

EFFECTS OF CONTAMINATION DETERGENT (LAS) ON THE
EXPRESSION OF iNOS IN KIDNEY COMMON CARP (*Cyprinus carpio* L.)

Pengaruh Kontaminasi Detergen (LAS) Terhadap Ekspresi iNOS
pada Ginjal Cranial Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.)

Ruku R Borut*

Study Program of Aquaculture, Faculty Of Fisheries And Marine Science
Pattimura University, Jl. Mr. Chr. Soplanit Kampus Poka, Ambon, 97234

*E-mail: rukubdp75@gmail.com / ratufish@yahoo.co.id

Received: December 2013 Published: January 2014

ABSTRACT

This research aims to know the expression of iNOS in the kidney of fish contamination of LAS (*linear alkylbenzene sulfonat*). Expression of iNOS observations of renal cells cranial common carp by using immunohistochemical methods show that distribution in the cytoplasm and iNOS cell nucleus. Expression of iNOS in the head kidney tissue distribution carp tubules and other networks is uneven. Expression of iNOS on a network of tubules occurs in cells on the outside. On other network distribution unevenly iNOS expression. Expression of iNOS in the head kidney tissues of common carp found in the control group and treatment group LAS contamination during 48 hours of observation. Expression of iNOS in the control group or normal ranges from 4.25-5.5 % of cells, treatment A (0,01 mg/L LAS) 10.5-15.75 % cell, treatment B (0,02 mg/L LAS) 9.75-22.25 % cell, treatment C (0,03 mg/L LAS) 10.75-21.00 %, treatment D (0,04 mg/L LAS) 14.5-18.00 % cell and treatment E (0,05 mg/L LAS) 13.00-18.00 % cell. Standard deviation on the control ranges from 2,08 up 3.4 while in group treatment ranged 1 to 1.25

Keywords: LAS, Expression of iNOS, *Cyprinus carpio* L.

PENDAHULUAN

Ikan 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).

Detergen merupakan surfaktan yang sangat luas penggunaannya baik untuk keperluan rumah tangga maupun industri (Bateman *et al.*, 1986 *dalam* Sudiana, 2004). Jenis surfaktan yang paling banyak digunakan dalam detergen adalah tipe anionik dalam bentuk sulfat (SO_4^{2-}) dan

sulfonat (SO_3^-) (Schleheck *et al.*, 2000 *dalam* Sudiana, 2004). Berdasarkan rumus struktur kimianya, detergen golongan sulfonat dibedakan menjadi dua jenis (Grayson, 1983 *dalam* Sudiana, 2004), yaitu jenis rantai bercabang sebagai contoh *Alkil Benzene Sulfonat* (ABS), dan jenis rantai lurus *Linear Alkil Sulfonat* (LAS). Kedua jenis senyawa tersebut di lingkungan terus meningkat, hal tersebut sejalan dengan penggunaan detergen yang makin meningkat (Kirk dan Othmer, 1979 *dalam* Sudiana, 2004).

Ikan dapat menunjukkan reaksi terhadap perubahan fisik air maupun terhadap adanya senyawa pencemar yang terlarut dalam batas konsentrasi tertentu (Mark, 1981 *dalam* Sudarmadi, 1993). Ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dapat digunakan sebagai hewan uji hayati karena sangat peka terhadap perubahan lingkungan (Sudarmadi, 1993). Di Indonesia ikan yang termasuk famili

Cyprinidae ini termasuk ikan yang populer dan paling banyak dipelihara rakyat, serta mempunyai nilai ekonomis. Ikan mas sangat peka terhadap faktor lingkungan pada umur lebih kurang tiga bulan dengan ukuran 8-12 cm (Sudarmadi, 1993).

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 (Miller, 1997)

Respon seluler terhadap stress eksternal di perairan dapat ditunjukkan oleh ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio. L*) karena dapat memicu timbulnya iNOS. Akibat dari paparan dalam jangka panjang 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.

METODOLOGI

a. 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

55-63°C; hot plate; pinset; pipet tetes, kotak preparat, waterbath suhu 95°C; pembuat blok; freezing mikrotom; pisau mikrotom dan Bunsen. Sedangkan untuk analisis imunohistokimia iNOS alat yang digunakan adalah mikropipet 1000µL, 100µL, 20µL 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 polyclonal anti-iNOS); antibodi sekunder (goat anti rabbit IgG berlabel biotin); DAB (diamono benzidine); mayer's hematoxilen dan entellan.

b. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan eksplorasi laboratorium berdasarkan kajian kimia dan molekuler. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan perlakuan dosis kontaminasi 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. Peubah yang diamati adalah *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) yang terdapat dalam jaringan ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio L.*), dengan waktu pengamatan mengacu pada prosedur penelitian toksisitas yaitu selama 48 jam. Prosedur penelitian yang dilakukan meliputi: pengambilan ikan, aklimatisasi, perlakuan LAS, isolasi jaringan ginjal *cranial* ikan mas dan pengamatan peningkatan iNOS pada ginjal *cranial* ikan mas. Pendeteksian iNOS pada jaringan ginjal *cranial* ikan mas dilakukan dengan metode imunohistokimia (Ramos-Vara, 2005).

c. Analisis Data

Data *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dalam jaringan ginjal cranial ikan mas akan diinterpretasi secara deskriptif yaitu dengan menghitung jumlah sel yang terekspresi (ditandai dengan warna kecokelatan) setiap 100 sel pada suatu lapang pandang dengan menggunakan mikroskop Fluorescent Nikon Optiphot-2 pada perbesaran 200x, 400x dan 1000x dan dinyatakan dalam persen (%), untuk mengetahui apakah terdapat peningkatan ekspresi iNOS pada ginjal *cranial* 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

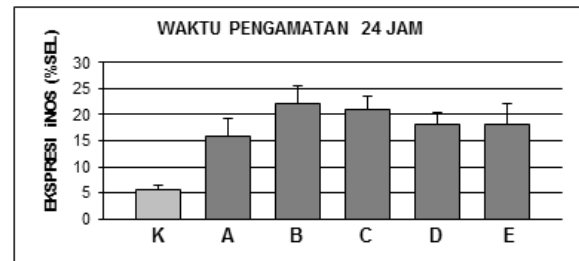
a. *inducible nitric oxide synthase* (iNOS)

Pada hasil pengamatan ekspresi iNOS terhadap sel-sel ginjal *cranial* (*head kidney*) ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) dengan menggunakan metode imunohistokimia, menunjukkan bahwa iNOS terdistribusi pada sitoplasma dan inti sel. Warna coklat dalam sitoplasma dan inti pada sel yang mengekspresi iNOS diamati dengan menggunakan mikroskop Fluorescent Nikon Optiphot-2 pada pembesaran 1000 x.

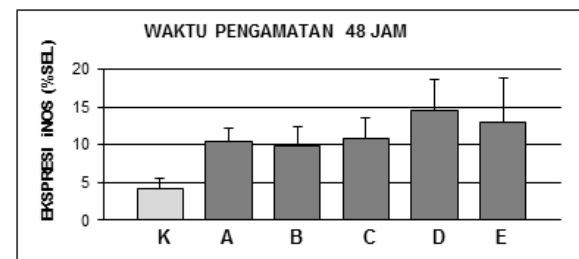
Ekspresi iNOS pada *head kidney* ikan mas terdistribusi pada jaringan tubulus dan jaringan lainnya secara tidak merata. Pada jaringan tubulus ekspresi iNOS terjadi pada sel di bagian luar. Pada jaringan lainnya ekspresi iNOS terdistribusi tidak merata.

Ekspresi iNOS dalam jaringan *head kidney* ikan mas ditemukan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan kontaminasi LAS selama 48 jam pengamatan. Ekspresi iNOS pada kelompok kontrol atau normal (K) berkisar 4.25-5.5 % sel, perlakuan A (kontaminasi 0,01 mg/L LAS) 10.5-15.75 % sel, perlakuan B (kontaminasi 0,02 mg/L LAS) 9.75-22.25 % sel, perlakuan C (kontaminasi 0,03 mg/L

LAS) 10.75-21.00 %, perlakuan D (kontaminasi 0,04 mg/L LAS) 14.5-18.00 % sel dan perlakuan E (kontaminasi 0,05 mg/L LAS) 13.00-18.00 % sel. Standar deviasi pada kontrol berkisar antara $\pm 2,08$ sampai $\pm 3,4$ sedangkan pada kelompok perlakuan berkisar antara ± 1.00 sampai ± 1.25 dapat dilihat pada gambar 1.



(a)



(b)

Gambar 1. Ekspresi iNOS dalam Jaringan Ginjal *Cranial* Ikan Mas Pada Kontaminasi LAS (% Sel) a) waktu 24 jam b) waktu 48 jam

Pengamatan ekspresi iNOS dalam penelitian ini dengan menggunakan teknik pemulasan imunohistokimia menunjukkan bahwa iNOS dalam sel ginjal *cranial* ikan mas terdistribusi pada sitoplasma maupun nukleus/inti sel. Hal ini didukung dengan pernyataan Cronstein *et al* (1993), Kendall *et al* (2000) Newton (2000), 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).

Berdasarkan rangsangan LAS ini melalui suatu sistem sinyal transduksi akan menstimulasi suatu bahan kimia sel yang

pH 7,52-7,80. Data parameter kualitas air menunjukkan kondisi perairan yang stabil pada suhu dan pH, sedangkan pada oksigen terlarut menunjukkan kondisi perairan yang cenderung menurun.

Hasil pengukuran parameter kualitas air

Tabel 1. Data Parameter Suhu, DO dan pH selama 48 Jam

Perlakuan	Suhu		DO		pH	
	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam	24 jam	48 jam
K (Norma)	22.7	22.1	6.58	6.58	7.69	7.57
A	22.7	22.1	6.35	6.24	7.76	7.60
B	22.8	22.2	6.14	6.09	7.52	7.53
C	22.7	22.1	6.63	6.50	7.80	7.64
D	22.8	22.2	6.39	6.09	7.73	7.53
E	22.7	22.1	6.35	6.12	7.77	7.6

didalam dikenal sebagai *second messenger*. Di dalam sitoplasma akan terjadi suatu reaksi berantai biokimia, yang menyebabkan terjadi fosforilasi berbagai protein, yang menginduksi berbagai proses biokimia dan fisiologis seperti motilitas, pembelahan sel, ekspresi gen dan metabolisme seluler. Hal ini di dukung pendapat Carafoli *et al*, (1990), Dedman & Kaetzel (1998) bahwa *second messenger* terdapat pada berbagai lokasi di sel mulai dari matriks sel, molekul adesi, di dalam membran sel, dalam organela sel, inti sel dan sitoplasma dalam bentuk yang terikat dengan reseptor protein maupun dalam kondisi bebas berperan dalam homeostatis sel.

Ekspresi iNOS pada ginjal *cranial* ikan mas terjadi di jaringan Tubulus dan di jaringan lain menunjukkan bahwa pada dasarnya peningkatan ekspresi iNOS dapat diekspresi oleh semua sel. Menurut Cronstein *et al* (1991, 1993), Nathan (1992) bahwa iNOS adalah enzim NOS yang terdapat di seluruh sel, berperan penting dalam peningkatan sel selama dalam kondisi stres.

b. Kualitas Air

Hasil pengukuran parameter kualitas air selama 48 jam menunjukkan kondisi yang tidak fluktuatif. Suhu berkisar antara 22,1-22,8 °C, oksigen terlarut 6,09-6,63 mg/L dan

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 (table 1).

Kisaran parameter kualitas air pada Tabel 1 tersebut di atas berada dalam kondisi optimum bagi kehidupan dan pertumbuhan ikan mas. Susanto (1987) 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.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan : kontaminasi LAS (0.01 mg/L selama 48 jam sudah dapat memicu peningkatan ekspresi iNOS pada sitoplasma dan inti sel dalam jaringan ginjal ikan mas (*Cyprinus carpio* L.).

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 februari 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.
- Iwama, G.K.; P.T. Thomas; R.B. Forsyth dan M.M. Vijayan, 2004b, Heat Shock Protein Expression in Fish. *SpringerLink Journal* 8: Abstrak.
- 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.
- 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* 55:603-613.
- 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. 135 hal