

PERFORMA GINJAL CRANIAL IKAN MAS (*Cyprinus carpio*. L) PADA MEDIA PEMELIHARAAN YANG BERBEDA

(*Cranial Kidney Performance of Carp (*Cyprinus carpio*. L)
on Different Media Culture*)

Ruku R Borut

*Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Jl. Mr.Chr. Soplanit, Poka-Ambon
rukubdp76@gmail.com/rukufish@yahoo.co.id*

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi histopatologi ginjal ikan mas berdasarkan pemeliharaan 72 jam paparan LAS. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan eksplorasi laboratorium berdasarkan kajian molekuler. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan perlakuan LAS yaitu; 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 mg/L dan kontrol. Peubah yang diamati adalah ekspresi *inducible nitric oxide shynthase* (iNOS) pada jaringan ginjal *cranial* ikan mas, dengan waktu pengamatan mengacu pada prosedur penelitian toksisitas yaitu 72 jam paparan LAS. Pendeteksian iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas dilakukan dengan metode imunohistokimia. Hasil Uji-t menunjukkan bahwa ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas pada masing-masing perlakuan paparan LAS nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dari kontrol. Rerata nilai ekspresi iNOS pada kontrol adalah 5,00 %sel, perlakuan A 17,5 %sel, perlakuan B 21,25 %sel, perlakuan C 21,25 %sel, perlakuan D 19,00 %sel, dan perlakuan E 20,5 %sel.

Kata Kunci: iNOS, ginjal *cranial* Ikan Mas, LAS

ABSTRACT: The purpose of this research was to determine histopathology conditions of *Cyprinus carpio*. L based on 72 hours cultured time LAS exposure. The method used is experiment by laboratory exploration accordance to molecular studies. Experimental design used was completely randomized design (CRD) with LAS treatment are 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, and 0.05 mg/L and control. The parameters observed were the expression of inducible nitric oxide shynthase (iNOS) in cranial kidney tissue of *Cyprinus carpio*. L, the time of observation refers to the toxicity research procedure is 72 hours LAS exposure. Detection of iNOS in cranial kidney tissue of *Cyprinus carpio*. L was carried out by immunohistochemical methods. T-test results showed that iNOS expression at each treatment LAS exposure was significantly higher ($P < 0.05$) than controls. The mean value of iNOS expression in control cells was 5.00%, a 17.5% cell treatment, treatment B 21.25% of the cells, the cells treated C 21.25%, 19.00% D treatment of cells, and treatment E 20, 5% of the cells.

Keywords: iNOS, *cranial* kidney of Carp, LAS

PENDAHULUAN

Ikan mas (*Cyprinus carpio*. L) merupakan organisme akuatik yang selalu dihadapkan pada adanya stressor (penyebab stress) baik di perairan alami maupun dalam kondisi budidaya. Stressor lingkungan terutama meliputi kondisi kimia perairan yang kurang baik, seperti adanya bahan pencemar yang merupakan stressor lingkungan (Iwama dkk., 2003). Salah satu bahan pencemar yang saat ini banyak ditemukan di perairan umum adalah LAS (*linear alkylbenzene sulfonat*) yang merupakan bahan aktif dalam produk detergen (Anonymous, 2004).

Ginjal merupakan tempat utama dari polutan lingkungan penyebab toksisitas, dengan konsekuensi fungsi ginjal yang terganggu akan berpotensi mengancam kehidupan. Dengan demikian penting untuk memahami mekanisme seluler yang mendasari fungsi ginjal normal dan menentukan polutan nephrotoksik yang mempengaruhinya. Kontribusi penting pada pengetahuan tentang fungsi ginjal dan nephrotoksitas polutan telah dilakukan oleh para peneliti menggunakan pendekatan komparatif dengan hewan-hewan akuatik (Miller, 1997).

LAS merupakan salah satu racun yang masuk ke dalam lingkungan perairan yang dapat menyebabkan efek sub lethal bagi organisme perairan. Sebagai benda asing yang mempengaruhi kehidupan ikan, LAS bertindak sebagai stressor yang dapat memicu timbulnya suatu respon stress seluler. Bahan tercemar tersebut yang masuk ke badan air ada yang dalam konsentrasi rendah dapat langsung menyebabkan kematian pada organisme. Tetapi pada konsentrasi yang lebih rendah lagi dapat menyebabkan terganggunya fungsi/faal organisme tersebut. Akibat yang disebabkan oleh racun yang tidak menyebabkan kematian secara langsung disebut efek sub lethal (Mason, 1980 dalam Cahaya, 2003). Pada ikan air tawar kontrol tekanan dan aliran darah merupakan penentu utama pengeluaran urine, karena ginjal merupakan saringan yang sempurna, sering digunakan untuk mendeteksi toksin dan bakteri. Kultur bakteri ginjal pada ikan yang akan dimatikan telah menjadi suatu prosedur standar (Ishizu dan Cover, 2002)

Dengan pertimbangan ini maka masalah yang akan dirumuskan dalam penelitian ini adalah apakah LAS (*linear alkylbenzene sulfonat*) dapat memicu perubahan-perubahan sel atau jaringan yang terjadi akibat pengaruh perubahan lingkungan perairan ikan mas (*Cyprinus carpio* L). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi histopatologi ginjal ikan mas pada pemeliharaan yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Pengambilan Ikan dan Aklimatisasi

Ikan diambil dari BBI (Balai Benih Ikan) Puntren sejumlah 60 ekor, dengan ukuran panjang (total length) 14.5 – 16.7 cm. Proses aklimatisasi dilakukan dalam 6 unit akuarium ukuran 75x35x35 cm³ selama 7 hari. Jumlah ikan tiap akuarium sejumlah 10 ekor. Pergantian air sejumlah 20%. Pakan komersial diberikan secara adlibitum, setelah 24 jam dari waktu pemasukan ikan. Pemberian pakan dilakukan dua kali setiap hari, yaitu pada jam 09.00 dan 15.00. Kotoran pakan di dasar akuarium dibersihkan dengan serok yang terbuat dari kain saring bermata halus, pada pagi hari sebelum pemberian pakan dan 30 menit setelah pemberian pakan. Pengukuran kualitas air (suhu, DO, pH dan amonia) dilakukan dua kali setiap hari, sebelum proses pemberian pakan.

Perlakuan LAS

Ikan yang telah diaklimatisasi ditampung dalam dua akuarium lain yang berukuran 80x40x40 cm³. Akuarium yang digunakan sebagai unit percobaan (ukuran 75x35x35 cm³ sejumlah enam unit) dibersihkan dan diisi air sebanyak 50 liter, selanjutnya diberi label perlakuan dan kontrol (tanpa LAS) yang dilakukan secara acak. Perlakuan yang diberikan adalah konsentrasi LAS sejumlah 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 dan 0,05 mg/L. LAS ditimbang menggunakan timbangan analitik, kemudian dimasukkan ke dalam air, diaduk dan dibiarkan selama satu jam agar tercampur secara homogen. Sebelum ditempatkan dalam unit-unit percobaan, ikan diukur panjang dan beratnya. Berat ikan diukur dengan timbangan analitik. Selanjutnya ikan diambil secara acak

dan ditempatkan dalam unit-unit percobaan, sebanyak 10 ikan per unit. Selama perlakuan tidak dilakukan pergantian air. Prosedur pemberian pakan, pembersihan kotoran dan pengukuran kualitas air sama dengan pada saat aklimatisasi. Pengambilan sampel ikan dilakukan setelah 72 jam, sejumlah dua ekor per unit perlakuan.

Isolasi Ginjal

Ikan mas yang telah menjalani perlakuan ditusuk bagian atas kepala sampai tembus ke medulla oblongata hingga mati. Kemudian ikan yang telah mati direntangkan pada *block paraffin* untuk dilakukan pembedahan (*section*) dengan membuka dinding perut, dimulai dari arah anal sampai ke batas operkulum. Ginjal *cranial* diisolasi dan ditempatkan dalam botol sampel yang telah diisi dengan larutan formalin 10%, selanjutnya dilakukan fiksasi dan preparasi jaringan dengan metode *frozen section* di Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Syaiful Anwar Malang.

Fiksasi dan Preparasi Jaringan

Jaringan ginjal *cranial* direndam dalam paraformaldehida (PFA) 4% dalam PBS pada suhu 4°C selama 1-7 hari. Dehidrasi dengan ethanol bertingkat (ethanol 70% selama 24 jam; 80% selama 2 jam; 90% selama 20 menit; 95% selama 20 menit dan ethanol absolut tiga kali masing-masing selama 20 menit) pada suhu ruang. Rendam jaringan dalam Xylol pada suhu ruang dua kali masing-masing selama 30 menit. Kemudian rendam dalam Xylol pada suhu 60–63°C tiga kali masing-masing selama 30 menit. Rendam dalam parafin tiga kali masing-masing selama 30 menit pada suhu 56–58°C. Selanjutnya dilakukan embedding yaitu jaringan dimasukkan dan ditata posisinya (bagian organ yang akan diiris menghadap ke bawah) dalam parafin hangat dalam blok hingga mendingin, setelah itu *block paraffin* disimpan pada suhu 4°C.

Proses berikutnya jaringan ginjal *cranial* dalam *block paraffin* diiris dengan ketebalan 4µm, dengan metode *frozen section* menggunakan *freezing microtome* pada suhu -20°C. Irisan jaringan dipindahkan ke air hangat (suhu 38-40°C), kemudian diambil

dengan gelas objek dan dikeringkan di atas *hot plate* (suhu 38 – 40°C). Selanjutnya preparat disimpan di suhu 38 – 40°C selama 24 jam.

Analisis Data

Gambaran histopatologi jaringan ginjal (*cranial*) ikan mas akan dianalisis secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar, untuk menjelaskan apakah sintesis iNOS pada ikan mas dapat dipicu oleh linear alkylbenzene sulfonat (LAS). Hasil ini akan menjadi dasar dalam penggunaan iNOS sebagai biomarker keberadaan LAS di lingkungan perairan budidaya maupun alami.

HASIL DAN PEMBAHASAN

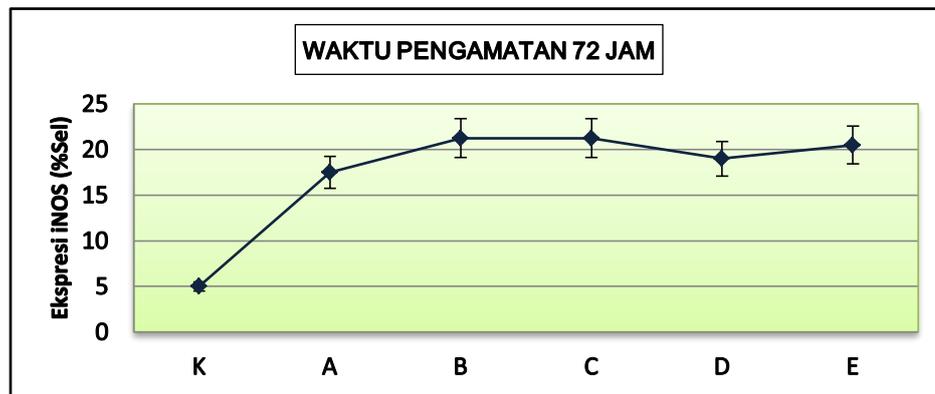
Kondisi Histopatologi Ginjal *cranial* Ikan Mas

Data Perubahan histopatologi ginjal *cranial* ikan mas yang mengekspresikan iNOS dapat dikelompokkan dalam kontrol dan perlakuan LAS pada waktu pengamatan (Tabel 1). Ginjal *cranial* ikan mas yang mendapatkan paparan LAS terjadi peningkatan perubahan struktur sel ekspresi iNOS pada semua waktu pengamatan. Jumlah sel yang mengekspresikan iNOS pada kontrol atau normal 5,00 %sel, perlakuan A 17,5 %sel, perlakuan B 21,25 %sel, perlakuan C 21,25 %sel, perlakuan D 19,00 %sel, perlakuan E 20,5 %sel, dan standar deviasi pada kontrol $\pm 1,41$. Standar deviasi berkisar antara 1,29–4,57.

Hasil penelitian histopatologi menunjukkan terjadi perubahan struktur sel-sel yang terdistribusi pada beberapa jaringan ginjal *cranial* ikan mas yang tidak merata. Intensitas peningkatan ekspresi sel iNOS pada waktu pengamatan 72 Jam (Tabel 1). Hal ini didukung oleh data sel secara kuantitatif menunjukkan nilai rerata kuantitas sel yang terekspresi pada tiap perlakuan terdapat fenomena yang berbeda yaitu jumlah sel yang terekspresi iNOS. Keberadaan LAS dapat memicu kondisi ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas. Peningkatan ekspresi iNOS terjadi pada semua perlakuan LAS berdasarkan waktu pengamatan 72 jam, dengan nilai peningkatan berkisar antara 12,50 – 15,25 %sel (Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Data Ekspresi iNOS dalam Ginjal *Cranial* Ikan Mas 72 Jam Kontaminasi LAS

Perlakuan	iNOS (% sel) ± SD (n = 4)	Peningkatan Ekspresi iNOS (% sel)
Kontrol (tanpa LAS)	5.00 ± 1.41	
A (0,01 mg/L)	17.5 ± 3.11	12.50
B (0,02 mg/L)	21.25 ± 4.57	16.25
C (0,03 mg/L)	21.25 ± 2.99	16.25
D (0,04 mg/L)	19.00 ± 3.74	14.00
E (0,05 mg/L)	20.5 ± 1.29	15.5



Gambar 1. Ekspresi iNOS dalam Jaringan Ginjal *Cranial* Ikan Mas pada Paparan LAS (% Sel)

Berdasarkan hasil pengamatan secara makroskopis, ekspresi iNOS pada ginjal *cranial* ikan mas terjadi perubahan histopatologi di jaringan Tubulus dan di jaringan lain. Hal ini menunjukkan bahwa pada dasarnya peningkatan perubahan struktur sel sehingga mengakibatkan ekspresi iNOS dapat diekspresi oleh semua sel. iNOS adalah enzim NOS yang terdapat di seluruh sel berperan penting dalam perubahan striktur sel selama dalam kondisi stres. iNOS bersifat inducible oleh cytokine dan stimuli lainnya, termasuk hypoxia (Kerwin Junior, *et al.*, 1995). Keberadaan iNOS terbentuk dalam beragam jaringan dari beberapa spesies ikan. Penelitian Pellegrino *et al.*, (2004) dan Tota *et al.*, (2005) memperlihatkan bahwa nNOS diekspresikan pada level lebih tinggi dalam otot kerangka dari ikan icefish dalam jaringan dari spesies berdarah merah, baik eNOS dan iNOS ditemukan juga dalam jantung ikan icefish.

Keberadaan iNOS pada kondisi normal (kontrol) menunjukkan bahwa ginjal *cranial*

ikan mas memiliki cNOS/NOS konstitutif. Penelitian ini didukung oleh pernyataan Pellegrino *et al.*, (2004) dan Tota *et al.*, (2005) NOS konsitutif ikan icefish yang diekspresikan eNOS dan nNOS pada kondisi normal. Ekspresi iNOS dalam ginjal *cranial* ikan mas diberi perlakuan LAS tidak merata pada jaringan. Data hasil penelitian ini dapat dilihat dari tingginya nilai standar deviasi baik pada kontrol maupun perlakuan. Pada kontrol standar deviasi ± 1,41 sedangkan pada kelompok perlakuan berkisar antara ± 1,29 sampai ± 4,57 (Tabel 1). Kondisi ini menunjukkan bahwa paparan konsentrasi LAS pada ikan mas yang dicobakan dalam penelitian ini berada dalam kondisi stress, dan pada semua kelompok perlakuan terdapat ekspresi iNOS pada keseluruhan sel di jaringan ginjal *cranial* bervariasi. Konsentrasi LAS yang dicobakan dalam penelitian ini adalah seperseratus dari nilai rata-rata LC50-96 jam LAS untuk ikan. Heinze (2007) dan OECD (2005) menyatakan bahwa nilai LC50-96 jam LAS pada ikan adalah 1,67 mg/L.

LAS dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas. Peningkatan ekspresi iNOS secara kuantitatif terjadi pada semua kelompok perlakuan LAS. Dengan demikian paparan LAS mulai dari konsentrasi 0,01 mg/L dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS yang dapat terdeteksi 72 jam setelah paparan LAS. Hasil penelitian ini di dukung oleh pernyataan Wang *et al.* (2001) menunjukkan hasil yang sama, sebab pada ikan mas/karper transkripsi iNOS dapat dideteksi 4 jam setelah dirangsang dengan LPS dan transkripsi maksimum tampak/nyata dalam 12 sampai 48 jam terjadi peningkatan ekspresi iNOS pada jaringan insang, dan hati ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang dipapar dengan LPS.

Mengacu pada berbagai pernyataan yang diungkap oleh berbagai penelitian tersebut, bahwa sel mengekspresikan iNOS dapat dipicu oleh adanya perlakuan LAS. Wang *et al.* (2001) menyatakan hal yang sama, dimana pada ikan mas/karper transkripsi iNOS dapat dideteksi 4 jam setelah dirangsang dengan LPS. Dengan demikian bahwa hasil penelitian ini sel yang mengekspresikan iNOS yang terpapar dengan LAS terdeteksi pada pengamatan 72 jam terjadi perubahan ekspresi sel iNOS pada beberapa jaringan ikan mas.

Kondisi Histopatologi dan Lingkungan

Parameter kualitas air selama penelitian pada kontrol dan perlakuan adalah suhu berkisar antara 22,2-22,25 °C, Oksigen terlarut 5,2-6,17 mg/L dan pH 7,42-7,46 (Tabel 2). Kisaran parameter kualitas air tersebut berada dalam kondisi optimum bagi kehidupan dan pertumbuhan ikan mas. Susanto (2002) menyatakan bahwa lingkungan perairan yang ideal untuk ikan mas di jaringan yang berketinggian 150 -600 m di atas permukaan laut dengan suhu air berkisar antara 20 – 35 °C. Selanjutnya (Sutisna dan Sutarmanto, 1995) menjelaskan bahwa kandungan oksigen terlarut sebesar 5 ppm optimal bagi pembenihan ikan mas. CO₂ berkisar antara 10 -100 ppm, kandungan amoniak kurang dari 1 ppm, pH air berkisar antara 6,7 – 8,2.

Tabel 2. Data Parameter Suhu, DO, dan pH

	Suhu (°C)		DO (mg/L)		pH
K	22.35	K	6.145	K	7.48
A	22.2	A	6.2	A	7.45
B	22.25	B	6.17	B	7.42
C	22.25	C	5.85	C	7.44
D	22.3	D	5.79	D	7.4
E	22.25	E	5.85	E	7.46

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan kondisi parameter kualitas air tidak fluktuatif. Hal ini penting karena kondisi kualitas air yang fluktuatif pada taraf tertentu dapat menyebabkan stress seluler pada ikan yang memicu ekspresi iNOS atau memiliki kemiripan performan histopatologi. Secara biologis organisme di lingkungan perairan sensitif dalam merespon perubahan yang terjadi di air. Kesatuan biotik dari sistem ekologi menggambarkan kesehatan fauna. Perubahan kadar polutan kimia pada populasi ikan dapat menyebabkan perubahan secara biokimia, histologi dan fisiologi. Perubahan tersebut mengindikasikan bagaimana kondisi lingkungan mempengaruhi suatu populasi ikan. Efek toksik dari suatu polutan dapat ditentukan pada tingkat seluler atau jaringan sebelum terjadi perubahan signifikan pada perilaku atau penampilan pada ikan (Brusle dan Gonzales, 1996).

Hasil penelitian ini didukung pernyataan (Kerwin Junior, *et al.*, 1995) bahwa iNOS bersifat inducible oleh cytokine dan stimuli lainnya, termasuk hypoxia. Hal yang sama dikemukakan oleh (Wang *et al.*, 2001) menyatakan bahwa ekspresi iNOS pada ikan rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) menunjukkan bahwa ekspresi iNOS dapat dipicu oleh kejutan suhu dan hypoksia (kondisi tanpa oksigen).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa performan histopatologi ginjal *cranial* ikan mas terkontaminasi LAS menunjukkan peningkatan ekspresi iNOS pada

semua jaringan yaitu tubulus dan jaringan lainnya dengan paparan perlakuan LAS nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dari pada kontrol, dengan rerata nilai ekspresi iNOS pada kontrol 5,00 %sel, perlakuan A 17,5 %sel, perlakuan B 21,25 %sel, perlakuan C 21,25 %sel, perlakuan D 19,00 %sel, dan perlakuan E 20,5 %sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 2004. *Detergen*. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Deputi Bidang Pengawasan Produk Terapeutik dan NAPZA. www.pom.go.id.htm. 23 Juli 2007.
- Cahaya, I. 2003. *Ikan Sebagai Alat Monitoring Pencemaran*. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Sumatera Utara.
- Heinze, J., 2007. *LAS. General Ingredient Information*. Cleangredients a Project of GreenBlue. <http://db.cleangredients.org/ingredients.php>. 23 Juli 2007.
- Iwama L.O.B. Afonso; A. Todgham; P. Ackerman dan K. Nakano, 2003. Are Hsps Suitable For Indicating Stressed States In Fish? *The Journal Of Experimental Biology* 207:15-19
- Ishizu, P. dan S. Cover, 2002. *Koi Physiology*. Southwest Koi and Pond Association (SKAPA). www.skapa.org/koi/physiology.htm. 7 Agustus 2007.
- Kerwin, J. F., Jr, Lancaster, J. R., Jr and Feldman, P. L. 1995. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *J. Med. Chem.* 38, 4343-4362.
- Miller, D.S., 1997. Aquatic Models for the Study of Renal Transport Function and Pollutant Toxicity. *Environmental Health Perspectives* Vol. 71, pp. 59-68.
- Pellegrino, D., Palmerini, C. A. and Tota, B. 2004. No hemoglobin but NO: the icefish (*Chionodraco hamatus*) heart as a paradigm. *J. Exp. Biol.* 207, 3855-3864.
- OECD SIDS. 2005. *Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS)*. UNEP Publications. <http://www.chem.unep.ch/las/pdf>. 23 Agustus 2007.
- Susanto. 2002. <http://www.kompas.com>/kompas cetak/. 20,2,2007.
- Sutisna, D. H. dan R. Sutarmanto. 1995. *Pembenihan Ikan Air Tawar*. Kanisius. Yogyakarta. 135 hal.
- Tota, B., Amelio, D., Pellegrino, D., Ip, Y. K. and Cerra, M. C. (2005). NO modulation of myocardial performance in fish hearts. *Comp. Biochem. Physiol.* 142A, 164-177.
- Wang, T., Mike, D., Peter, G and Christopher J. S., 2001. *Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene*. *Department of Zoology, University of Aberdeen, Aberdeen AB24 2TZ, U.K., and Institute of Child Health, University of Sheffield, Sheffield S10 2TH, U.K.