

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**



**PENGARUH LOGAM BERAT TERHADAP REGULASI
OSMOTIK, IONIK, STRES OKSIDATIF, DAN PERUBAHAN
STRUCTUR INSANG IKAN NILA NILA (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*) YANG DIPELIHARA PADA SALINITAS
BERBEDA**

TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. Dr. AGOES SOEGIANTO, DEA,
Prof. Dr. BAMBANG IRAWAN, M.Sc,
KIKI SYAPUTRI H., S.Pi., M.Si**

**0003086204
0004055504
081617027318**

**DIBIAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN PENDIDIKAN MAGISTER MENUJU DOKTOR
UNTUK SARJANA UNGGUL (PMDSU)**

KKC
KK
LP 06/19
Soe
P



**PENGARUH LOGAM BERAT TERHADAP REGULASI
OSMOTIK, IONIK, STRES OKSIDATIF, DAN PERUBAHAN
STRUCTUR INSANG IKAN NILA NILA (*OREOCHROMIS
NILOTICUS*) YANG DIPELIHARA PADA SALINITAS
BERBEDA**

TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN

**Prof. Dr. AGOES SOEGIANTO, DEA,
Prof. Dr. BAMBANG IRAWAN, M.Sc,
KIKI SYAPUTRI H., S.Pi., M.Si**

**0003086204
0004055504
081617027318**

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pengaruh Logam Berat terhadap Regulasi Osmotik, Ionik, Stres Oksidatif, dan Perubahan Struktur Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipelihara pada Salinitas Berbeda

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. Ir AGOES SOEGIANTO, D.E.A
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0003086204
Jabatan Fungsional : Guru Besar
Program Studi : Teknik Lingkungan
Nomor HP : 0811344203
Alamat surel (e-mail) : agoes_soegianto@unair.ac.id

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. Drs BAMBANG IRAWAN
NIDN : 0004055504
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 177,500,000

Mengetahui,
Dekan F&T Unair

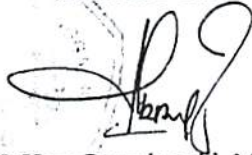
(Prof. Drs. Wirj Darmanto, M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 19610616 1987011001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018
Ketua,



(Dr. Ir AGOES SOEGIANTO, D.E.A)
NIP/NIK 196208031987101001

Menyetujui,
Ketua LPI Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Limbah di perairan diantaranya dapat berupa logam berat. Dimana logam dapat mengganggu integritas fisiologis dan mekanisme biokimia pada ikan, karena ikan merupakan organisme penting dalam ekosistem serta pada industri makanan, sehingga lingkungan perairan harus terus dipantau (Hogstrand *et al.* 1999; Basha dan Rani 2003; Atli dan Canli 2010).

Biokumulasi merkuri pada ikan nila telah diteliti oleh Wang (2010), tetapi pada perlakuannya, yang digunakan hanya media hidup dengan paparan merkuri, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh paparan merkuri dan salinitas. Perubahan salinitas dan paparan merkuri menjadikan ikan beradaptasi dengan lingkungannya, dan proses adaptasi tersebut dapat memberikan efek terhadap regulasi osmotik, ionik, hematologi dan kadar Na^+/K^+ -ATPase (NKA) serta kade Carbonic Anhidrase (CA) pada insang ikan nila. Selain indikator tersebut, lokasi (NKA) pada insang perlu juga diamati karena berkaitan langsung dengan proses pertukaran ion di dalam tubuh ikan.

Pengujian osmolalitas serum darah ikan yaitu dengan cara sampel darah disentrifugasi untuk diperoleh serum darah, serum darah yang diperoleh selanjutnya diambil sebanyak 20 μl untuk diukur nilai osmolalitasnya menggunakan osmometer. Nilai osmolalitas serum darah yang diperoleh akan dinyatakan dalam satuan mOsm/kg pelarutnya. Kapasitas osmoregulasi dapat dikalkulasi dari rasio antara nilai osmolalitas serum darah dengan osmolalitas medium (Lignot *et al.*, 2000). Untuk uji kadar ionik, serum darah yang telah diperoleh melalui proses sentrifuge selanjutnya dimasukkan ke dalam alat ISE (Jokoh electrolyte EX-D) untuk diukur kadar ion Natrium (Na^+), Kalium (K^+), dan Klorida (Cl^-). Pengujian kadar NKA dan CA pada insang dilakukan dengan menggunakan metode sandwich *Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)* dengan ELISA kit merek *bioassay technology* dan pembacaan dengan *ELISA reader* dilakukan di *Institute of Tropical Disease*. Pengujian imunohistokimia dilakukan di laboratorium histologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Berdasarkan uraian diatas, diharapkan hasil dari penelitian ini dapat menjadi informasi terbaru yang berguna bagi masyarakat yang membutuhkan baik nasional maupun internasional melalui publikasi jurnal internasional bereputasi.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan kasih sayangNYA, sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan akhir yang berjudul “Pengaruh Logam Berat terhadap Regulasi Osmotik, Ionik, Stres Oksidatif, dan Perubahan Struktur Insang Ikan Nila Nila (*Oreochromis Niloticus*) yang Dipelihara pada Salinitas Berbeda”.

Pada kesempatan ini penulis memberikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE, Mt., Ak., CMA selaku Rektor Universitas Airlangga.
3. Prof. H. Hery Purnobasuki, M. Si.Ph.D selaku Ketua LMG/L Universitas Airlangga.
4. Prof. Drs. Win Darmanto, M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
5. Dr. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si selaku KPS Program Magister Biologi.
6. Prof. Dr. Ir. Agoes Soegianto, DEA selaku ketua peneliti dan promotor
7. Prof. Dr. Bambang Irawan selaku co-promotor
8. Seluruh staff Unit Pelaksana Teknis Pengembangan Budidaya Air Tawar (UPT PBAT), Umbulan, Kabupaten Pasuruan yang telah membantu proses pengambilan sampel ikan.
9. Semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Walaupun demikian penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat dan bisa memberi sumbangan pemikiran, dalam kaitannya ikut serta berpartisipasi aktif dalam mensukseskan pembangunan bangsa dan negara.

Surabaya, November 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	
Latar Belakang.....	1
Permasalahan	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
Ikan Nila (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	5
Salinitas	8
Osmoregulasi	9
Hematologi	11
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
Tujuan	14
Tujuan fungsional	14
Tujuan operasional	14
Manfaat penelitian.....	15
BAB 4 METODE PENELITIAN	
Tempat dan Waktu Penelitian	16
Bahan dan Peralatan Penelitian	16
Alat Penelitian.....	17
Rancangan Penelitian	17
Prosedur Penelitian	18
Tahap persiapan penelitian.....	18
Tahap pelaksanaan penelitian.....	19
Variabel Penelitian.....	22
Analisis Data	22
Tahapan Penelitian.....	23
BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	
Pengujian papran merkuri harian.....	24
Pengujian merkuri dan salinitas.....	33
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	
Kesimpulan	45
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
5.1. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	24
5.2. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	25
5.3. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	25
5.4. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	26
5.5. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	26
5.6. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	27
5.7. Hasil uji harian osmolalitas serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L..	27
5.8. Hasil uji harian osmolalitas serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L.....	28
5.9. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L	29
5.10. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L	29
5.11. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L	30
5.12. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L	30
5.13. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L.....	31
5.14. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L.....	31
5.15. Hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L.....	32
5.16. Hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L.....	32
5.17. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	33
5.18. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	34
5.19. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	35
5.20. Hasil uji osmolalitas ikan nila yang dipapar Hg dan salinitas	36
5.21. Hasil uji leukosit ikan nila yang dipapar Hg dan salinitas	37
5.22. Hasil uji eritrosit ikan nila dipapar Hg dan salinitas	38
5.23. Hasil uji hemoglobin ikan nila dipapar Hg dan salinitas	39
5.24. Hasil uji hematokrit ikan nila dipapar Hg dan salinitas	40
5.25. Hasil uji kadar NKA insang ikan nila dipapar Hg dan salinitas	41
5.26. Hasil uji kadar NKA ginjal ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	42
5.27. Hasil uji kadar CA insang ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	43
5.28. Hasil uji kadar CA ginjal ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Keseimbangan Natrium.....	11
4.1. Bagan Alir Penelitian	23
5.1. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	25
5.2. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	25
5.3. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	26
5.4. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	26
5.5. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L	27
5.6. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L	27
5.7. Hasil uji harian osmolalitas serum ikan yang dipapar Hg 0,1 mg/L..	28
5.8. Hasil uji harian osmolalitas serum ikan yang dipapar Hg 1 mg/L.....	28
5.9. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L	29
5.10. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L	30
5.11. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L	30
5.12. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L	31
5.13. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L.....	31
5.14. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L.....	32
5.15. Hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar Hg 0,1 mg/L.....	32
5.16. Hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar Hg 1 mg/L.....	33
5.17. Hasil uji harian Na serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	34
5.18. Hasil uji harian K serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	35
5.19. Hasil uji harian Cl serum ikan yang dipapar Hg dan salinitas	35
5.20. Hasil uji osmolalitas ikan nila yang dipapar Hg dan salinitas	36
5.21. Hasil uji leukosit ikan nila yang dipapar Hg dan salinitas.....	37
5.22. Hasil uji eritrosit ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	38
5.23. Hasil uji hemoglobin ikan nila dipapar Hg dan salinitas	39
5.24. Hasil uji hematokrit ikan nila dipapar Hg dan salinitas	40
5.25. Hasil uji kadar NKA insang ikan nila dipapar Hg dan salinitas	41
5.26. Hasil uji kadar NKA ginjal ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	42

5.27.	Hasil uji kadar CA insang ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	43
5.28.	Hasil uji kadar CA ginjal ikan nila dipapar Hg dan salinitas.....	44

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Artikel ilmiah terpublikasi di jurnal.....	
2. Hasil karya ilmiah terpublikasi pada seminar	

BAB 1

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) termasuk dalam komoditas air tawar, serta dikenal sebagai ikan yang tahan terhadap perubahan lingkungan hidup. Kemampuan ikan nila beradaptasi dengan lingkungan baru menjadikan ikan tersebut dengan cepat menyebar dan dikenal di dunia budidaya perairan. Salah satu kemampuan tersebut diantaranya adalah mentoleransi salinitas pada lingkungan hidupnya sehingga disebut *euryhaline*. Cara adaptasi nila salah satunya dilakukan dengan mengontrol keseimbangan ion-ion di dalam tubuh ikan dengan lingkungannya melalui sel berpori. Proses tersebut disebut dengan osmoregulasi (Nicol, 1967).

Salinitas merupakan padatan total, baik padatan terlarut maupun padatan tersuspensi di dalam air setelah semua karbonat dikonversi menjadi oksida, semua bromida dan iodida diganti oleh klorida, dan semua bahan organik telah teroksidasi. Kadar garam yang tinggi di perairan dapat mempengaruhi toksisitas merkuri di perairan. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa toksisitas logam di perairan berbanding terbalik dengan salinitas di perairan (Handajani *et al*, 2001; Erlangga, 2007).

Limbah di perairan diantaranya dapat berupa logam berat. Dimana logam dapat mengganggu integritas fisiologis dan mekanisme biokimia pada ikan, karena ikan merupakan organisme penting dalam ekosistem serta pada industri makanan, sehingga lingkungan perairan harus terus dipantau (Hogstrand *et al*. 1999; Basha dan Rani 2003; Atli dan Canli 2010). Penelitian menunjukkan peningkatan atau penurunan aktivitas enzim tergantung pada dosis, spesies, dan rute paparan dari logam (Wong and Wong 2000; Sanchez *et al*. 2005). Meskipun data penelitian dari salinitas dan logam terbatas, banyak penelitian yang menunjukkan efek toksik logam pada ikan (Blanchard dan Grosell 2006; Atli dan Canli 2011; Li *et al*. 2011).

Pencemaran di perairan salah satunya dapat disebabkan oleh logam berat dari unsur (Hg). Menurut Sudarmaji dkk (2006) merkuri merupakan logam berat dengan toksisitas tertinggi dibandingkan dengan logam berat lainnya. Merkuri (Hg) adalah unsur kimia dengan nomor atom 80, isotopnya terdiri dari nomor massa 193 hingga 205. Logam



tersebut dapat hadir secara alami yaitu melalui rembesan tanah dari aktivitas gunung berapi, (Lestaris, 2010).

Merkuri yang bersumber dari alam dan aktivitas manusia tersebut akan masuk ke perairan diubah menjadi metilmerkuri oleh bakteri tertentu. Saputra (2011) mengungkapkan, hewan di perairan akan terkontaminasi metilmerkuri jika perairan yang menjadi habitatnya tercemar oleh merkuri dengan cara kontak langsung dengan perairan tersebut yaitu, meminum atau memakan organisme yang lebih kecil yang hidup di dalamnya. Proses tersebut dikenal dengan nama bioakumulasi dan berlangsung terus menerus dengan kadar merkuri yang semakin meningkat. Tubuh hewan nekton seperti ikan, memiliki potensi yang besar untuk terakumulasi merkuri. Konsentrasi Hg di Surabaya, di perairan pesisir wonorejo, tergolong tinggi jika dibandingkan dengan standar baku yang telah ditetapkan pemerintah yaitu 0,016 mg/L (Sari dkk, 2017).

Biokumulasi merkuri telah diteliti oleh Wang *et al* (2010), tetapi pada perlakuannya, yang digunakan hanya media hidup ikan nila dengan paparan merkuri, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh paparan merkuri dan salinitas. Perubahan salinitas dan paparan merkuri menjadikan ikan melakukan adaptasi dengan lingkungannya, dan proses adaptasi tersebut diasumsikan dapat memberikan dampak terhadap regulasi osmotik, ionik, hematologi, kadar NKA dan kadar Hg pada ikan nila.

Penelitian yang telah dilakukan Chen *et al* (2011) menjelaskan tentang mekanisme glikogen yang terjadi di insang ikan mujair selama terpapar kadmium 12 jam dan regulasi ionik menurun secara signifikan setelah terpapar kadmium dan penelitian Nursanti (2016) menunjukkan semakin tinggi salinitas, semakin rendah kadar kadmium di dalam tubuh ikan serta semakin tinggi konsentrasi kadmium pada media hidup ikan, semakin tinggi kadar metallothionein (MT). Hal tersebut merupakan salah satu acuan perlunya dilakukan penelitian mengenai kadar ion-ion tersebut, karena telah diketahui bahwa merkuri lebih beracun bila dibandingkan dengan kadmium.

Selain perlu dilakukan pengujian kadar ion dalam serum darah ikan, uji keberadaan antigen NKA juga perlu dilakukan. Hal tersebut berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Armesto *et al* (2014) pada larva ikan euryhaline yang diberi paparan salinitas. NKA merupakan enzim yang terikat membran yang mengangkut ion melalui membran biologis dan mengatur volume seluler, tekanan osmotik, dan permeabilitas membran (Li *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, digunakan konsentrasi Hg rendah dan tinggi yaitu 0,1 mg/L dan 1 mg/L, waktu paparan 4 hari dimana saat paparan dilakukan pengamatan harian selama 7 hari. Penentuan tinggi dan rendahnya konsentrasi berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan menggunakan model penelitian. Merkuri yang digunakan pada penelitian ini adalah HgCl₂. Beberapa penelitian menggunakan HgCl₂ salah satunya yaitu penelitian yang dilakukan Cardoso *et al* (2017). Waktu paparan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4 hari untuk paparan Hg dan salinitas, kemudian untuk Hg tanpa salinitas dengan pengamatan harian yaitu 7 hari. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Handayani *et al* (2017), Novianty (2017) dan Saputri (2017) dengan waktu paparan 5 hari dan diamati setiap hari yaitu, ada perbedaan kadar tembaga media terhadap tembaga dan MT insang ikan nila, ada pengaruh tembaga media terhadap osmolalitas, kadar ion natrium dan ion klorida serum darah serta salinitas mempengaruhi peningkatan kadar katalase, glutathion tereduksi dan malondialdehid dalam insang ikan nila yang dipelihara pada salinitas berbeda selama 7 hari. Karlinda (2017) dan Shinta (2017) menyimpulkan bahwa ada perubahan osmolalitas, kadar ion, jumlah eritrosit, jumlah leukosit, nilai hematokrit dan kadar hemoglobin ikan nila setelah terpapar logam Cd dan Zn dengan konsentrasi berbeda selama 7 hari.

Berdasarkan penjelasan diatas dan juga berdasarkan kemampuan ikan nila mentoleransi salinitas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai dampak paparan Hg dan salinitas berbeda terhadap regulasi osmotik, ionik, hematologi, konsentrasi dan lokalisasi NKA serta kadar Hg pada ikan nila. Dengan demikian, kebaruan dari penelitian ini adalah terletak pada pengamatan yang dilakukan, yaitu pengamatan yang lebih rinci dibandingkan penelitian sebelumnya.

Permasalahan

Berdasarkan latar belakang pemikiran tersebut dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah ada perbedaan kadar Hg insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda?
2. Apakah ada perbedaan osmoregulasi ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda?
3. Apakah ada perbedaan konsentrasi NKA dan lokasi aktivitas NKA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda?

4. Apakah ada perbedaan konsentrasi CA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda?
5. Apakah ada perbedaan respon hematologis ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda?

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*)

Oreochromis niloticus merupakan species dari genus *Oreochromis*, Famili Cichlidae (Triastuti, 2014). *O. niloticus* merupakan jenis ikan yang berasal dari sungai nil. Ciri ikan nila di Indonesia adalah berwarna gelap dengan garis-garis vertikal sebanyak 6 hingga 8 buah. Linea lateralis bagian atas memanjang mulai dari tutup insang hingga belakang sirip punggung sampai pangkal sirip ekor. Selain pada sirip ekor, garis tersebut juga terdapat pada sirip punggung dan sirip anal (Monteiro *et al.*, 2005).

Pada umur 4-5 bulan, ikan nila dengan bobot 100-150 g sudah mulai kawin dan bertelur. Tanda-tanda ikan nila jantan adalah warna badan lebih gelap dari ikan betina, alat kelamin berupa tonjolan (papila) di belakang lubang anus, dan tulang rahang melebar ke belakang. Sedangkan ciri khas ikan nila betina adalah alat kelamin berupa tonjolan di belakang anus, dimana terdapat 2 lubang. Lubang yang di depan untuk mengeluarkan telur, sedang yang di belakang untuk mengeluarkan air seni dan bila telah mengandung telur yang matang dan abdomennya tampak membesar (El-Sayed, 2006). Berdasarkan penelitian sebelumnya, nila memiliki insang yang berperan dalam merespon keberadaan logam berat diperairan.

Beberapa struktur dari insang meliputi *gill fillament*, *gill arch* dan *gill rakers*. Lembaran insang (*Gill fillament*) dilapisi oleh lapisan epitel dan sel mukus. Lapisan epitel yang miliki spesies tersebut luas dan berfungsi untuk melindungi lamela kontralateral (Zayed *et al*, 2004). Lamela memiliki fungsi sebagai tempat pertukaran gas. Bagian bawah operculum berwarna putih, sedangkan pada nila lokal putih kehitaman bahkan ada yang kuning berwarna merah (Campbell *et al.*, 2004). Monteiro *et al* (2010) menyebutkan bahwa insang merupakan organ yang tepat untuk mempelajari efek lingkungan pada organisme dan secara tidak langsung dapat dijadikan indikator tingkat pencemaran lingkungan. Selain insang, organ lain yang berperan dalam mengetahui efek fisiologis logam adalah usus (Federici *et al*, 2007).

Ikan nila merupakan herbivora bila dilihat dari usus yang dimilikinya. *Botryococcus* merupakan salah satu alga yang telah ditemukan di dalam organ pencernaan spesies tersebut dan termasuk alga yang penting bagi pola makannya (Getachew and Fernando, 1989). Anhar dkk (2008) menyatakan bahwa ikan nila merupakan planktivor



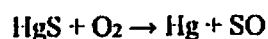
karena dari hasil penelitian yang dilakukan, *Nitzschia*, *Netrium*, dan *Closterium* merupakan pakan penting bagi spesies tersebut.

Nila dikenal sebagai ikan yang tahan terhadap perubahan lingkungan tempat hidupnya. Nila hidup di lingkungan air tawar, air payau, dan air laut. *O. niloticus* mampu hidup pada rentang salinitas antara 0-35 ppt tetapi pertumbuhan optimumnya adalah pada salinitas 15 ppt (Triastuti, 2014). Ikan nila air tawar dapat dipindahkan ke air asin dengan proses adaptasi bertahap. Dengan cara kadar garam air dinaikkan sedikit demi sedikit. Pemindahan ikan nila secara mendadak ke dalam air yang kadar garamnya sangat berbeda dapat mengakibatkan stress dan kematian ikan. Tempat hidup Ikan nila umumnya berada pada perairan yang dangkal dengan arus yang tidak begitu deras, ikan ini tidak suka hidup di perairan yang mengalir, akan tetapi jika dilakukan perlakuan terhadap ikan nila seperti pengadaptasian terhadap lingkungan air yang mengalir maka ikan nila juga dapat hidup baik pada perairan yang mengalir (El-Sayed, 2006).

Habitat yang paling ideal adalah perairan air tawar yang memiliki suhu antara 14°C – 38°C, atau suhu optimal 25°C – 30°C. Keadaan suhu yang rendah yaitu suhu kurang dari 14°C ataupun suhu yang terlalu tinggi di atas 30°C akan menghambat pertumbuhan nila. Ikan nila memiliki toleransi tinggi terhadap perubahan lingkungan hidup. Batas bawah dan batas atas suhu yang mematikan ikan nila berturut-turut adalah 11-12°C dan 42°C. Keadaan pH air antara 5 – 11 dapat ditoleransi oleh ikan nila, tetapi pH yang optimal untuk pertumbuhan dan perkembangbiakkan ikan ini adalah 7- 8. Oleh karena itu, ikan nila dapat dibudidayakan di perairan payau dan perairan laut, terutama untuk tujuan usaha pembesaran (El-Sayed, 2006).

Logam Berat Merkuri

Logam Merkuri adalah unsur kimia dengan nomor atom 80, isotopnya terdiri dari nomor massa 193 hingga 205. Logam tersebut dapat ditemukan secara alami yaitu melalui rembesan tanah dari aktivitas gunung berapi (Lestaris, 2010). Merkuri dihasilkan dari bijih sinabar, HgS, yang mengandung unsur merkuri antara 0,1% - 4%.



Merkuri yang telah dilepaskan kemudian dikondensasi, sehingga diperoleh logam cair murni. Logam cair inilah yang dikemudian digunakan oleh manusia untuk bermacam-macam keperluan termasuk bagi penambang emas tradisional. Secara umum logam merkuri memiliki sifat-sifat sebagai berikut :

1. Berwujud cair pada suhu kamar (25°C) dengan titik beku paling rendah sekitar -39°C
2. Merupakan logam yang paling mudah menguap jika dibandingkan dengan logam-logam yang lain.
3. Tahanan listrik yang dimiliki sangat rendah, sehingga menempatkan merkuri sebagai logam yang sangat baik untuk menghantarkan daya listrik.
4. Dapat melarutkan bermacam-macam logam untuk membentuk alloy yang disebut juga dengan amalgam.
5. Merupakan unsur yang sangat beracun bagi semua makhluk hidup, baik itu dalam bentuk unsur tunggal (logam) ataupun dalam bentuk persenyawaan (Palar, 2008).
Secara umum ada 3 bentuk merkuri (Hammond dan Beliles, 1980) yaitu

1. Merkuri Metal (Hg)

Merupakan logam berwarna putih, berkilau dan pada suhu kamar berada dalam bentuk cairan. Pada suhu kamar akan menguap dan membentuk uap merkuri yang tidak berwarna dan tidak berbau. Makin tinggi suhu, makin banyak yang menguap. Merkuri metal banyak digunakan untuk pemurnian emas dan digunakan pada thermometer)

2. Merkuri anorganik

Senyawa merkuri anorganik terjadi ketika merkuri dikombinasikan dengan elemen lain seperti klorin, sulfur oksigen. Senyawa ini biasa disebut garam-garam merkuri, garam-garam merkuri anorganik termasuk amoniak merkuri klorida dan merkuri iodide digunakan untuk cream pemutih kulit.

3. Merkuri organik

Senyawa merkuri organik terjadi ketika merkuri bertemu dengan karbon atau organometri. Yang paling populer adalah metal merkuri (dikenal monometil merkuri)



Merkuri organik sebagai contoh metal merkuri yang secara komersial digunakan sebagai fungisida, desinfektan, dan sebagai pengawet cat. Terpaparnya merkuri pada tubuh dalam waktu yang lama dapat menimbulkan dampak kesehatan hingga kematian pada manusia. Salah satu pengaruh merkuri terhadap fisiologi manusia yaitu ; pada sistem saluran pencernaan dan ginjal, terutama akibat merkuri yang terakumulasi, juga berpengaruh terhadap system syaraf, karena senyawa kerusakan otak yang irreversible sehingga mengakibatkan kelumpuhan permanen serta berpengaruh terhadap pertumbuhan (Wurdiyanto, 2007).

Pengaruh utama yang ditimbulkan oleh merkuri didalam tubuh adalah menghalangi kerja enzim dan merusak membran sel, keadaan itu disebabkan karena kemampuan merkuri dalam membentuk gugus yang mengandung belerang(s) yang terdapat dalam protein, enzim atau membrane sel. Keracunan yang bersumber dari senyawa merkuri biasanya melalui saluran pernapasan, disebabkan karena senyawa-senyawa alkil-merkuri mempunyai rantai pendek yang mudah menguap, yang masuk bersama jalur pernapasan akan mengisi ruang-ruang dan organ pernapasan dan berkaitan dengan darah (Palar, 2008). Konsentrasi kadmium dapat dipengaruhi oleh salinitas, semakin tinggi salinitas maka kadar kadmium akan semakin rendah (Handajani *et al.*,2001). Pernyataan tersebut sama seperti yang diungkapkan oleh Erlangga, (2007) bahwa salinitas berbanding terbalik dengan keberadaan logam, bila terjadi penurunan salinitas karena adanya proses *desalinasi* maka akan menyebabkan peningkatan daya toksik logam berat dan tingkat bioakumulasi logam berat semakin besar (Mance, 1990). Berdasarkan hal tersebut, diasumsikan bahwa Hg juga dipengaruhi oleh salinitas, karena Hg memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan Cd.

Salinitas

Salinitas dapat mempengaruhi peningkatan biomarker stres oksidatif pada insang ikan nila (Handayani *et al* 2017). Salinitas merupakan padatan total, baik padatan terlarut maupun padatan tersuspensi di dalam air setelah semua karbonat dikonversi menjadi oksida, semua bromida dan iodida diganti oleh klorida, dan semua bahan organik telah dioksidasi. Salinitas dinyatakan dalam satuan gr/kg atau ‰ (Nicol, 1967; Effendy, 2003). Salinitas air disebabkan oleh 7 ion utama, yaitu Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Kalsium (Ca^{2+}), Klorida (Cl^-), Sulfat (SO_4^{2-}), dan Bikarbonat (HCO_3^-) (Effendy, 2003). Tekanan osmotik (osmolaritas) air berasal ketujuh ion tersebut, semakin besar jumlah ion yang terkonsentrasi di dalam air, maka tingkat salinitas dan kepekatan osmolar larutan semakin tinggi, sehingga tekanan osmotik media semakin membesar. Tingkat salinitas yang terlalu tinggi, atau rendah dan fluktuasinya, dapat menyebabkan kematian pada ikan (Anggoro, 1992).

Logam berat yang terlarut dalam badan air secara alamiah berbentuk ion bebas, pasangan ion-ion anorganik, kompleks anorganik maupun organik (Connell dan Miller, 1995). Kation merkuri yang terlarut di air laut akan berinteraksi dengan anion-anion yang ada (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^-) membentuk kompleks anorganik ataupun organik sehingga

mengurangi keberadaan ion merkuri dalam bentuk bebas, namun lain halnya dengan paparan salinitas tanpa merkuri.

Sudiana (2008) menjelaskan bahwa H_2O_2 terbentuk karena adanya aktivitas suatu enzim yang disebut SOD (superoksida dismutase) dimana enzim ini mengubah Radikal superoksida menjadi (H_2O_2). Dengan demikian paparan salinitas yang tinggi dapat pula menyebabkan stres oksidatif (Lutfiyah, 2014). Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan sel sehingga menyebabkan perubahan tekanan osmotik dan ion dalam darah ikan. Pada penelitian Shinta (2017) telah disimpulkan bahwa pemberian logam Cd dan Zn menyebabkan peningkatan osmolalitas dan kadar ion Na^+ dan Cl^- .

Osmoregulasi

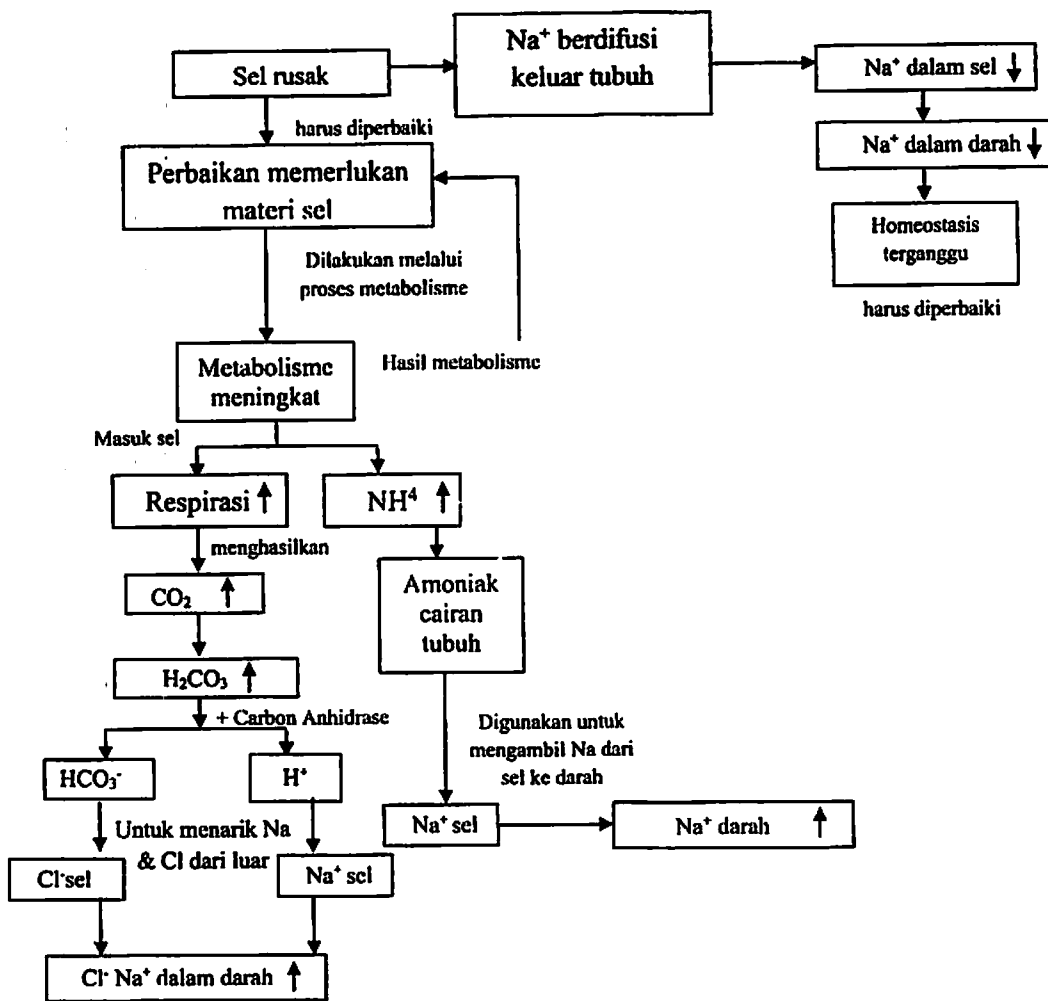
Menurut Evans (2011) osmoregulasi merupakan proses fundamental pada sistem kehidupan yang memungkinkan ikan untuk mempertahankan komposisi cairan dan volume cairan seluler, sedangkan menurut Atli dan Canli (2010) osmoregulasi merupakan proses pemeliharaan konsentrasi osmotik intraseluler dan ekstraseluler terhadap osmolaritas eksternal yang sangat diperlukan untuk adaptasi fisiologi organisme air. Osmoregulasi dapat dilakukan ikan dengan jalan melakukan mekanisme transport aktif terutama terhadap ion natrium (Na), Kalium (K) dan klorida (Cl), sehingga dengan adanya mekanisme ini terjadi keseimbangan komposisi ion-ion tersebut antara cairan intraseluler dengan cairan ekstraseluler (lingkungan). Proses penyeimbangan Na dapat dilihat pada Gambar 2.1. Perbedaan konsentrasi ion dan konsentrasi total osmotik pada air menentukan besar dan arah ion (difusi) pada cairan tubuh ikan serta pergerakan air (osmosis) di epitel insang ikan. Ikan dapat membatasi pertukaran ion dan air dengan menciptakan hambatan (permeabilitas) di permukaan kulit seperti lapisan lendir (Farrell *et al.*, 2011). Shinta (2017) dan Novianty (2017) menggunakan osmolalitas, ion Na, K dan Cl pada serum darah ikan nila sebagai parameter osmoregulasi.

Ikan air tawar akan mempertahankan keseimbangannya dengan tidak banyak minum air, kulitnya diliputi mucus. Secara umum kulit ikan merupakan lapisan kedap, sehingga garam di dalam tubuhnya tidak mudah keluar dari tubuh ikan. Satu-satunya bagian ikan yang berinteraksi dengan air adalah insang. Ikan air laut bersifat hipotonik atau hipoosmotik terhadap lingkungannya. Oleh karena itu ikan air laut cenderung kehilangan air karena tekanan atau kadar garam di dalam tubuh lebih rendah daripada lingkungan (Evans, 2011).

Transport ion merupakan proses perpindahan atau pertukaran ion dari satu tempat ke tempat yang lain dalam sistem kehidupan yang melewati membran sel pada organisme hidup. Dalam mengatur komposisi jumlah ion, terdapat beberapa macam ion yang konsentrasi ionnya dipertahankan lebih kecil daripada konsentrasi media seperti ion Na^+ , Cl^- , dan Ca^{2+} . Oleh karena itu, ion tersebut dapat berpindah melalui transport pasif dan aktif. Transport pasif merupakan perpindahan molekul yang tidak memerlukan energi dan berkaitan dengan perbedaan konsentrasi antar kedua sisi membran. Transport aktif merupakan perpindahan molekul melewati membran sel yang memerlukan energi atau ATP. Pada transport aktif primer yang menyediakan energi metabolik merupakan protein transport seperti enzim ATPase. Sedangkan transport sekunder, energi yang digunakan berasal dari tenaga yang ditimbulkan oleh adanya gradient elektrokimia (Irawan, 2013).

ATPase yaitu enzim yang berperan dalam pengangkutan ion melalui membran biologi (Eroglu dan Canli, 2013). Selain itu, ATPase juga berperan dalam mengatur permeabilitas membran, tekanan osmotik, dan volume seluler (Marshall dan Grosell 2005). Menurut Li *et al* (2011) enzim yang terikat membran yang mengangkut ion melalui membran biologis dan mengatur volume seluler, tekanan osmotik, dan permeabilitas membran adalah NKA. NKA terletak pada membran basolateral, memiliki protein kompleks yang terdiri dari katalis subunit α yang terdiri dari 1022 asam amino dan subunit β terdiri dari 300 asam amino (McCormick, 1995).

Moorman *et al* (2014) melakukan penelitian mengenai perubahan salinitas terhadap ikan nila dengan variabel terikat salah satunya adalah imunokreatif ionosit NKA menggunakan metode imunohistokimia. McCormick (1995) menyebutkan bahwa penentu lingkungan yang paling banyak dikenal dan diselidiki dari pengembangan NKA dan klorida insang adalah salinitas. Inokuchi dan Kaneko (2012) menyimpulkan dari hasil penelitian pada ikan nila yang telah dilakukan bahwa terbentuknya dan degradasi dari sel yang kaya akan mitokondria (Sel klorida) dipengaruhi oleh perubahan salinitas pada lingkungannya.



Gambar 2.1. Proses keseimbangan natrium (Irawan, 2013)

Hematologi

Parameter nilai hematologi yang memperlihatkan perubahan pada darah, meliputi kadar hemoglobin, nilai hematokrit, jumlah leukosit, dan jumlah eritrosit (Rifa'i, 2002, Al-Asgah *et al*, 2015). Darah terbentuk di limpa (spleen) yang berasal dari sel punca atau hematopoiesis. Hematopoiesis merupakan proses produksi (mengganti sel yang mati) dan perkembangan sel darah dari sel induk atau stem sel, dimana terjadi proliferasi, maturasi dan diferensiasi sel yang terjadi secara serentak. Maturasi merupakan proses pematangan sel darah, sedangkan diferensiasi menyebabkan beberapa sel darah yang terbentuk memiliki sifat khusus yang berbeda-beda (Bain, 2014).

Jumlah sel darah putih (leukosit) atau (WBC/white blood cell) dan diferensiasinya merupakan bantuan hematologi yang berguna untuk evaluasi respon inang terhadap infeksi mikroba dan untuk diagnosis leukemia (Sahetapy, 2011). Meningkatnya jumlah sel darah putih (leukosit) disebut leukositosis sedangkan penurunan disebut leucopenia. Leukositosis lebih umum terjadi dari pada leucopenia dan tidak merupakan hal yang serius, bahkan mungkin hanya fisiologis (Sahetapy, 2011). Hal ini sering terjadi pada hewan yang belum dewasa dan biasanya akibat stress, juga adanya gangguan fisik sehingga leukositosis ini bisa terjadi dalam keadaan sehat ataupun sakit dan bisa bersifat fisiologis maupun patologis. Sedangkan leukopenia umumnya berhubungan dengan infeksi bakterial atau viral (Aliambar, 1999). Hasil penelitian Yanto dkk (2015) leukosit ikan nila pada kondisi normal adalah $191,98 \times 10^3 \text{ sel/mm}^3$.

Jumlah sel darah merah (eritrosit) atau (RBC/ red blood cell) merupakan sel yang paling banyak jumlahnya. Inti sel eritrosit terletak sentral dengan sitoplasma terlihat jernih kebiruan dengan pewarnaan Giemsa (Dchinabut *et al.*, 1991 dalam Mulyani, 2006). Seperti halnya pada nilai hematokrit, jumlah sel darah merah (eritrosit) yang rendah menunjukkan terjadi anemia. Logam berat kadmium (Cd) dan seng (Zn) menyebabkan defisiensi enzim G-6PD (Glukosa-6-Fosfat Dehidrogenase) dan penghambatan enzim pirimidin-5'-nukleotidase sehingga terjadi akumulasi hasil degradasi RNA serta ribosom eritrosit yang ditandai dengan ditemukannya Basophilic Stippling (terdapat bintik biru atau bintik basofilik pada eritrosit). Hal ini menyebabkan turunya masa hidup eritrosit dan meningkatnya kerapuhan membran eritrosit, sehingga terjadi penurunan jumlah eritrosit (Ganiswara, 1995). Pada ikan teleostei, jumlah normal eritrosit adalah $1,05 \times 10^6 - 3,0 \times 10^6 \text{ sel/mm}^3$ (Robert, 1978 dalam Mulyani, 2006).

Hematokrit (HCT) adalah istilah yang menunjukkan besarnya volume sel-sel eritrosit seluruhnya didalam 100 mm^3 darah dan dinyatakan dalam persen (%) (Hoffbrand dan Pettit, 1987). Hasil pemeriksaan terhadap nilai hematokrit dapat dijadikan sebagai salah satu patokan untuk menentukan keadaan kesehatan ikan. Keadaan stres pada ikan juga dapat mengganggu nilai hematokrit yang dapat berdampak pada kesehatan ikan, hal ini seperti yang diungkapkan Mazur dan Iwana (1993) bahwa kondisi stres pada hewan dapat menyebabkan peningkatan nilai hematokrit darah. Kadar hematokrit ini bervariasi tergantung pada faktor nutrisi, umur ikan, jenis kelamin, ukuran tubuh dan masa pemijahan (Sahetapy, 2011). Nilai hematokrit sebesar 40% berarti dalam darah mengandung 40% sel darah merah (Kuswardani, 2006). Nilai hematokrit pada ikan

teleostei berkisar antara 20-30%, dan pada beberapa spesies ikan laut sekitar 42% (Bond, 1979).

Hemoglobin (Hb/hemoglobin) merupakan senyawa organik yang kompleks terdiri atas 4 pigmen porfirin merah yang mengandung atom Fe dan globulin yang merupakan protein globuler (terdiri atas 4 asam amino). Hemoglobin bertanggung jawab terhadap transport oksigen dan karbondioksida dalam darah. Kadar hemoglobin berbanding searah dengan jumlah sel darah merah, semakin tinggi jumlah sel darah merah maka akan semakin tinggi pula kadar hemoglobin dalam sel darah merah tersebut (Haryono, 1978). Sintesis hemoglobin dan proses destruksinya seimbang dalam kondisi fisiologis normal, adanya gangguan pada salah satunya dapat menimbulkan gangguan hematologis yang nyata (Aliambar, 1999). Kadar hemoglobin yang rendah dapat dijadikan sebagai petunjuk mengenai rendahnya kandungan protein pakan, defisiensi vitamin atau ikan mendapat infeksi. Menurut Salasia dkk (2001) kadar hemoglobin normal ikan nila berkisar 5,05-8,33 g/dl. Karlinda (2017) menggunakan kadar hemoglobin, eritrosit, leukosit dan hematokrit sebagai paramater hematologi ikan nila yang terpapar logam Cd dan Zn.



BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan

Tujuan penelitian terbagi menjadi yaitu tujuan fungsional dan tujuan operasional. Tujuan fungsional yaitu tujuan untuk menjelaskan fenomena yang terjadi setelah perlakuan, sedangkan tujuan operasional yaitu aktivitas nyata yang dilakukan dalam penelitian untuk mengumpulkan data yang diperlukan untuk menjelaskan fenomena tersebut dan untuk mencapai tujuan fungsional.

Tujuan Fungsional

Tujuan fungsional dari penelitian ini diantaranya :

1. Menjelaskan bahwa paparan merkuri dan salinitas dapat menyebabkan perbedaan kadar Hg insang ikan nila (*O. niloticus*).
2. Menjelaskan bahwa paparan merkuri dan salinitas dapat menyebabkan perbedaan osmoregulasi ikan nila (*O. niloticus*).
3. Menjelaskan bahwa paparan merkuri dan salinitas dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi NKA insang ikan nila (*O. niloticus*).
4. Memastikan lokasi aktivitas NKA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.
5. Menjelaskan bahwa paparan merkuri dan salinitas dapat menyebabkan perbedaan konsentrasi CA insang ikan nila (*O. niloticus*).
6. Menjelaskan bahwa paparan merkuri dan salinitas dapat menyebabkan perbedaan respon hematologis ikan nila (*O. niloticus*).

Tujuan Operasional

Tujuan operasional dari penelitian ini yaitu :

1. Mengukur kadar Hg pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.
2. Mengukur tekanan osmose dan kadar ion (Na^+ , K^+ dan Cl^-) pada serum darah ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.
3. Mengukur konsentrasi NKA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.

4. Mendeteksi lokasi aktivitas NKA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.
5. Mengukur konsentrasi CA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda
6. Mengukur jumlah sel darah merah (eritrosit), jumlah sel darah putih (leukosit), nilai hematokrit dan kadar hemoglobin ikan nila yang diberi paparan merkuri pada salinitas yang berbeda.

Manfaat penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh Hg pada salinitas dan waktu paparan yang berbeda terhadap osmolalitas, kadar ion (Na^+ , K^+ , Cl^-) serum darah dan kadar Hg insang ikan nila.
2. Memberikan informasi mengenai konsentrasi NKA dan CA serta lokasi aktivitas NKA pada insang ikan nila setelah terpapar merkuri dan salinitas berbeda.
3. Memberikan informasi ilmiah mengenai seberapa jauh ikan nila mampu beradaptasi dengan lingkungannya sehingga dapat dijadikan sebagai ide untuk penelitian selanjutnya.

Sebagai informasi ilmiah untuk masyarakat baik secara nasional maupun internasional mengenai dampak Hg pada salinitas berbeda terhadap osmoregulasi dan respon hematologis ikan nila.



BAB 4

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini dilakukan untuk menguji osmolalitas dan ionik (Na, K, Cl) serum darah ikan nila, kemudian menguji kadar WBC, RBC, HGB dan HCT (hematologi) darah ikan nila, menguji kadar NKA dan CA serta uji lokalisasi NKA pada insang ikan nila (*O. niloticus*) yang dipapar merkuri dengan salinitas dan waktu berbeda.

Penelitian ini dilakukan di beberapa tempat. Untuk perlakuan salinitas dan merkuri terhadap ikan nila, uji kadar ion, osmolalitas, uji konsentrasi NKA, uji imunohistokimia untuk lokalisasi NKA dan uji hematologi dilakukan di Laboratorium Ekologi FST Unair Surabaya. Uji konsentrasi NKA dan CA di Lembaga Penyakit Tropis Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan pada Mei 2016 – November 2018.

Bahan Penelitian

Ikan uji yang digunakan adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diperoleh dari Unit Pelaksana Teknis Pengembangan Budidaya Air Tawar (UPT PBAT), Umbulan, Pasuruan dengan umur rata-rata adalah 3 - 3,5 bulan, ukuran 13 -15 cm. Media uji yang digunakan berupa air tawar yang berasal dari PDAM dan air laut yang diperoleh dari Tanjung Kodok Lamongan dengan salinitas 35 ‰.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: senyawa logam merkuri (Hg) dalam bentuk $HgCl_2$, air laut 5‰, 10‰, 15 ‰ insang ikan nila yang diambil dan dicuci dengan NaCl fisiologis (0,9%) (Amr *et al*, 2015). Bahan lain yang digunakan dalam pengamatan histologi adalah metil alkohol, ethanol, H_2O_2 3%, *Phosphat Buffer Saline* (PBS dengan pH; 7,4), antibodi primer NKA α 1 (Santa cruz biotechnology, Inc), antibodi sekunder goat anti rabbit, 3,3-diaminobenzidine-tetrachloride (DAB), 10 mL HNO_3 pekat, *coating* buffer, *coating* antigen, 100 μ L PBS Tween 0,2%, 200 μ L PBS Tween 0,2%, 100 μ L antibodi primer anti MT, assay buffer, 100 μ L antibodi sekunder IgG biotin anti rabbit, 100 μ L larutan SAHRP, 100 μ L substrat sure blue TMB microwell, dry ice, *aqua Demineralized* (akuades).

Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: jaring ikan, akuarium (40x40x60cm), aerator, jarum suntik 3 mL, tabung suntik 1mL tabung EDTA, *sample*

cup, tabung termos, galon air mineral/jerigen, mortar, autoclave, ember plastik, selang, jangka sorong, kertas label, timbangan digital, gelas ukur, aerator, *refrigerator*, microwave, pisau bedah, pinset, gunting bedah, papan bedah, sentrifuse, mikroskop, pH meter, refraktometer, *ice water bath*, pipet, mikropipet 20-200 μL , tabung Eppendorf, tabung mikro, *Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS)* dan kamera untuk dokumentasi.

Prosedur Penelitian

Tahap persiapan penelitian

A. Pengambilan, pemilihan dan aklimasi ikan nila

Sampel ikan nila yang digunakan untuk penelitian berasal dari UPT PBAT Umbulan, Pasuruan. Pemilihan ukuran ikan nila yang digunakan adalah dengan panjang total 13-15 cm. Ikan yang telah dipilih dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya kemudian dipuasakan selama 2x24 jam dan diaklimatisasi selama 1 minggu sebelum dilakukan perlakuan pemaparan merkuri dan salinitas (Souid *et al*, 2013).

B. Pembuatan media dengan salinitas 0 ‰, 5 ‰, 10 ‰ dan 15 ‰

Dalam penelitian ini, media hidup ikan nila adalah berupa air dengan salinitas berbeda. Salinitas yang berbeda diperoleh dengan cara mencampurkan antara air laut dengan air tawar (PDAM) yang telah diendapkan selama 24 jam. Perhitungan yang digunakan untuk membuat salinitas tertentu adalah dengan rumus sebagai berikut.

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

V1 : Volume air laut

V2 : Volume air tawar (PDAM)

N1 : Salinitas air laut

N2 : Salinitas media hidup yang diinginkan

C. Pembuatan larutan merkuri dengan konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L dan 1 mg/L

Merkuri adalah logam berat yang memiliki berat atom 200,59 dengan titik lebur -38,9°C dan titik didih 356,6°C. Larutan merkuri 1000 mg/L dibuat dengan menimbang kristal HgCl_2 sebanyak 1,3539 gram. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan merkuri pada penelitian ini yang digunakan adalah 0 mg/L, 0,1 mg/L, dan 1 mg/L dibuat dengan cara pengenceran

dari larutan induk merkuri dengan menggunakan contoh perhitungan rumus sebagai berikut.

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

Pembuatan larutan Hg 0,1 mg/L (mg/L):

$$\begin{aligned} V_1 N_1 &= V_2 N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ mg/L} &= 40 \text{ L} \times 0,1 \text{ mg/L} \\ V_1 &= 4 \text{ mg}/1000 \text{ mg/L} \\ V_1 &= 0,004 \text{ L} \\ V_1 &= 4 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan Hg 1 mg/L (mg/L):

$$\begin{aligned} V_1 N_1 &= V_2 N_2 \\ V_1 \times 1000 \text{ mg/L} &= 40 \text{ L} \times 1 \text{ mg/L} \\ V_1 &= 20 \text{ mg}/1000 \text{ mg/L} \\ V_1 &= 0,04 \text{ L} \\ V_1 &= 40 \text{ mL} \end{aligned}$$

Keterangan:

- V₁: Volume larutan induk merkuri (L).
 N₁: Konsentrasi larutan induk merkuri (mg/L).
 V₂: Volume larutan yang akan dibuat (L).
 N₂: Konsentrasi larutan yang akan dibuat (mg/L).

Tahap pelaksanaan penelitian

A. Tahap pemaparan merkuri terhadap ikan nila dengan salinitas berbeda

Tahap pemaparan merkuri terhadap ikan nila dengan salinitas berbeda

Ikan nila sebanyak 75 ekor yang telah diambil dari Umbulan diaklimasi dengan diberi pakan terlebih dahulu kemudian dipuasakan selama 2x24 jam. Selanjutnya setelah proses aklimatisasi selama 7 hari, dimasukkan ke dalam 15 akuarium masing-masing 5 ekor dengan diberi paparan HgCl₂ selama 5 hari konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L dan 1 mg/L dan setiap hari ikan dikorbkan untuk diamati osmolalitas, ion serum darah serta kadar Hg insangnya. Sebanyak 60 ekor ikan nila yang telah diaklimatisasi dimasukkan ke dalam 12 akuarium masing-masing 5 ekor untuk pemaparan salinitas dan HgCl₂. Sebelum dipindahkan ke akuarium yang berisi salinitas 5 ‰ ikan diaklimasi di salinitas 5 ‰ selama satu hari kemudian diberi paparan HgCl₂. Sebelum dipindahkan ke akuarium yang berisi

salinitas 10 ‰ ikan diaklimasi di salinitas 5 ‰ selama satu hari dan pada salinitas 10 ‰ selama satu hari kemudian diberi paparan HgCl₂. Untuk perlakuan salinitas 15 ‰ ikan diaklimasi di salinitas 5 ‰ selama satu hari, pada salinitas 10 ‰ selama satu hari serta di salinitas 15 ‰ selama satu hari kemudian diberi paparan HgCl₂.

Pemaparan dilakukan selama tujuh hari untuk setiap kombinasi paparan Hg dan salinitas. Untuk pengamatan harian paparan Hg dilakukan selama 5 hari. Ikan diberi pakan berupa pelet dengan rasio 1% dari berat tubuhnya setiap hari (Aruna *et al* 2015). Setiap dua hari sekali dilakukan penggantian air dan pengamatan terhadap kualitas air akuarium setiap hari yang meliputi : suhu, pH dan *Dissolved Oxygen* (DO) (Abdel-Khalek *et al* 2015). Ikan nila yang telah diberikan perlakuan paparan selama tujuh hari diambil sampel insang dan darahnya untuk diuji osmolalitas, ionik, hematologi, konsentrasi NKA dan CA serta lokalisasi NKA. Hal tersebut dilakukan pula pada seluruh kombinasi perlakuan salinitas dan paparan merkuri pada tabel 3.1.

B. Pengambilan insang dan darah ikan nila

Masing-masing akuarium diberikan 0,1 ml/10L minyak cengkeh untuk membius ikan yang akan diambil insangnya. Ikan yang berada di dalam akuarium yang telah diberi minyak cengkeh akan terbius dan melemah dalam waktu 10-15 menit, setelah ikan melemah, ditimbang dengan timbangan digital, kemudian diukur panjang total ikan, lalu dipotong operkulumnya dan diambil insang sisi kiri dan kanan. Sebagian insang untuk diawetkan dengan Paraformaldehyde (PFA) 4%, lainnya diuji konsentrasi NKA dan kadar Hg dalam insang tersebut. Sampel darah diambil dengan menggunakan syringe berukuran 1 mL yang diinjeksikan pada bagian jantung ikan melalui tubuh bagian dorsal (heart puncture). Masing-masing perlakuan jumlah ikan yang diambil sampel darahnya berjumlah 5 ekor. Darah yang diperoleh dimasukkan di *sample cup* dan tabung EDTA yang kemudian dibawa ke Laboratorium ekologi FST Unair Surabaya untuk diuji osmolalitas, ion Na⁺, K⁺ dan Cl⁻, kadar WBC, RBC, HGB serta HCT.

C. Pengujian Osmolalitas dan Kadar ionik

Uji kadar osmolalitas diawali dengan memindahkan sampel darah dari spuit ke *sample cup* atau *microtube*. Selanjutnya sampel darah dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga dan disentrifugasi (Eppendorf

centrifuge 5418 R) dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh serum darah. Serum darah dari tabung centrifuge dipindah ke sample cup yang baru dengan menggunakan *micropipette*. Serum darah dalam *sample cup* kemudian dipindah ke *microtube* dengan diambil sebanyak 10 μ L untuk diukur nilai osmolalitasnya dengan menggunakan *micro-osmometer*. Nilai osmolalitas serum darah yang diperoleh akan dinyatakan dalam satuan mOsm/kg pelarutnya.

Sampel darah yang telah diperoleh pada tahap pelaksanaan dipindah ke dalam *microtube* kemudian dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya untuk diuji kadar ion Na^+ , K^+ , dan Cl^- . Sampel darah diperoleh dari *sample cup* kemudian disentrifugasi (Eppendorf centrifuge 5418 R) dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum darah. Setelah disentrifuge, serum darah dipindah ke *microtube* dan dimasukkan ke dalam alat electrolyte analyzer (SpotChem EL SE-1520) untuk diukur kadar ion natrium (Na^+), kalium (K^+), dan klorida (Cl^-).

D. Pengujian konsentrasi NKA, CA, dan lokalisasi NKA

Penentuan konsentrasi NKA dan CA dengan metode *sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)*. Pengujian konsentrasi NKA/CA dengan prinsip *sandwich ELISA* dimulai dengan melakukan preparasi reagen yang dibutuhkan dari kit ELISA yaitu menambahkan 50 μ l larutan standar dan 40 μ l supernatan sampel (insang) pada setiap sumuran, inkubasi 37°C selama 90 menit. Cairan dibuang setelah inkubasi lalu dilakukan penambahan 10 μ l *anti NKA/CA Ab* pada setiap sumuran, kemudian dilakukan penambahan 50 μ l konsentrasi konjugat *Horse-radish Peroxidase (HRP)* pada setiap sumuran. Tahapan selanjutnya adalah inkubasi selama 60 menit dengan suhu 37°C, setelah itu dilakukan aspirasi dan pencucian dengan *buffer wash* sebanyak lima kali menggunakan *immunowash*. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan antigen yang tidak berikatan dengan antibodi, selanjutnya dilakukan, kemudian ditutup dengan *plate sealer* yang baru. Dilakukan penambahan 50 μ l *substrate reagent A* dan B pada setiap sumuran, lalu ditutup dengan *plate sealer* yang baru. Inkubasi dilakukan kembali hanya saja dengan waktu yang berbeda yaitu selama 10 menit dengan suhu 37°C tanpa cahaya, kemudian dilakukan penambahan 50 μ l *Stop Solution*, dibaca pada gelombang 450 nm dan selanjutnya hasil penghitungan konsentrasi NKA dan CA dibaca dengan menggunakan ELISA reader.

Insang dari sampel ikan yang telah didapatkan difiksasi menggunakan PFA 4% minimal 24 jam dan disimpan pada suhu 4°C (Wu *et al* 2012). Tahapan selanjutnya yaitu dehidrasi insang menggunakan metil alkohol bertingkat yang diencerkan dengan *Phospat Buffer Saline*. Selanjutnya proses embedding dilakukan pada insang yang telah didehidrasi dan dipotong dengan ketebalan 5-8 µm dan dimounting pada objek kaca yang telah dilapisi gelatin. Tahap berikutnya yaitu menghilangkan lilin dengan cara merendam xylol dan rehidrasi dengan menggunakan ethanol bertingkat (100% ethanol hingga air). Jaringan insang yang telah terhidrasi diuji keberadaan antigen NKA dengan uji imunohistokimia menggunakan metode avidin-biotin complex (ABC). Antibodi primer yang digunakan terdiri dari *rabbit polyclonal* terhadap NAKα1. Ikatan antibodi sekunder *goat anti-rabbit* dan formasi ABC divisualisasikan oleh reaksi kromogen menggunakan DAB. Sampel insang yang diwarnai dengan imunohistokimia diberi *counterstain* hematoxilin. Tahapan akhir pewarnaan tersebut yaitu *mounting* dan ditutup dengan kaca penutup dan diamati dibawah mikroskop (Armesto *et al* 2014). Tahap terakhir yaitu mendeteksi lokasi ikatan antigen NKA dengan antibodi anti NKA yang berwarna coklat, kemudian dibandingkan distribusinya antar perlakuan dari lamela primer hingga lamela sekunder.

F. Pengujian kadar WBC, RBC, HGB dan HCT

Darah yang telah diambil dimasukkan ke dalam tabung EDTA kemudian diuji dengan menggunakan alat hematologi analyzer (SFRI Blood Cell Counter 33) untuk memperoleh data respon hematologis (kadar hemoglobin (g/dL), nilai hematokrit (%), jumlah sel darah merah ($10^6 \mu\text{l}$), dan jumlah sel darah putih ($10^3 \mu\text{l}$). Sampel darah yang telah homogen dengan antikoagulan dan dicampur dengan reagent didilusi secara otomatis dengan meletakkan sampel tersebut di bawah *sucker* pada mesin hematology analyzer, mesin tersebut akan bekerja dan menghasilkan blok data processing secara otomatis yang muncul pada layar display hematology analyzer. Data selanjutnya dicatat atau dapat juga di print untuk segera dianalisis.

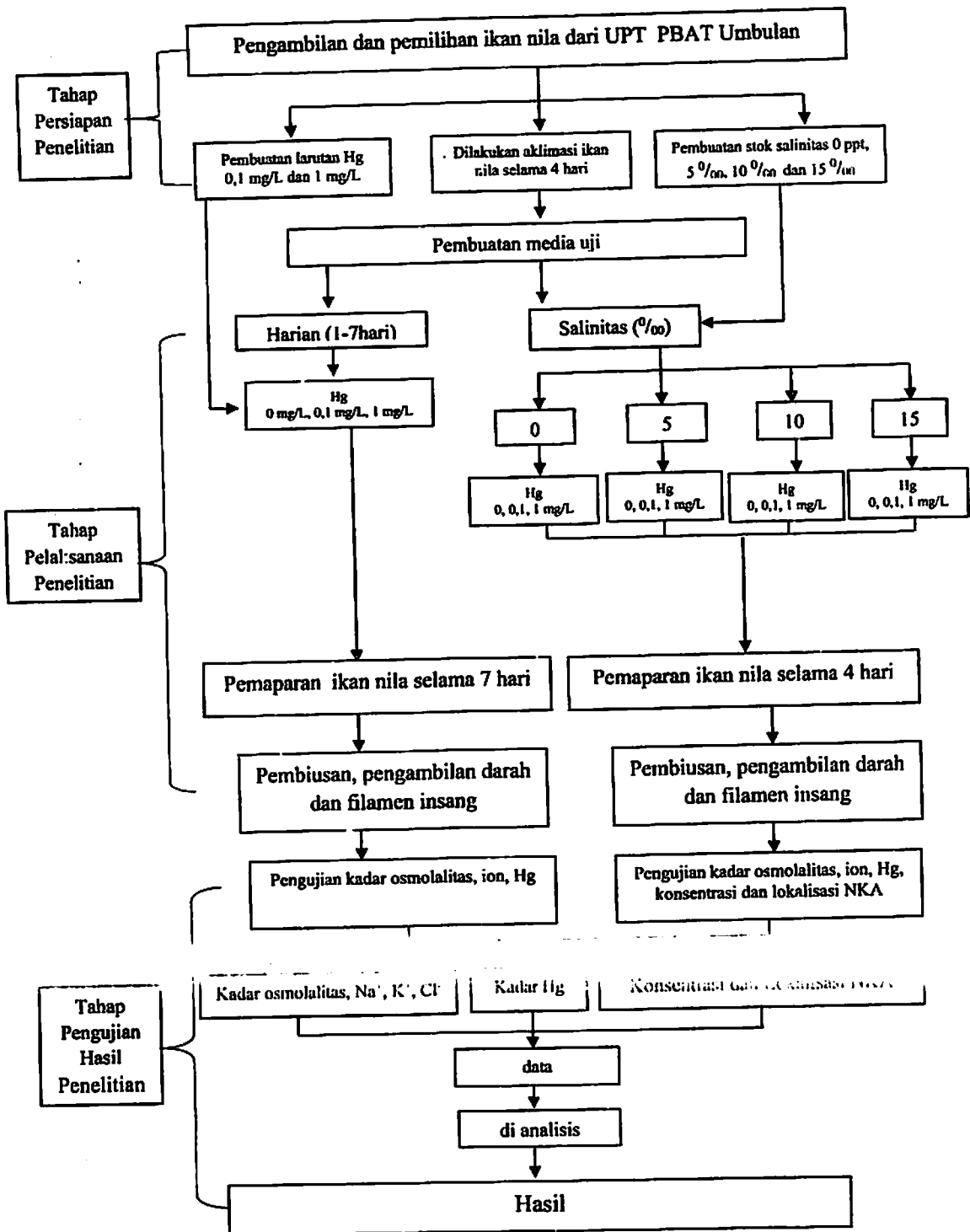
Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: salinitas media tanpa garam, 5‰, 10‰ dan 15‰ konsentrasi merkuri 0 mg/L, 0,1 mg/L dan 1 mg/L dan lama waktu paparan.

2. **Variabel Terikat:** osmolalitas serum darah, konsentrasi ion Na, K dan Cl dalam serum darah ikan, nilai hematologis yaitu WBC, RBC, HGB dan HCT, kadar NKA, CA dan lokalisasi NKA dalam insang ikan nila.
3. **Variabel Kendali:** Ikan nila, media perlakuan seperti akuarium dan air serta jenis pakan.

Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian secara skematis yang diawali dengan persiapan penelitian hingga pengolahan data dapat dilihat pada **Gambar 4.1**



Gambar 4.1. Bagan alir penelitian.

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Pemaparan merkuri dan pengambilan sampel insang dan darah ikan

Sampel ikan nila diambil dari UPT PBAT Umbulan kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Selanjutnya setelah proses aklimatisasi selama 7 hari, dimasukkan ke dalam 15 akuarium, masing-masing 8 ekor dengan diberi paparan HgCl₂ selama 7 hari konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L dan 1 mg/L dan setiap hari ikan dikorbkan untuk diamati osmolalitas, ion serum darah, dan nilai hematologisnya. Sebanyak 96 ekor ikan lainnya dimasukkan ke dalam 12 akuarium untuk perlakuan paparan salinitas dan HgCl₂ yang dikorbkan setelah 4 hari paparan.

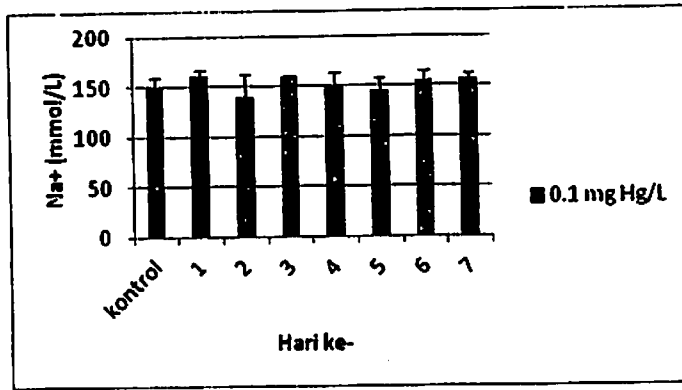
Hasil uji harian regulasi ionik dan osmolalitas

Pada bab ini akan disajikan hasil dari pengujian regulasi ionik dan osmolalitas. Hasil pengujian ini akan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Ikan yang digunakan pada penelitian ini berukuran 13,28±0,17 dengan suhu akuarium perlakuan 28,3°C ±0,15°C dan DO perairan akuarium 7,4±0,02. Ikan yang telah dipaparkan logam dengan konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L, dan 1 mg/L diambil darahnya, selanjutnya darah yang didapat disentrifugasi, diambil serumnya kemudian serum tersebut diuji kadar ion Natrium, Kalium, Klorida dan Kalsiumnya serta diukur osmolalitasnya. Hasil uji harian ion, osmolalitas, dan hematologi darah ikan nila yang terpapar merkuri dapat dilihat pada Tabel 5.1, hingga Tabel 5.16 serta Gambar 5.1 hingga Gambar 5.16

Tabel 5.1 Tabel hasil uji harian Na serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

	Na ⁺ (mmol/L) hari ke-							
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mg Hg/L	150	160,2	140,2	158,8	149,2	145,6	154,6	157
SD	10	6,140033	22,59867	2,167948	14,85598	13,01153	10,62073	5,477226

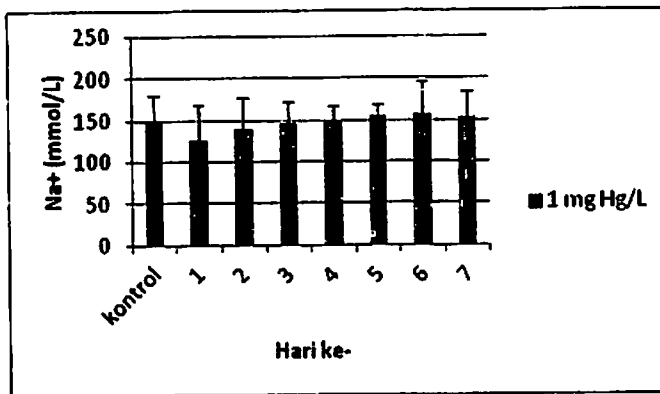




Gambar 5.1. Hasil uji harian Na serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.2. Tabel hasil uji harian Na serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

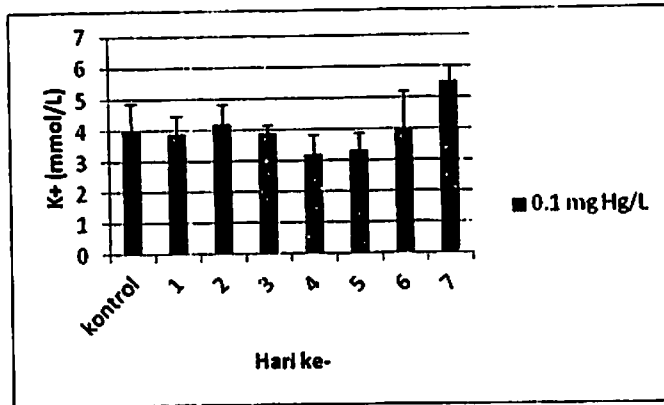
Na+ (mmol/L) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	150	126,8	140,6	146,2	150,2	155,6	157,25	152,75
SD	150	17,13768	21,06656	13,14154	9,628084	12,1161	4,112988	10,34005



Gambar 5.2. Hasil uji harian Na serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.3. Tabel hasil uji harian K serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

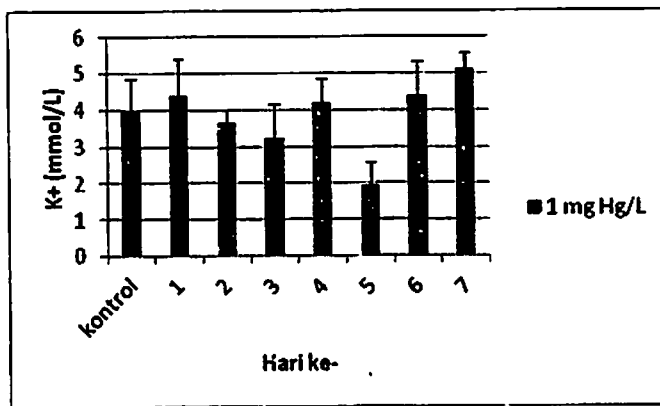
K+ (mmol/L) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mg Hg/L	4	3,9	4,2	3,9	3,2	3,36	4	5,52
SD	0,88	0,561249	0,636396	0,273861	0,667083	0,517687	1,220656	0,496991



Gambar 5.3. Hasil uji harian K serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.4 Tabel hasil uji harian K serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

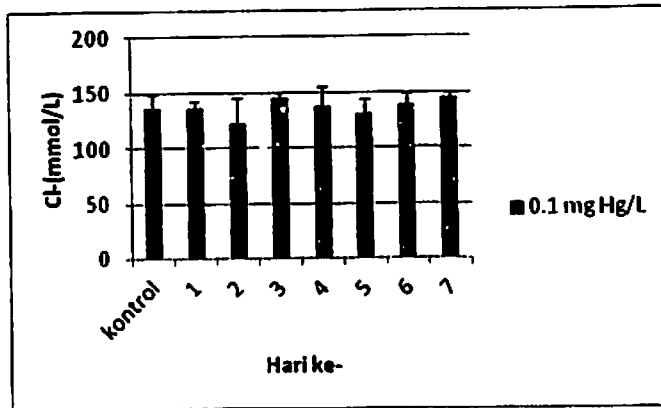
K+ (mmol/L) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	4	4,4	3,66	3,24	4,22	1,96	4,4	5,15
SD	0,88	1	0,357771	0,928978	0,637966	0,60663	0,938083	0,404145



Gambar 5.4. Hasil uji harian K serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.5 Tabel hasil uji harian Cl serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

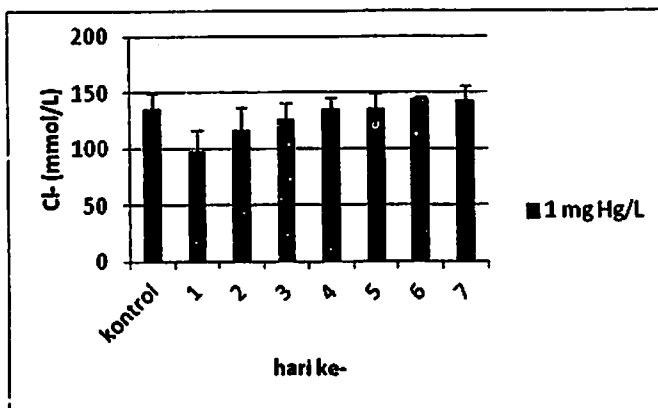
Cl- (mmol/L) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mg Hg/L	136	135,8	122	145,2	138,2	131,2	139	144,8
SD	13,24	7,120393	23,27015	5,761944	17,48428	12,33694	9,721111	5,540758



Gambar 5.5. Hasil uji harian Cl serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.6 Tabel hasil uji harian Cl serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

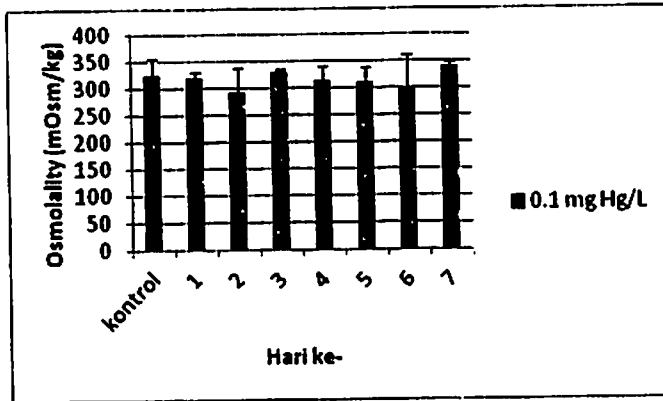
Cl- (mmol/L) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	136	97,6	117,2	127,2	136	136,2	145	143,25
SD	13,24	19,56528	20,3519	13,21741	10,19804	14,02498	1,414214	13,07351



Gambar 5.6. Hasil uji harian K serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.7 Tabel hasil uji harian osmolalitas serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

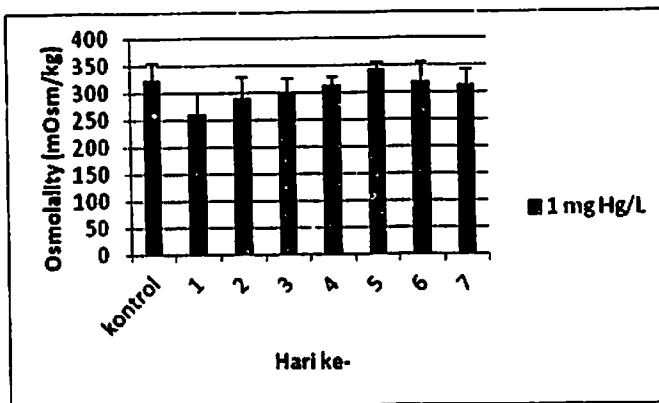
Osmolalitas (mOsm/kg) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0,1 mg Hg/L	326	319,6	294	330,2	315,2	311,4	301,4	339,6
SD	30	10,13903	43,15669	5,167204	26,12853	27,75428	60,65723	8,264381



Gambar 5.7. Hasil uji harian osmolalitas serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.8 Tabel hasil uji harian osmolalitas serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Osmolalitas (mOsm/kg) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	326	260,8	291,4	302,2	313,4	342,4	319,2	313,2
SD	30	41,23348	37,39385	25,87856	16,39512	13,20227	38,50584	30,7197



Gambar 5.8. Hasil uji harian osmolalitas serum darah ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

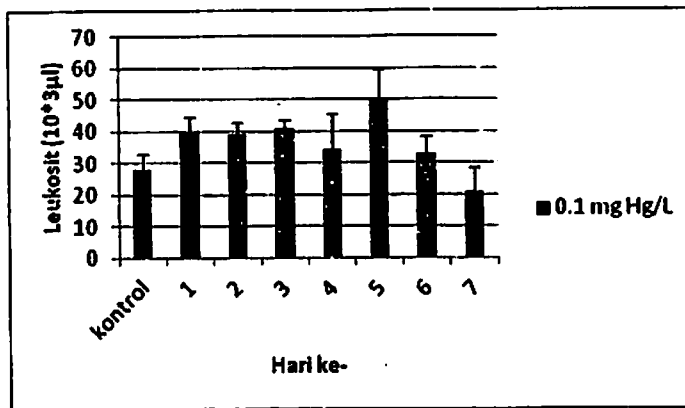
Hasil uji harian hematologis ikan nila

Hasil penelitian akan disajikan dalam bentuk tabel. Ikan yang digunakan pada penelitian ini berukuran $14,28 \pm 0,87$ dengan suhu akuarium perlakuan $25,7^\circ\text{C} \pm 0,72^\circ\text{C}$, pH perairan akuarium $7,6 \pm 0,29$ dan DO perairan akuarium $7,5 \pm 0,21$. Ikan yang telah dipaparkan logam dengan konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L dan 1 mg/L diambil darahnya menggunakan spuit

1 cc dan jarum spuit 3 cc. Selanjutnya darah yang didapat dimasukan ke dalam tabung vakum yang berisi EDTA, lalu diuji jumlah WBC, RBC, HGB dan HCT darah tersebut. Kendala dari penelitian ini adalah sedikitnya darah ikan yang didapat sehingga darah yang didapat menggumpal serta sulit untuk dilakukan pengujian. Hal tersebut yang mengakibatkan peneliti harus melakukan pengulangan. Hasil uji hematologi darah ikan nila yang terpapar merkuri dan salinitas dapat dilihat pada Tabel dan Gambar 5.9 hingga tabel 5.16.

Tabel 5.9 Tabel hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

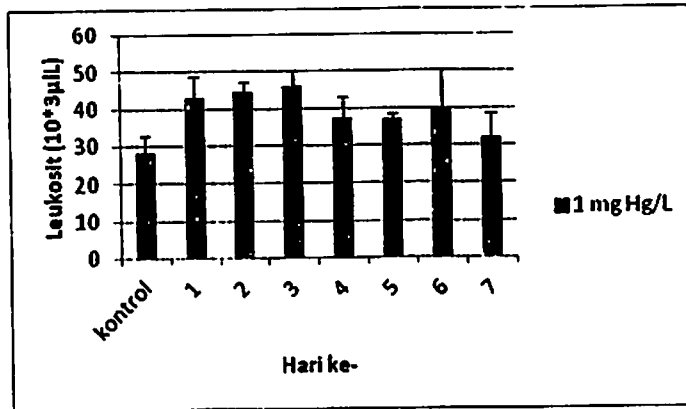
Leukosit ($10^3 \mu\text{l}$) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mg Hg/L	28,3	40,08	39,52	40,96	34,38	50,6	33,1	21,02
SD	4,6	4,77462	3,299545	2,944996	10,95819	9,156692	5,356305	7,712782



Gambar 5.9. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.10 Tabel hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

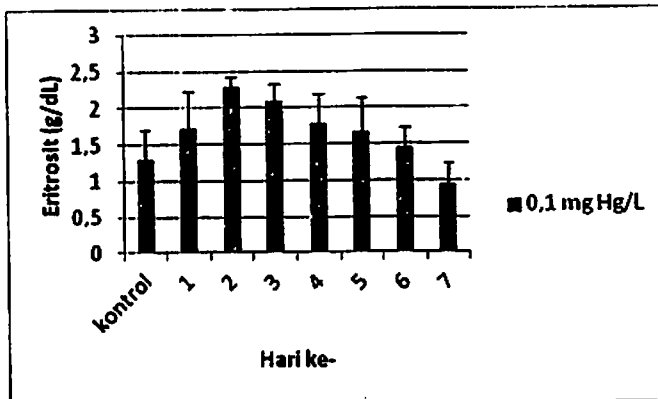
Leukosit ($10^3 \mu\text{l}$) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	28,3	43,14	44,46	46,08	37,4	37	39,93333	32
SD	4,6	5,759601	2,809448	4,16137	5,635601	1,519868	10,36163	6,488837



Gambar 5.10. Hasil uji harian leukosit ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.11 Tabel hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

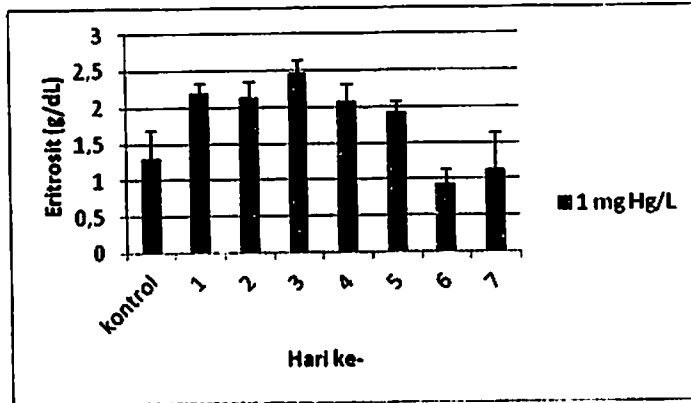
Eritrosit (g/dL) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0,1 mg Hg/L	1,3	1,732	2,284	2,106	1,776	1,678	1,456667	0,944
SD	0,4	0,502762	0,149766	0,230825	0,424653	0,463379	0,273922	0,288496



Gambar 5.11. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.12 Tabel hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

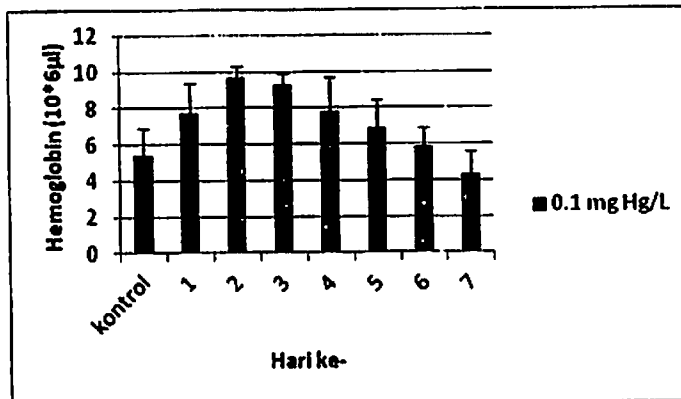
Eritrosit (g/dL) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	1,3	2,2	2,132	2,468	2,078	1,922	0,946667	1,136
SD	0,4	0,143875	0,2272	0,179778	0,240562	0,152217	0,1823	0,502524



Gambar 5.12. Hasil uji harian eritrosit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.13 Tabel hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

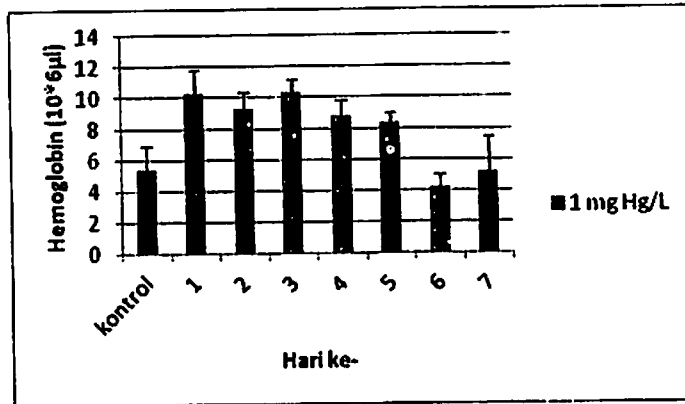
Hemoglobin (10*6µl) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0.1 mg Hg/L	5,4	7,8	9,68	9,34	7,88	6,88	5,933333	4,32
SD	1,5	1,570032	0,672309	0,598331	1,81989	1,605304	0,960902	1,296919



Gambar 5.13. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.14 Tabel hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

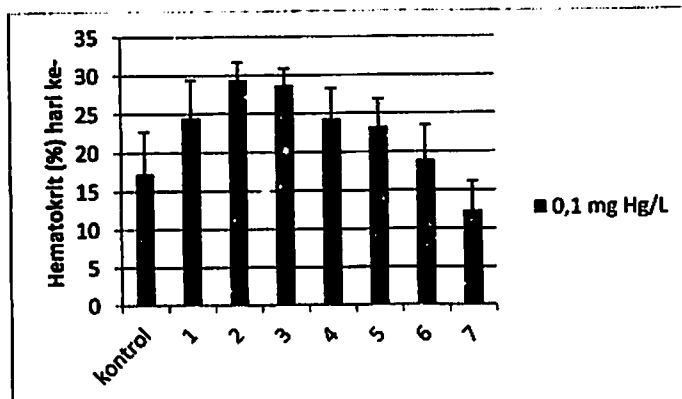
Hemoglobin (10*6µl) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	5,4	10,26	9,24	10,34	8,82	8,38	4,166667	5,18
SD	1,5	1,558204	1,154556	0,841427	1,030534	0,657267	0,83865	2,281885



Gambar 5.14. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Tabel 5.15 Tabel hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

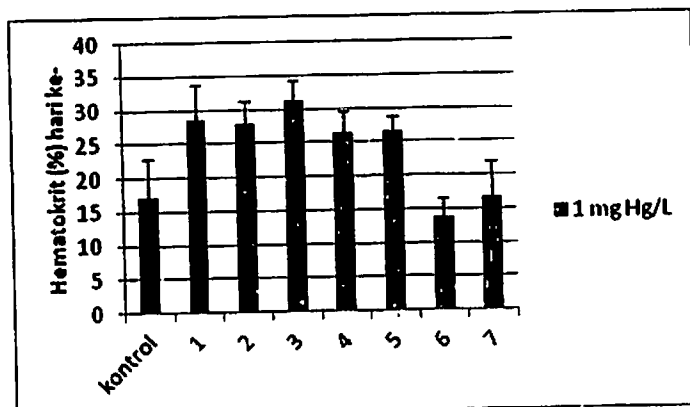
Hematokrit (%) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
0,1 mg Hg/L	17,3	24,5	29,4	28,7	24,32	23,26	18,93333	12,38
SD	5,5	4,934065	2,378024	2,238303	3,985223	3,614277	4,518112	3,766563



Gambar 5.15. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 0,1 mg/L

Tabel 5.16 Tabel hasil uji harian hematokrit ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Hematokrit (%) hari ke-								
	kontrol	1	2	3	4	5	6	7
1 mg Hg/L	17,3	28,62	27,96	31,28	26,48	26,62	13,8	16,76
SD	5,5	5,240897	3,437005	3,057286	3,094673	2,260973	2,787472	5,31112



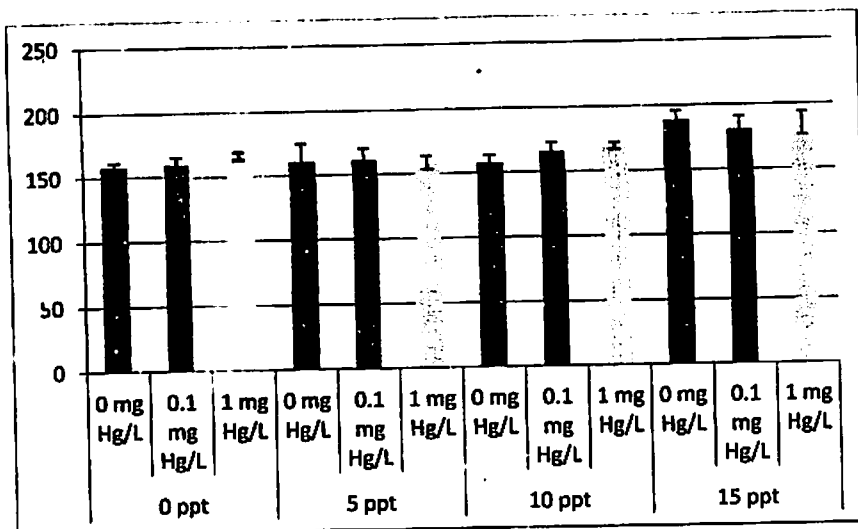
Gambar 5.16. Hasil uji harian hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 1 mg/L

Hasil uji osmoregulasi dan hematologis ikan nila selama 4 hari paparan

Pada bab ini akan disajikan hasil dari pengujian regulasi ionik dan osmolalitas. Hasil pengujian ini akan disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Ikan yang digunakan pada penelitian ini berukuran $13,28 \pm 0,17$ dengan suhu akuarium perlakuan $28,3^\circ\text{C} \pm 0,15^\circ\text{C}$ dan DO perairan akuarium $7,4 \pm 0,02$. Ikan yang telah dipaparkan logam dengan konsentrasi 0 mg/L, 0,1 mg/L, dan 1 mg/L diambil darahnya, selanjutnya darah yang didapat disentrifugasi, diambil serumnya kemudian serum tersebut diuji kadar ion Natrium, Kalium, Klorida dan Kalsiumnya serta diukur osmolalitasnya. Hasil uji ion, osmolalitas, dan hematologi darah ikan nila yang terpapar merkuri dan salinitas selama 4 hari dapat dilihat pada Tabel 5.17 hingga Tabel 5.24 serta Gambar 5.17 hingga Gambar 5.24. Hasil uji kadar NKA dan CA pada insang dan ginjal ikan nila yang diberi paparan dapat dilihat pada Tabel 5.25 hingga 5.28 serta Gambar 5.25 dan 5.28.

Tabel 5.17 Tabel hasil uji natrium serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

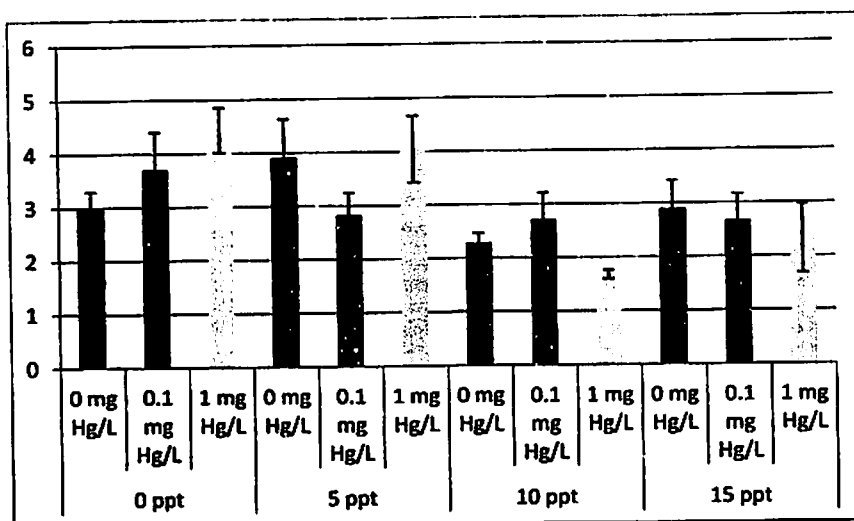
Salinitas	Hg							
	0 mg Hg/L		0,1 mg Hg/L		0,5 mg Hg/L		1 mg Hg/L	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
0 ppt	158,2	3,1144823	159,2	5,932959	162,8	6,534524	166	2,915476
5 ppt	160,6	14,79189	161,4	9,396808	162	7,035624	158,8	5,310367
10 ppt	157,4	6,1481705	166,2	7,014271	166,4	3,04959	169,8	2,588436
15 ppt	188,667	7,0237692	181	10,29563	183,25	6,075909	185	8,906926



Gambar 5.17. Hasil uji natrium serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.18 Tabel hasil uji kalium serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

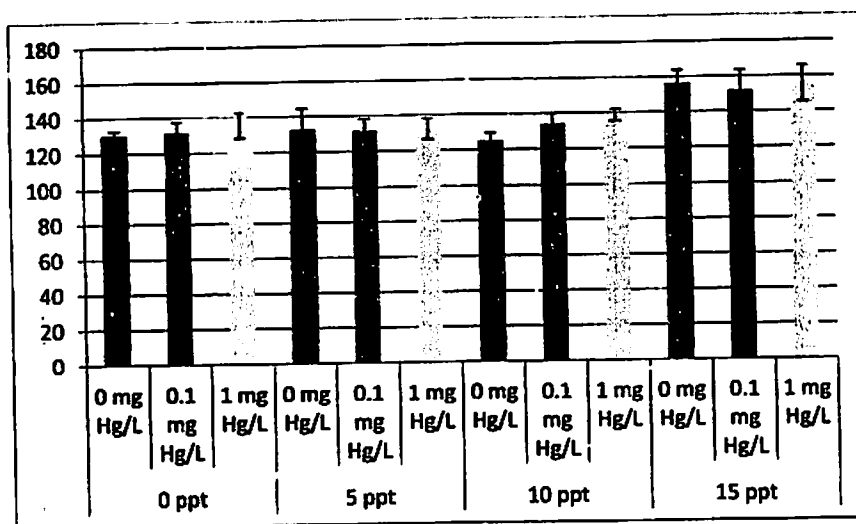
Salinitas	Hg							
	0 mg Hg/L		0,1 mg Hg/L		0,5 mg Hg/L		1 mg Hg/L	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
0 ppt	2,98	0,319374	3,72	0,683374	4,2	0,533854	4,44	0,415933
5 ppt	3,93	0,715542	2,836	0,418903	1,94	0,403733	4,06	0,61887
10 ppt	2,28	0,1788854	2,72	0,496991	1,56	0,336155	1,68	0,083666
15 ppt	2,9	0,52915	2,67	0,499166	5,275	1,717314	2,32	0,639661



Gambar 5.18. Hasil uji kalium serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.19 Tabel hasil uji klorida serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

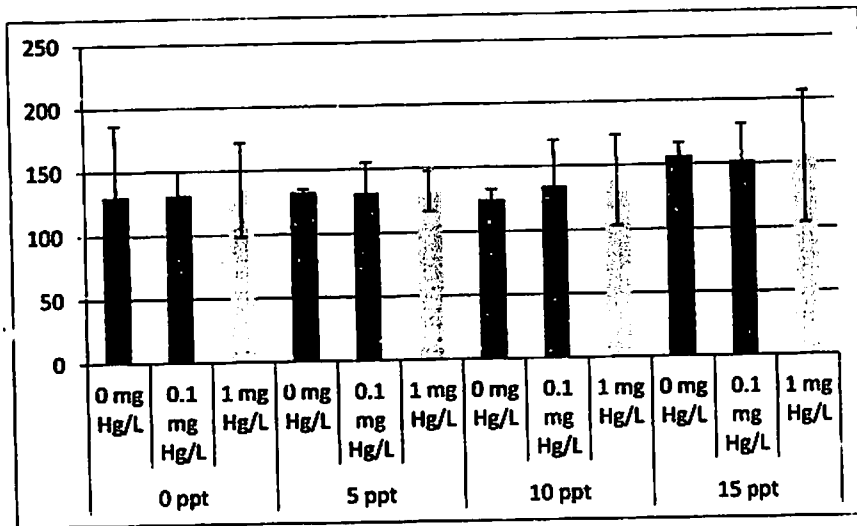
Salinitas	Hg							
	0 mg Hg/L		0,1 mg Hg/L		0,5 mg Hg/L		1 mg Hg/L	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
0 ppt	130,4	2,607681	131,6	5,94138	136,4	7,503333	135,6	7,231874
5 ppt	133	11,726039	131,6	6,841053	132,2	6,058052	132,4	5,85662
10 ppt	125,2	4,2071368	134,2	6,058052	135	4,123106	138,8	3,271085
15 ppt	156,33	7,5055535	152,25	11,14675	161	8,041559	155,5	10,21437



Gambar 5.19. Hasil uji klorida serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.20 Tabel hasil uji osmolalitas darah ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1, dan 1 mg/L dalam (mOsm/kg) selama 4 hari

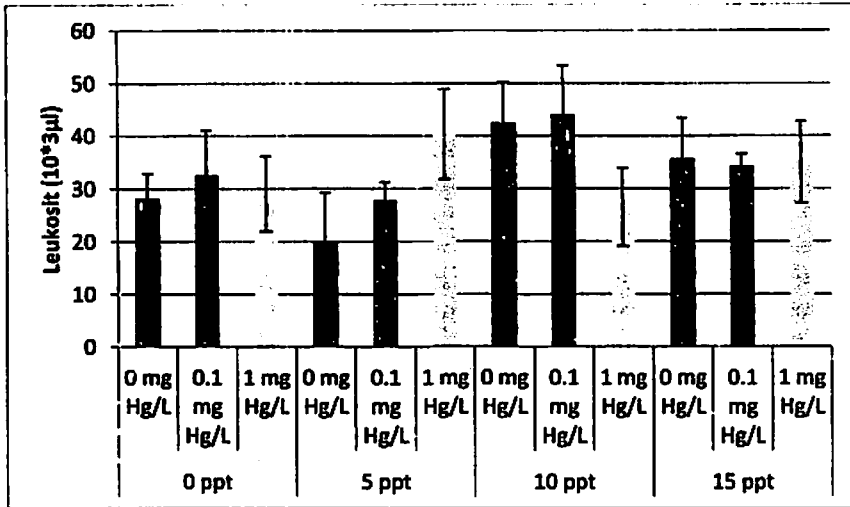
osmolalitas			
0 ppt	0 mg Hg/L	383	56,43285
	0.1 mg Hg/L	346,4	18,60914
	1 mg Hg/L	375	36,7242
5 ppt	0 mg Hg/L	353,25	2,5
	0.1 mg Hg/L	323,4	23,77604
	1 mg Hg/L	356,4	15,51773
10 ppt	0 mg Hg/L	355,25	7,804913
	0.1 mg Hg/L	365	36,3318
	1 mg Hg/L	399,8	35,40056
15 ppt	0 mg Hg/L	379,75	10,68878
	0.1 mg Hg/L	398,75	28,8603
	1 mg Hg/L	434,6	51,19863



Gambar 5.20. Hasil uji osmolalitas serum darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.21 Tabel hasil uji leukosit ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L harian

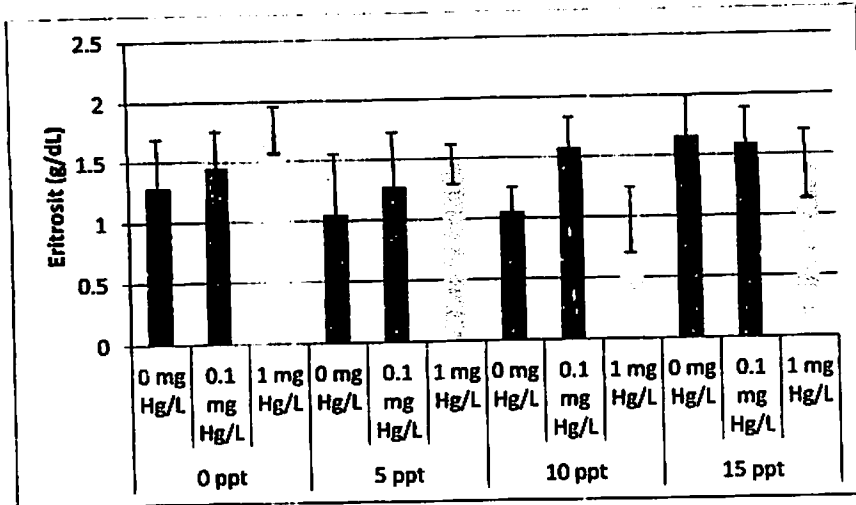
Leukosit ($10^3 \mu\text{l}$)			
0 ppt	0 mg Hg/L	28,3	4,649193
	0.1 mg Hg	26,58984	14,93341
	1 mg Hg/L	29,14162	19,11332
5 ppt	0 mg Hg/L	17,92	11,17596
	0.1 mg Hg	18,85919	9,79672
	1 mg Hg/L	29,47697	22,91899
10 ppt	0 mg Hg/L	44,14	7,51984
	0.1 mg Hg	33,02521	16,40356
	1 mg Hg/L	33,909	18,32814
15 ppt	0 mg Hg/L	34,1	8,80426
	0.1 mg Hg	29,01246	11,97903
	1 mg Hg/L	24,21622	14,62197



Gambar 5.21. Hasil uji leukosit darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.22 Tabel hasil uji critrosit ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

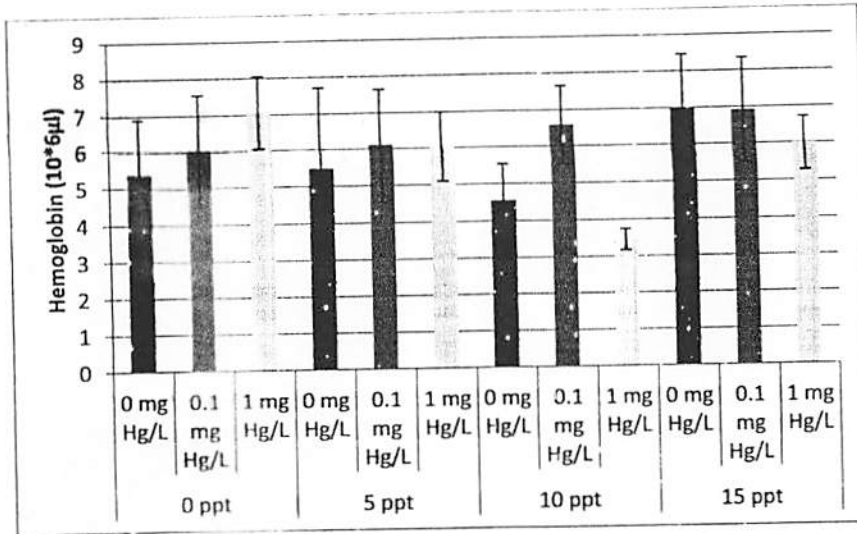
		Eritrosit (g/dL)	
0 ppt	0 mg Hg/L	1,288	0,404809
	0.1 mg Hg/L	1,454	0,307213
	1 mg Hg/L	1,768	0,196774
5 ppt	0 mg Hg/L	1,05	0,505668
	0.1 mg Hg/L	1,166	0,565624
	1 mg Hg/L	1,140541	0,56262
10 ppt	0 mg Hg/L	1,056667	0,198461
	0.1 mg Hg/L	1,215025	0,260887
	1 mg Hg/L	0,914	0,700082
15 ppt	0 mg Hg/L	1,665714	0,328778
	0.1 mg Hg/L	1,594	0,296024
	1 mg Hg/L	1,42	0,285132



Gambar 5.22. Hasil uji eritrosit darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.23 Tabel hasil uji hemoglobin ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

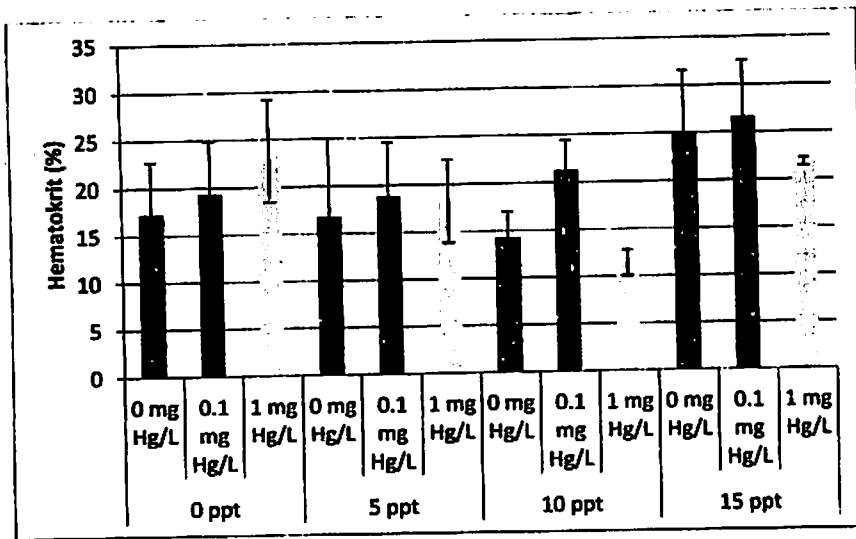
Hemoglobin (10*6µl)			
0 ppt	0 mg Hg/L	5,38	1,520526
	0.1 mg Hg/L	6,04	1,527416
	1 mg Hg/L	7,06	0,998999
5 ppt	0 mg Hg/L	5,5	2,219234
	0.1 mg Hg/L	5,52	2,254329
	1 mg Hg/L	5,64	1,504327
10 ppt	0 mg Hg/L	4,566667	0,972968
	0.1 mg Hg/L	6,6	1,059874
	1 mg Hg/L	3,42	2,094517
15 ppt	0 mg Hg/L	7,014286	1,453076
	0.1 mg Hg/L	6,94	1,409965
	1 mg Hg/L	6	0,72111



Gambar 5.23. Hasil uji hemoglobin darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.24 Tabel hasil uji hematokrit ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

Hematokrit (%)			
0 ppt	0 mg Hg/L	17,28	5,470558
	0.1 mg Hg/L	19,4	5,466717
	1 mg Hg/L	23,88	5,381171
5 ppt	0 mg Hg/L	16,84	8,176368
	0.1 mg Hg/L	18,928	5,594544
	1 mg Hg/L	18,22	4,372299
10 ppt	0 mg Hg/L	14,31667	2,751303
	0.1 mg Hg/L	21,31429	3,111499
	1 mg Hg/L	11,44	1,374045
15 ppt	0 mg Hg/L	25,12857	6,41709
	0.1 mg Hg/L	26,66	5,859437
	1 mg Hg/L	21,83333	0,404145

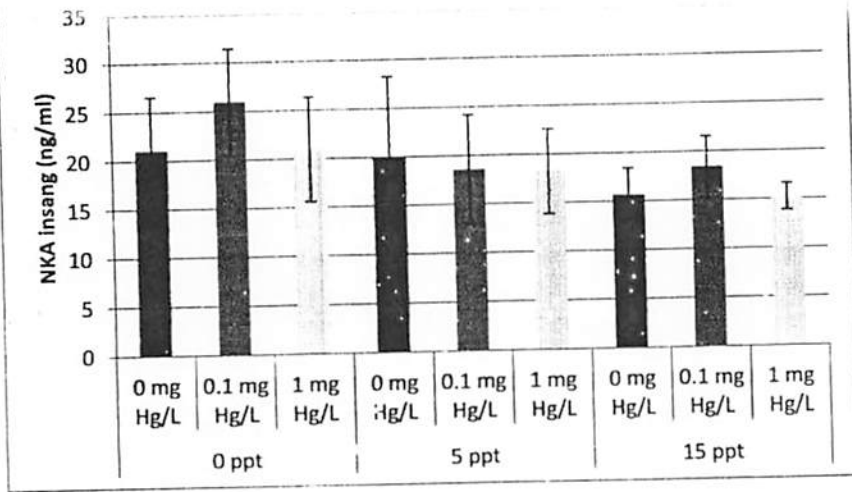


Gambar 5.24. Hasil uji hematokrit darah ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

Tabel 5.25 Tabel hasil uji kadar NKA insang ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

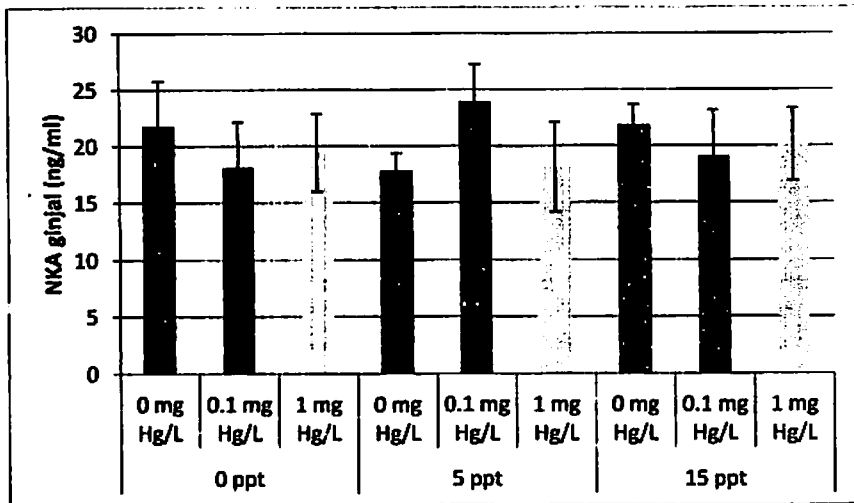
NKA insang (ng/ml)			
0 ppt	0 mg Hg/L	21,1028	5,268809
	0.1 mg Hg/L	26,0068	5,177949
	1 mg Hg/L	20,9898	5,426676
5 ppt	0.1 mg Hg/L	16,8158	4,271558
	1 mg Hg/L	18,2714	4,091492
15 ppt	0 mg Hg/L	15,6838	3,209751
	0.1 mg Hg/L	18,4562	4,254353
	1 mg Hg/L	15,2386	2,465732

Gambar 5.25. Hasil uji NKA insang ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas



Tabel 5.26 Tabel hasil uji kadar NKA ginjal ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

NKA ginjal (ng/ml)			
0 ppt	0 mg Hg/L	21,8295	3,959741
	0.1 mg Hg/L	18,15375	4,030837
	1 mg Hg/L	19,47725	3,442819
5 ppt	0 mg Hg/L	17,8915	1,522609
	0.1 mg Hg/L	23,972	3,287212
	1 mg Hg/L	18,14325	3,961482
15 ppt	0 mg Hg/L	21,9055	1,782974
	0.1 mg Hg/L	19,08875	4,073885
	1 mg Hg/L	20,099	3,22241

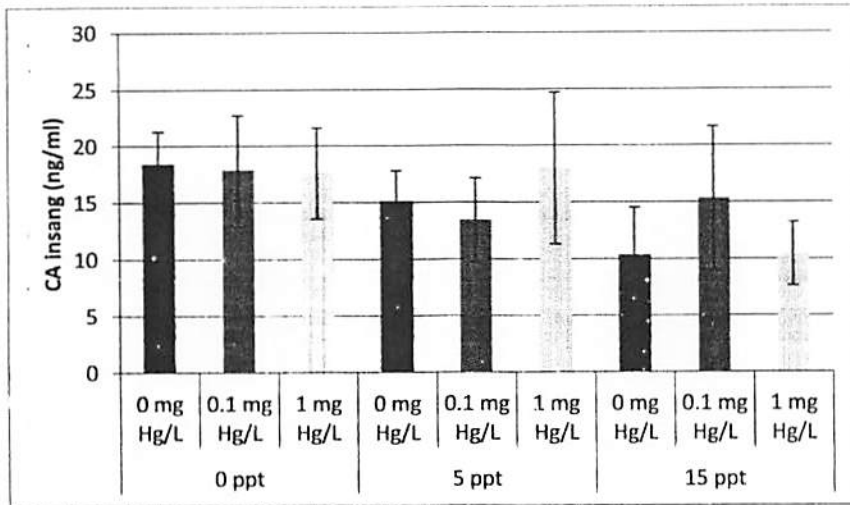


Gambar 5.26. Hasil uji NKA ginjal ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas

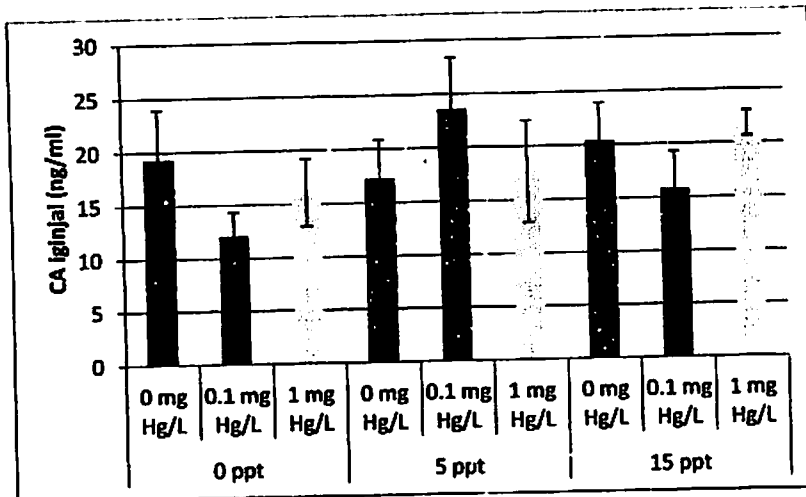
Tabel 5.27 Tabel hasil uji kadar CA insang ikan nila yang dipapar merkuri 0, 0,1 dan 1 mg/L selama 4 hari

CA insang (ng/ml)			
0 ppt	0 mg Hg/L	18,4246	2,876004
	0.1 mg Hg/L	17,884	4,869235
	1 mg Hg/L	17,6158	4,007356
5 ppt	0 mg Hg/L	15,166	2,655595
	0.1 mg Hg/L	13,4692	3,664816
	1 mg Hg/L	18,0414	6,708016
15 ppt	0 mg Hg/L	10,4016	4,147742
	0.1 mg Hg/L	15,3378	6,351274
	1 mg Hg/L	10,4324	2,795144

Gambar 5.27. Hasil uji CA insang ikan nila yang dipapar merkuri dan salinitas



CA ginjal (ng/ml)			
0 ppt	0 mg Hg/L	19,30125	4,661429
	0.1 mg Hg/L	12,11975	2,198855
	1 mg Hg/L	16,1085	3,138747
5 ppt	0 mg Hg/L	17,274	3,602348
	0.1 mg Hg/L	23,596	4,787877
	1 mg Hg/L	17,6795	4,757289
15 ppt	0 mg Hg/L	20,42075	3,537705
	0.1 mg Hg/L	15,8455	3,414347
	1 mg Hg/L	21,83975	1,175024



Gambar 5.29. Hasil uji CA Iginjal pada ikan nila yang dipelihara pada konsentrasi merkuri...

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan di tahun pertama, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Konsentrasi merkuri 1 mg/L menyebabkan kematian ikan yang tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 0,1 dan 0,5.
2. Didapatkan sampel darah yang sedikit dari ikan nila yang dipelihara pada konsentrasi 1 mg/L dan 0,1 mg/L sehingga perlu dilakukan pemaparan kembali

3. Jumlah ikan yang hidup dari 160 ekor yang dipelihara pada penelitian lanjutan adalah 112 ekor.
4. Telah didapatkan hasil uji hematologi pada darah ikan nila yang dipapar pada Hg dan salinitas berbeda selama 4 hari dengan hasil yang cukup variatif.
5. Kadar natrium dan klorida pada serum darah ikan yang diberi perlakuan merkuri dan salinitas selama 4 hari meningkat.

Saran

1. Perlu dilakukan penghitungan dengan teliti untuk konsentrasi merkuri yang dipaparkan pada media hidup ikan nila.
2. Dibutuhkan sampel ikan lebih banyak guna mengantisipasi sedikitnya darah yang didapat dan adanya sampel darah ikan yang lisis.
3. Perlu dilakukan uji lanjutan mengenai kadar asam basa pada darah ikan nila yang diberi paparan merkuri dan salinitas.



DAFTAR PUSTAKA

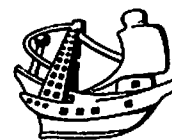
- Abdel-Fattah, M dan El-Sayed. 2006. Tilapia culture. Edited by CABI Publishing, Cambridge, USA.
- Abdel, T. M. dan Wafeek, M. 2008. Response of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) to Environmental Cadmium Toxicity During Organic Selenium Supplementation. *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*.
- Abdel-Khalek, A. A., M. A. M, Kadry, S. R. Badran, M. S. Marie. 2015. *Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; Oreochromis niloticus: Biochemical and oxidative stress. The Journal of Basic & Applied Zoology* (2015) 72,43–57.
- Almeida, J. A., Y.S. Diniz, S.F.G. Marques, L.A. Faine, B.O. Ribas, R.C. Burncikob, E.L.B. Novelli. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International* 27 (2002) 673–679.
- Anggoro, S, 1992. Efek Osmotic Berbagai Tingkat Salinitas Media Terhadap Daya Tetas Telur Dan Vitalitas Larva Udang Windu *Penaeus monodon*. Disertasi: Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Anhar, M., K.S. Henry., D. Aradhita., A. Hazrina. 2008. Cara Makan dan Kebiasaan Makan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) dan Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*). Penulisan Ilmiah. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Atli, G and Mustafa. 2010. *Response of antioxidant system of freshwater fish Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Hg, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety* 73 (2010) 1884–1889. Turki.
- Atli G, Canli M. 2011. *Alterations in ion levels of freshwater fish Oreochromis niloticus following acute and chronic exposures to five heavy metals*. Turk J Zool 35(5):725–736.
- Basha PS, Rani AU. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf* 56:218–221.
- Blanchard J, Grosell M. 2006. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities *Aquat Toxicol* 80:131–139.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Mitchell, L. C., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., dan Jackson, R. B. 2004. *Biologi: edisi 8 jilid 3*. Jakarta: Erlangga.



- Connell D.W. dan Miller G. J. 1995. *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. Jakarta: Universitas Indonesia press.
- Cao, L., W. Huang., X. Shan., Z. Ye and S. Dou. 2012. *Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles*. *Environmental toxicology and pharmacology*. Cina.
- Effendy, H. 2003. *Telaah Kualitas Air*. Kanisius: Yogyakarta.
- Erlangga. 2007. *Efek Pencemaran Perairan Sungai Kampar Di Provinsi Riau Terhadap Ikan Baung (Hemibagrus Nemurus)*. Thesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Garcia-Santos, S., S. Monteiro., S. Malakpour-Kolbadinezhad. 2015. *Effects of Hg injection on osmoregulation and stress indicators in freshwater Nile tilapia*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. Portugal.
- Grosell, M., Nielsen, C., Bianchini A. 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 133:287–303.
- Erlangga. 2007. *Efek Pencemaran Perairan Sungai Kampar Di Provinsi Riau Terhadap Ikan Baung (Hemibagrus Nemurus)*. Thesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Fatima, M., N. Usmani, F. Firdaus, M. F. Zafeer, S. Ahmad, K. Akhtar, S. M. D. Husaine, M. H. Ahmad, E. Anis, M. M. Hossain. 2015. *In vivo induction of antioxidant response and oxidative stress associated with genotoxicity and histopathological alteration in two commercial fish species due to heavy metals exposure in northern India (Kali) river*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*.
- Getachew, T and C. H. Fernando. 1989. *The food habits of an herbivorous fish (Oreochromis niloticus Linn.) in Lake Awasa, Ethiopia*. *Hydrobiologia* 174: 195-200, 1989.
- Handajani, U. S., Agus, S. dan Ristina, Y. 2001. *Pengaruh Salinitas Terhadap Akumulasi Hg pada Insang Udang (Macrobrachium sintangense)*. *Jurnal Matematika dan ilmu pengetahuan Alam* Vol 6 Page 159-163.
- Hogstrand C, Ferguson EA, Galvez F, Shaw R, Webb NA, Wood CM. 1999. *Physiology of acute silver toxicity in the starry flounder (Platichthys Stellatus) in seawater*. *J Comp Physiol B* 169:461–473.
- Jin, Y., Z. Liu., F. Liu., T. Peng and Z. Fu. 2015. *Embryonic exposure to cadmium (II) and chromium (VI) induce behavioral alterations, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish (Danio rerio)*. *Neurotoxicology and Teratology*. Cina.

- Li, Z, H. Li., P. Randak T. 2011. *Evaluating the toxicity of environmental concentrations of waterborne chromium (VI) to a model teleost, *Oncorhynchus mykiss*: a comparative study of in vivo and in vitro*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153:402–407.
- Lignot, J. H., Spanings, C. P., Charmantier, G: 2000. *Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans*. *Review. Aquaculture*. 191: 209-245.
- Liu, G., Z. Sheng., Y. Wang., Y. Han., Y. Zhou and J. Zhu. 2015. *Glutathione peroxidase 1 expression, malondialdehyde levels and histological alterations in liver of *Acrossocheilus fasciatus* exposed to cadmium chloride*. *Gene. Cina*.
- Lutfiyah, L. 2014. *Studi Perkembangan Vertebra Larva Hasil Penetasan Telur Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) pada Salinitas yang Berbeda dengan Metode Pewarnaan Ganda*. Tesis. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mance, G. 1990. *Pollution Threat Of Heavy Metals In Aquatic Environments*. *Elsevier Applied Science*: London And New York.
- Mohanty, B. P., M. R Mahananda., S. Pradhan. 2013. *Cadmium Induced Toxiced and antioxidant Activities in *Labeo Rohita* (Hamilton)*. *Environment and Ecology Research*. India.
- Monteiro, M. S., Mancera, M. J., Fernandes, F. A., dan Sousa, M. 2005. *Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus**. *Comparative Biochemistry and Physiology Elsevier*, Vol. 141 Page 375 –383.
- Nicole, J. A. C. 1967. *The Biology of Marine Animals*. Interscience Publishers: New York.
- Nursanti L. 2016. *Kadar Kadmium dan Metallothionein pada Insang Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Dipapar Kadmium dengan Salinitas Berbeda*. Tesis. Universitas Airlangga.
- Palar, H. 2008. *Pencemaran dan Toksikologi Logam Berat*. Rineka Cipta: Jakarta.
- Popma, T and Masser M. 1999. *Tilapia life history and biology*. Southern. Regional Aquaculture Center Publication 283.
- Portier, J. C. 2012. *Toxicological Profile for Cadmium*. *Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry*: Atlanta.
- Pugazhendy, K., A. Revathi, K. Murugan and J. Hwang. 2015. *Chelating properties of *Cardiospermum halicacabum* against Cadmium toxicity on antioxidant enzyme*

- activities in the Fresh water Crab, *Paratelphusa hydrodromaus*. *Int. J. Adv. Res. Biol.Sci.* 2(5): (2015): 183–188.
- Sanchez, W., Palluel O., Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:177--183.
- Soares, S.S., H. Martin., C. Gutiérrez-Merino and M. Aureliano. 2008. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers. *Spainol.*
- Soud, G., N. Souayed., F. Yaktiti, and K. Maaroufi. 2013. Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Tunisia.
- Sudarmaji., J. Mukono dan I. P. Corie. 2006. Toksikologi Logam Berat B3 dan Dampaknya Terhadap Kesehatan. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. Vol. 2, No.2, Januari 2006:129-142.
- Sudiana, I. K. 2008. Patobiologi Molekuler Kanker. *Salemba Medika*,35-52.
- Triastuti, J. 2014. Pengaruh Induksi Hipersalinitas Terhadap Gangguan Perkembangan dan Kejadian Kelainan Pada Embrio dan Larva Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus* L.) Jatimbulan. Disertasi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wang, R., M. Wong dan W. Wang. 2010. *Mercury exposure in the freshwater tilapia Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution* 158 (2010) 2694e2701.
- Wong, C. K.C dan Wong, M. H. 2000. *Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (Oreochromis mossambicus) to ambient cadmium exposure*. *Aquat Toxicol*.Vol 48 Page 517–527.
- Wurdiyanto, G. 2007. Merkuri, Bahayanya dan Pengukurannya. *Buletin Alara* 9, (1,2).
- Zayed, A. M and S. A. Mohamed. 2004. *Morphological study on the gills of two species of fresh water fishes: Oreochromis niloticus and Clarias gariepinus*. *Ann Anat* 186 (2004): 295-304. Mesir.



Oxidative stress responses in gills of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 following exposure to cadmium at different salinities

Sri SHOFIATUN, Kiki SYAPUTRI HANDAYANI, Hasti SURYANI, Bambang IRAWAN and Agoes SOEGIANTO*
Department of Biology, Faculty of Sciences and Technology, Universitas Airlangga,
Kampus C, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115 Indonesia
*E-mail: agoes_soegianto@unair.ac.id; soegiant@indo.net.id

Abstract: The present study investigated the effects of sublethal concentrations of cadmium (Cd) at different salinity level on the levels of catalase (CAT), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in gills of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. The levels of CAT in gills were significantly higher at salinity 5 than at 15 and 27 with and without Cd exposure. At salinities 5 and 27, the levels of CAT in control gills were significantly higher than in Cd-exposed gills. The levels of GSH in both control and Cd-exposed gills at all salinities were not significantly different. The level of MDA in Cd-exposed gills at salinity 5 was higher than in control gills. Meanwhile the MDA levels in control and Cd-exposed gills at salinity 15 and 27 were not significantly different. The high level of MDA paralleled with the low activity of CAT at low salinity suggested that salinity played a protective role for shrimp under Cd exposure.

Résumé : Réponse au stress oxydatif dans les branchies de la crevette blanche *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 après une exposition au cadmium sous différentes salinités. Cette étude a porté sur les effets de concentrations non létales de cadmium (Cd) sous différentes salinités sur le niveau de catalase (CAT), de glutathion (GSH) et de malondialdéhyde (MDA) dans les branchies de la crevette blanche *Litopenaeus vannamei*. Les niveaux de CAT dans les branchies étaient significativement supérieurs à une salinité de 5 qu'à une salinité de 15 et 27, que ce soit avec ou sans exposition au Cd. Aux salinités 5 et 27, le niveau de CAT des branchies était significativement supérieur dans les branchies témoins que dans celles exposées au Cd. Les niveaux de GSH n'étaient pas significativement différents, quels que soient les niveaux d'exposition au Cd ou celui de la salinité. Le niveau de MDA était supérieur dans les branchies exposées au Cd à une salinité de 5, alors qu'il n'y avait pas de différences entre témoins et branchies exposées aux salinités 15 et 27. Le niveau important de MDA parallèlement à la faible activité de la CAT à faible salinité a joué un rôle protecteur des crevettes exposées au Cd.

Keywords: Cadmium; Gills; Catalase; Glutathione; Malondialdehyde, *Litopenaeus vannamei*

Reçu le 9 janvier 2017 ; accepté après révision le 20 mars 2017.
Received 9 January 2017; accepted in revised form 20 March 2017.

SHORT TITLE (35 CHARACTERS MAX.)

Introduction

The white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 is the most important commercially farmed shrimp species in the western hemisphere, mainland China, Taiwan, and other Asian countries, including Indonesia (Rosenberry, 2002; Tackle et al., 2006; Ardiansyah et al., 2012). *L. vannamei* is an euryhaline species and has been cultured in waters ranging in salinity from 0.5 to 32 (Bray et al., 1994; Rosas et al., 1999). Euryhaline species must develop complex osmoregulatory mechanisms to survive successfully both in hypo-osmotic and hyper-osmotic environments (Martinez-Alvarez, 2002).

Cadmium (Cd) is a nonessential metal, commonly regarded as a pollutant and widely toxic to aquatic animals (White & Rainbow, 1986). In regions impacted by human activities, shrimp often encounter both water salinity changes and elevated Cd. The toxicity of Cd to *L. vannamei* has been shown to increase with decreasing salinity (Ardiansyah et al., 2012). This inverse relationship is usually explained as the result of an increase in free metal ion concentrations with decreasing salinity (Blust et al., 1992; Bervoets et al., 1996). In higher salinity, the increasing cation concentrations may decrease bioavailability of metal due to competition for binding sites on the gills (Alsop et al., 1999; Santore et al., 2002).

Changes in temperature, salinity, oxygen and metal levels can be considered a potential source of stress, as it prompts a number of responses in the animal to deal with the physiological, biochemical and metabolic changes triggered by environmental changes (Martinez-Alvarez, 2002; Wu et al., 2013; Hossain et al., 2016; Wang et al., 2016).

As a consequence of metabolic activity, reactive oxygen species (ROS) are continuously produced and eliminated maintaining a steady-state ROS concentration. The dynamic equilibrium can be disturbed leading to enhanced ROS level and damage to cellular constituents, referred to as oxidative stress (Lushchak, 2011). ROS which include hydroxyl radicals ($^{\bullet}\text{OH}$), superoxide anions ($\text{O}_2^{\bullet-}$), and hydrogen peroxide (H_2O_2), are highly damaging for lipids, DNA, and proteins and thereby result in oxidative damage (Liu et al., 2014). ROS are generally under tight control of antioxidant defense system. The major enzymatic defenses are superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), and non-enzymatic antioxidants are glutathione (GSH), ascorbic acid, and tocopherols (Valko et al., 2006). The antioxidant enzymes SOD, GPx and CAT are considered vital first-line defenses against oxygen toxicity. They have related functions and are essential for the conversion of ROS to harmless metabolites. The dismutation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ is scavenged to H_2O_2

and O_2 by SOD, and H_2O_2 is decomposed to non-toxic H_2O and O_2 by GPx and CAT (Romeo et al., 2000; Wang et al., 2013). GSH and GSH-related enzymes, as the second-line defenses against oxidative damage, play a major role in reduction of peroxides and free radical scavenging (Liu et al., 2014). GSH is a crucial low molecular weight non-protein thiol that plays an important role in intracellular defense against ROS-induced oxidative damage (Valko et al., 2006).

Activities of antioxidant defenses differ among the organs and tissues of freshwater and marine animals, environmental factors and other ecological conditions (Roche & Boge, 1996; Martinez-Alvarez, 2002; Lushchak, 2011). When the rate of ROS generation exceeds the antioxidant capacity of cells, excessive ROS can provoke oxidative stress, which causes damage to biomolecules by free radical attachment to polyunsaturated fatty acid side chains in cells and leads to lipid peroxidation (LPO) (Rodriguez-Ariza et al., 1999). Malondialdehyde (MDA) is one of the final products of LPO and is responsible for cell membrane damage (Valko et al., 2006).

In the present study, we investigated the levels of CAT, GSH and MDA in gills of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* after exposure to sublethal concentrations of Cd at different salinity levels.

Materials and Methods

Collection and handling of shrimp

Litopenaeus vannamei juveniles (12.7 ± 0.3 g) were obtained from a commercial hatchery of East Java Indonesia, and transported to the laboratory in plastic bags containing aerated ambient water. Shrimp were divided into three groups and acclimatized for a period of one week in seawater at 5, 15, or 27 salinity. The acclimation media were continuously aerated and filtered through gravel, sand and sponge filters. Seawater was obtained from the Surabaya coast adjacent to the university and the freshwater used for dilution was dechlorinated municipal tap water (Putranto et al., 2014). Throughout acclimation and experimentation, the values of temperature, pH and dissolved oxygen ranged from 28-29°C, 7.8-8.2 and 6.9-7.6 mg.L⁻¹, respectively, with a natural photoperiod. Shrimp were fed commercial fish food (*ad libitum*) and uneaten food and debris were removed daily to maintain the quality of the media.

Sublethal effects of Cd on oxidative responses

Tests were conducted using the static renewal method, with 80% test solutions renewed every 48 h. Juvenile *L.*

vannamei were exposed for 7 days to a sublethal concentration of cadmium (0.35 mgCd.L^{-1}) at three salinities (5, 15, and 27), while no metal was used for the control group. The Cd concentrations used in this study was based on the results from Ardiansyah et al. (2012). For each of the six treatments, there were eight shrimp per container with duplicate containers per treatment for a total of 16 shrimps per treatment. Animals were fed with commercial fish food (*ad libitum*) during the tests. Test media were continuously aerated. To maintain the quality of the media, uneaten food and debris were removed daily. At the end of exposure period, six shrimps were randomly removed from each treatment and the levels of CAT, GSH and MDA were determined using ELISA kits according to the manufacturer's instructions (Elabscience Biotechnology Co., Ltd).

Biochemical assays

We used competitive-ELISA to measure GSH and MDA, and sandwich-ELISA to measure CAT according to the instructions from Elabscience Biotechnology Co., Ltd. All microtiter plates provided in the kits were pre-coated with an antibody specific to CAT, GSH and MDA respectively.

On the last day of the experiment, shrimps were decapitated, gills were carefully excised, minced to small pieces, rinsed thoroughly in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 0.01M , $\text{pH} = 7.4$) to remove excess hemolymph and stored at -20°C until analysis (≤ 3 days). Tissue pieces were weighed and homogenized in PBS with a glass homogenizer on ice. The homogenates were then centrifuged for 5 minutes at $5000 \times g$ to obtain the supernatant.

To measure GSH and MDA $50 \mu\text{L}$ of standard, blank or sample was added to each well. Immediately $50 \mu\text{L}$ of biotinylated detection Ab (the detection antibody in the GSH kit is rabbit polyclonal, and mouse monoclonal for MDA kit) working solution was added to each well, covered with the plate sealer supplied by kit manufacture and incubated for 45 minutes at 37°C . To measure CAT, $100 \mu\text{L}$ of standard, blank or sample was added to each well. The plate was then covered with sealer provided by kit manufacture and incubated for 90 minutes at 37°C . The liquid was then removed from each well, $100 \mu\text{L}$ of biotinylated detection Ab (the detection antibody in the kit is rabbit polyclonal) was added to each well, and the plate was resealed and incubated for 1 hour at 37°C .

After completing the above procedure, we conducted the following step for each parameter. The plates were aspirated and washed 3 times with wash buffer (approximately $350 \mu\text{L.well}^{-1}$). After the last wash, any remaining wash buffer was removed by aspirating or decanting. $100 \mu\text{L}$ of horseradish peroxidase (HRP) conjugate working solution was added to each well, the plates were resealed and

incubated for 30 minutes at 37°C , then washed 5 times as described in previous step. Then, $90 \mu\text{L}$ of substrate solution was added to each well, and the plates were resealed and incubated for about 15 minutes at 37°C while protected from light. To terminate the enzyme reaction, $50 \mu\text{L}$ of stop solution was added to each well and optical density was determined using an automatic microplate reader (Bio-Rad, model iMark, Japan) at 450 nm . The concentrations of CAT, GSH and MDA were determined using the appropriate standard curves and data were expressed as pg.mL^{-1} , $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and ng.mL^{-1} , respectively.

Statistical analysis

Six individuals for each treatment were used for CAT, GSH and MDA measurements. All data were expressed as mean \pm standard deviation and verified for normality and homogeneity. Two-way ANOVA followed by a Duncan's post hoc analysis for multiple comparisons was used to evaluate effects of cadmium on CAT, GSH and MDA levels in gills at different salinity levels. $P < 0.05$ was considered as the level of significance.

Results

The effects of Cd and salinity on CAT, GSH and MDA levels in gill tissue are presented in figures 1, 2 & 3 respectively. The CAT level in gills was significantly higher at salinity 5 than at 15 and 27 with and without Cd exposure. At 5 and 27, CAT levels in control gills were significantly higher than in Cd-exposed gills. While at 15, the levels of CAT in control and Cd-exposed gills were not significantly different.

Levels of GSH in both control and Cd-exposed gills at all salinities were not significantly different. Comparison of

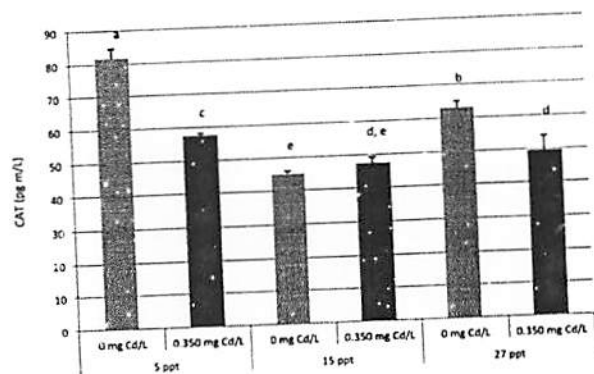


Figure 1. *Litopenaeus vannamei*. Catalase (CAT) in gill tissue exposed to 0 and 0.350 mg Cd/L under different salinities for 7 d. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, $a > b > c > d > e$). Data are means of six determinations.

SHORT TITLE (35 CHARACTERS MAX.)

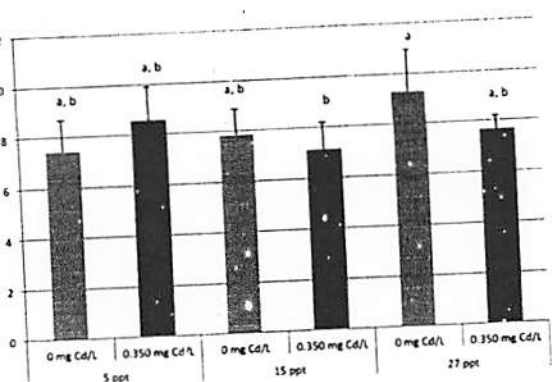


Figure 2. *Litopenaeus vannamei*. Glutathione (GSH) in gill tissue exposed to 0 and 0.350 mg Cd/L under different salinities for 7 d. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, a, b). Data are means of six determinations.

The GSH levels between control and Cd-exposed gills at each salinity also demonstrated no significant difference.

Levels of MDA in gills were not significantly different among salinities without Cd exposure. Meanwhile the MDA level in gills was significantly higher at 5 than at 15 and 27 with Cd exposure. Levels of MDA of Cd-exposed gills at 15 and 27 were not significantly different. The level of MDA in Cd-exposed gills at 5 was higher than in control gills. There was no significant difference between MDA levels in control vs. Cd-exposed gills at 15 and 27.

Discussion

Gills of shrimp are known as the primary site for both active and passive exchanges between the organism and its environment, thus it is likely to be a first target for metals accumulation before distribution to other organs (Romano & Zeng, 2012). Accumulation of metals leads to disruption of the defense mechanism of gills. Antioxidant enzymes (e.g., SOD, CAT and GPx) and non-enzymatic antioxidants (e.g., GSH) are considered an important component of the antioxidant defense system in animals (Qu et al., 2014). They can be induced as a compensatory response to an oxidative stress caused by environmental changes such as temperature, oxygen, salinity and metals (Lushchak, 2011). In our study, salinity exerted a significant effect on CAT (Fig. 1), but did not affect the levels of GSH (Fig. 2) and MDA (Fig. 3) in gills. Without Cd exposure, the levels of CAT in gills at salinity 5 were higher than at 15 and 27. Li et al. (2008) found the similar findings, the activities of CAT in *L. vannamei* increased at salinity 3, then decreased at 17 and increased again at 32. CAT is the primary enzyme for radical scavenging, which are involved in protective mechanisms within tissue injury following oxidative

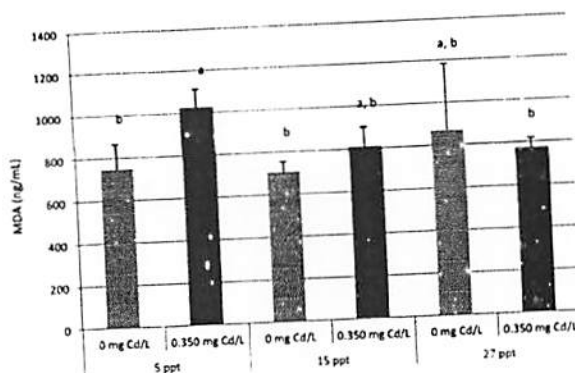


Figure 3. *Litopenaeus vannamei*. Malondialdehyde (MDA) in gill tissue exposed to 0 and 0.350 mg Cd/L under different salinities for 7 d. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, a > b). Data are means of six determinations.

process and phagocytosis (Li et al., 2008). Its activity is related to the status of the organisms affected by different factors including environmental salinity (Winston & Giulio, 1991; Li et al., 2008). Higher CAT activity indicates there are more radicals need to be reacted (Ross et al., 2001; Chien et al., 2003). In present study, the higher CAT concentrations in shrimp at lower and higher salinities might indicate that the stress of salinity resulted in an accumulation of radicals to a higher level in shrimp.

L. vannamei is a euryhaline animal and can live in waters with salinity between 0.5 to 32 (Bray et al., 1994; Rosas et al., 1999). Buckle et al. (2006) reported that *L. vannamei* hyper-regulates between 10 and 20 and hypo-regulates between 20 and 40. The isosmotic points of *L. vannamei* were between 20 and 27 (Buckle et al., 2006). Many studies have revealed that aquatic animals have a lower energetic cost of osmoregulation (Febry & Luts, 1987; Peterson et al., 2005), and are more resistant to metals at the isosmotic point (De Lisle & Roberts, 1988; Hall Jr & Anderson, 1995; Grosell et al., 2007; Ardiansyah et al., 2012). Since at isosmotic point juveniles of *L. vannamei* have a lower energetic cost of osmoregulation (Buckle et al. 2006) and are more resistant to Cd (Ardiansyah et al., 2012), the lower level of CAT at this salinity could be indicated that there are no excess H_2O_2 should be scavenged by CAT. Our current study suggests that the isosmotic point of juvenile of *L. vannamei* is near 15. Furthermore, we found that the levels of CAT in gills exposed to Cd at 5 and 27 decreased when compared to the controls (exposed to the same salinities but without Cd). The decreased CAT might be attributed to the inactivation of the enzyme and the inhabitation of de novo enzyme protein synthesis (Verma & Dubey, 2003). Romeo et al. (2000) suggested that the inhibition of CAT may be caused as a result of the direct binding of Cd to metallothionein-

like proteins. Fatima & Ahmad (2005) suggested that some other H_2O_2 scavenging enzymes particularly GPx may be active. It is known that GPx has higher affinity for H_2O_2 than CAT (Fatima & Ahmad, 2005; Valko et al., 2006) and thus it is effective in decomposing H_2O_2 .

As the most abundant non-protein thiol and prominent cellular antioxidant in living organisms, GSH plays a key role in preventing oxidative stress (Wang et al., 2008). Our experimental data showed that the levels of GSH in both control and Cd-exposed shrimps in different salinities did not change. In this case, its cysteine thiol group might rapidly react with the metals by forming a stable GS-Cd complex and by relieving the oxidative stress effects caused by Cd through the formation of oxidized glutathione (GSS) (Noctor & Foyer, 1998). The unchanged GSH in present study might reflect homeostasis between synthesis and loss of GSH.

Lipid peroxidation is a free radical-mediated chain reaction. It can be initiated by ROS or by the reaction of lipoxygenase and severely affects functionality and integrity of the cell membranes (Ana et al., 2007; Liu et al., 2014). The current results showed that MDA levels in Cd-exposed gills were higher at low salinity (5) than at higher salinities (15 and 27). In addition, at low salinity (5) we noted that the high level of MDA paralleled with the low activity of antioxidant systems (particularly CAT). We suggest that Cd exposure resulted in the generation of ROS and antioxidant defense systems, but these defenses were not able to completely scavenge ROS, which led to lipid peroxidation. At higher salinity, it is probable salinity played a protective role for juveniles under Cd exposure. Our previous study confirmed that Cd is more toxic to juvenile *L. vannamei* at 5 than at 15 and 27 (Ardiansyah et al., 2012). Similar findings have been reported in fish (*Takifugu onscurus* Abe, 1949) exposed to Cd at salinity 0 and 15 (Wang et al., 2016). They found the levels of MDA in gills of fish were higher at salinity 0 than at 15. Some authors also demonstrated that the enhancement of MDA level is a consequence of a decrease in antioxidant reserves (Liu et al., 2014). Qu et al. (2014) also found the depletion of CAT activity and elevated levels of MDA in freshwater fish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) is strongly correlated with ROS generation and lipid peroxidation, indicating the induction of marked oxidative stress in fish following exposure to Cd and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes.

Conclusion

In conclusion, Cd had a significant inhibitory effect on the activity of CAT at low salinity, in parallel the MDA content increased at low salinity. Since Cd is more toxic to juvenile

L. vannamei at low salinity than at higher salinities (Ardiansyah et al., 2012), it is likely that salinity plays a protective role for *L. vannamei* under Cd exposure.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. N. Usman and Mr. Setiyanto for technical assistance during experiment. We also wish to thank anonymous referees for valuable advice and constructive comments to improve the manuscript.

References

- Aksoy D.H., McGeer J.C., McDonald D.G. & Wood C.M. 1999. Costs of chronic waterborne zinc exposure and the consequences of zinc acclimation on the gill/zinc interactions of rainbow trout in hard and soft water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 1014-1025.
- Ana Z., Susana G. & Luisa M.S. 2007. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environmental and Experimental Botany*, 59: 150-159.
- Ardiansyah S., Irawan B. & Soegianto A. 2012. Effect of cadmium and zinc in different salinity levels on survival and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45: 291-302.
- Bervoets L., Blust R. & Verheyen R. 1996. Uptake of zinc by the midge larvae *Chironomus riparius* at different salinities: role of speciation, acclimation, and calcium. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 1423-1428.
- Blust R., Kockelbergh E. & Bailhieu M. 1992. Effect of salinity on the uptake of cadmium by the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Marine Ecology Progress Series*, 84: 245-254.
- Bray W.A., Lawrence A.L. & Leung-Trujillo J.R. 1994. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. *Aquaculture*, 122: 133-146.
- Buckle L.F., Baron B. & Hernandez M. 2006. Osmoregulatory capacity of the shrimp *Litopenaeus vannamei* at different temperatures and salinities, and optimal culture environment. *Revista de Biología Tropical*, 54: 745-753.
- Chlen Y.H., Pan C.H. & Hunter H. 2003. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. *Aquaculture*, 216: 177-191.
- De Lisle P.F. & Roberts Jr M.H. 1988. The effect of salinity on cadmium toxicity to the estuarine mysid *Mysidopsis bahia*: role of chemical speciation. *Aquatic Toxicology*, 12: 357-370.
- Fatima R.A. & Ahmad M. 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, 346: 256-273.
- Febry R. & Lutz P. 1987. Energy partitioning in fish: the activity-related cost of osmoregulation in a euryhaline cichlid. *Journal of Experimental Biology*, 128: 63-85.
- Grosell M., Blanchard J., Brix K.V. & Gerdes R. 2007.

- physiology in pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 84: 162-172.
- Ill L.W. & Anderson R.D. 1995. The influence of salinity on the toxicity of various classes of chemicals to aquatic biota. *Critical Review in Toxicology*, 25: 281-346.
- Jassin M.A., Aktar S. & Qin J.G. 2016. Salinity stress response in estuarine fishes from the Murray estuary and Coorong, South Australia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42: 1571-1580.
- Li E., Chena L., Zeng C., Yua N., Xiong Z., Chen X. & Qin J.G. 2008. Comparison of digestive and antioxidant enzymes activities, haemolymph oxyhemocyanin contents and hepatopancreas histology of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, at various salinities. *Aquaculture*, 274: 80-86.
- Liu N., Wang L., Yan B., Li Y., Ye F., Li J. & Wang Q. 2014. Assessment of antioxidant defense system responses in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to lead. *Hydrobiologia*, 741: 3-13.
- Mushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101: 13-30.
- Martinez-Alvarez R.M., Hidalgo M.C., Domezain A., Morales A.E., Garcia-Gallego M. & Sanz A. 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *Journal of Experimental Biology*, 205: 3699-3706.
- Noctor G. & Foyer C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Peterson M.S., Slack W.T. & Woodley C.M. 2005. The occurrence of non-indigenous Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) in coastal Mississippi, USA: ties to aquaculture and thermal effluent. *Wetlands*, 25: 112-121.
- Putranto T.W.C., Andriani R., Muuawwaroh A., Irawan B. & Soegianto A. 2014. Effect of cadmium on survival, osmoregulation and gill structure of the Sunda prawn, *Macrobrachium sintangense* (de Man), at different salinities. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 47: 349-360.
- Qu R., Wang X., Wang Z., Wei Z. & Wang L. 2014. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish *Carassius auratus* in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, 275: 89-98.
- Roche H. & Boge G. 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41: 27-43.
- Rodriguez-Ariza A., Albama J., Diaz-Mendez F.M. & Lopez-Barea J. 1999. Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of *Sparus aurata* fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutation Research*, 438: 97-107.
- Romano N. & Zeng C. 2012. Osmoregulation in decapod crustaceans: implications for potential improvement and interactions with elevated ammonia exposure. *Aquaculture*, 334-337: 12-23.
- Romeo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M. & Girard J.P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 48: 185-194.
- Rosas C., Ocampo L., Gaxiola G., Sanchez A. & Soto L.A. 1999. Effect of salinity on survival, growth, and oxygen consumption of postlarvae (PL10-PL21) of *Litopenaeus setiferus*. *Journal of Crustacean Biology*, 19: 244-251.
- Rosenberry B. 2002. *World shrimp farming 2002*. Shrimp News International: San Diego (CA). 276 pp.
- Ross S.W., Dalton D.A., Kranmer S. & Christensen B.L. 2001. Physiological (antioxidant) responses of estuarine fishes to variability in dissolved oxygen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130C: 289-303.
- Santore R.C., Mathew R., Paquin P.R. & DiToro D. 2002. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133C: 271-285.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M. & Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1-40.
- Verma S. & Dubey R.S. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164: 645-655.
- Wang J., Zhang P., Shen Q., Wang Q., Liu D., Li J. & Wang L. 2013. The effects of cadmium exposure on the oxidative state and cell death in the gill of freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Plos One*, 8(5): e64020.
- Wang J., Zhu X., Huang X., Gu L., Chen Y. & Yang Z. 2016. Combined effects of cadmium and salinity on juvenile *Takifugu onscurus*: cadmium moderates salinity tolerance; salinity decreases the toxicity of cadmium. *Scientific Reports*, 6: 30968.
- Wang L., Yan B., Liu N., Li Y. & Wang Q. 2008. Effect of cadmium on glutathione synthesis in hepatopancreas of freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Chemosphere*, 74: 51-56.
- White S.L. & Rainbow P.S. 1986. Accumulation of cadmium by *Palaemon elegans* (Crustacea: Decapoda). *Marine Ecology Progress Series*, 32: 17-25.
- Winston G.W. & Giulio R.T. 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 19: 137-161.
- Wu H., Xuan R., Li Y., Zhang X., Wang Q. & Wang L. 2013. Effects of cadmium exposure on digestive enzymes, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 4085-4092.

Oxidative stress responses in gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different salinities

Kiki Syaputri Handayani, Zahra Novianty, Miftahul Rohmah Saputri, Bambang Irawan, and Agoes Soegianto

Citation: AIP Conference Proceedings **1868**, 090006 (2017); doi: 10.1063/1.4995198

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4995198>

View Table of Contents: <http://aip.scitation.org/toc/apc/1868/1>

Published by the American Institute of Physics



**ALL PRINT
PROCEEDINGS!**

ENTER COUPON CODE
SUMMER2017

Oxidative Stress Responses in Gills of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) at Different Salinities

Kiki Suryantri Handayani^{a)}, Zahra Novianty, Miftahul Rohmah Saputri, Bambang

*Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Airlangga University
Jl Mulyorejo, Mulyorejo, Surabaya, Indonesia*

^{a)}Corresponding author: kikisyaputri@icloud.com

Abstract. The objective of present study is to evaluate the impact of different salinities on the levels of CAT, GSH and MDA of the gills of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Nile tilapia was treated by exposure to salinities concentration 0 ‰, 5 ‰ and 10 ‰. Research models were weakened and sacrificed, then took the left and right sides of the gills. The result of gills homogeneity was centrifuged for supernatan, then supernatan was proceed with testing levels of CAT, GSH and MDA by ELISA assay methods. The levels of CAT in gills were significantly higher at 10 ‰ than at 5 ‰ and 0 ‰. The levels of GSH in gills were significantly higher at 0 ‰ than 5 ‰. The levels of GSH in gills at 5 ‰ and 10 ‰ salinities were not significantly different. The levels of MDA in gills at salinity 10 ‰ and 5 ‰ were higher than in control gills at 0 ‰ salinities. This occurs because the salinity of 10 ‰ salinity was optimal for live of fish tilapia. In conclusion, salinity impact the increasing of CAT, GSH, and MDA levels in gills of Nile tilapia.

INTRODUCTION

Nile tilapia (*O. niloticus*) is one of the most important freshwater fishes. Its ability to adapt to the new environment makes Nile tilapia quickly spread. Nile tilapia is euryhaline fish because of its capability, wide salinity tolerance towards its environment. For that reasons, Nile tilapia is one of good biological models, and also its ease to handling [3,4,5,15,16,22,28]. Salinity is the salt levels or total solids, both the dissolved solids or solids are suspended in the water after all carbonates are converted into oxides, all bromide and iodide were replaced by chlorides, and all the organic materials have been oxidized [30,45]. Previous study showed that salinity affected metal concentration in estuarine killfish [19].

According to Garcia-santos [22] heavy metal can be disrupted oxidative damage on tissues of Nile tilapia. From that previous research, it is important to evaluate the salinity effect of oxidative damage. Changes in salinity can be considered a potential source of stress, as it induces several responses to deal with the physiological and biochemical changes [24,45]. As a consequence of physiological and biochemical changes, reactive oxygen species (ROS) is continuously produced. Their steady-state concentration is a balance between production and elimination providing certain steady-state ROS level. The dynamic equilibrium will be disturbed leading to enhanced ROS and damage cellular constituents which is called oxidative stress [7,8,21,26,34,41,42,43].

Oxidative stress can be analyzed from several biomarkers, such as the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), as well as the level of lipid peroxidation (LPO) are tested from the end product such as the Malondialdehida (MDA), and their response has been studied using heavy metals exposure such as cadmium [6,11,17,20,22,23,31,35,36,39,40,46,47], but without salinity as another source of stress. Based on descriptions above, the present work evaluated the impact of salinity on levels of CAT, GSH and MDA of the gills of Nile tilapia after being treated at different salinity concentrations.

METHODS

Collection and handling of *Nile tilapia*

Collection. Adults Nile tilapia (12-13 cm length) were obtained from UPT PBAT Umbulan, Pasuruan and transported to the laboratory of Hang Tuah University Surabaya in plastic bag containing oxygen. In the laboratory conditions, the fish were divided into three groups and acclimatized for a period of 1 week. The acclimation media were continuously aerated and filtered through gravel, sand and sponge filter. Seawater was obtained from the Surabaya coast adjacent to the laboratory and the freshwater was obtained from municipal tap water. Over the acclimation and experiment, the values of pH, temperature and dissolve oxygen were 7.1 ± 0.5 , $28.3^\circ\text{C} \pm 0.15^\circ\text{C}$ and 7.4 ± 0.02 , respectively.

Stages of exposure the Nile tilapia with different salinities. To reach 5 and 10 ‰ the seawater (with salinity of 35 ‰) was mixed with the dechlorinated freshwater. Treatment on salinity 0 ‰ used fish that has been acclimate for seven days. After that, acclimatized on salinity 5 ‰ and 10 ‰ for two days continuously. The exposure was carried out for seven days for each treatment, then the fish were given fed with commercial fish food 3% of the weight of its body twice a day at the time of morning and afternoon [29]. Once in two days we did the replacement of the water. Groups of 3 fish were periodically weakened and 6 replicated fish were dissected. The observation of the quality of aquarium water every day which includes: temperature, pH and Dissolved Oxygen (DO) [2]. Nile tilapia have been given seven days of exposure to treatment, taken for gills samples tested the levels of MDA, GSH and CAT which are indicator of oxidative stress.

Biochemical Assays

Retrieving the gills of the Nile tilapia. Each Aquarium given 0.01 mL^{-1} clove oil as an analgesic. Fish in aquariums have been given the clove oil will weaken within 10-15 minutes. Fish weakened and sacrificed, the fish weighed with digital scales, then measured the total length of the fish with a caliper, and then cut the operculum out and taken the left and right sides of the gills. Gills have taken to filament pieces. Gill filaments of 0.5 gram weighed, crushed with a mortar on top of the ice cubes, the gills put into microtubes and homogenized with phosphate buffer saline (PBS) (0.01 M pH = 7.4) which the PBS adjusts volume by weight or gills filaments with a comparison 1:1. The results of its homogeneity centrifuged for 5 minutes with the speed of 5000 xg for supernatan, then supernatan is taken and put into a new microtubes and proceed with testing levels of CAT, GSH and MDA. Competitive-ELISA to measure GSH and MDA, then sandwich-ELISA to measure CAT were used according to the instructions from Elabscience Biotechnology Co., Ltd.

RESULTS AND DISCUSSION

Stress Oxidative Responses

The effects of different salinities on CAT, GSH and MDA levels in gill tissue are presented in Figures 1, 2 and 3 respectively. The CAT levels in gills at 0 ‰, 5 ‰ and 10 ‰ were significantly different. The level of CAT was significantly higher at 10 ‰ than at 0 and 5 ‰. At 5 ‰, CAT levels in gills were significantly higher than at 0 ‰. We noted that the levels of GSH in gills at 0 ‰, 5 ‰ and 10 ‰ were increasing. At salinity 5 ‰ and 10 ‰, the levels of GSH in gills were significantly higher than at 0 ‰. While, the levels of GSH at 5 ‰ and 10 ‰ were not significantly different. The levels of MDA in gills were significantly different at 0 ‰, 5 ‰ and 10 ‰. The MDA levels in gills were significantly higher at 5 ‰ and 10 ‰ than at salinity 0 ‰. Meanwhile the levels of MDA at salinity 5 ‰ and 10 ‰ were not significantly different.

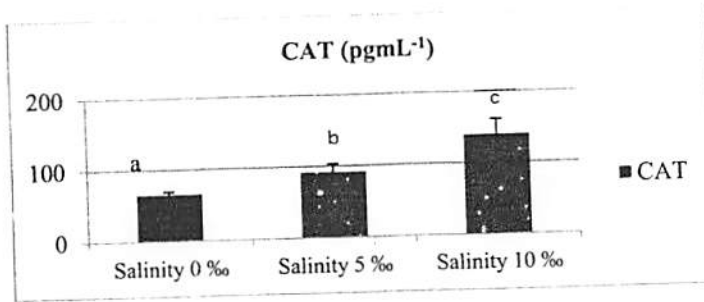


FIGURE 1. Catalase in gill tissue of *O. niloticus* under different salinities for 7 d. lowercase letters indicate significant differences at different salinities ($p < 0.05$, $a < b < c$).

Catalase, a very highly conserved enzyme that is ubiquitous in archaea, prokaryotes and eukaryotes, plays an important role in the cell redox equilibrium [18,38]. It breaks H_2O_2 into two molecules of water and one of oxygen thus reducing its toxic effect and maintaining cellular redox balance [37]. According to Blanchard and Grosell [12] and also Atli and Canli [10], salinity has a major effect on osmoregulation and regulation of fish physiology and metal ions can interfere with the integrity of the physiological and biochemical mechanisms in fish. Based on our study, it can be concluded that the low salinity may occur oxidative stress in the gill tissue of fish and will be reduced if the salinity increases. At low salinity, media osmose pressure lower than in the its body or body fluids of

[44], so it can be assumed that the process of ROS work, medium with 10 ‰ salinity could cause ROS on the gills of Nile tilapia, but it was able to balance the amount of ROS with the antioxidant defense system, the enzyme CAT, thus causing the highest levels on CAT at salinity 10 ‰. Blewett and Wood [13] results showed that levels of CAT activity in fish freshwater exposed nickel for 7 days decreased significantly, while in the seawater a significant increase. It is proved that the salinity has an influence on exposure to metals in the water. That assumption is supported by research that has been done by Listiyani [25], which showed a significant difference to the levels of sodium and chloride blood serum of tilapia exposed Cd 2.5 mgL^{-1} on the salinity of 10 ‰ because the fish did adaptation. Sodium and Chloride ions needed by the body of fish is constantly in the process of ion balancing within the body and its environment [25]. The ion balancing process takes place properly so that the ROS induced by the effect of salinity can be offset by the increased levels of CAT at 10 ‰ salinity.

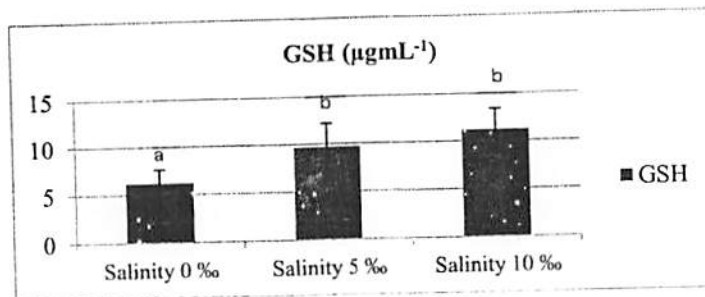


FIGURE 2. Reduced glutathione in gill tissue of *O. niloticus* under different salinities for 7 d. Lowercase letters indicate significant differences at different salinities ($p < 0.05$, $a < b$)

As the most abundant non-protein thiol and prominent cellular antioxidant in living organisms, GSH plays a key role in preventing oxidative stress [9,23]. Based on the present study, it can be assumed that fish change ROS caused by salinity in the media through the first path of antioxidant enzymes CAT, was in the gill tissue followed by the second track was GSH. Thus, the use of these two paths lead to significant differences between GSH levels in salinity 0 ‰ with salinity of 5 ‰ and salinity of 10 ‰. There was no significant difference of the treatment group salinity of 5 ‰ to 10 ‰ assumed that second track work optimally when salinity 0 ‰ and stop working when the state of the environment began to stabilize at salinity 10 ‰. When the second line is used, then the GSH levels will

decrease. This is similar to the research conducted by Dudley and Klassen [18] which states that the decrease in GSH aligned with decreased activity of the GPx enzyme in a tissue.

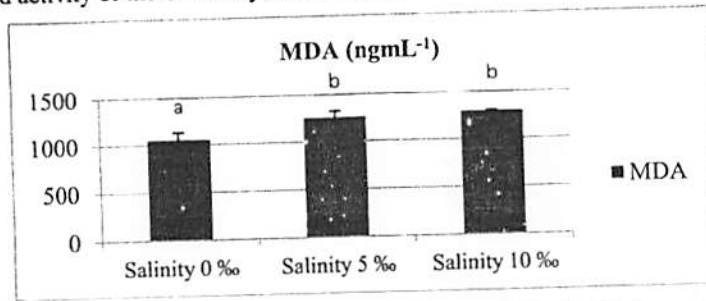


FIGURE 3. Malondialdehyde in gill tissue of *O. niloticus* under different salinities for 7 d. Lowercase letters indicate significant differences at different salinities ($p < 0.05$, $a < b$)

Lipid peroxidation is one of the main indicators of oxidative damage [2,14]. MDA is not only an important product of lipid peroxidation but also can react with a protein has free amino acid and cause cross linking within and between protein molecules, which consequently damage the cell [27,33]. Our data confirmed that MDA can cause the oxidative damage to the gill tissue held in high salinity. In this work, the medium with a salinity of 10 ‰ caused oxidative damage as a result of ROS on the gills of tilapia, but tilapia was able to balance the amount of ROS with the antioxidant defense system, the CAT enzyme, thus causing the highest levels CAT in the salinity levels of 10 ‰ as explained before. The low salinity media result in oxidative damage to lipids and increases in salinity 5 ‰ and 10 ‰ but an increase in lipid oxidative damage at a salinity of 10 ‰ offset by an increase in the highest levels of CAT so that oxidative stress is assumed to occur at 0 ‰ and 5 ‰ salinities, but not at a salinity of 10 ‰. Nogueira [32] observed biochemical biomarker on the gills of Nile tilapia after a given exposure to diesel oil, natural biodiesel and biodiesel blends. The results from these studies showed an increase in MDA levels were significantly on the day seventh in 2 aquarium treatments, so it is in line with the results of this study, where there was a significant increase in MDA levels between the control and treatment of tilapia on the day seventh.

CONCLUSION

The existence of the salinity causes a decrease in the increasing of CAT and GSH levels, as well as causing a decrease in elevated levels of MDA. The more salinity approaching 10 ‰, the higher the CAT, GSH and MDA levels on the gills of the Nile tilapia. This occurs because the salinity at 10 ‰ salinity was optimal for live of Nile tilapia. In conclusion, salinity impact the increasing of CAT, GSH, and MDA levels in gills of Nile tilapia.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank to the first author for his contribution to this study. And also we thank to Kementerian Riset, Teknologi dan Inovasi for providing the scholarship to the first Author.

REFERENCES

1. Abdel-Fattah and M. El-Sayed, *Tilapia culture*, CABI Publishing, Cambridge, USA, (2006).
2. N. K. M Abdel-khalek, E.W. Ghazy, and M. M. Abde-Daim, *Environmental Science and Pollution Research*, **22**, 3023 – 3031, (2014).
3. A. Abdel-Khalek, M. A. M. Kadry, S. R. Badran, and M. S. Maric, *The Journal of Basic and Applied Zoology*, **72**, 43–57, (2015).
4. M. Abdel-Tawwab, and M. Wafeek, *International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, **41**, 106 – 114, (2008).
5. I. M. K. Abumourad, M. M. N. Authman, and W. T. Abbas, *Journal of Applied Sciences Research*, **9**, 612-619, (2013).

6. J. A. Almeida, Y. S. Diniz, S. F. G. Marques, L. A. Faine, B. O. Ribas, R. C. Burneikob, and E. L. B. Novelli, *Environment International*, **27**, 673 – 679, (2002).
7. R. Ananc, and E. E. Creppy, *Human & Experimental Toxicology*, **20**, 477–48, (2001).
8. J. Arockiaraj, S. Easwaran, P. Vanaraja, A. Singh, R. Y. Rothman, and S. Bhassu, *Fish Shellfish Immunol*, **32**, 670–682, (2012).
9. G. Atli, and M. Canli, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **25**, 33–38, (2008).
10. G. Atli, and M. Canli, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 1884–1889, (2010).
11. P. S. Basha, and A. U. Rani, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 218–221, (2003).
12. J. Blanchard, and M. Grosell, *Aquatic Toxicology*, **80**, 131–139, (2006).
13. T. A. Blewett, and C. M. Wood, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**, 382–394, (2015).
14. L. Cao, W. Huang, X. Shan, Z. Ye, and S. Dou, *Environmental toxicology and pharmacology*, **33**, 16–25, (2012).
15. K. M. Chan, *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 411–415, (1995).
16. A. P. L. Cheung, T. H. -J. Lam, K. M. Chan, *Marine Environmental Research*, **58**, 389–394, (2004).
17. M. J. Chowdhury, E. F. Pane, and C. M. Wood, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **139**, 163 – 173, (2004).
18. R. E. Dudley, and C. D. Klassen, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **72**, 530-8, (1984).
19. J. Dutton, and N. S. Fisher, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30**, 2107–2114, (2011).
20. M. Fatima, N. Usmani, F. Firdaus, M. F. Zafeer, S. Ahmad, K. Akhtar, S. M. D. Husaine, M. H. Ahmad, E. Anis, and M. M. Hossain, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 176-177, 17-30, (2015).
21. O. Firat, and F. Kargin, *Fish Physiology and Biochemistry*, **36**, 647 – 653, (2010).
22. S. Garcia-Santos, S. Monteiro, and S. Malakpour-Kolbadinezhad, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **167**, 81–89, (2015).
23. Y. Jin, Z. Liu, F. Liu, T. Peng, and Z. Fu, *Neurotoxicology and Teratology*, **48**, 9–17, (2015).
24. E. M. Leonard, I. Barcarolli, K. R. Silva, W. Wasielesky, C. M. Wood, A. Bianchini, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **154**, 409–419, (2011).
25. P. A. Listiyani, Regulasi Ionik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Terpapar Kadmium (Cd) pada Salinitas Berbeda. Thesis. Airlangga University, Surabaya, (2016).
26. V. I. Lushchak, *Aquatic Toxicology*, **101**, 13-30, (2011).
27. W. Luczaj, and E. Skrzydlewska, *Cellular and Molecular Biology Letters*, **8**, 391–413, (2003).
28. K. L. Lam, P. W. Ko, J. K-Y. Wong, K. M. Chan, *Marine Environmental Research*, **46**, 563–566, (1998).
29. K. F. Mahrous, A. M. Hassan., H. A. Radwan and M. A. Mahmoud, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **119**, 140–147, (2015).
30. D. S. McLusky, V. Bryant, and R. Campbell, *Annual Review Oceanography and Marine Biology*, **24**, 147 – 155, (1986).
31. B. P. Mohanty, M. R. Mahananda, and S. Pradhan, *Environment and Ecology Research*, **1**, 41-47, (2013).
32. L. Nogueira, A. L. M. Sanches, D. G. H. da Silva, V. C. Ferrizi, A. B. Moreira, and E. A. de Almeida, *Chemosphere*, **85**, 97–105, (2011).
33. E. Papadimitriou, and N. S. Loumbourdis, *Bulletin Environment Contamination Toxicology*, **69**, 885–891, (2002).
34. S. M. G. J. Pelgrom, R. A. C. Lock, P. H. M. Balm and S. E. Wendelaar Bonga, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **111**, 227-235, (1995).
35. K. Pugazhendy, A. Revathi, K. Murugan, and J. Hwang, *International Journal of Advanced Research in Biology Sciences*, **2**, 183–188, (2015).
36. R. Qu, X. Wang, Z. Wang, Z. Wei, L. Wang, *Journal of Hazardous Materials*, **275**, 89 – 98, (2014).
37. S. Rama, and S. N. Manjabhat, *Ecotoxicology Environment Safety*, **107**, 207–213, (2014).
38. H. Shi, Y. Sui, X. Wang, Y. Luo, L. Ji, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **140**, 115 – 121, (2005).
39. S. S. Soares, H. Martin, C. Gutiérrez-Merino, and M. Aureliano, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **147**, 168–178, (2008).
40. G. Souid, N. Souaycd, F. Yaktiti, and K. Maaroufi, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **89**, 1–7, (2013).
41. J. W. Tsai, Y. R. Ju, Y. H. Huang, Y. Deng, W. Y. Chen, C. C. Wu, and C. M. Liao, *Environmental Science and Pollution Research*, **20**, 3771–3780, (2013).

42. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol., M. Izakovic, and M. Mazur, *Chemico-Biological Interactions*, **160**, 1–40, (2006).
43. K. Vijayavel, S. Gopalakhrisnan, H. Thilagam, M. P. Balasubramanian, *Science of the Total Environment*, **372**, 157 – 163, (2006).
44. T. E. Wahyurini, *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, **3**, 87-97, (2005).
45. L. Wang, B. Yan, N. Liu, Y. Li, and Q. Wang, *Chemosphere*, **74**, 51-56, (2008).
46. C. K. C. Wong, and M. H. Wong, *Aquatic Toxicology*, **48**, 517–527, (2000).
47. S. M. Wu, M. J. Shih, Y. C. Ho, *Elsevier Biochemistry and Physiology*, **145**, 218-226, (2008).

090006-6

