

EXPRESSION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE (iNOS) IN KIDNEY OF CARP (*Cyprinus carpio* L.) LINEAR ALKYL BENZENE SULFONAT (LAS) EKSPOSURE

Ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dalam Ginjal Ikan Mas (*Cyprinus carpio*. L) Setelah Paparan Linear Alkylbenzene Sulfonat (LAS)

Ruku R. Borut*

*Program Studi Budidaya Perairan, Universitas Pattimura
Jl. Mr. Chr. Soplanit Kampus Poka, Ambon, 97234, Maluku-Indonesia*

**Corresponding author, email: rukubdp76@gmail.com*

Received: June 2016 Published: July 2016

ABSTRACT

This study aims to determine the expression of iNOS in renal tissue of carp to contamination LAS (linear alkyl benzene sulfonate). The method used in this study is an experimental method using laboratory based study of molecular exploration. The experimental design used was completely randomized design (CRD), with exposure treatment LAS namely (A) 0.01 mg / L, (B) 0.02 mg / L, (C) 0.03 mg / L, (D) 0.04 mg / L, (E) 0.05 mg / L and control (without LAS). The parameters measured were the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in renal tissue cranial carp after 96 hours of exposure to LAS. Detection of iNOS in renal tissue cranial carp do with immunohistochemical methods. T-test results showed that iNOS expression in the kidney tissue cranial carp at each treatment LAS exposure was significantly higher ($P < 0.05$) than controls. The mean value of iNOS expression in control cells was 6.25%, a 14.5% cell treatment, treatment and 21% of the cells, the cells C treatment 32.5%, 36.5% D treatment of cells, and treatment E 28.25% cell.

Keywords: LAS, Expression of iNOS and Common carp

PENDAHULUAN

LAS berbahaya untuk spesies akuatik (vertebrata, invertebrata dan alga) (The Soap and Detergent Association, 2005). Toksisitas LAS pada beberapa organisme akuatik adalah ikan LC₅₀-96 jam 1,67 mg/L, Daphnia EC₅₀-48 jam 1,62 mg/L dan alga IC₅₀-96 jam 29 mg/L (Heinze, 2007; OECD, 2005; The Soap and Detergent Association, 2005). Toksisitas kronis untuk ikan air tawar nilainya berkisar antara 0,25 – 3,4 mg/L (The Soap and Detergent Association, 2005).

Ikan mas sangat peka terhadap faktor lingkungan setelah berumur diatas tiga bulan dengan ukuran 8-12 cm. Di samping itu ikan mas di kolam air tenang (*Stagnant water*) memiliki kecepatan tumbuh 3 cm setiap bulannya. Pertumbuhan organisme perairan dipengaruhi oleh pH, DO, BOD, suhu, salinitas dan alkalinitas berpengaruh nyata terhadap mortalitas ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) (Suwindere, 1983). 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.

Respon seluler terhadap stress eksternal di perairan dapat ditunjukkan oleh ginjal ikan mas karena dapat memicu timbulnya iNOS. Akibat dari paparan suatu stressor antara lain penurunan pertumbuhan, resistensi penyakit, keberhasilan reproduksi, pernapasan dan kemampuan renang (Barton, 1997 dalam Iwama dkk., 1999). Oleh karena itu pendeteksian dini keberadaan suatu stressor di perairan sangat penting, untuk sedini mungkin dapat dilakukan upaya rehabilitasi terhadap lingkungan perairan yang tercemar dengan perubahan yang terjadi dalam ekspresi iNOS selanjutnya dapat dijadikan biomarker,

yang merupakan sistem peringatan dini adanya paparan polutan dan indikasi adanya perubahan kondisi lingkungan perairan.

Ginjal adalah 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.

Berbagai uraian di atas maka masalah yang dirumuskan dalam penelitian ini adalah bagaimana ekspresi *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dalam ginjal ikan mas setelah 96 jam paparan LAS dengan tujuan untuk mengetahui ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) setelah 96 jam paparan LAS. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan sebagai biomarker untuk menandai kondisi stress pada ikan mas dan menandai keberadaan bahan pencemar LAS di lingkungan perairan.

METODOLOGI

a. Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan eksplorasi laboratorium berdasarkan kajian molekuler. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan perlakuan dosis paparan linear alkylbenzene sulfonat (LAS): 0,01 mg/L, 0,02 mg/L, 0,03 mg/L, 0,04 mg/L, 0,05 mg/L dan kontrol. Kontrol adalah ikan mas yang tidak diberi paparan LAS. Peubah yang diamati adalah *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) yang terdapat dalam jaringan ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) setelah 96 jam paparan LAS. Pendeteksian iNOS pada jaringan ginjal ikan mas dilakukan dengan metode imunohistokimia (Ramos-Vara, 2005).

b. Alat dan Bahan

Alat dan bahan Alat yang digunakan dalam adalah DO meter type oxi315i merk WTW; pH meter type ad140ph merk ama-digit; timbangan analitik tipe AA-250 merk Denver Instrument Company; timbangan analitik tipe XL-3100 merk Denver Instrument; botol sampel;

dan perlengkapan bedah.inkubator 55-63oC; hot plate; pinset; pipet tetes, kotak preparat, waterbath suhu 95oC; pembuat blok; freezing mikrotom; pisau mikrotom dan Bunsen. Sedangkan untuk analisis imunohistokimia iNOS alat yang digunakan adalah mikropipet 1000 μ L, 100 μ L, 20 μ L dan spuit; mikroskop Fluorescent Nikon Optiphot-2. Bahan yang digunakan adalah jaringan ginjal *cranial* ikan mas; slide; cover slide; 4% paraformaldehid dalam PBS (phosphate buffered saline); ethanol bertingkat (70%, 80%, 90%, dan absolute); xylol dan parafin. Sedangkan untuk analisis imunohistokimia iNOS bahan yang digunakan adalah PBS pH 7,4 (pembuatan PBS dengan mencampurkan 8 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; dan ditepatkan pada PH 7,4 dengan menggunakan NaOH); aquades; 3% H₂O₂ dalam PBS; 5% FBS (Fetal Bovine Serum); antibodi primer antibodi primer (Antibody NOS2 Rabbt Polyclonal IgG Merk Santa Cruz Biotechnology no Katalog H-174); DAB (diamono benzidine); mayer's hematoxilen dan entellan.

c. Analisis Data

Data *inducible nitric oxide shyntase* (iNOS) dalam 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

a. *inducible Nitric Oxide Synthesa* (iNOS)

Analisis iNOS dalam ginjal ikan mas yang terkontaminasi LAS, secara kuantitatif dengan metode imunohistokimia. Hasil analisis tersebut dapat dilihat pada (Tabel 1). Hasil analisis statistik dengan menggunakan Uji-t menunjukkan bahwa ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal ikan mas pada semua perlakuan konsentrasi LAS nyata lebih tinggi ($P < 0.05$) dari kontrol, dengan nilai rerata pada kontrol = 6.25 %sel, perlakuan A = 22.00 %sel ($P = 0.0272$), perlakuan B = 28.75 %sel ($P = 0,0479$), perlakuan C = 24.5 %sel ($P = 0.0229$), perlakuan D = 19.25 %sel ($P = 0,0312$), dan perlakuan E = 23.00 %sel ($P = 0,0117$). Adapun nilai peningkatan ekspresi

Tabel 1. Data Ekspresi iNOS dalam Ginjal *Cranial* Ikan Mas Setelah 96 Jam Paparan Linear Alkilbenzena Sulfonat (LAS)

Perlakuan	iNOS (% sel) \pm SD (n = 4)	Peningkatan Ekspresi iNOS (% sel)	Uji-t
Kontrol (tanpa LAS)	5.00 \pm 2.94		
A (0,01 mg/L)	22.00 \pm 2.94	17.00	(P=0.0272)
B (0,02 mg/L)	28.75 \pm 4.99	23.75	(P=0,0479)
C (0,03 mg/L)	24.5 \pm 4.20	19.50	(P=0.0229)
D (0,04 mg/L)	19.25 \pm 5.44	14.25	(P=0,0312)
E (0,05 mg/L)	23.00 \pm 3.56	18.00	(P=0,0117)

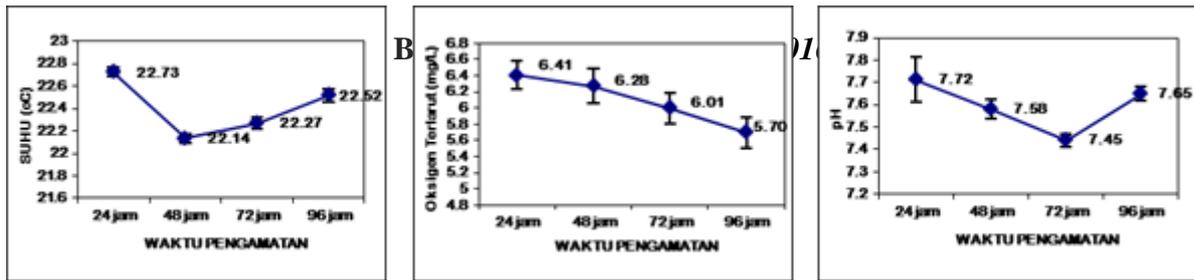
iNOS pada perlakuan A = 17.00 %sel, perlakuan B = 23.75 %sel, perlakuan C = 19.50 %sel, perlakuan D = 14.25 %sel dan perlakuan E = 18.00 %sel. Standar deviasi pada kontrol \pm 2.94 sedangkan pada perlakuan berkisar antara \pm 2.94 sampai \pm 5.44 (Tabel 1)

Ekspresi iNOS pada ginjal ikan mas terjadi pada jaringan tubulus, dan di jaringan lain seperti sitoplasma dan dalam inti sel. Hasil penelitian ini menunjukkan sel-sel yang terdistribusi tidak merata. Intensitas peningkatan ekspresi sel iNOS pada waktu pengamatan 96 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 tidak merata pada jaringan ikan mas. LAS dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal ikan mas. Peningkatan ekspresi iNOS terjadi pada semua perlakuan kontaminasi LAS berdasarkan waktu pengamatan 96 jam, dengan nilai peningkatan berkisar antara 14.25–23.75 % sel.

Pengamatan iNOS dalam penelitian ini menunjukkan bahwa iNOS dalam sel ginjal *cranial* ikan mas terdistribusi pada sitoplasma maupun nukleus/inti sel. Hal ini dapat didukung dengan pernyataan Cronstein *et al* (1993), Huang *et al* (1995), Kendall *et al* (2000) Newton (2000), Qiu *et al* (2004), bahwa iNOS merupakan molekul intraseluler yang ditemukan di dalam sitosol, mitokondria, retikulum endoplasma, dan nukleus eukariot. Dalam synthase NO (NOS), ekspresi iNOS dihasilkan oleh stimulasi beragam cytokiner ataupun infeksi bacteria. Nathan (1992). memperlihatkan bahwa adenosin, yang menjadi nukleosida endogenus, punya sejumlah aksi biologis terhadap beragam sel dan dapat memodulasi beragam fungsi sel yang terlibat dalam respon inflamasi. (Cronstein *et al*, 1991, 1993).

Rangsangan LAS dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS dalam jaringan ginjal *cranial* ikan mas. Peningkatan ekspresi iNOS secara kuantitatif terjadi pada perlakuan LAS selama pengamatan 96 jam. Dengan demikian paparan LAS mulai dari konsentrasi 0,01 mg/L dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS yang dapat terdeteksi mulai dari 24 jam sampai 96 jam setelah paparan LAS. Berdasarkan 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. Penelitian (Burgner, 1999) yang menyatakan bahwa, iNOS secara cepat terekspresi jika terstimuli oleh zat-zat tertentu, misalnya sitokin proinflamasi. Sekali terbentuk iNOS dapat tetap aktif selama 24 sampai 36 jam serta dapat mensintesis NO 100-1000 kali lebih banyak daripada nNOS dan eNOS.

Ekspresi iNOS dalam ginjal *cranial* ikan mas diberi perlakuan LAS tidak merata pada jaringan. Hasil penelitian ini dapat dilihat dari tingginya nilai standar deviasi baik pada kontrol maupun perlakuan. kontrol (Tanpa LAS) standar deviasi berkisar antara \pm 2,94, sedangkan pada kelompok perlakuan berkisar antara \pm 2,94 sampai \pm 5.44 (Tabel 2). Kondisi ini menunjukkan bahwa paparan konsentrasi LAS pada ikan mas yang dicobakan dalam penelitian ini berada dalam kondisi stress, dan pada semua kelompok perlakuan 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), OECD (2005) dan The Soap and Detergent Association (2005) menyatakan bahwa



Gambar 1. Data Pengukuran Beberapa Parameter Kualitas Air Selama 96 Jam yang meliputi Suhu, Oksigen Terlarut dan pH.

nilai LC50-96 jam LAS pada ikan adalah 1,67 mg/L.

b. Kualitas Air

Hasil pengukuran parameter kualitas air selama penelitian pada kelompok kontrol dan perlakuan adalah suhu berkisar antara 22,1-22,8 °C, Oksigen terlarut 5,50-6,63 mg/L dan pH 7,4-7,8 (gambar 9). Kisaran parameter kualitas air tersebut berada dalam kondisi optimum bagi kehidupan dan pertumbuhan ikan mas. (Sutisna dan Sutarmanto, 1995) 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.

Berdasarkan hasil penelitian ini kondisi parameter kualitas air tidak fluktuatif. Hal ini penting dalam penelitian ini sebab kondisi kualitas air yang fluktuatif pada taraf tertentu dapat menyebabkan stress seluler pada ikan yang memicu ekspresi iNOS. 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 : kontaminasi LAS (0.01 mg/L selama 96 jam sudah dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS pada sitoplasma dan inti sel dalam jaringan ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya penulis sampaikan kepada: Ibu Erina Ramadiyanti, S.Si, M.Si. atas perkenannya sehingga penulis dapat bergabung dalam payung riset dengan judul: Ekspresi Stress Protein HSP70 dan MAPK p38 pada Regulasi iNOS dalam Hepatosit *Cyprinus carpio* L. yang Mengalami Pemaparan LAS.

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.
- Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI, 1991, Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:2441-2445.
- Cronstein BN, Naime D, Ostad E, 1993, The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J Clin Invest* 92:2675-2682
- Iwama, G.K., 2008, Stress in Fish. Institute for Marine Biosciences, National Research Council of Canada, Nova Scotia. <http://www-heb.pac.dfo-mpo.gc.ca/pdf>. 28 Pebruari 2008.
- Iwama, G.K.; 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.
- Iwama, G.K.; L.O.B. Afonso dan M.M. Vijayan, 2004a, Stress in Fish. AquaNet Workshop on Fish Welfare. September 27, 2004. <http://aquanet.ca/iwama/pdf>. 15 Agustus 2007.

- Kendall HK, Haase HR, Li H, Xiao YG, Bartold PM, 2000, Nitric oxide synthase type-II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res* 35:194- 200.
- 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.
- Nathan C, 1992, Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064. Nathan CF, Hibbs JB (1991). Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3:65-70.
- Newton, 2000, Molecular mechanism of Glucocorticoid Action : What is important?. *Thorax* 2000;55:603-613.
- Heinze, J., 2007, LAS. General Ingredient Information. Cleangredients a Project of GreenBlue.
<http://db.cleangredients.org/ingredients.php>.
23 Juli 2007.
- 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.
- Sudiana, I Made, 2004, Peran Komunitas Mikroba Lumpur Aktif dalam Perombakan Detergen Alkil Sulfonat Linear dan Benzena Alkil Sulfonat. Pusat Penelitian Biologi-LIPI. Bogor. Indonesia
- Sutisna, D. H. dan R. Sutarmanto, 1995, *Pembenihan Ikan Air Tawar*. Kanisius. Yogyakarta.