LTD. New Delhi Chennai Mumbai Kolkata.
- Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N. 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 62, pp.42–52.
- Arnold H, Pluta HJ, Braunbeck T. 1995. Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in-vivo-ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 33:17–43
- Arnold, B.S., Jagoe, CH, Gross, T.S., Howerth, EW, Reinert, R.E. 2000. *Effect of Low Levels of Methyl Mercury on The Development of Gonads in The Nile Tilapia*. Presented at the 20th annual meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Philadelphia.
- Aziz, S. H. A, dan Ghazaly N.E.L, 2006. Effect Of Pollutants in Coastal Water Of Jeddah on 2-The Histological Structure Of Liver Of The Fish *Saiganus rivulatus*. Saudi Arabia. *Egyptian Journal Of Aquatic Research* 1687-4285 Vol. 32 No.1, 2006:316-333.
- Babich, H., and G. Stotzky. 2001. Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the mikrobiota. Dalam J.O. Nriagu (eds.). *Aquatic Toxicology*. A Wiley Interscience Publication, New York. P. 1-46.
- Badan Lingkungan Hidup Propinsi Jawa Tengah, 2010. *Laporan Pemantauan Kualitas Air Kaligarang*. BLH Jateng. Semarang.
- Badan Lingkungan Hidup Propinsi Jawa Tengah Kota Semarang. 2010. *Laporan Status Lingkungan Hidup Kota Semarang Tahun 2010*. BLH Kota Semarang.
- Bae H, Nam SS, Park HS, Park K. 2005. Metallothionein mRNA sequencing and induction by cadmium in gills of the Crucian Carp, *Carassius auratus*. *J Health Sci* 51(3): 284-290.
- Badan Lingkungan Hidup Jawa Tengah., 2009, *Laporan Program Kali Bersih XXI*. BLH Jateng Semarang.

- Barka, S., Pavillon, J.F., Amiard, J.C., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTL levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C 128, 479–493.
- Bebianno, M.J., Nott, J.A., Langston, W.J., 2000. Cadmium metabolism in the clam *Ruditapes decussata*: the role of metallothioneins. *Aquat. Toxicol.* 27, 315–334.
- Bebianno, M.J., Cravo, A., Miguel, C., Morais, S., 2003. Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspersa*: variation with size. *Sci. Total Environ.* 301, 151–161.
- Bernard, A. and Lauwerys. 2001. *Cadmium in Human Population*. Experientia 40, Birkhauser Verlag CH-4010 Bazel/Switzerland. p. 143-151.
- Berthet, B., Mouneyrac, Perez, T., Amiard-Triquet, C., 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141 (3), 306–313.
- Binz, P.A., Kagi, J.H.R., 2000. *Metallothionein: molecular evolution classification*. In: Klaassen, C. (Ed.), *Metallothionein IV*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 7–13.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.-D., Trottier, S., 2002. Molluscan shellfish biomarker study of the Québec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Environ. Toxicol.* 17, 170–186.
- Boudou A., D.G. Scudlark, and J.P. Desmazes. 2000. [Ecotoxicological](#) role of the membran barrier in transport and bioaccumulation of mercury [compound](#). [Dalam. J.O. Nriagu](#) (eds.). *Aquatic Toxicology*. John Wiley and Sons, New p. 117-152.
- Brammell, Ben F. & Andrew J. Wigginton. 2010. Differential Gene Expression in Zebrafish (*Danio rerio*) Following Exposure to Gaseous Diffusion Plant Effluent and Effluent Receiving Stream Water. *American Journal of Environmental Sciences* 6 (3): 286-294.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 66, 267–278.
- Brouwer, M., Syring, R., 2002. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *J. Inorg. Biochem.* 88, 228–239.
- Butler, R.A., Roesijadi, G., 2001. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of a molluscan metallothionein mRNA. *Aquat. Toxicol.* 54, 59–67.
- Cai, L., Satoh, M., Tohyama, C., Cherian, M.G., 1999. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132, 85–98.
- Campagne MV, Thibodeaux H, Van Bruggen N, Cairns B, Lowe DG. 2000. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci*, 15, 5200-5207.
- Carajaville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, V.C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal

- environment of the Iberian Peninsula: practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295–311.
- Carpene E, G. Andreani & G. Isani. 2007. Metallothionein Function and Structural Characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21:35-39.
- Cavaletto, M., Ghezzi, A., Burlando, B., Evangelisti, V., Cerratto, N., Viarengo, A., 2002. Effect of hydrogen peroxide on antioxidant enzymes and metallothionein level in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 447–455.
- Ceratto, N., Dondero, F., Loo, J.-W., Burlando, B., Viarengo, A., 2002. Cloning and sequencing of a novel metallothionein gene in *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 217–222.
- Chaabouni, LR., Machreki, AM., Hamza-Chaffai, A. 2011. Use of metallothioneins as biomarkers for environmental quality assessment in the Gulf of Gabès (Tunisia). [*Environ Monit Assess.* 25 May.](#)
- Chassaigne, Hubert & Ryszard Lobinski (1999) Rapid analysis for Cadmium Metallothionein complexes by HPLC Using Microparticulate Stationary Phases”. *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999): 522-525.
- Chandrasekera L.W.H.U. Pathiratne A. and Pathiratne K. A. S. 2008. Effects of water borne cadmium on biomarker enzymes and metallothioneins in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka* ; 36 (4):315-322
- Chen, C., Chou Liu, M., Liang Shih, M., Yu, S., Yeh, C., Ting Lee, S., Yang, T., Hung, S., 2001. Microsomal monooxygenase activity in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to a bleached kraft mill effluent using different exposure systems. *Chemosphere* 45, 581-588.
- Ch`evre, N., Gagn`e, F., Gagnon, P., Blaise, C., 2003. Application of rough sites analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* 51, 13–23.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182.
- Choirudin dan Indrajid (2007). *Eceng Gondok Penyerap Logam Berat Cd di Sungai Kaligarang Semarang*. Makalah Olimpiade Science Tingkat Internasional di Turki, SMA Semesta Semarang.
- Connell, Des W. 2002. *Bioakumulasi Senyawaan Xenobiotic*. UI Press, Jakarta. Hal 5-75, 146-211.
- Connell, D.W and G.J. Miller. 2001. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. A Wiley Interscience Publication. London
- Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Mar. Environ. Res.* 54, 357–360.
- Cosson, R.P., 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cell. Mol. Biol.* 46 (2), 295–309.

- Cotou, E., Vagias, C., Rapti, T., Roussis, V., 2001. Metallothionein levels in the bivalves *Callista chione* and *Venus verrucosa* from two Mediterranean sites. *Z. Naturforsch.* 56, 848–852.
- De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D. and Bouvet, Y. 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comparative Biochemical Physiology*, Vol. C122, pp.345–352.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martinez, M., Pastor, A., Diaz-Mayans, J., 1995. Quantification of cadmium-induced Metallothionein in Crustaceans by the silver-saturation Method. *Mar. Environ. Res.* 39, 121–125.
- Dewi.N.K., Purwanto, Henna Rya Sunoko 2010. *Biomarker Pada Ikan Sebagai Biomonitoring Pencemaran Logam Berat Kadmium di Perairan Kaligarang Semarang*. Laporan Penelitian Hibah Doktor. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Domouthsidou, G.P., Dailianis, S., Kaloyianni, M., Dimitriadis,V.K.,2004. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers. Combination with trace metals concentrations. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 572–586.
- Donatus, I.A. 2001, *Toksikologi Dasar*. Laboratorium Farmalogi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, UGM, Yogyakarta.
- Downs, C.A., Dillon, R.T., Fauth, J.E., Woodley, C.M., 2001. A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to natural and anthropogenic stressors. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 259, 189–214.
- Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B., Ivankovic, D., Pavicic, J., 2004. Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Environ. Intern.* 30, 1019–1025.
- Dreisbach, R.H. 2000. *Hand Book of Poisoning*. eleven edition. Lange Medical Publication, California. p. 274.
- Duncan Rigby, K.E, Stillman MJ. 2006. Metal-dependent protein folding: metallation of metallothionein. *J Inorg Biochem*;100:2101–7.
- Effendie, M.I. 2002. *Biologi Perikanan*. Yayasan Pustaka Nusantara. Yogyakarta.
- Ekpo, K.E., I.O Asia, K.O. Amayo & D.A. Jegede. 2008. Determination of Lead, Cadmium and Mercury in Surrounding Water and Organs of Some Species of Fish From Ikpoba River in Benin City, Nigeria. *International Journal of Physical Science* 3 (11):289-292.
- English,T.E., Storey, K.B., 2003. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the foot muscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Biol.* 206,2517–2524
- Everaats, J.M., 2006. Uptake and release of cadmium in various organs of the common mussel, *Mytilus edulis* (L.) *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 45, 560-567
- Filipic M, Fathur T, Vuldrag M. 2006. *Molecular Mechanisms of Cadmium Induced Mutagenecity*. *Journal. Human & Experimental Toxucology*. Vol. 25. No. 2. 67-77. Slovenia.

- Finney, D.J. 2009. *Probit Analysis; A Statistical Treatment Of The Sigmoid Response Curve*, Cambridge at the University Press.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyama, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Salazar, M., 2002. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environ. Toxicol.* 17, 149–159.
- Galt, J. Scheidig, F, Siestrup, C.G. 2006. The Toxicity Of Cadmium And Resulting Hazards For Human Health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*.
- Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., Mouneyrac, C., 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and a metal-rich sites. *Biomarkers* 6 (2), 91–107.
- Géret, F., Rainglet, F., Cosson, R.P., 2000. Comparison between isolation protocols commonly used for the purification of molluscs metallothioneins. *Mar. Environ. Res.* 46, 545–555.
- Giarrocco, V., Bruce, Q., Matthew, K., 1997. Retention Time Locking : Concepts and Applications. *Agilent Technologies Inc.* 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808-1610 USA.
- Hadi, Sudharto P.2005. *Dimensi Lingkungan Perencanaan Pembangunan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot* 53: 1–11.
- Hammond, P.B. and [R.P. Beliles](#). 2001. *Metals In Toxicology The Basic Science of Poisons*. (Casarett). 2nd ed. Mc Millan Publishing Co. Inc., New York. P.428-435.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B., 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C* 127, 185–197.
- Hanson N, Guttman E, Larsson A. 2006. The effect of different holding conditions for environmental monitoring with caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Journal of Environmental Monitoring* 8 (10):994-999.
- Hanson N, Larsson A. 2007. Influence of feeding procedure on biomarkers in caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) used in Environmental Monitoring. *Journal of Environmental Monitoring* 9 (2):168-173.
- 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.
- Hanson N, Larsson A. 2008^a. Experiences from a biomarker study on farmed rainbow trout used for Environmental Monitoring in a Swedish river. *Submitted Manuscript*.
- Hanson N, Larsson A. 2008^b. Biomarker analyses in fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill. *Submitted Manuscript*.
- Hanson N, Persson S, Larsson A. 2008. Analyses of perch (*Perca fluviatilis*) bile suggest increasing exposure to PAH and other pollutants in a reference area on the Swedish Baltic coast. *Journal of Environmental Monitoring*. In Press DOI:10.1039/b817703a.

- Hanson N, Forlin L, Larsson A 2008. Evaluation of Long Term Biomarker Data From Perch (*Perca Fluviatilis*) in The Baltic Sea Suggest Increasing Exposure To Environmental Pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. In press DOI:10.1897/08-259.1.
- Hellawell, J.M. 2000. *Biological Indicators of Freshwater Pollution And Environmental Management*. Elsevier Applied Science. London and New York. Hal. 58-76.
- Henna Rya Sunoko 2007. *Kajian Pemajanan Kronik Pb Lingkungan Terhadap Biosintesis Heme dengan Penanda Biologis δ Ala, Zn Protoporfirin, Protoporfirin dan Porfirin pada Anak*. Disertasi. Pasca Sarjana UNDIP. Semarang.
- Isani, G., Andreani, G., Kindt, M., Carpen`e, E., 2000. Metallothioneins (MTs) in marine molluscs. *Cell. Mol. Biol.* 46 (2), 311–330.
- Jessica D, Robert M, Frederic S, Arnaud B, Delphine L, Jean-Pierre, Patrick K.2007. Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers ? *Science of the Total Environment*. 372(2-3):497-514.
- Kartini & Danusaputro.H. 2005. Estimasi Penyebaran Polutan dengan Metode Self Potential (Studi Kasus TPA Jati barang, Kecamatan Mijen, Semarang) *Berkala Fisika* 8 (1):27-32.
- Katzung B.G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed (Internasional Ed), Boston, Ner York: Mc Graww Hill. P. 1-10.
- Kavun, V.Y., V.M. Shulkin and N.K. Khristoforova, 2002. Metal accumulation in mussels of the Kuril Islands, northwest Pacific Ocean, *Marine Environmental Res.*, 53: 219-226.
- Klaassen, C.D., J. Liu and S. Choudhuri, 1999. Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol.Toxico.*, 39: 267-294.
- Klaassen C.D. 2001. *Csarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th Ed. Mc. Graw Hill, New Yorks.
- Klotz A.V., Stegeman J.J. & Walsh C. (1984). An alternative 7-ethoxyresorufin)-deethylase activity assay; a countinuous visible spectrometric method for measurement of cytochrome P-450 monooxygenase activity. *Analytical Biochemistry* 140(1):138-145.
- Kosnett M.J. 2007. Heavy metal intoxication & chelators. In Katzung B.G. (ed): *Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed (International Ed), Boston, New York: Mc Graw Hill. P. 970-981.
- Kovarova, R, Rene Kizek, Vojtech Adam, Danka Harustiakova, Olga Celechovska, and Zdenka Svobodova. 2009. Effect of Cadmium Chloride on Metallothionein Levels in Carp. *Sensors* ; 9: 4789-4803
- Knapen D, Reynders H, Bervoets L, Verheyen E, Blust R. 2007. Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudge on populations. *Aquat Toxicol*;82:163–72.

- Krizkova, S., Zitka O., Adam V., Beklova M., Horna A., Svobodova Z., Sures B., Trnkova L., Zeman L. Dan Kizek R. 2007. Possibilities of Electrochemical Techniques in Metallothionein and Lead Detection in Fish Tissues. *Czech Journal of Animal Science* 52 (5):143-148.
- Larsson A, Forlin L, Grahn O, Landner L, Lindesjoo E, Sandstrom O. 2000. Guidelines for interpretation and biological evaluation of biochemical, physiological and pathological alterations in fish exposed to pulp mill effluents. In: Ruoppa M, Paasivirta J, Lehtinen K-J, Ruonala S, editors. *Proceedings, 4th International Conference on Environmental Impact of the Pulp and Paper Industry*, 12-15 June 2000. Helsinki, Finland: Finnish Environment Institute. P. 185-189.
- Larsson A, Forlin, Lindesjoo E, Sandstrom O. 2002. Monitoring of individual organism responses in fish populations exposed to pulp mill effluents. In : Struthridge T, Van den Heuvel M, Marvin N, Slade A, Gifford J, editors. *Environmental Impacts of pulp and Paper Waste Streams*. Pensacola, FL (USA):SETAC Press.216-226.
- Laws, E.A. 2000. *Aquatic Pollution, An Introductory Text*. John Wiley and Sons. New York.
- Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246, 259–279.
- Leidy, R.B. 2000. Aquatic Organism in F.E. Guthrie and J.J. Perry (ed.). *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier. New York. p. 120-132.
- Leung, K.M.Y., Furness, R.W., 2001. Survival, growth, metallothionein and glycogen levels of *Nucella lapillus* (L.) exposed to sub-chronic cadmium stress: the influence of nutritional state and prey type. *Mar. Environ. Res.* 52, 173–194.
- Leung, K.M.Y., Morgan, I.J., Wu, R.S.S., Lau, T.C., Svavarsson, J., Furness, R.W., 2001. Growth rate as a factor confounding the use of the dogwhelk *Nucella lapillus* as biomonitor of heavy metal contamination. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 221, 145–159.
- Leung, K.M.Y., Svavarsson, J., Crane, M., Morrill, D., 2002. Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 274, 175–189.
- Lieb, B., 2003. A new metallothionein gene from the giant keyhole limpet *Megathura crenulata*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 134, 131–137.
- Linderoth M, Hansson T, Liewenborg B, Sundberg H, Noaksson E, Hanson M, Sebuhr Y, Balk L., 2006. Basic physiological biomarkers in adult female perch (*perca fluviatilis*) in achronically polluted gradient in the Stockholm recipient (Sweden). *Marine Pollution Bulletin* 53(8-9):437-450.
- Mailman, R.B. 2002. Heavy metals. In. F.E. Guthrie and J.J. Perry (ed). *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier North Holland, Inc. New York. p. 34-42.

- Marina M. P. Camargo and Cláudia B. R. Martinez. 2007. *Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream*. Laboratory of Animal Ecophysiology, Department of Physiological Sciences State University of Londrina (UEL). *Neotropical Ichthyology*, 5(3):327-336
- Martin J, Larry K., Black MC. 1998. Biomarker assessment of the effects of coal strip-mine contamination on Channel Catfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41(3):307-320.
- Marr, J.C.A., J. Lipton, D. Cacela, J.A. Hansen, J.A. Bergman, J.S. Meyer and C. Hogstrand, 1996. Relationship between copper exposure duration, tissue copper concentration and rainbow trout growth, *Aquatic Toxicol.*, 36: 17-30.
- Miller, T.G, Jr. 2007. *Living in The Environment : Principle, Connection and Solutions*. Singapore: Thompson Brooks/Cole.
- Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., Rodilla, V., 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 35–70.
- Mitchell B., Setiawan B., Rahmi D.H. 2000. *Pengelolaan Sumberdaya dan Lingkungan*. Universitas Gadjahmada, Yogyakarta.
- Montaser Metwally, Magdy E. Mahfouz, Samir A.M. El-Shazly, Gamal H. Abdel-Rahman and Sayed Bakry. 2010. Toxicity of Heavy Metals on Fish at Jeddah Coast KSA: Metallothionein Expression as a Biomarker and Histopathological Study on Liver and Gills. *World Journal of Fish and Marine Sciences* 2 (3): 174-185
- Mosleh, Y.Y., Paris P.S., Arnoult, F., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2004. Metallothionein induction in aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to herbicide isoproturon. *Environ. Toxicol.* 19, 88–93.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Cottier, A., Rainbow, P.S., Smith, B.D., 2002. Partitioning of accumulated trace metals in the talitrid amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*: a cautionary tale on the use of metallothionein-like proteins as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 57 (4), 225–242.
- Ossana, N.A., Bettina L Eisasa, and Alfredo Salibián. 2009. Short communication: Cadmium bioconcentration and genotoxicity in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Int. J. Environment and Health*, 3:3 : 303-311.
- Palar, Heryanto. 2008. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Pantung N., Kerstin G. Helander, Herbert F. Helander, and Voravit Cheevaporna. 2008. *Histopathological Alterations of Hybrid Walking Catfish (Clarias macrocephalus x Clarias gariepinus) in Acute and Subacute Cadmium Exposure*. Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. *EnvironmentAsia* 1 (2008) 22-27.
- Park, J.-S., Chung, S., Park, I.-S., Kim, Y., Koh, C.-H., Lee, I.-S., 2002. Purification and characterization of metallothionein-like cadmium binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131, 425–431.

- Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 82 Tahun 2001. *Tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air*.
- Peraturan Gubernur Jawa Tengah Nomor 156 Tahun 2010 *Tentang Peruntukan Air dan Pengelolaan Kualitas Air Sungai Garang di Provinsi Jawa Tengah*.
- Plaa G.L. 2007. Introduction to toxicology:Occupational & Environmental. In Katzung B.G. (ed): *Basic & Clinical Pharmacology*, 10th Ed (International Ed), Boston, New York: Mc Graw Hill p. 958-970.
- Petrovic, S., B. Ozretic, M. Krajnovic-Ozretic & D. Bobinac. 2001. Lysosomal membrane stability and metallothioneins in digestive gland of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as biomarkers in a field study. *Marine Pollution Bulletin* 42: 1373-1378.
- Philcox JC, Tilley MH, Coyle P. 1994. Metallothionein and zinc homeostasis during tumor progression. *Biol. Trace. Elem. Res*, 40, 295-308.
- Rand, G.M. 2000. *Detection Bioassay*, in F.E. Guthrie and J.J. Perry (ed). *Introduction to Environmental Toxicology*. Elsevier, New York.p.245-247.
- Raspor, B., Dragun, Z., Erk, M., Ivankovic, D., Pavicic, J., 2004. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? *Sci. Total Environ.* 333, 99–108.
- Ratningsih, Nining. 2008. Uji Toksisitas Molase pada Respirasi Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) *Jurnal Biotika* 6 (1):22-33.
- Ravera, O. 2001. *Cadmium in Fresh Water Ecosystems*. Experientia 40, Birkhauser Verlag, CH-4010, Basel/Switzerland. P. 2-12.
- Regoli, F., D. Pellegrini, G.W. Winston, S. Gorbi, S. Giuliani, C. Virno-Lamberti and S. Bompadre, 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.,
- 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.
- Rodriguez-Ortega, M.J., Alhama, J., Funes, V., Romero-Ruiz, A., Rodriguez-Ariza, A., Lopez-Barea, J., 2002. Biochemical biomarkers of pollution in the clam *Chamaelea gallina* from south-Spanish littoral. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 542–549.
- Roesijadi, G., 2002. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 113 (2), 117–123.
- Sandstrom O, Larsson A, Andersson J, Appelberg M, Bignert A, Ek H, Forlin L, Olsson M. 2005. Three decades Swedish experience stresses the need of integrated long-term monitoring in marine coastal areas. *Water Quality Research Journal of Canada.* 40 (3):233-250.

- Sastroasmoro, S. Ismael, S. 2008. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, May TW, Tillitt DE. 2007. Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of south-eastern Missouri, USA. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67 (1):31-47.
- Serafim, A., Company, R.M., Bebianno, M.J., Langston, W.J., 2002. Effect of temperature and size on metallothionein synthesis in the gill of *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Mar. Environ. Res.* 54, 361–365.
- Shailaja, M.S., Rodrigues, A., 2001. Nitrite-induced enhancement of toxicity of phenanthrene in fish and its implications for coastal waters. *Estuarine, Coastal & Shelf Science* 56, 1107-1110
- Shailaja, M.S., D'Silva, C., 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53, 835-841.
- [Siah A](#), [Pellerin J](#), [Amiard JC](#), [Pelletier E](#), [Vigilino L](#). 2003. Delayed Gametogenesis and Progesterone levels in soft-shell Clams (*Myrenaria*) in relation to in contamination to organotins and heavy metals in the St Lawrence River (Canada). *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol Pharmacol.* 135(2):145-56.
- Simes, D.C., Bebianno, M.J., Moura, J.J.G., 2003. Isolation and characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquat. Toxicol.* 63, 307–318.
- Soemarwoto, Otto. 2001. *Atur-Diri-Sendiri, Paradigma Baru Pengelolaan Lingkungan Hidup*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sonne, Ch, Ole Aspholm, Rune Dietz, Steen Andersen, Marc H.G.Berntssen, Ketil Hylland. 2009. A Study of metal concentrations and metallothionein binding capacity in liver, kidney and brain tissues of three Arctic seal species. *Science of the Total Environment* 407: 6166–6172.
- Steel, R.G.O. and James H. Torrie. 2000. *Principles and Procedure of Statistics. A Biometrical Approach*. Second edition. Mc. Graw-Hill, Kogakusha Ltd., Tokyo. p.633.
- Sunu, P. 2001. *Melindungi Lingkungan dengan Menerapkan ISO 14001*. P.T. Gramedia Widia Sarana Indonesia. Jakarta
- Supriharyono. 2009. *Konservasi Ekosistem Sumberdaya Hayati*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Syring, R.A., Hoexum Brouwer, T., Brouwer, M., 2000. Cloning and sequencing of cDNAs encoding for a novel copper-specific metallothionein and two cadmium-inducible metallothioneins from the blue crab *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 125, 325–332.
- Tanguy, A., Moraga, D., 2001. Cloning and characterization of a gene coding for a novel metallothionein in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (CgMT2): a case of adaptive response to metal-induced stress? *Gene* 273, 123–130.

- Tugiyono, Nurcahyani, N., Supriyanto, R. dan Kurniati, M. 2009. Biomonitoring Pengolahan Air Limbah Pabrik Gula PT Gunung Madu Plantation Lampung Dengan Analisis Biomarker: Indeks Fisiologi Dan Perubahan Histologi Hati Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Linn) *J.Sains MIPA*, 15: 42-50.
- Tugiyono, Nurcahyani, N. Supriyanto, R and Hadi, S. 2011. Biomonitoring of effects Following Exposure of Fish to Sugar Refinery Effluent. *J. Modern Applied Science*, 5: 39-44.
- Ueng Y.F., Liu C., Lai C.F., Meng L.M, Hung Y.Y. & Ueng T.H. (1996). Effects of cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytochrome P450 in tilapia. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 57(1):125-131.
- Undang-Undang Republik Indonesia No.32 Tahun 2009 *Tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup*.
- Verschuren, P., Doorewaard, H. 2005., *Designing a Research Project*. LEMMA Publisher, Utrecht, Nederlands.
- Van Campenhout, K., H.G. Infante, F. Adams and R. Blust, 2004. Induction and binding of Cd, Cu and Zn to metallothionein in using HPLC-ICP-TOFMS. *Toxicol. Sci.*, 80: 276-287.
- Van der Oost R., Beyer J., & Vermeulan N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology & Pharmacology* 13(2): 57-149.
- Viarenggo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A.2007. The use of biomarkers in biomonitoring : A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 146(3):281-300.
- Viarenggo, A., Burlando, B., Ceratto, N., Panfoli, I., 2000. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. *Cell Mol. Biol.* 46 (2), 407–417.
- Viarenggo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C* 104 (3), 355–372.
- Wardhana, W.A. 2004. *Dampak Pencemaran Lingkungan*. Penerbit Andi, Yogyakarta.
- Ward, F.J. 2001. Laboratory Study of The Accumulation and Distribution of Cd in the Sidney Rock Ovster *Saccostrea Commercialis*. *Aust. J. Mar. Fresh. Wat. Res.* 33 : 33-34.
- Watts, R.J. 2000. *Hazardous Wastest: Surces, Pathways, Receptors*. John Wiley and Sons.Inc. New York.
- Webb D, Gagnon MM, Rose TH.2005. Interannual variability in fish biomarkers in a contaminated temperature urban estuary. *Exocology and Environmental Safety* 62(1):53-65.
- Whitehead A, Kuivila KM, Orlando JL, Kotelevtsev S, Anderson SL. 2004. Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(12):2868-2877.

- WHO, 1993. *Research Guidelines For Evaluating The Safety And Efficacy of Herbal Medicines*. Regional Office for the Western Pacific. Manila.
- Wisnu D.A., dan H. Ati, 2001. Penyerapan Logam Berat Merkuri dan Kadmium pada ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Purifikasi* Vol.1 No.2. ITS. Surabaya.
- Withgott Jay and Brennan Scott. 2007. *Environment : The Science Behind the Stories*. San Fransisco; Pearson Benjamin Cummings.
- 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 α -domain. *J. Biochem* 359: 353-360.
- Zatta, P. 2008. *Metallothionein in Biochemistry and Pathology*. World Scientific Publishing Company.