

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**RESPON FISIOLOGIS PEMAPARAN TEMBAGA (CU) PADA
IKAN NILA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*): EVALUASI
TERHADAP REGULASI IONIK, OSMOTIK, DAN
METALLOTHIONEIN DALAM INSANG**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 2 TAHUN

PROF. DR. AGOES SOEGianto

NIDN 0003086204

DRS. TRISNADI W. C. PUTRANTO, MSI.

NIDN 0015126305

PROF. DR. BAMBANG IRAWAN

NIDN 0004055504

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 AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



kkc
K10
LP.25/19
Soe
r

**RESPON FISIOLOGIS PEMAPARAN TEMBAGA (CU) PADA
IKAN NILA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*): EVALUASI
TERHADAP REGULASI IONIK, OSMOTIK, DAN
METALLOTHIONEIN DALAM INSANG**

TAHUN KE-1 DARI RENCANA 2 TAHUN

PROF. DR. AGOES SOEGianto

NIDN 0003086204

DRS. TRISNADI W. C. PUTRANTO, MSI.

NIDN 0015126305

PROF. DR. BAMBANG IRAWAN

NIDN 0004055504

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**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Perubahan Struktur, Warna dan Fungsi Melanofor pada
Sisik Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*) setelah Dipapar
dengan Kadmium: Sebagai Bioindikator Potensial
Pencemaran Kadmium

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 : Drs TRISNADI WIDYALEKSONO C P M.Si
NIDN : 0015126305
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

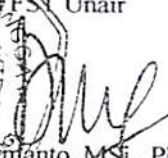
Anggota (2)

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 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 94,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 192,000,000

Mengetahui,
Dekan FST Unair



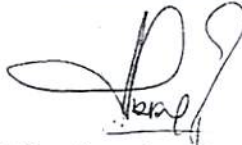
(Prof. Win Darmanto, MSc., PhD.)
NIP/NIK 196106161987011001

Kota Surabaya, 8 - 11 - 2018
Ketua,



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

Menyetujui,
Ketua LPI Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, MSc., PhD.)
NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Tembaga (Cu) adalah logam esensial yang dibutuhkan dalam proses respirasi sel, pertahanan terhadap radikal bebas dan metabolisme sel. Namun jika kadarnya tinggi, Cu bersifat toksik karena dapat memproduksi radikal bebas. Mengingat Cu bersifat toksik dan sekaligus esensial, sebagai konsekuensinya organisme harus dapat menjaga kesimbangannya agar tidak kekurangan maupun kelebihan Cu. Kepekaan organisme terhadap Cu dipengaruhi oleh umur. Organisme muda lebih peka terhadap defisiensi maupun toksisitas Cu karena peningkatan kebutuhannya untuk pertumbuhan dan karena mereka mempunyai efisiensi yang tinggi dalam menyerap Cu ditambah belum sempurnanya sistem ekskresinya. Peningkatan kegiatan industri dan penggunaan CuSO_4 sebagai fungisida pada kegiatan pertanian serta dalam pengendalian alga dan penyakit dalam kegiatan akuakultur menyebabkan kadar Cu dalam perairan meningkat. Peningkatan kadar Cu di lingkungan alami umumnya terdapat dalam konsentrasi sublethal. Peningkatan kadar Cu dapat menyebabkan berbagai gangguan fisiologi, pertumbuhan dan mortalitas pada organisme. Namun demikian dampak Cu terhadap organisme tersebut sering tidak konsisten, karena ternyata dalam beberapa kasus dimana konsentrasi Cu yang mematikan hanya menyebabkan gangguan fisiologi yang ringan pada organisme. Hal ini dapat terjadi dikarenakan organisme yang hidup di lingkungan yang tercemar Cu sudah beradaptasi dengan lingkungan tersebut, sehingga mereka mempunyai toleransi yang tinggi jika dipapar dengan konsentrasi akut Cu. Di lingkungan alami, logam berat umumnya terdapat dalam konsentrasi sublethal. Jika terjadi pencemaran logam berat dalam perairan, organisme air akan mengalami tiga tahap respon terhadap pencemaran tersebut. Pertama tahap shock, kedua tahap recovery (pemulihan), dan ketiga tahap aklimasi dimana organisme mengalami peningkatan toleransi terhadap pemaparan logam berat yang berkelanjutan. Tahap shock biasanya terjadi kerusakan fisik khususnya kerusakan insang dan gangguan homeostasis fisiologis internal tubuh. Tahap ini umumnya berlangsung singkat (beberapa hari). Kemudian tahap pemulihan bersamaan dengan terjadinya peningkatan proses biosintesis (mitosis, sintesis protein) yang membantu memperbaiki kerusakan dan memulihkan gangguan fisiologis. Pada tahap ini produksi protein pengikat logam seperti metallothionein meningkat dan terjadi peningkatan regulasi ion untuk melawan efek merusak dari logam berat. Akhirnya fisiologi internal organisme kembali ke keadaan awal (*pre-exposure*) dan keseimbangan baru terbentuk. Pada tahap akhir ini toleransi organisme terhadap logam menjadi meningkat. Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dirancang untuk mengkaji 1) Respon ikan nila strain Jawa Timur (*Oreochromis niloticus*) terhadap paparan konsentrasi sublethal Cu, 2) Respon ikan nila terhadap kadar Cu dikaji melalui respon fisiologisnya yaitu perubahan kadar ion Na^+ , K^+ dan Cl^- serta tekanan osmotik serum ikan nila, 3) Respon hematologisnya meliputi sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, dan hematocrit, 4) Respon stress oksidatif dan protein pengikat logam (metallothionein) dan 5) Besarnya tingkat akumulasi Cu ke dalam insang sebagai organ yang pertama kali merespon adanya Cu.

Kata Kunci: ikan nila, tembaga, ion, osmolalitas, darah, metallothionein, stress oksidatif, insang



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan kasih sayang NYA, sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan kemajuan yang berjudul “Respon Fisiologis Pemaparan Tembaga (Cu) pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*): Evaluasi terhadap Regulasi Ionik, Osmotik, dan Metallothionein dalam Insang”. Pada kesempatan ini penulis memberikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa walaupun penelitian ini sudah menghasilkan paper yang dikirim ke jurnal internasional (masih *under review*), namun penulis tetap menerima masukan dari pihak lain untuk penyempurnaan hasil penelitian selanjutnya. Akhirnya penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat dan bisa memberi sumbangan pemikiran, dalam kaitannya dengan pencemaran, serta berpartisipasi aktif dalam mensukseskan pembangunan bangsa dan negara.

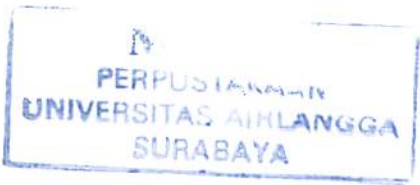
Walaupun demikian penulis berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat dan bisa memberi sumbangan pemikiran, dalam kaitannya ikut serta berpartisipasi aktif dalam mensukseskan pembangunan bangsa dan negara.

Surabaya, 12 Nopember 2018

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN JUDUL | 0 |
| LEMBAR PENGESAHAN | 1 |
| RINGKASAN | 2 |
| PRAKATA | 3 |
| DAFTAR ISI | 4 |
| DAFTAR GAMBAR | 5 |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 6 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN | 14 |
| BAB 4. METODE PENELITIAN | 15 |
| BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN | 20 |
| BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA | 26 |
| BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN | 27 |
| DAFTAR PUSTAKA | 28 |
| LAMPIRAN | |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| Gambar 2.1. Efek bertambahnya konsentrasi logam dalam tubuh organisme | 8 |
| Gambar 2.2. Proses penyerapan ion dan mekanisme regulasi asam-basa ikan air tawar | 10 |
| Gambar 2.3. Mekanisme transport ion dari lingkungan melewati sel epitelium insang menuju Hemolimfa dan sebaliknya | 11 |
| Gambar 5.1 Konsentrasi Cu (mg/kg) dalam insang <i>O. niloticus</i> setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L. | 20 |
| Gambar 5.2 Konsentrasi MT (ng/ml) dalam insang <i>O. niloticus</i> setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L. | 21 |
| Gambar 5.3 Konsentrasi SOD (mU/ml) dalam insang <i>O. niloticus</i> setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L. | 21 |
| Gambar 5.4. Konsentrasi CAT (nmol/ml) dalam insang <i>O. niloticus</i> setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L. | 22 |
| Gambar 5.5. Konsentrasi MDA (nmol/ml) dalam insang <i>O. niloticus</i> setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L. | 23 |

BAB 1. PENDAHULUAN

Tembaga (Cu) adalah logam esensial yang dibutuhkan dalam proses respirasi sel, pertahanan terhadap radikal bebas dan metabolisme sel (Solomon & Lowery 1993). Namun jika kadarnya tinggi, Cu bersifat toksik karena dapat memproduksi radikal bebas (*reactive oxygen species*= ROS).

Mengingat Cu bersifat toksik dan sekaligus esensial (dibutuhkan oleh organisme), sebagai konsekuensinya organisme harus dapat menjaga keseimbangan agar tidak kekurangan Cu maupun kelebihan Cu. Dalam hal ini organisme harus mempunyai sistem regulasi yang canggih untuk menjaga homeostasis Cu dalam tubuhnya.

Kepekaan organisme terhadap Cu dipengaruhi oleh umur. Organisme muda lebih peka terhadap defisiensi maupun toksisitas Cu karena peningkatan kebutuhannya untuk pertumbuhan dan karena mereka mempunyai efisiensi yang tinggi dalam menyerap Cu ditambah belum matangnya sistem ekskresinya (Kamunde et al. 2002).

Peningkatan kegiatan industri dan penggunaan CuSO_4 sebagai fungisida pada kegiatan pertanian serta dalam pengendalian alga dan penyakit dalam kegiatan akuakultur menyebabkan kadar Cu dalam perairan meningkat. Peningkatan kadar Cu di lingkungan alami umumnya terdapat dalam konsentrasi sublethal (McGeer et al. 2000). Peningkatan kadar Cu dapat menyebabkan berbagai gangguan fisiologi, pertumbuhan dan mortalitas pada organisme. Namun demikian dampak Cu terhadap organisme tersebut sering tidak konsisten, karena ternyata dalam beberapa kasus dimana konsentrasi Cu yang mematikan hanya menyebabkan gangguan fisiologi yang ringan pada organisme (Taylor et al. 2000). Hal ini dapat terjadi dikarenakan organisme yang hidup di lingkungan yang tercemar Cu sudah beradaptasi dengan lingkungan tersebut, sehingga mereka mempunyai toleransi yang tinggi jika dipapar dengan konsentrasi akut Cu (McGeer et al. 2000). Di lingkungan alami, logam berat umumnya terdapat dalam konsentrasi sublethal (McGeer et al. 2000).

Jika terjadi pencemaran logam berat dalam perairan, organisme air akan mengalami tiga tahap respon terhadap pencemaran tersebut. Pertama tahap shock, kedua tahap recovery (pemulihan), dan ketiga tahap aklimasi dimana organisme mengalami peningkatan toleransi terhadap paparan logam berat yang berkelanjutan (McDonald & Wood 1993).

Tahap *shock* biasanya terjadi kerusakan fisik khususnya kerusakan insang dan gangguan homeostasis fisiologis internal tubuh. Tahap ini umumnya berlangsung singkat (beberapa hari). Kemudian tahap pemulihan bersamaan dengan terjadinya peningkatan proses biosintesis (mitosis, sintesis protein) yang membantu memperbaiki kerusakan dan memulihkan gangguan fisiologis. Pada tahap ini produksi protein pengikat logam seperti metallothionein meningkat dan terjadi peningkatan regulasi ion untuk melawan efek merusak dari logam berat. Akhirnya fisiologi internal organisme kembali ke keadaan awal (*pre-exposure*) dan keseimbangan baru terbentuk. Pada tahap akhir ini toleransi organisme terhadap logam menjadi meningkat (Pelgrom et al. 1995; Hogstrand & Wood 1996).

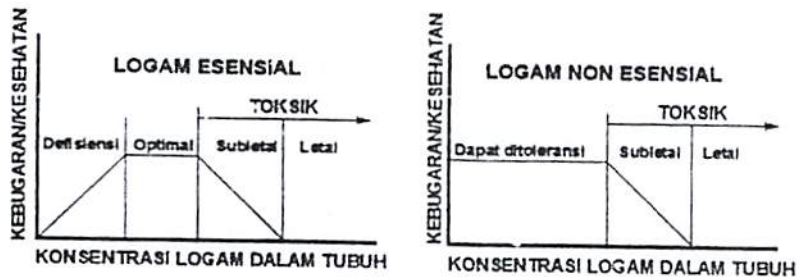
Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dirancang untuk mengkaji:

- 1) Respon ikan nila strain Jawa Timur (*Oreochromis niloticus*) terhadap paparan konsentrasi sublethal Cu.
- 2) Respon ikan nila terhadap kadar Cu dikaji melalui respon fisiologisnya yaitu perubahan kadar ion Na^+ , K^+ dan Cl^- serta tekanan osmotik serum ikan nila.
- 3) Respon hematologisnya meliputi sel darah erah, sel darah putih, hemoglobin, dan hematocrit.
- 4) Respon protein pengikat logam (metallothionein)
- 5) Respon stress oksidatif, dan
- 6) Besarnya tingkat akumulasi Cu ke dalam insang sebagai organ yang pertama kali merespon adanya Cu.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Transpor Logam

Logam apabila masuk ke dalam tubuh organisme dengan konsentrasi yang berbeda akan memberikan efek yang berbeda. Pada logam esensial (Cu, Fe, Zn) jika konsentrasinya terlalu rendah akan menyebabkan defisiensi (malnutrisi), sedangkan jika terlalu tinggi maka dapat menyebabkan racun sehingga konsentrasi yang masuk harus tepat agar dapat mendukung proses metabolisme secara efektif dan efisien. Terdapat tiga kondisi pada konsentrasi logam esensial yaitu kondisi kekurangan atau defisiensi, optimal, dan keracunan. Pada logam non esensial, jika konsentrasinya rendah maka masih dapat ditoleransi sedangkan jika konsentrasinya terlalu tinggi maka dapat mengakibatkan toksik. Grafik yang berkaitan dengan konsentrasi dan pengaruh yang ditimbulkan oleh logam esensial dan non esensial dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 2.1 Efek bertambahnya konsentrasi logam dalam tubuh organisme (Irawan, 2013)

2.2. Regulasi Ionik dan Osmotik

Ikan air tawar menempati lingkungan perairan dalam komposisi ion dan pH yang sangat beragam, yang umumnya memiliki konsentrasi total garam yang jauh lebih rendah dari cairan tubuh ikan. Sebagai akibatnya, semua ikan air tawar terus menerus menambah air dan kehilangan ion karena difusi pasif yang menurunkan gradien osmotik dan ionik antara cairan tubuh dan lingkungan air tawar. Oleh karena itu, untuk menjaga keseimbangan cairan dan ion dalam tubuh ikan harus melakukan proses osmoregulasi. Osmoregulasi didefinisikan sebagai pemeliharaan konsentrasi osmotik intraseluler dan ekstraseluler terhadap osmolaritas eksternal yang sangat diperlukan untuk adaptasi fisiologi organisme air. Oleh karena itu, regulasi ion, seperti Na^+ , K^+ ,

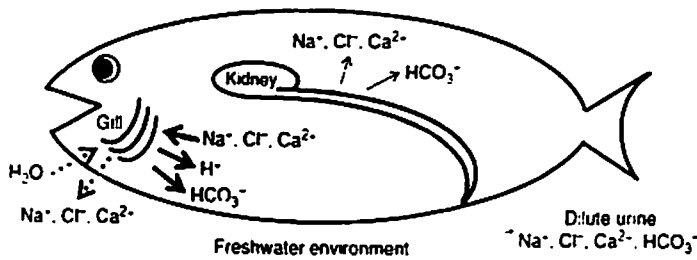


dan kation divalen Mg^{2+} dan Ca^{2+} , yang dibutuhkan untuk stabilisasi permeabilitas membran, memainkan peran penting dalam metabolisme ikan (Atli dan Canli, 2010). Tanpa ion atau osmoregulasi, ikan di air tawar hanya akan memperluas volume dan mati (Hwang, 2011).

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. Terdapat empat jenis transport pasif yaitu difusi, difusi berfasilitas, filtrasi dan osmosis. Transport aktif merupakan perpindahan molekul melewati membran sel yang memerlukan energi atau ATP. Terdapat dua jenis transport aktif yaitu transport aktif primer dan transport aktif sekunder. 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).

Protein transporter merupakan protein yang terlibat dalam pemindahan molekul atau ion melintasi membran sel. Berdasarkan arah perpidahannya protein transporter dibagi menjadi tiga yaitu uniporter, simporter, dan antiporter. Uniporter dapat berupa protein pembawa atau protein carrier, dapat juga berupa saluran atau kanal. Terdapat saluran yang memfasilitasi masuknya ion berdasarkan jenis muatannya (Positif: kation, atau negatif: anion). Simporter merupakan protein integral yang memindahkan dua jenis atau lebih molekul atau ion melintasi membran sel dengan arah yang sama. Antiporter merupakan protein integral yang dapat memindahkan molekul atau ion melawan gradien, pada saat bersamaan memindahkan molekul atau ion lain yang sesuai dengan arah gradien (Irawan, 2013).

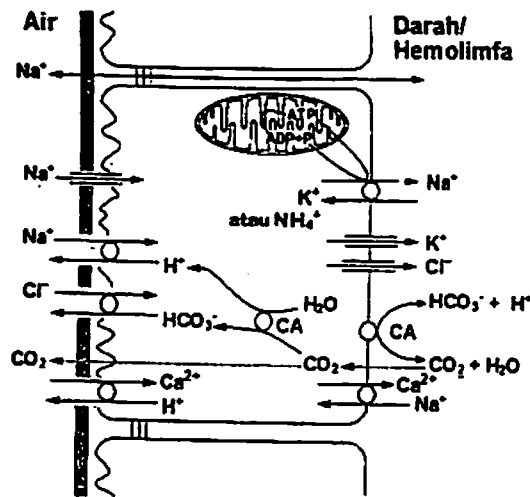
Dalam mengatasi hidup dalam lingkungan yang encer, ikan air tawar meningkatkan efisiensi mekanisme ion/ osmoregulasi untuk menjaga keseimbangan ionik lingkungan internal. Ikan mengimbangi hilangnya ion dengan aktif menyerap garam dari lingkungan eksternal melalui epitel insang (Gambar 3.2). Untuk menjaga keseimbangan, ikan menghasilkan urine yang encer akibat reabsorpsi garam di ginjal untuk meminimalkan kehilangan ion.



Gambar 2.2. Proses penyerapan ion dan mekanisme regulasi asam-basa ikan air tawar (sumber: Hwang, 2011)

Derajat keasaman (pH) internal dicapai dengan mengatur pengeluaran H^+ dan HCO_3^- di insang. Insang bertanggung jawab untuk sebagian besar penyerapan ion (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , dan lain-lain) ke dalam tubuhnya, yang terutama dicapai melalui transport aktif dengan pengangkutan jenis sel ion tertentu, yang disebut "ionocytes" atau ionosit (Hwang, 2011). Ionosit adalah sel epitel khusus yang terlibat dalam pemeliharaan homeostasis osmotik dan memiliki ciri-ciri dengan melimpahnya mitokondria yaitu mitochondrion-rich (sel-kaya mitokondria) dan bertanggung jawab untuk fungsi transport transepitelial ion tertentu (Farrell *et al.*, 2011). Ionosit utama dalam insang ikan air tawar adalah mitochondrion-rich (MR).

Pada ikan air tawar, proses biokimia yang terlibat dalam pengaturan ion (yaitu, pemeliharaan ion Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , dan Mg^{2+}) tidak dapat dipisahkan dari proses asam basa atau pH, karena kedua proses tersebut terjadi pada lokasi yang sama (insang) dan berbagi jalur umum (Hwang, 2011). Regulasi ion merupakan kapasitas organisme untuk membangun dan mempertahankan gradien ionik spesifik antara cairan tubuh dan cairan sel (Muralidharan, 2014). Regulasi komposisi ionik cairan tubuh dianggap memiliki makna adaptif (menyesuaikan diri) untuk organisme (Burton, 1973). Sebagian besar ikan mencapai keseimbangan pH internal yang menyesuaikan kadar plasma pada senyawa HCO_3^- dengan memvariasikan ekskresi (pengeluaran) H^+ dan HCO_3^- di insang (Gambar 3.2). Selain itu, pengeluaran H^+ dan HCO_3^- adalah mekanisme masuknya pasangan ion Na^+ dan Cl^- di insang ikan. Mekanisme keluar masuknya ion dari lingkungan ke dalam organisme dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 3.3. Pada Gambar 3.3 menunjukkan proses perpindahan ion dari lingkungan luar (air) melewati sel epitelium insang menuju darah atau hemolimfa dan sebaliknya. Selain melewati epitelium, ion juga dapat berpindah melalui sela-sela epitelium. Dalam melakukan proses regulasi ion memerlukan ATPase.



Gambar 2.3. Mekanisme transport ion dari lingkungan melewati sel epitelium insang menuju hemolimfa dan sebaliknya (sumber: Irawan, 2013)

ATPase adalah enzim yang bertanggung jawab untuk pengangkutan ion melalui membran biologi (Eroglu dan Canli, 2013). Selain itu, ATPase juga mengatur permeabilitas membran, tekanan osmotik, dan volume seluler (Marshall dan Grosell 2005). Na^+/K^+ -ATPase adalah enzim yang terikat membran yang mengangkut ion melalui membran biologis dan mengatur volume seluler, tekanan osmotik, dan permeabilitas membran (Li et al., 2011). Ion yang memainkan peran penting dalam beberapa fungsi tubuh, yaitu ion natrium, kalium dan klorida (monovalen) terlibat dalam rangsangan neuromuskular, keseimbangan asam basa dan tekanan osmotik (Verma et al., 1981), sedangkan kation kalsium (divalen) memfasilitasi rangsangan neuromuskular, reaksi enzimatik dan retensi membran permeabilitas.

Dalam proses memindahkan ion bermuatan dari air ke dalam ikan (atau sebaliknya dalam kondisi asam), insang menggunakan berbagai transport protein yang menempel dalam membran ionosit insang. Pertama transport protein memindahkan ion dari cairan pada satu sisi sel melintasi membran ke dalam sel, dan kemudian kumpulan protein lainnya memindahkan ion melintasi membran lain dalam cairan di sisi lain dari sel. Membran sel yang memisahkan bagian dalam insang dari lingkungan air yang disebut 'membran apikal' dan membran sel yang memisahkan sel dari darah atau sel lain di dalam tubuh ikan yang disebut 'membran basolateral' (Hwang, 2011).

2.3. Protein *Metallothionein*

Jumlah logam berat yang terakumulasi dalam tubuh organisme perairan tergantung pada efek kimia logam berat tersebut dan cenderung berikatan dengan protein dan lipid pada jaringan biologis. Jenis protein yang menjadi sasaran utama bagi perlekatan dengan logam berat adalah protein-protein yang memiliki kandungan logam pada struktur proteinnya (Rumahlatu, 2012).

Metallothionein (MT) merupakan protein yang sangat peka dan akurat sebagai indikator pencemaran. Hal ini didasarkan pada suatu fenomena alam di mana logam-logam dapat terikat di dalam jaringan tubuh organisme yang dimungkinkan karena adanya protein tersebut. Dengan demikian, MT merupakan protein pengikat logam (*metal-binding protein*) yang berfungsi dan berperan dalam proses pengikatan logam di dalam jaringan setiap makhluk hidup (Noël-Lambot *et al.*, 1978; Bebianno *et al.*, 1993).

MT terdiri atas protein (polipeptida) yang mempunyai massa molekul yang kecil (6-7 kDa), dan sifat utamanya adalah mengandung 26-33% 'cysteine' serta tidak mempunyai asam amino aromatik atau histidin (Frankenne *et al.*, 1980; Le Gal, 1988; Carpenç, 1993). Sebagai konsekuensi dari banyaknya kandungan asam amino 'cysteine' maka protein ini mengandung kelompok 'thiol' (*sulfhydryl*, -SH) dalam jumlah yang besar. Kelompok ini mengikat logam-logam berat sangat kuat, khususnya merkuri (Hg), kadmium (Cd), perak (Ag), seng (Zn) dan tin. Residu *sulfhydryl* dari 'cysteine' mampu mengikat logam, di mana 1 atom logam (misalnya: Cd, Zn atau Hg) untuk 3 residu -SH, atau 1 atom logam 2 residu -SH (Noël-Lambot and Bouquegneau, 1977; Noël-Lambot *et al.*, 1978; Le Gal, 1988).

MT dapat terinduksi pada semua golongan makhluk hidup (misalnya mamalia, ikan, moluska/kerang, zooplankton dan fitoplankton) dan di berbagai tingkat jaringan/organ (misalnya hati, ginjal, insang, testis, usus, otot, plasma, eritrosit, sel-sel epitelial dan urine). Demikian pula protein ini tersebar pada semua organisme laut, baik pada tumbuhan maupun organisme vertebrata dan invertebrata; organ organisme terutama hati, hepatopankreas, insang, ginjal, termasuk pula jenis alga *Cyanophyceae*. Konsentrasinya dalam jaringan (hati, insang, kelenjar pencernaan) meningkat ketika organisme terkontaminasi oleh unsur-unsur logam berat (Noël-Lambot *et al.*, 1978; Le Gal, 1988; Bebianno and Langston, 1993).

Salah satu fungsi dari MT adalah keterlibatannya sebagai antioksidan tubuh. Molekul MT memiliki sejumlah besar kelompok *thiolic* dengan sifat *nukleofilik* membuat MT mampu mengikat tidak hanya logam tetapi juga radikal bebas. Selain itu MT berfungsi sebagai detoksifikasi logam

untuk mencapai keadaan *homeostasis*, sehingga organisme menjadi resisten terhadap paparan logam berat dan menyebabkan toksisitas dari logam berat berkurang. Hal ini merupakan cara MT untuk melindungi sel dari senyawa mematikan (Campagne *et al.*, 2000).

MT disintesis sebagai konsekuensi dari berbagai macam cekaman pada tingkat seluler dan ditemukan baik pada intraseluler maupun ekstraseluler. Pada tingkat intraseluler, MT dapat bertindak sebagai penyimpan logam-logam yang esensial, sebagai *scavenger reactive oxygen species* (ROS) dan regulator untuk aktifitas transkripsi. Sedangkan keberadaan *metallothionein* pada tingkat ekstraseluler berperan sebagai *danger signal* terhadap kerusakan yang ditimbulkan pada tingkat seluler (Carpene *et al.*, 2007; Ogra *et al.*, 2008; Pearce *et al.*, 2008).

Organisme yang hidup diperairan tercemar logam berat menghasilkan MT lebih banyak dibanding organisme yang tidak terpapar logam berat. Jumlah MT yang dihasilkan di dalam sel sangat dipengaruhi oleh jumlah logam berat yang masuk. Semakin banyak logam berat yang ada, maka produksi MT semakin banyak pula. Selain itu menurut Sevcikova *et al.* (2013) produksi MT yang dihasilkan bervariasi tergantung dari jenis kelamin, umur, ukuran tubuh ikan, jenis logam berat, lamanya pemaparan, sifat kimia-fisik air (pH, suhu, salinitas, DO), dan musim. Pendapat yang sama juga menyatakan bahwa kemampuan MT untuk mengikat logam berat dipengaruhi oleh faktor species ikan, umur, jenis kelamin, kondisi lingkungan/air, lamanya pemaparan, dan konsentrasi kadmium (Kovarova *et al.*, 2009).

Logam berat diketahui dapat menstimulasi transkripsi gen MT, sehingga kecepatan produksinya akan meningkat (Klaassen *et al.*, 2009). Induksi sintesis MT berasal dari pengaturan ekspresi gen MT yang berasal dari proses transkripsi dan translasi. Peningkatan logam dalam sel akan disampaikan oleh gen MT melalui aktivasi logam sebagai faktor transkripsi untuk mengikat logam tertentu (Roesijadi, 1992).

Regulasi gen MT oleh logam berat diperantarai oleh inhibitor yang berinteraksi dengan faktor transkripsi secara aktif. Afinitas *in vitro* dari protein menurun dalam urutan yang terdiri atas $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^+, \text{Ag}^+, \text{Bi}^{3+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Co}^{2+}$ (Quaife *et al.*, 1994) menunjukkan bahwa Zn bisa diganti atau digeser oleh logam lain yang pada umumnya dianggap paling toksik.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Terdapat lima (5) bidang/tema riset unggulan Universitas Airlangga yaitu: pertanian, kesehatan dan obat, sosial ekonomi dan hukum, matematika dan ilmu pengetahuan alam, serta psikologi dan budaya, dan memiliki 10 *output/outcome* yaitu: HKI/paten, publikasi ilmiah, ilmu pengetahuan, teknologi, produk, model, kebijakan, seni dan budaya, buku ajar dan pengabdian kepada masyarakat. Topik penelitian yang sedang diusulkan ini masuk dalam tema pertanian khususnya menunjang ketahanan pangan serta dengan *output/outcome* publikasi ilmiah internasional serta buku ajar.

Hasil penelitian ini akan memberikan informasi tentang dampak penggunaan CuSO_4 sebagai fungisida pada kegiatan pertanian, serta dalam pengendalian alga dan penyakit dalam kegiatan akuakultur agar tidak mengganggu organisme akuatik yang hidup di dalamnya. Dengan demikian sekaligus melindungi sumberdaya hayati perairan agar tetap berkembang dengan baik.

Tujuan penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui respon ikan nila terhadap paparan konsentrasi sublethal Cu.
- 2) Mengetahui respon fisiologis (perubahan kadar ion Na^+ , K^+ dan Cl^- serta tekanan osmotik serum ikan nila) terhadap kadar Cu.
- 3) Respon hematologis,
- 4) Respon metallothioncin,
- 5) Respon stress oksidatif, dan
- 6) Besarnya tingkat akumulasi Cu ke dalam insang sebagai organ yang pertama kali merespon adanya Cu.

Luaran penelitian yang dihasilkan dari penelitian ini adalah:

- 1) Publikasi internasional yang direncanakan di terbitkan pada jurnal bereputasi satu paper/tahun. Jurnal yang direncanakan akan dituju diantaranya: *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *Journal of Applied Ichthyology*, *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *Chemosphere*, *Fish Physiology and Biochemistry* atau yang lainnya.
- 2) Buku ajar/teks.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian akan dilakukan di Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya pada periode 2018 - 2019.

4.2. Hewan Percobaan

Ikan nila (*Oreochromis niloticus*) strain Jawa Timur dengan nama lokal Jatimbulan yang berukuran 13-15 cm diperoleh dari Unit Pengelolaan Budidaya Air Tawar (UPBAT) Pandaan, Pasuruan Jawa Timur. Sebelum digunakan dalam percobaan ikan diaklimasi selama 1 minggu dengan kondisi laboratorium pada salinitas 0 ppt (air tawar). Selama proses aklimasi, air diganti setiap dua hari dan diberi aerasi untuk menjaga agar kadar oksigen terlarut tersedia secara layak bagi ikan nila. Selama aklimasi ikan diberi makan berupa makanan buatan yang berbentuk butiran (pelet) setiap dua hari sekali. Kotoran dan sisa makanan yang tidak dimakan oleh ikan diambil dari tempat pemeliharaan dengan cara disifon setiap hari.

4.3. Penelitian Tahap I

4.3.1. Pembuatan Larutan Induk Cu

Membuat larutan induk Cu sebesar 1000 ppm yaitu dengan cara mencampurkan 3,9 gram tembaga sulfat CuSO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) dengan aquademineral sebanyak 1 L, kemudian diaduk merata sampai tidak terdapat endapan.

4.3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan, yaitu waktu paparan (1, 2, 3, 4, dan 5 hari) dan konsentrasi tembaga media (0 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L). Jumlah ikan yang digunakan sebanyak 5 ekor tiap perlakuan.

Pada masa pemaparan, ikan diberi makanan berupa pelet dua hari sekali dan dilakukan pengamatan terhadap kondisi air pada media uji yaitu pH, suhu, dan oksigen terlarut (DO). Setelah tujuh hari pemaparan ikan nila diambil sampel kulit dan sisiknya untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

4.3.3. Analisis Kadar Ion dan Osmolalitas dalam Serum

Sebelum pengambilan sampel darah, ikan dibuat pingsan terlebih dahulu dengan minyak cengkeh, kemudian diukur panjang dan beratnya. Setelah itu, sampel darah diambil menggunakan syringe berukuran 1 mL yang diinjeksikan pada bagian jantung ikan melalui tubuh bagian dorsal. Darah yang diperoleh dimasukkan di *sample cup* dan kemudian dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya untuk diuji kadar ion Na^+ , K^+ , dan Cl^- . Teknik pengambilan darah ini berlaku untuk kedua uji, baik untuk kadar ion maupun uji tekanan osmotik.

4.3.3.1. Pengukuran Osmolalitas

Dalam melakukan uji osmoregulasi yaitu sampel darah yang telah diperoleh pada tahap pelaksanaan dipindah ke *sample cup*. Selanjutnya sampel darah dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh serum darah. Kemudian serum darah dari tabung centrifuge dipindah ke *sample cup* yang baru dengan menggunakan pipet. Serum darah dalam *sample cup* kemudian dipindah ke *microtube* dengan dicuplik sebanyak 20 μL untuk diukur nilai osmolalitasnya dengan menggunakan *micro-osmometer* (Fiske 210). Nilai osmolalitas serum darah yang diperoleh akan dinyatakan dalam satuan mOsm/kg. Nilai osmolalitas media juga diukur dengan mengambil air pada media uji pada setiap perlakuan.

4.3.3.2. Pengujian kadar ion

Sampel darah yang telah diperoleh pada tahap pelaksanaan dipindah ke dalam *sample cup* kemudian dibawa ke Laboratorium Ekologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya untuk diuji kadar ion Na^+ , K^+ , dan Cl^- . Sampel darah diperoleh dalam *sample cup* kemudian disentrifugasi (Rotofix 32 A) dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum darah. Setelah disentrifuge, serum darah dipindah ke *microtube* dan dimasukkan ke dalam alat ISE (Jokoh electrolyte EX-D) untuk diukur kadar ion Natrium (Na^+), Kalium (K^+), dan Klorida (Cl^-).

4.3.4. Pengukuran Parameter Hematologi

Sebelum pengambilan sampel darah, ikan dibuat pingsan dengan larutan cengkeh untuk kemudian diukur panjang dan berat ikan. Setelah ikan pingsan, darah diambil dengan menggunakan suntik berukuran 1 ml yang diinjeksikan pada bagian jantung ikan. Jumlah ikan untuk sampel respon hematologi masing-masing 5 ekor. Darah yang diperoleh dari sampel ikan untuk respon hematologi dimasukkan di tabung EDTA.

Darah yang telah diambil kemudian diuji dengan menggunakan alat *hematology analyzer* (Sysmex/Mindray) untuk memperoleh data respon hematologi (kadar hemoglobin, nilai hematokrit, jumlah sel darah merah, dan jumlah sel darah putih). Sampel darah yang telah homogen dengan antikoagulan diletakkan di dalam adaptor pada mesin *hematology analyzer*, mesin tersebut akan bekerja dan menghasilkan data secara otomatis yang muncul pada layar *hematology analyzer*. Data yang dihasilkan kemudian dicatat (atau di print).

4.3.5. Pengukuran Stres oksidatif

Pengukuran stress oksidatif mengikuti kit yang disediakan oleh perusahaan pembuat kit dengan metode direct ELISA.

4.3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS versi 15. Normalitas sebaran data diuji dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas data dianalisis menggunakan uji Levene's test. Untuk mengetahui pengaruh salinitas Cu terhadap kadar ion serum, osmoregulasi dan respon hematologi ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dilakukan analisis ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar tiap perlakuan dengan taraf ketelitian $\alpha = 0,05$. Jika perlakuan berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji Duncan.

4.4. Penelitian Tahap 2

Pembuatan larutan induk Cu dan rancangan penelitian sama dengan penelitian Tahap 1. Membuat larutan induk Cu sebesar 1000 ppm yaitu dengan cara mencampurkan 3.9 gram

tembaga sulfat CuSO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) dengan aquademineral sebanyak 1 L, kemudian diaduk merata sampai tidak terdapat endapan.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan, yaitu waktu paparan (1, 2, 3, 4, dan 5 hari) dan konsentrasi tembaga media (0 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, dan 10 mg/L). Jumlah ikan yang digunakan sebanyak 5 ekor tiap perlakuan.

Pada masa pemaparan, ikan diberi makanan berupa pelet dua hari sekali dan dilakukan pengamatan terhadap kondisi air pada media uji yaitu pH, suhu, dan oksigen terlarut (DO). Setelah tujuh hari pemaparan ikan nila diambil sampel kulit dan sisiknya untuk dilakukan penelitian lebih lanjut.

4.4.1. Penentuan kadar Cu insang ikan nila

Insang ikan nila bagian kanan kirinya diambil dari bagian tubuhnya kemudian sampel ditimbang sebanyak kurang lebih 1 g dan menambahkan akuades untuk proses destruksi fisik. Destruksi secara kimia dilakukan dengan memasukkan insang ikan nila ke dalam labu digesti dan ditambahkan 10 mL HNO_3 pekat dan H_2SO_4 pekat. Larutan tersebut dipanaskan sampai temperatur $\pm 60^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Selanjutnya didinginkan selama 5 menit dan ditambahkan masing-masing HNO_3 pekat sebanyak 10 mL. Kemudian dipanaskan sampai mendidih. Larutan dibiarkan selama 5 menit kemudian ditambahkan 1 mL H_2O_2 sampai warna jernih. Memindahkan larutan ke dalam tabung nessler dan ditambahkan lagi akuades hingga 100 mL. Kemudian larutan yang telah homogen siap uji spektrofotometer serapan atom (Chudaifah 2010).

4.4.2. Penentuan kadar *metallothionein* dalam insang

Insang ikan nila bagian kanan kirinya diambil dari bagian tubuhnya kemudian dihancurkan menggunakan mortar dan alu. Hasil dari penghancuran berupa *homogenate* yang selanjutnya dipindahkan ke tabung *Eppendorf* dan menambahkan sebanyak 300-500 μL buffer ekstrak dalam keadaan dingin. Setelah itu, menginkubasi *homogenate* dalam refrigerator selama 30 menit dengan dishaker sekali selama 10 menit, dan dilanjutkan dengan mensentrifugasi *homogenate* pada 1600 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C .

Hasil dari proses tersebut berupa supernatant, untuk mengendapkan protein non *metallothionein* maka 1 mL supernatant aliquot dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit,

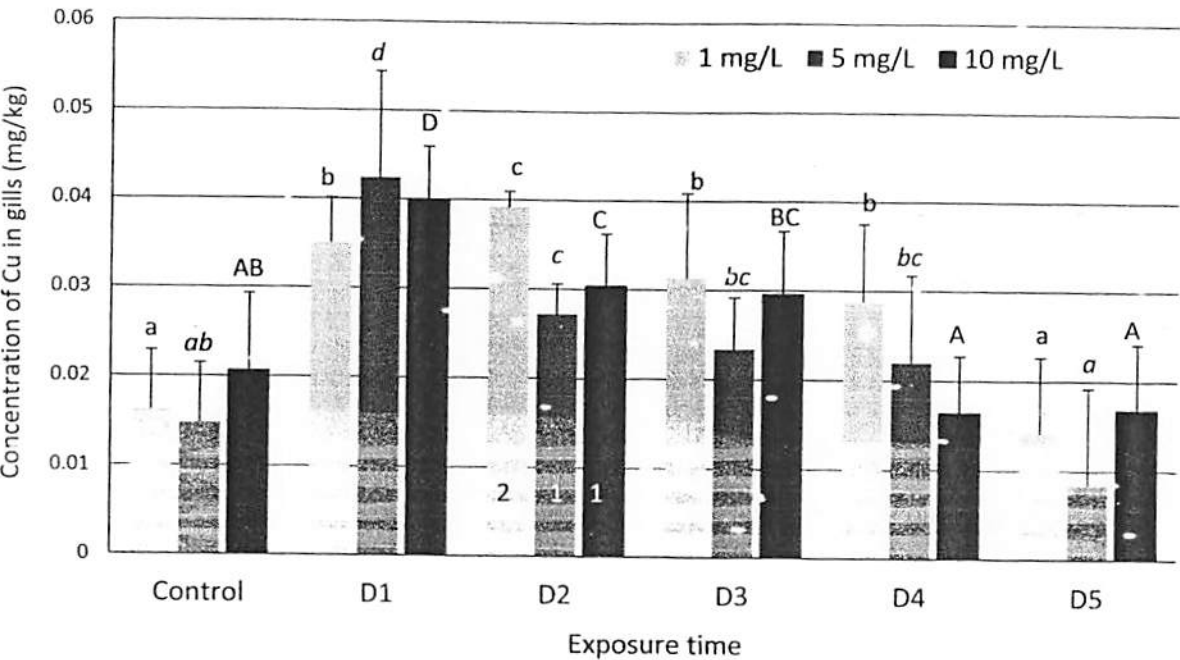
kemudian dipindahkan ke tabung Eppendorf baru, dan mensentrifugasi supernatant pada 1400 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C, dihasilkan pelet yang selanjutnya ditambahkan sebanyak 100 µL PBS pH 7,4 dan diresuspensi sehingga didapatkan metallothionein hasil ekstraksi untuk proses selanjutnya.

Penentuan kadar metallothionein dilakukan dengan metode ELISA. Tahapan proses pengujian ELISA sebagai berikut: membuat denah Elisa plate berdasarkan kode sampel dan lokasi penempatan sampel dan coating buffer dengan kondisi fresh. Selanjutnya membuat coating antigen yang diencerkan dengan coating buffer dengan kadar antigen yang digunakan (1:40), yang diinkubasi pada suhu 4°C semalam. Keesokan harinya plate dicuci dengan PBS Tween 0,2% sebanyak 100 µL dan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Kemudian ditambahkan sebanyak 100 µL antibodi primer anti metallothionein (1:400) dalam assay buffer, elisa plate diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam dan dishaker menggunakan shaker *Elisa plate*. Tahap berikutnya dilakukan proses pencucian dengan larutan PBS Tween 0,2% sebanyak 200 µL dan dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Selanjutnya ditambahkan 100 µL antibodi sekunder IGg biotin anti rabbit (1:800) dalam assay buffer, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam sambil dishaker. Selanjutnya dicuci kembali dengan PBS sebanyak 6 kali. Setelah itu mencuci kembali dengan PBS sebanyak 200 µL dengan pengulangannya 6 kali. Kemudian menambahkan sebanyak 100 µL substrat sure blue TMB microwell pada masing-masing sumuran, diinkubasi selama 20-30 menit pada ruang gelap. Jika terjadi reaksi antigen dan antibodi maka larutan akan berubah menjadi biru. Tahapan reaktif, menambahkan 100 µL HCl 1 N untuk menghentikan reaksi (menunjukkan perubahan warna menjadi kuning). Hasil dikuantifikasi dengan Elisa reader panjang gelombang 450 nm. Selanjutnya dikonversi dengan kurva standart.

4.4.3. Analisis Data

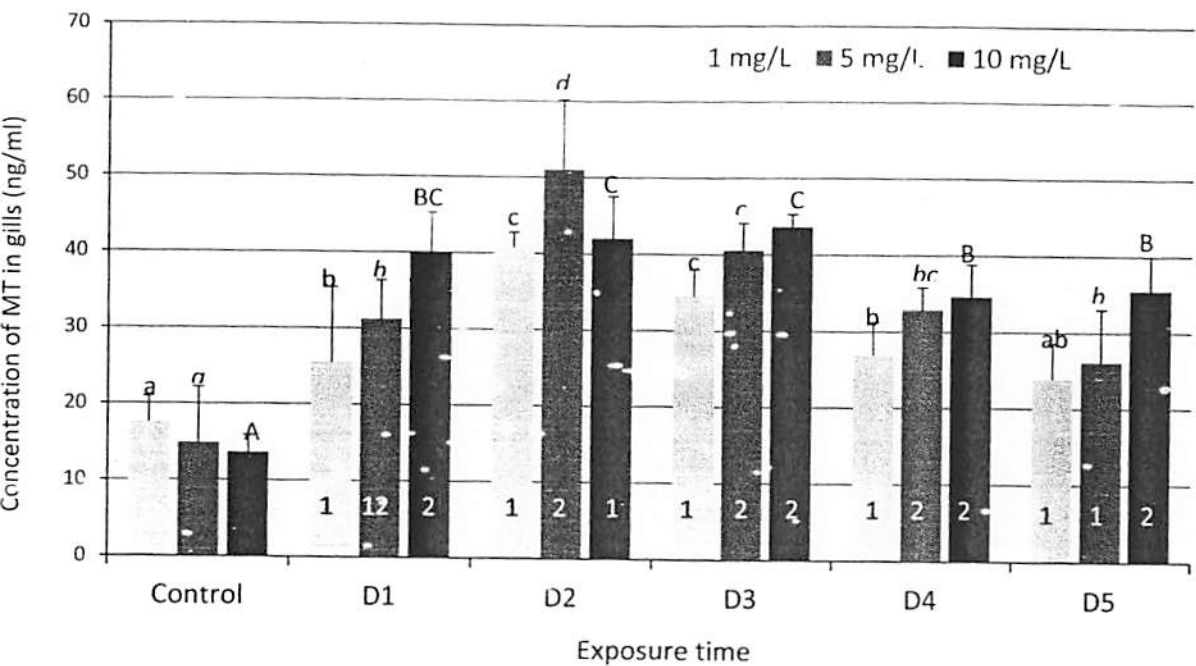
Data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS versi 15. Normalitas sebaran data diuji dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov dan homogenitas data dianalisis menggunakan uji Levene's test. Untuk mengetahui pengaruh salinitas Cu terhadap kadar Cu dan metallothionein dalam ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dilakukan analisis ANOVA untuk mengetahui perbedaan antar tiap perlakuan dengan taraf ketelitian $\alpha = 0,05$. Jika perlakuan berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji Duncan.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN



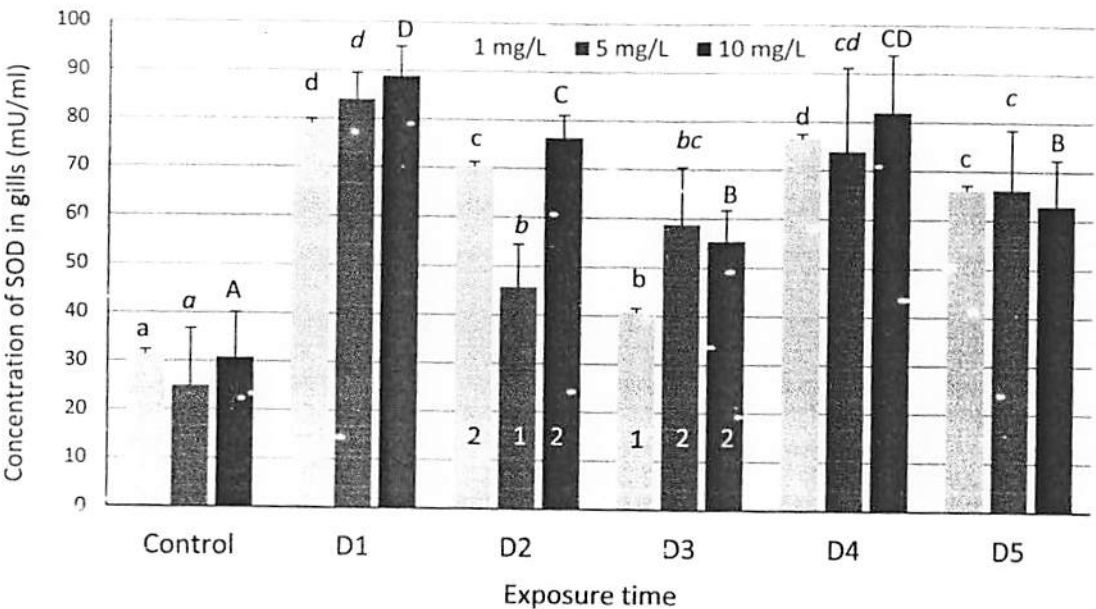
Gambar 5.1. Konsentrasi Cu (mg/kg) dalam insang *O. niloticus* setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L.

Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.



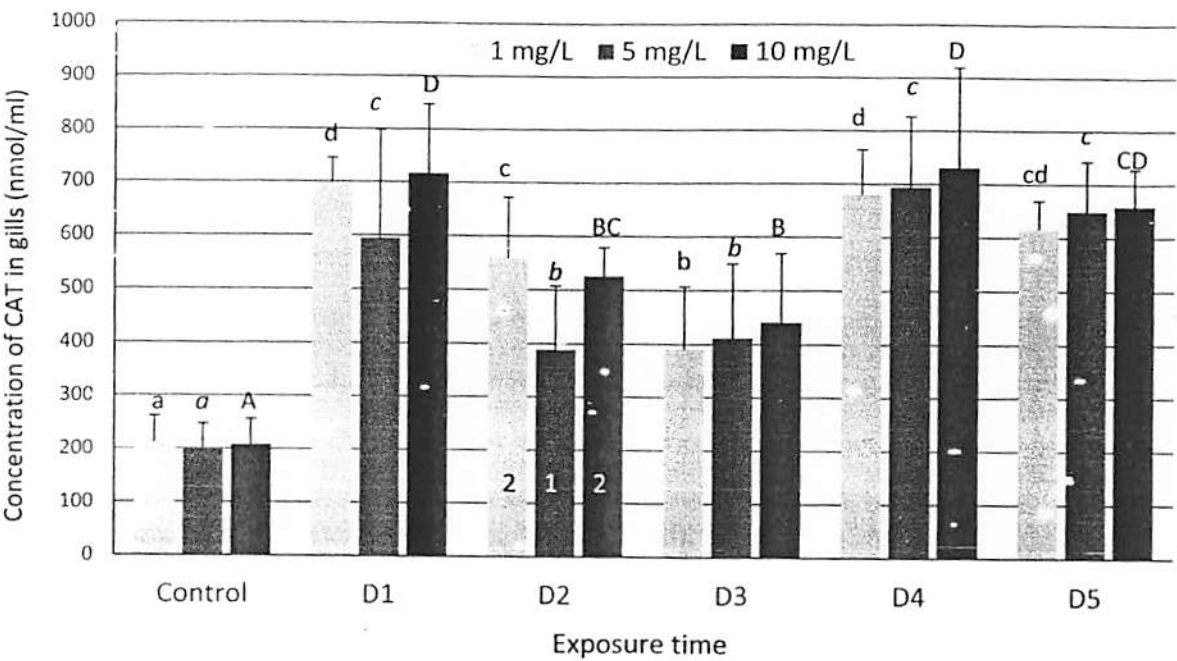
Gambar 5.2. Konsentrasi MT (ng/ml) dalam insang *O. niloticus* setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L.

Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.



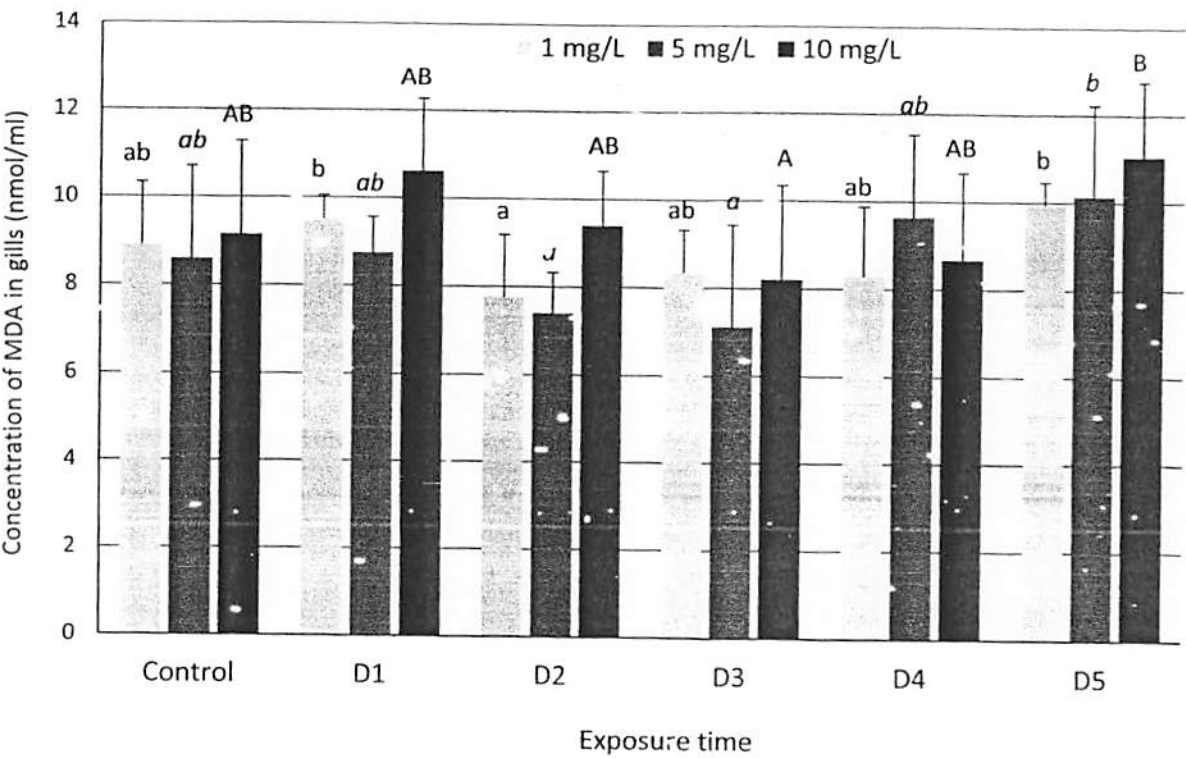
Gambar 5.3. Konsentrasi SOD (mU/ml) dalam insang *O. niloticus* setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L.

Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.



Gambar 5.4. Konsentrasi CAT (nmol/ml) dalam insang *O. niloticus* setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L.

Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.



Gambar 5.5. Konsentrasi MDA (nmol/ml) dalam insang *O. niloticus* setelah dipapar 1, 5 dan 10 mg Cu/L.

Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B$). No significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p > 0.05$). The data presented are the means of five determinations.

Luaran yang dicapai adalah sebuah paper berjudul:

“Effect of cadmium on plasma melanocyte-stimulating hormone and morphological changes of melanophore in the cichlid fish *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1757 at different salinity levels” yang disubmit pada jurnal *Ecohydrology & Hydrobiology*. Bukti submit dapat dilihat pada lampiran.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Rencana penelitian selanjutnya adalah:

- 1) Melakukan penelitian lanjutan pengaruh Cu terhadap osmolalitas serum ikan
- 2) ion serum (Na, K, dan Cl),
- 3) hematologi (sel darah merah, sel darah putih, hemoglobin, hematokrit)
- 4) Serta memperbaiki manuscript yang akan dikirim ke jurnal internasional.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

- 1) Penelitian ini mengungkapkan bahwa kadar Cu dalam insang dari semua ikan nila yang terkena Cu (1, 5 dan 10 mg Cu / L) meningkat secara signifikan selama beberapa hari pertama, kemudian secara bertahap menurun, dan mencapai nilai yang sama dengan kontrol pada D4 -D5.
- 2) Tingkat MT, SOD, dan CAT dalam insang ikan yang terkena Cu sebanding dengan akumulasi Cu.
- 3) Peningkatan MT, SOD dan CAT selama beberapa hari pertama mungkin merupakan respon adaptif dari hewan terhadap toksisitas Cu. MT mengikat Cu yang meningkat, sementara SOD dan CAT mengais radikal bebas yang meningkat karena meningkatnya kadar Cu.
- 4) Hasil saat ini menunjukkan bahwa tingkat MDA dalam insang dari semua ikan yang terpapar Cu tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol, menunjukkan sistem pertahanan antioksidan (SOD dan CAT) dikombinasikan dengan induksi MT yang mampu sepenuhnya mengais peningkatan ROS, yang mencegah LPO.

7.2. Saran

Melakukan Penelitian lanjutan pengaruh Cu terhadap osmolalitas, ion serum dan parameter hematologi.



DAFTAR PUSTAKA

- Atli, G. and Canli, M. 2010. 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.
- Bebianno, M.J., Nott, J.A., Langston, W.J., 1993. Cadmium Metabolism in the Clam *Ruditapes decussata*: The Role of *Metallothioneins*. *Aqua. Toxicol.* 27, 315–334.
- Burton, R.F. 1973. The significance of ionic concentrations in the internal media of animals. *Biol Rev.* 48: 195 - 231.
- Campagne, M.V., Thibodeaux, H., Van Bruggen, N., Cairns, B., and Lowe, D.G., 2000. Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the *metallothionein-1* promoter and rapid induction of *metallothionein-1* and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *Journal Neurosci.* 15, 5200-5207.
- Carpene, E., 1993. *Metallothionein in marine mollusc* dalam Dallinger, R. & P.S. Rainbow (ed.), *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, 55-72.
- Carpene, E., Andreani, G., and Isani, G., 2007. *Metallothionein Functions and Structural Characteristics*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- Chudaiyah, L., 2010. Konsentrasi Pb, Cd, dan Hg pada Ikan Pepetek (*Leicognathus equulus*) yang Ditangkap di Pantai Jawa Timur dan Batas Aman Konsumsinya. *Tesis*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Eroglu, A. and Canli, M. 2013. Effects of Cd, Zn, Cd + Zn Combination on ATPase Activity in The Gill and Muscle of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull Environ Contam Toxicol.* 91: 420-425.
- Farrell, A.P., Cech, E.D.S.JJ., JR, Richards, J.G. (Eds). 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology from Genom to Environment Volume 2*. Vancouver, BC, Canada: Academic Press.
- Frankenne, F., Noël-Lambot and Disteche, A., 1980. Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium-loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 66C: 179-182.
- Hwang, P.P. 2011. Mechanisms of Ion Transport in Freshwater Fishes. In: Farrell, A. P., E. Don Stevens J. J. C., JR, Jeffrey G. Richards (Eds), *Encyclopedia of Fish Physiology*. Academic Press. Elsevier. Hal: 1359-1365.
- Irawan, B. 2013. *Karsinologi dengan Penjelasan Deskriptif dan Fungsional*. Surabaya: Airlangga University Press, Surabaya.
- Klaassen, C.D., Jie, L., and Diwan, A.B, 2009. *Metallothionein* protection of cadmium toxicity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238: 215-220.
- Kovarova, J., Kizek, R., Adam, V., Harustiakova, D., Celechovska, O., and Svobedova, Z., 2009. Effect of Cadmium Chloride on Metallothionein Levels in Carp. *Journal of Sensors*, 9, 4789-4803; doi: 10.3390/s90604789.
- Le Gal, Y. 1988. *Biochimie Marine*. Chapitre 9, Pollutions, Masson, Paris, 223-274.
- 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.* 153C: 402–407.
- Marshall W.S. and Grosell M. 2005. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. *Physiol Fish.* 2022 C006: 177–230.
- Muralidharan, L. 2014. Impact of Fenthion on Ionic Regulation in the Blood of Freshwater Fish, *Cyprinus carpio* (Linn). *J Environ Sci And Food Tech.* 8: 63-70.



- Noël-Lambot, F., J. M. Bouquegneau, F., Frankenke and Disteché, A., 1978. Le-role des *metallothioneins* dans le-stockage des métaux lourds chez les- animaux marins. *Revue Internationale d'Océanographic Medicale*, 49, 13-20.
- Noël-Lambot, F., and Bouquegneau, J.M., 1977. Comparative study of toxicity, uptake and distribution of cadmium and mercury in the sea water adapted eel *Anguilla anguilla*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 18(4): 418-424.
- Ogra, Y., Onishi, S., Kajiwarra, A., Atsuko Hara., and Suzuki, K.T., 2008. Enhancement of Nuclear Localization of Metallothionein by Nitric Oxide. *Journal of Health Science*, 54, 339-342.
- Pearce, L.L, Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R., and Levitan, E.S., 2008. Role of *Metallothionein* in Nitric Oxide Signaling as Revealed by a Green Fluorescent Fusion Protein. *PNAS*, 97: 477-482.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P., Palmiter, R.D., 1994. Induction of a new *metallothionein* isoform (Mt-Iv) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 33: 7250-7259.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 22: 81-114.
- Rumahlatu, D., Corebirna, A.D., Amin, M., dan Rohman, F., 2012. Kadmium dan Efeknya terhadap Ekspresi Protein Metallothionein pada *Deadema setosum* (Echinoidea; Echinodermata). *Jurnal Penelitian Perikanan*, 1(1): 26-35.
- Sevcikova, M., Modra, H., Kruzikova, K., Zitka, O., Hynek, D., Adam, V., Celechovska, O., Kizek, R., Svobodova, Z., 2013. Effect of Metals on Metallothionein Content in Fish from Skalka and Želivka Reservoirs. *Int.Journal of Electrochemical science*, 8, 1650-1663.
- Verma, S.R., Rani, S., Dalela, R.C. 1981: Pesticide induced physiological alterations in certain tissues of fish, *Mystus vittatus*. *Toxicol Lett*. 9: 327-337.

LAMPIRAN

Manuscript Details

| | |
|-------------------|---|
| Manuscript number | ECOHYD_2018_311 |
| Title | The daily changes of metallothionein and oxidative response in gills of the cichlid fish <i>Oreochromis niloticus</i> after exposed to copper |
| Article type | Original article |

Abstract

Copper is an essential element for the aquatic organisms for a number of biological processes, however, at high concentrations it may be toxic to organisms. In the present study, we investigated the effects of waterborne copper (Cu) on the levels of metallothionein (MT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malodialdehyde (MDA) in gills of fish *Oreochromis niloticus*. The Cu concentrations in gills of fish exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L were increased significantly at day 1 (D1), then gradually decreased starting from D2 and reaches the similar value with the controls at D5. A similar tendency has been observed in MT levels in the gills. All Cu-exposed fish showed the highest level of MT on D1, then decreased at D3 and a plateau at D4 and D5. The levels of SOD and CAT of gills in all Cu-exposed fish showed a similar pattern, increased significantly at D1, then gradually decreased starting from D2, and increased again at D4 and D5. The levels of MDA in gills of all Cu-exposed

| | |
|------------------------------------|--|
| Keywords | Cichlid Fish, Cu, Metallothionein, Oxidative Stress, Free Radicals |
| Corresponding Author | Agoes Soegianto |
| Corresponding Author's Institution | Airlangga University |
| Order of Authors | Faridlotul Ma'rifah, Agoes Soegianto, Miftahul Rohmah Saputri, Bambang Irawan, Trisnadi Wi'yaleksono Caatur Putranto |
| Suggested reviewers | M Sevcikova, Mathan Ramesh, Mohsen Abdel-Tawwab |

Submission Files Included in this PDF

| | |
|---|--|
| File Name [File Type] | |
| Cover Letter HH 2018.docx [Cover Letter] | |
| Title and name of authors HH 2018.docx [Title Page (with Author Details)] | |
| MANUSCRIPT Accum CU MT Oxidative 2018 EH Double blinds rev.docx [Manuscript (without Author Details)] | |
| AuthorsStatementEcohyd #1.docx [Author Agreement] | |

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Research Data Related to this Submission

There are no linked research data sets for this submission. The following reason is given:
Data will be made available on request



Agoes Soegianto
Department of Biology
Airlangga University
Kampus C, Jl. Mulyorejo,
Surabaya 60115 Indonesia

October 26, 2018

Dear the Editor-in-Chief

Ecohydrology & Hydrobiology

Dr. Maciej Zalewski

European Regional Centre for Ecohydrology, Polish Academy of Sciences, Łódź, Poland

On behalf of all authors, please find attached our manuscript entitled: "**The daily changes of metallothionein and oxidative response in gills of the cichlid fish *Oreochromis niloticus* after exposed to copper**" that we submit to be considered for publication in "**Ecohydrology & Hydrobiology**".

This paper is our original unpublished work and it has not been submitted to any other journals for reviews.

Looking forward to your comments, and with our
Best Regards,

Prof. Dr. Agoes Soegianto
Department of Biology, Faculty of Sciences and Technology
Airlangga University
Kampus C, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia
Tel. 62-31-5936501, Facs. 62-31-5936502,
e-mail: agoes_soegianto@unair.ac.id; soegiant@indo.net.id

Daily changes of metallothionein and oxidative response in gills of the cichlid fish *Oreochromis niloticus* after exposed to copper

Faridlotul Ma'rifah, Miftahul Rohmah Saputri, Agoes Soegianto, Bambang Irawan, Trisnadi Widyaleksono Catur Putranto*

Department of Biology, Faculty of Sciences and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

***Corresponding author:**

Prof. Dr. Agoes Soegianto

Department of Biology, Faculty of Sciences and Technology, Universitas Airlangga, Kampus C, Jl. Dr. Ir. Soekarno, Surabaya, Indonesia. Tel. 62-31-5936501. Fax. 62-31-5936502

E-mail: agoes_soegianto@unair.ac.id; soegiant@indo.net.id

Orcid: <http://orcid.org/0000-0002-8030-5204>

The daily changes of metallothionein and oxidative response in gills of the cichlid fish *Oreochromis niloticus* after exposed to copper

Abstract

Copper is an essential element for the aquatic organisms for a number of biological processes, however, at high concentrations it may be toxic to organisms. In the present study, we investigated the effects of waterborne copper (Cu) on the levels of metallothionein (MT), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malodialdehyde (MDA) in gills of fish *Oreochromis niloticus*. The Cu concentrations in gills of fish exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L were increased significantly at day 1 (D1), then gradually decreased starting from D2 and reaches the similar value with the controls at D5. A similar tendency has been observed in MT levels in the gills. All Cu-exposed fish showed the highest level of MT on D1, then decreased at D3 and a plateau at D4 and D5. The levels of SOD and CAT of gills in all Cu-exposed fish showed a similar pattern, increased significantly at D1, then gradually decreased starting from D2, and increased again at D4 and D5. The levels of MDA in gills of all Cu-exposed fish showed no significant difference, and had relatively similar values with the controls.

Keywords: cichlid fish, Cu, metallothionein, oxidative stress, free radicals

1. Introduction

Copper is commonly found in aquatic systems as a result of both natural (such as geological deposits, volcanic activity, weathering and erosion of rocks and soils), and anthropogenic sources (such as mining activities, agriculture, metal and electrical manufacturing, and pesticide use) (USEPA, 2007). In most natural waters, copper is usually present at sublethal concentration, however, in polluted waters, it can reach 0.85–7.75 mg/L (Wong, 1993; Saager et al., 1997; Soegianto et al., 1999; Boran and Altinok, 2010), and have in some cases been reported in the 200 mg/L in and near mining areas (Davis and Ashenberg, 1989; Robins et al., 1997; USEPA, 2007).

Copper is an essential element for the aquatic organisms, including fish (Ogino and Yang, 1980; Satoh et al., 1983). It can be utilized by a number of processes such as cellular respiration, iron oxidation, pigment formation, connective-tissue biogenesis, peptide amidation, neurotransmitter biosynthesis, and free-radical defense and cellular metabolism (Solomon and Lowery, 1993; Pena et al., 1999). However, Cu is also a very toxic element when its cellular level is elevated (Harris and Gitlin, 1996; Pena et al., 1999). Body Cu levels, therefore should be subject to tight homeostatic control in order to guard against deficiency and toxicity (Kamunde et al., 2002; Bury et al., 2003). The maintenance of body Cu balance involves the strict regulation of uptake, distribution, metabolism, detoxification and excretion (Kamunde et al., 2002; Wang and Wang, 2016).

Freshwater fish uptake waterborne Cu mainly through the gills, followed by the skin and intestine (Carvalho and Fernandes, 2008). It has been known from toxicological studies that elevated copper concentration in water can lead to increased copper levels in the gills (Grosell and Wood, 2002), and alters the function of the gills by causing severe ion regulation, gas

exchange, and excretion of metabolic waste products (Lauren and McDonald, 1987; Reid and McDonald, 1988; Cerqueira and Fernandes, 2002; Monteiro et al., 2009).

Accumulation of metals in organs does not always cause harmful effects as long as the organisms are able to protect themselves from metal toxicity by increasing excretion, sequestering among organs and by binding metals with metallothionein (MT) intercellularly (Bervoets et al., 2013; Nursanti et al., 2017). Studies suggest that antioxidant may also play an important role in reducing hazardous effects of metals (Elia et al., 2003; Atli and Canli, 2010; Saglam et al., 2014). Antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) are considered vital defenses against reactive oxygen species (ROS) toxicity due to the change in metal levels (Elia et al., 2003; Atli and Canli, 2010; Wang et al., 2013; Saglam et al., 2014; Shofiatur et al., 2017). However, when the production of ROS surpasses the capacity of cells to generate antioxidant, excessive ROS can provoke oxidative stress, which induces lipid peroxidation (LPO). Malondialdehyde (MDA) is one of the final products of LPO and is responsible for cell membrane damage (Rodriguez-Ariza et al., 1999; Valko et al., 2006; Shofiatur et al., 2017).

In the present study, we investigated the levels of MT, SOD, CAT and MDA in gills of fish *Oreochromis niloticus* after exposure to waterborne copper.

2. Materials and methods

2.1. Fish acclimation and determination 96-h LC_{50} of copper

The fish *O. niloticus*, approximately 10.7 ± 0.4 cm length and 15.2 ± 0.6 g weight were obtained from a commercial farm in Pasuruan, East Java Province, Indonesia. The fish were transferred to the laboratory of Department of Biology, Universitas Airlangga, Indonesia, and

kept for two weeks for adaptation in a large fiberglass tank (250 L) supplied with a continuous flow of dechlorinate freshwater (FW) through gravel, sand and sponge filter. Illumination was maintained at 12 h light, 12 h dark cycle using fluorescent tubes as a light sources. During the acclimation fish were fed twice a day to satiation with Takari commercial pellets (30% protein, 3% fat and 4% fiber). Before used as experimental animals, fish were starved 48 h. A static bioassay was performed to determine the median lethal concentration (96h LC_{50}) of Cu to *O. niloticus*. Fish were exposed to nominal copper concentrations: 0 (control), 2.5, 5, 10, 20, 40 and 80 mg/L in 63 L plastic tanks (each tank contains 50 L of testing media). A stock solution of Cu (1000 mg/L) was prepared by dissolving 3.845 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Merck, Germany) in 1000 mL deionized water. Each tank contained 10 fish in duplicate. During the toxicity test, media were aerated continuously, but was not renewed. The fish were not fed during the toxicity test. Regular observations were made, and fish mortality was recorded daily. The 96 h LC_{50} and 95% confidence intervals were calculated using the trimmed Spearman-Kärber method (Putranto et al., 2014). The 96 h LC_{50} and 95% confidence intervals of Cu to *O. niloticus* were 26.02 (20.89-32.41) mg/L. The Cu concentrations used in this study were 1, 5 and 10 mg/L. According to the ecotoxicological point of view, these concentrations can potentially be found by fish in their natural environment (USEPA 2007).

2.2. Effects of Cu on levels of MT, SOD, CAT and MDA

After acclimation, the fish (180 individuals) were randomly selected from the holding tank and distributed among 36 tanks. Each tank contains 50 L of selected testing media: 1, 5 and 10 mg Cu/L, and the control (without Cu). There were five fish per tank in duplicate. The experiment was conducted in a static system with 80% test solutions being renewed every 48 h.

The experiment lasted for five days. Five fish were randomly collected from each treatment (with Cu) every day (D1, D2, D3, D4, and D5), and five individuals in the control group (D0). Before sacrificed, fish were anesthetized with 200 mg/L clove solution (Soegianto et al., 2017), then the gills were sampled for MT, SOD, CAT and MDA measurement.

2.3. *Water quality*

The temperature was measured using mercury in glass thermometer (°C), pH using a pH meter (Hanna Model HI 981502, China), and the dissolved oxygen (DO) using DO meter (Lutron DO 5510, Taiwan). The values of temperature, pH, and dissolved oxygen during the experiment were 27-29 °C, 7.65 – 8.10 and 7.0 – 7.5 mg L⁻¹, respectively.

2.4. *Determination of Cu*

After the fish were sacrificed, the gills were dissected and stored at -20°C until a Cu determination as described by Ruaeny et al. (2015). Prior to the analysis, the gills were thawed at room temperature and then kept in the oven at 65° C for 48 h to a constant weight. The dried sample was then ground into a fine powder using agate mortar and pestle. Approximately 2 g of the homogenized tissue sample was thoroughly homogenized and digested using 5 ml concentrated HNO₃ at 100° C for 3 h in the microwave digester (Mars 6). After cooling, the sample was diluted to 50 ml with deionized water. An aliquot was taken for Cu detection using an atomic absorption spectrometer (Analitik Jena, ZEE nit 700). Cu concentrations were expressed as mg/kg dry weight (dw). Analytical blanks were run in the same way as the samples, and concentrations were determined using standard solutions prepared in the same acid matrix. The accuracy of the Cd determination was verified using dogfish muscle reference material

(DORM-2) provided by the National Research Council of Canada (Ottawa, Canada), with Cu recovery of 109% and detection limit of 0.002 mg/kg dw.

2.5. Determination of MT, SOD, CAT and MDA

The sandwich-ELISA was used to measure MT, SOD, CAT, and MDA. The measurement protocol followed the instructions from Bioassay Technology Laboratory. All micro-titer plates provided in the kits were pre-coated with an antibody specific to MT, SOD, CAT, and MDA respectively.

On the last day of the experiment, the fish were sacrificed, the gills were carefully excised, weighed, and minced into small pieces, rinsed thoroughly in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 0.01M, pH=7.4) to remove excess blood and stored at -20°C until analysis (≤ 5 days). Tissue pieces were weighed and homogenized in PBS with a motorized mini handheld homogenizer on ice. The homogenates were then centrifuged at 3000 RPM for 20 minutes to obtain the supernatant.

To measure the levels of MT, SOD, CAT, and MDA, all samples experienced the following treatments: 50 μ l of standard, and 40 μ l sample was added to each well, then immediately 10 μ l of a biotin-conjugated anti-Fish (MT, SOD, CAT and MDA respectively) antibody was added to each well, then 50 μ l of streptavidin horseradish was added to sample and standard well and mixed well. The plate was then covered with a sealer provided by kit manufacture and incubated for 60 minutes at 37°C.

After conducting the above procedure, the plates were aspirated, washed 5 times with wash buffer, and then soaked with wash buffer (approximately 350 μ l/well) for one minute. Any remaining wash buffer was removed by aspirating or decanting. Further, 50 μ L of substrate

solution A and 50 μL of substrate solution B were added to each well. Then the wells were covered with new sealers and incubated for 10 minutes at 37°C in the dark. To terminate the enzyme reaction, 50 μL of stop solution was added to each well, the blue color will change into yellow immediately. The optical density of each well was determined using an automatic microplate reader (Bio-Rad, model iMark, Japan) at 450 nm within 10 minutes after adding the stop solution. The concentrations of MT, SOD, CAT and MDA were determined using the appropriate standard curves and data were expressed as ng/ml for MT and SOD, mU/ml for CAT, and nmol/ml for MDA.

2.6. Statistical Analysis

Prior to statistical analysis, all data were tested for normality of distribution using the Kolmogorov-Smirnov test. Then the data were subject to one-way ANOVA to evaluate effects of waterborne Cu exposure on level of Cu, MT, SOD, CAT and MDA in gills respectively. When significant differences were detected ($p < 0.05$), Duncan test was used to determine which treatment is resulting in significant effects at a significance level of 0.05.

3. Results

The levels of Cu in gills of fish after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L is presented in Figure 1. Compared to control group, the Cu concentrations in gills of all Cu-exposed fish were increased significantly at D1, then gradually decreased starting from D2 to D4, and its concentration reaches the similar value with the control at D5. At D2, the Cu level in gills of fish exposed to 1 mg Cu/L was higher than those in fish exposed to 5 and 10 mg Cu/L.

The levels of MT in gills of all Cu-exposed fish gradually increased starting from D1 to D2, then decreased at D3 and reached an apparent plateau at D4 and D5. The Cu levels of gills of

fish exposed to 10 mg Cu/L on D4 and D5 were higher than those exposed to 1 and 5 mg Cu/L. At D5, only fish exposed to 1 mg Cu/L showed no significantly different with the control group (Figure 2).

The levels of SOD of fish exposed to all Cu concentrations increased significantly at D1 compared to the control, then gradually decreased from D2 to D3, increased again at D4 and D5 (Figure 3). The levels of SOD of all treatments on D5 were higher than those of the controls.

Compared to the control, the levels of CAT of gills increased significantly at D1 in fish exposed to all Cu concentrations. Then the values gradually decreased from D2 to D3, and increased again at D4 and D5. The levels of CAT of all Cu-exposed fish on D5 were higher than the control group (Figure 4).

The levels of MDA in gills of fish exposed to all Cu concentrations showed no significant difference (Figure 5). Their levels were relatively similar to the control.

4. Discussion

The concentrations of Cu in gills of fish exposed to three Cu concentrations increased significantly on the first day (D1), then gradually decreased, and reached the same value with the control on D5. The highest value of Cu in gills on the first day (D1) after exposure to all Cu concentrations could be the initial shock phase of animal in response the waterborne Cu. This phase usually corresponds to a period of physical damage, primarily occurs in the gills, and results the disturbances of internal physiological homeostasis. This damage phase is usually short-timed (McDonald and Wood 1993). In our study, depending on the level of waterborne Cu, the recovery phase starts on D2, and takes place between two and four days. however at D5 the Cu level in gills of all Cu-exposed fish reached the control value. A similar pattern was observed

in the gills of juvenile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Cu uptake increased during the first 1-2h of radiolabelled copper incubation, after 2h, branchial ^{64}Cu level decreased considerably (Grosell and Wood, 2002). Recovery usually begins in conjunction with the increase in biosynthetic process (such as elevated protein synthesis, mitosis) which support to improve the tissue damage and to correct the physiological disruptions (McDonald and Wood 1993; Mc Geer et al., 2000). Inherent within the recovery phase is the massive production of metal binding protein such as MT (Bradley et al., 1985; Hogstrand and Wood, 1996) to impede the harmful effect of metal (McGerr et al., 2000). Hogstrand and Haux (1991) prompted that if metal ions enter the cell, the synthesis of MT will increase, and homeostasis will be restored by aggregation of metal into MT. MT has been proposed to reduce Cu toxicity in fish by sequestering Cu away from metabolically important enzyme systems (Lauren and McDonald 1987). The present study showed that the induction of MT in gills was proportional with the accumulated Cu, however, its increase was one day slower than the increase of Cu in the gills. Starting from D3, the level of MT gradually declined, and showed the plateau at D4 and D5, however, at D5 its level was still higher than the control. The higher level of MT in gills of D5 than the control, suggesting that it is in a temporary state of MT imbalance, and might indicate that MT regulation is not yet down-regulated. The present study revealed that Cu did not induce serious gill damage for at least five days of Cu exposure. Apparently MTs are involved in regulating the Cu as an essential metal, and the MT binding capacity to Cu has not been exceeded (Brown and Parsons, 1978; Coyle et al. 2002). MT can also act as non-toxic metal reserves for metalloenzyme synthesis, protect against ionizing radiation and play an important role as an antioxidant (Di Giulio and Meyer. 2008; Simonato et al., 2016).

Accumulation of metal leads to enhanced ROS level leading the damage of cellular constituent (Lushchak 2011; Shofiatun et al. 2017). In organism, ROS are continuously produced and eliminated to maintain a balance of ROS concentration. ROS are generally under tight control of antioxidant defense system (Valko et al. 2006). The levels of SOD and CAT as the vital first-line defenses against ROS toxicity in gills of fish exposed to all Cu concentrations increased significantly on D1, then gradually decreased on D2 and/or D3, and increased again on D4 and D5. The levels of SOD and CAT on D5 were still higher than the control. Our results suggest that Cu exposure might increase significantly free radicals in the first few days and lead to the production of ROS causing oxidative stress in fish. It is likely that the enhancement of SOD and CAT was an adaptive response of the animal to Cu toxicity and served to neutralize the impact of increased ROS generation (Valko et al. 2006; Lushchak 2011; Shofiatun et al. 2017; Abdel-Tawwab and Hamed 2018). Carvalho et al. (2015) revealed that SOD and CAT had the prominent roles in the scavenging of free radicals to protect the organisms from oxidative stress. SOD is an early produced antioxidant to protect cells against superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) by decomposing this superoxide radicals to hydrogen peroxide (H_2O_2) and O_2 (Liu et al. 2014; Carvalho et al., 2015). CAT decomposed H_2O_2 to non-toxic H_2O and O_2 (Romeo et al. 2000; Wang et al., 2013; Carvalho et al., 2015). While, the decrease of SOD and CAT on D3 may be attributed to the inactivation of these enzymes and the inhibition of de novo enzyme protein synthesis after continuous and high production of these enzymes in the first few days in response the Cu stress (Verma and Dubey 2003), or some other antioxidants such as glutathione peroxidase, glutathione, and glutathione-related enzymes may be active to scavenge ROS (Fatima and Ahmad 2005; Valko et al. 2006; Wang et al., 2008; Liu et al. 2014). Furthermore,

since the levels of Cu in gills on D5 were not significantly different with D0 (the control), higher levels of SOD and CAT on D5 suggested that these enzymes were not yet down-regulated.

When production of ROS in cell exceeds the antioxidant generation, excessive ROS can destroy biomolecules through free radical attaches to polyunsaturated fatty acid side chains in cell membranes and leads to LPO (Rodriquez-Ariza et al., 1999). LPO is a highly destructive process that increases the rigidity and decrease the fluidity of cellular membranes (Wey and Yang 2015). It has been reported that the levels of MDA increased as a result of oxidation of lipoprotein and lipids in cell membranes during oxidative stress (Moghaddam et al. 2015; Abdel-Tawwab and Hamed 2018). The current results showed that the level of MDA in gills of all Cu-exposed fish were not significantly different with the control. Regarding to the present MDA values, we suggest that although Cu exposure resulted in the generation of ROS and antioxidant defense systems (SOD and CAT), however, these defenses combined with the increase in the MT response were able to completely scavenge the increased ROS, which prevent to LPO.

5. Conclusion

The present study revealed that the levels of Cu in gills of all Cu-exposed tilapia (1, 5 and 10 mg Cu/L.) increased significantly during the first few days, then gradually decreased, and reached the same value with the control at D4-D5. The levels of MT, SOD, and CAT in gills of Cu-exposed fish were proportional with the accumulated Cu. The enhancements of MT, SOD and CAT during the first few days might be the adaptive response of the animal to Cu toxicity. MT binds the elevated Cu, while SOD and CAT scavenge the increased free radicals due to the increasing level of Cu. The current results showed that the level of MDA in gills of all Cu-exposed fish were not significantly different with the control, suggesting the antioxidant defense

systems (SOD and CAT) combined with the induction of MT were able to completely scavenge the increased ROS, which prevent to LPO.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement

Authors state that the research was conducted according to ethical standards.

Acknowledgement

Funding

References

- Abdel-Tawwab, M., Hamed. H.S., 2018. Effect of bisphenol A toxicity on growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). J. Appl. Ichthyol. <http://dx.doi.org/10.1111/jai.13763>.
- Atli, G., Canli, M., 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1884-1889. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.09.005>
- Bervoets, L., Knapen, D., De Jonge, M., Campenhout, K.V., Blust, R., 2013. Differential hepatic metal and metallothionein levels in three feral fish species along a metal pollution gradient. Ploes One 8 (3), e60805. doi:10.1371/journal.pone.0060805.

- Boran, M., Altinok, I., 2010. A review of heavy metals in water, sediment and living organisms in the Black Sea. *Turk. J. Fish. Aquat. Sc.* 10, 565-572.
<https://doi.org/10.4194/trjfas.2010.0418>
- Bradley, R.W., DuQuesnay, C., Sprague, J.B., 1985. Acclimation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to zinc: kinetics and mechanisms of enhanced tolerance induction. *J. Fish Biol.* 27, 367-379.
- Brown, D. A., Parsons, T.R., 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish. Res. Board Can.* 35, 880-884.
- Bury, N.R., Walker, P.A., Giover, C.N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 206, 11-23.
- Carvalho, C.S., Fernandes, M.N., 2008. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 151A, 437-442.
- Carvalho, C.S., Bernusso, V.A., Fernandes, M.N., 2015. Copper levels and changes in pH induce oxidative stress in the tissue of curimbata (*Prochilodus lineatus*). *Aquat. Toxicol.* 167, 220-227.
- Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 83-89.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., Rofe, A. M., 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 627-647.
- Davis, A., Ashenberg, D., 1989. The aqueous geochemistry of the Berkeley Pit, Butte, Montana, U.S.A. *Appl. Geochem.* 4, 23-36.
- Elia et al. 2003; Elia, A.C., Galarini, R., Taticchi, M.I., Dörr, A.J.M., and Mantilacci, L. 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55: 162-167. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00123-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00123-9).
- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci. Total Environ.* 346, 256-273.

- Di Giulio, R.T., Meyer, J.N., 2008. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T., Hilton, D.E. (Eds.), *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 273–326.
- Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205, 1179–1188.
- Harris, Z.I., Gitlin, J.D., 1996. Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 836S–841S.
- Hogstrand, C., Haux, C., 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with references to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C, 137–141.
- Hogstrand, C., Wood, C.M., 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. In: Taylor, E.W. (Ed.), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 61–84.
- Kamunde, C., Clayton, C., Wood, C.M., 2002. Waterborne vs. dietary copper uptake in rainbow trout and the effects of previous waterborne copper exposure. *Am. J. Physiol.-Reg. I.* 283, R69–R78.
- Lauren, D. J., McDonald, D.G., 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri*: biochemistry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 44, 105–111.
- 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.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- McGeer, J.C., Szededinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquat. Toxicol.* 50, 247–258.
- McDonald, D.G., Wood, C.M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp. 297–321.
- Moghaddam, H.S., Samarghandian, S., Farkhondeh, T., 2015. Effect of bisphenol A on blood glucose, lipid profile and oxidative stress indices in adult male mice. *Toxicol. Mech. Meth.* 25, 507–513. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1056395>

- Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2010. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology* 19, 105–123.
- Nursanti, L., Nofitasari, E., Hayati, A., Hariyanto, S., Irawan, B., Soegianto, A., 2017. Effects of cadmium on metallothionein and histology in gills of tilapia (*Oreochromis niloticus*) at different salinities. *Toxicol. Environ. Chem.* 99, 926–937.
<https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1315120>.
- Ogino, C., Yang, G.Y., 1980. Requirements of carp and rainbow trout for dietary manganese and copper. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 46, 455–458.
- Pena, M.M.O., Lee, J., Thiele, D., 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129, 1251–1260.
- Putranto, T.W.C., Andriani, R., Munawwaroh, 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. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 47, 349–360. <https://doi.org/10.1080/10236244.2014.940703>.
- Reid, S.D., McDonald, D.G., 1988. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 244–253.
- Robins, R.G., Berg, R.B., Dysinger, D.K., Duhaime, T.E., Metesh, J.J., Diebold, F.E., Twidwell, L.G., Mitman, G.G., Chatham, W.H., Huang, H.H., Young, C.A., 1997. Chemical, physical and biological interactions at the Berkeley Pit, Butte, Montana. *Tailings and Mine Waste* 97. Bakeman, Rotterdam.
- Rodriguez-Ariza, A., Alhama, 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. *Mutat. Res.* 438, 97–107.
- 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*. *Aquat. Toxicol.* 48, 185–194.
- Ruaeny, T.A., Hariyanto, S., Soegianto, A., 2015. Contamination of copper, zinc, cadmium and lead in fish species captured from Bali Strait, Indonesia, and potential risks to human health. *Cah. Biol. Mar.* 56, 89–95.

- Saager, P.M., De Baar, H.J.W., De Jong, J.T.M., Nolting, R.F., Schijf, J., 1997. Hydrography and local sources of dissolved trace metals Mn, Ni, Cu, and Cd in the northeast Atlantic Ocean. *Mar. Chem.* 57, 195–216.
- Saglam, D., Atli G Dogan, Z., Baysoy, E., Gurler, C., Eroglu, A., Canli, M., 2014. Response of the antioxidant system of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to metals (Cd, Cu) in differing hardness. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 14, 43-52.
https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_06
- Satoh, S., Yamamoto, H., Takeuchi, T., 1983. Effects on growth and mineral composition of carp of deletion of trace elements or magnesium from fish meal diet. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.* 49, 431–435.
- Shofiatur, S., Handayani, K.S., Suryani, H., Irawan, B., Soegianto, A., 2017. Oxidative stress responses in gills of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 following exposure to cadmium at different salinities. *Cah. Biol. Mar.* 58, 461-466.
<https://doi.org/10.21411/CBM.A.C64CCDC>
- Simonato et al., 2016
- Simonato, J.D., Mela, M., Doria, H.B., Guiloski, I.C., Randi, M.A.F., Carvalho, P.S.M., Meletti, P.C., Silva de Assis, H.C., Bianchini, A., Martinez, C.B.R., 2016. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 170, 31–41
- Soegianto, A., Charmantier-Daures, M., Trilles, J-P., Charmantier, G., 1999. Impact of copper on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus*. *J. Crust. Biol.* 19, 209–223.
- Soegianto, A., Adhim, M.A., Zainuddin, A., Putranto, T.W.C., Irawan, B., 2017. Effect of different salinity on serum osmolality, ion levels and hematological parameters of East Java strain tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mar. Freshwat. Behav. Physiol.* 50, 105–113.
<https://doi.org/10.1080/10236244.2017.1333391>
- Solomon, E. I., Lowery, M. D., 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *Science* 259, 1575–1581.
- USEPA. 2007. Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria – Copper. EPA-822-R-07-001.2007 revision. Washington, DC: US Environmental Protection Agency.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem.-Biol. Interact.* 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 Sci.* 164, 645-655.
- Wang, X., Wang, W-X., 2016. Homeostatic regulation of copper in a marine fish simulated by a physiologically based pharmacokinetic model. *Environ. Pollut.* 218, 1245-1254.
- 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), e64920.
- 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.
- Wei, K., Yang, J., 2015. Oxidative damage induced by copper and beta-cypermethrin in gill of the freshwater crayfish *Procambarus clarkia*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 446-453.
- Wong, C.K., 1993. Effects of cadmium, copper, nickel, and zinc on longevity and reproduction of the cladoceran *Moina macrocopa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50, 633-639.

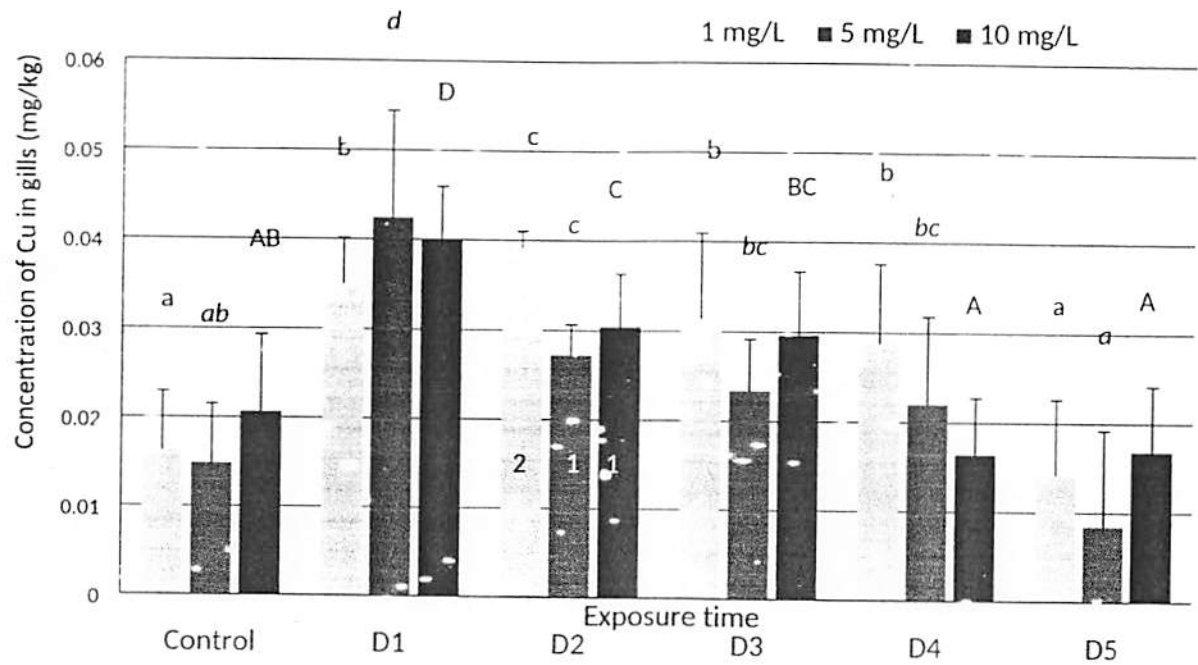


Figure 1. Concentration of Cu (mg/kg) in gills of *O. niloticus* after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L. Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.

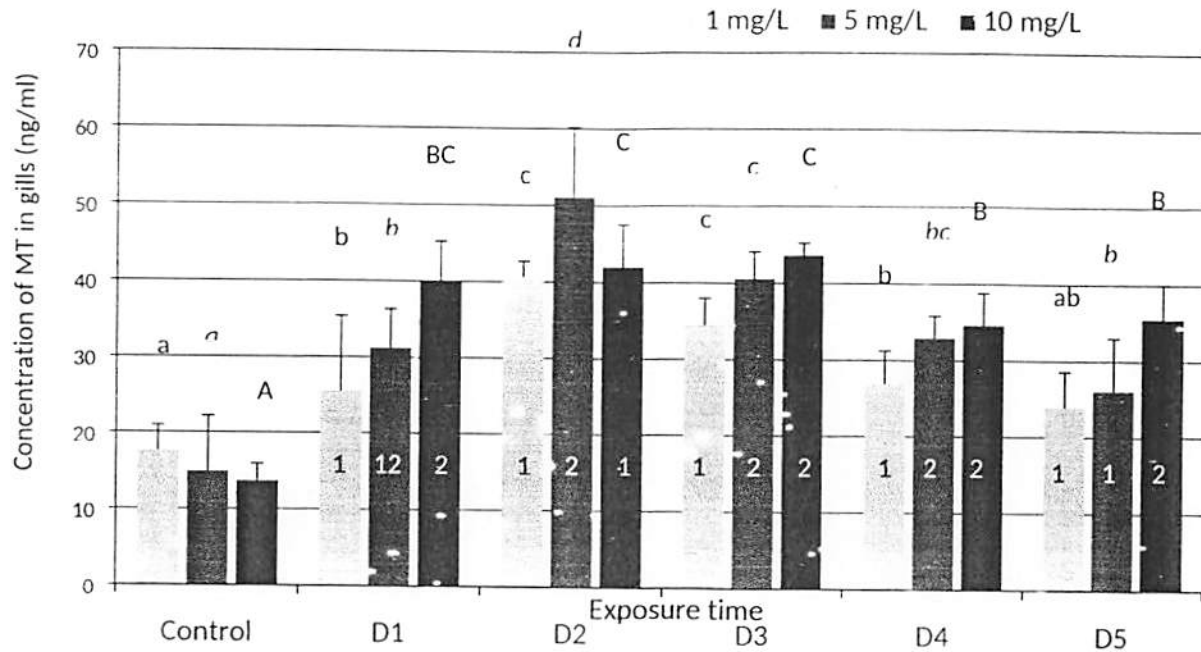


Figure 2. Concentration of MT (ng/ml) in gills of *O. niloticus* after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L. Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.

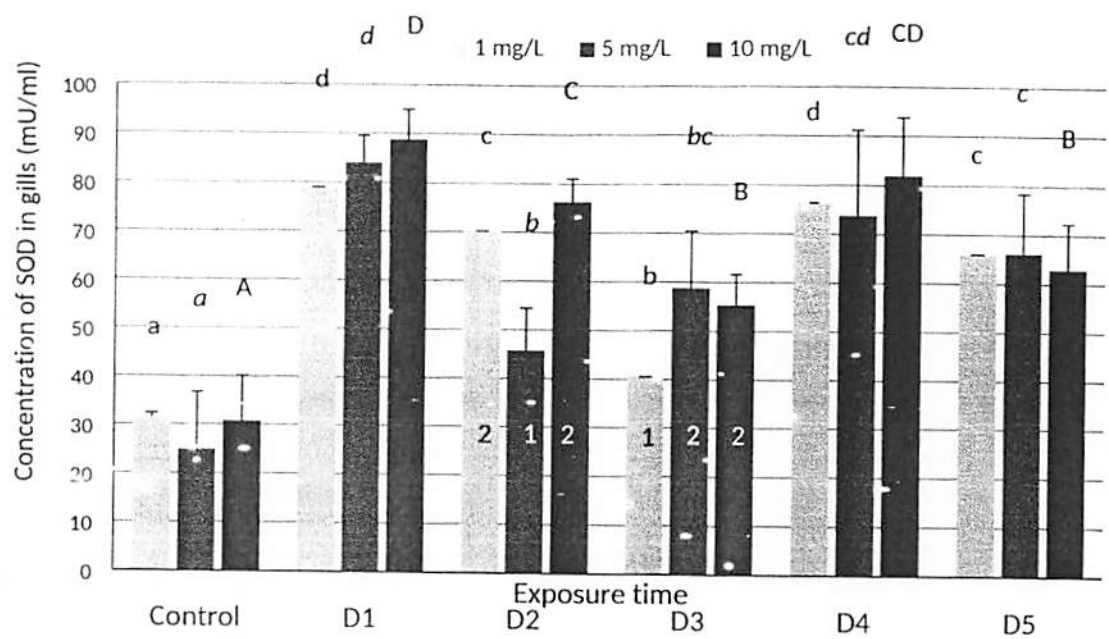


Figure 3. Concentration of SOD (mU/ml) in gills of *O. niloticus* after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L. Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c < d$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.

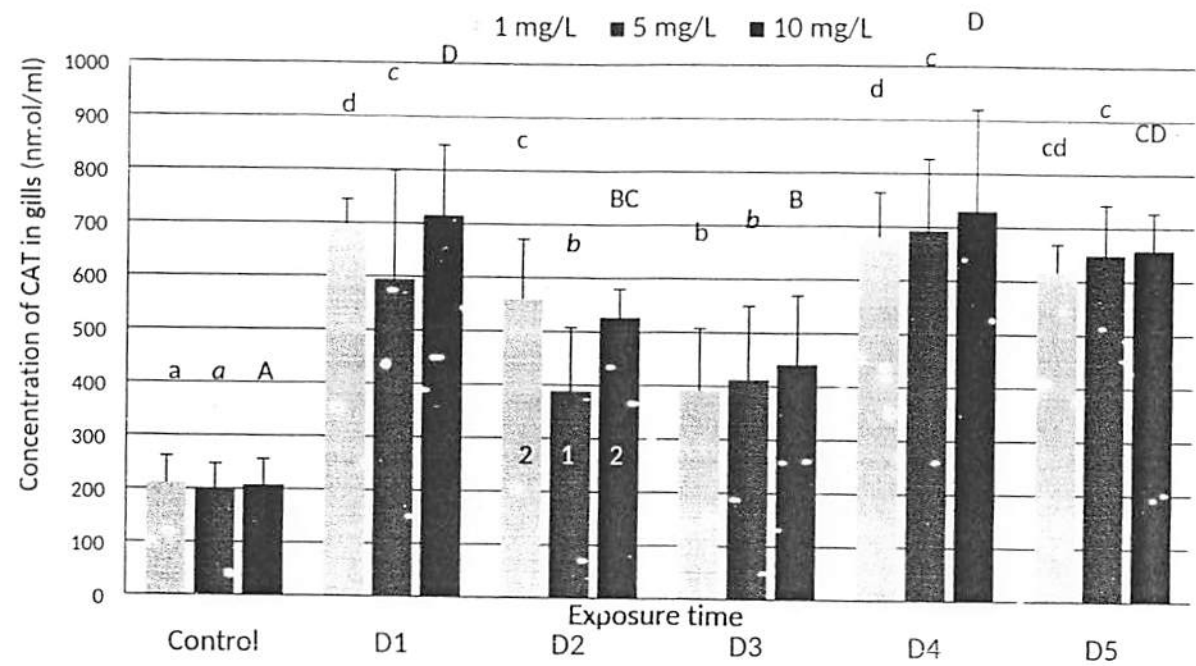


Figure 4. Concentration of CAT (nmol/ml) in gills of *O. niloticus* after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L. Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b < c$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B < C < D$). The number inside bars denotes a significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p < 0.05$, $1 < 2$). The data presented are the means of five determinations.

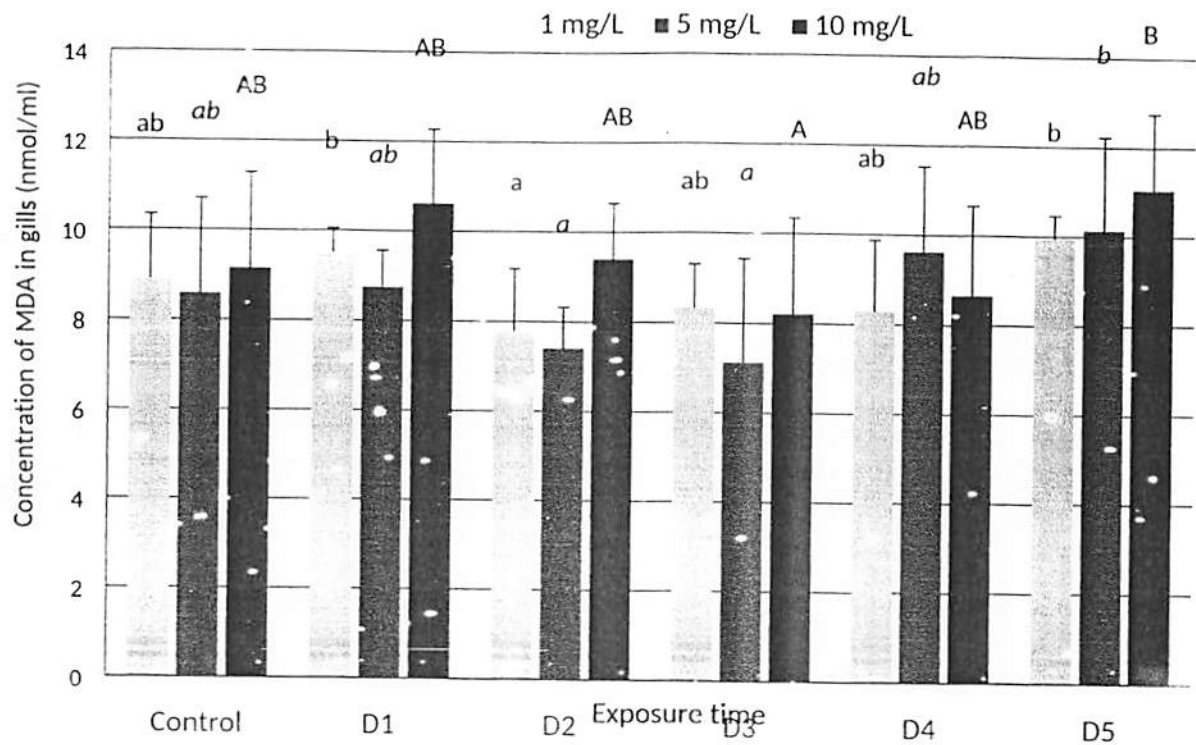


Figure 5. Concentration of MDA (nmol/ml) in gills of *O. niloticus* after exposed to 1, 5 and 10 mg Cu/L. Lowercase letters (regular) indicate significant differences under Cu exposure to 1 mg/L ($p < 0.05$, $a < b$). Lowercase letters (*italic*) indicate significant differences under Cu exposure to 5 mg/L ($p < 0.05$, $a < b$). Capital letters indicate significant under Cu exposure to 10 mg/L ($p < 0.05$, $A < B$). No significant difference between different Cu concentrations under the same day ($p > 0.05$). The data presented are the means of five determinations.

Conflict of interest:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical statement:

Authors state that the research was conducted according to ethical standards.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Mr. Setiyanto for technical assistance during experiment.

Funding Body:

This study was supported by Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (Directorate of Research and Community Service), Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Indonesia (Indonesian Ministry of Research, Technology and Higher Education) through the Decree Letter No. 01/E/KPT/2018 and Contract No. 200/UN3.14/LT/2018.

Surabaya, 26 October 2018

Corresponding author,
(On behalf of all authors)

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by a smaller, more complex mark that resembles a cross or a star.

Agoes Soegianto

