

**EFEK PERLAKUAN LOGAM BERAT KADMIUM TERHADAP APOPTOSIS MELALUI
AKTIVASI CASPASE-3 BULU BABI *Deadema setosum*: APLIKASI BIOMONITORING
PENCEMARAN DI PERAIRAN LAUT**

*(Effect of Cadmium Heavy Metal Treatment Toward Apoptosis Through Caspase-3 Activation of
Sea Urchin Deadema setosum: Application of Pollution Biomonitoring in Sea Waters)*

Dominggus Rumahlatu^{1,*}, Aloysius Duran Corebima², Mohamad Amin² dan Fatchur Rohman²

¹Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP Universitas Pattimura, Jl. Dr. Tamaela, Ambon.

²Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Malang, Malang, Jawa Timur.

*Penulis korespondensi. No Telp: 0911-312343; Email: dominggus_amq@yahoo.co.id

Diterima: 9 Oktober 2013

Disetujui: 24 Januari 2014

Abstrak

Kadmium yang terakumulasi pada hewan dapat menyebabkan karsinogenik, mutagenik, dan teratogenik. Pada penelitian ini, dilakukan secara eksperimen nonfaktorial dalam RAL 6 level dengan 7 ulangan selama 4 minggu, untuk mengkaji efek perlakuan logam berat Cd terhadap apoptosis melalui aktivasi protein *caspase-3* bulu babi *Deadema setosum*. Penelitian dilakukan di laboratorium Balai LIPI Ambon dalam 6 bak aquarium berukuran 100 x 60 x 70 cm³. Tiap bak perlakuan diisi 200 L air laut yang diganti satu kali setiap minggu. Konsentrasi perlakuan adalah 0, 1, 3, 6, 9, dan 12 µg/L Cd terlarut. Pada tiap bak diterapkan satu level perlakuan konsentrasi Cd, dan tiap bak itu dihuni oleh 7 individu *D. setosum* sebagai ulangan. Usia hewan uji sekitar 8 bulan berbobot 90 g dengan lingkaran tubuh 15 cm. Hewan uji diberi pakan lamun. Pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* dilakukan pada organ hepar dengan metode *Caspase Colorimetric Assay Kit*, sedangkan pemeriksaan apoptosis dilakukan dengan teknik pengecatan *Hematoxilen-Eosin* (HE). Data penelitian terkait konsentrasi protein *caspase-3* dianalisis dengan *One Way Anova* dan uji lanjut dihitung dengan Duncan 0,05. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa perlakuan Cd sangat signifikan meningkatkan kadar protein *caspase-3*; semakin tinggi kadar Cd, kadar protein *caspase-3* juga makin tinggi. Konsentrasi protein *caspase-3* pada konsentrasi perlakuan 12 µg/L Cd adalah yang paling tinggi dibanding kontrol. Gambaran histologi hepar *D. setosum* yang mengalami apoptosis atas dasar pengecatan HE sangat sesuai dengan tiap konsentrasi protein *caspase-3* yang terekam. Hasil ini menunjukkan bahwa protein *caspase-3* memiliki potensi sebagai satu alternatif biomonitoring pencemaran Cd pada tingkat seluler *D. setosum* di perairan laut.

Kata kunci: kadmium, *Deadema setosum*, apoptosis, *caspase-3*, biomonitoring pencemaran.

Abstract

Cadmium which accumulated in animals could cause carcinogenic, mutagenic and teratogenic. In this research, non factorial experiments conducted in Complete Random Design (CRD) 6 level with 7 replication for 4 weeks, in order to examine effect of Cd heavy metal treatment toward apoptosis through caspase-3 protein activation in sea urchin Deadema setosum. Research conducted in LIPI Ambon laboratory using 6 aquarium tank size 100 x 60 x 70 cm³. Each tank was filled with 200 L of sea waters that being replace once a week. Treatment concentrations in tanks are containing 0, 1, 3, 6, 9, and 12 µg/L dissolved Cd. In each tank there is one level Cd concentration treatment level, and each tank was filled with seven D. setosum individual as replication. The age of animals is approximately 8 month with the weight 90 g and body circumference 15 cm. These animals were fed with seagrass. Measurement of Caspase-3 protein concentration was conducted in heparin organ using the method Caspase Colorimetric Assay kit, while apoptosis examination was conducted by painting technique using Hematoxilen-Eosin (HE). Research data concerning caspase-3 protein concentration was analyzed by One Way Anova and further test was calculated by Duncan 0.05. Result of this research showed that Cd treatment is significantly increasing caspase-3 protein content; higher Cd content, caspase-3 protein would essentially higher. Caspase-3 protein concentration in treatment concentration of 12 µg/L is the highest compared to control treatment. Histological description of D. setosum heparin organ that experiencing apoptosis based on HE painting is in accord with each recorded caspase-3 protein concentration. This result showed that caspase-3 protein has the potential to become one alternative in Cd pollution biomonitoring at celluler level of D. setosum in the sea.

Keywords: cadmium, *Deadema setosum*, apoptosis, *caspase-3*, pollution biomonitoring.

PENDAHULUAN

Kadmium dikenal sebagai logam berat non esensial bagi tubuh, sehingga dengan kadar rendah dapat menyebabkan karsinogenik, teratogenik, dan mutagenik pada berbagai jenis hewan (Pal, 2006). Bulu babi dikenal sebagai biota perairan yang sangat sensitif terhadap polutan logam (Russo dkk., 2003; Soualili dkk., 2008), dan imbasnya banyak penelitian tentang akumulasi logam berat kadmium di lingkungan perairan dan berbagai organ, dan tahapan perkembangan embrio dan dewasa pada berbagai biota perairan telah dilakukan selama beberapa dekade. *Deadema setosum* dan *Paracentrotus lividus* telah digunakan sebagai bioindikator untuk mengevaluasi kontaminasi logam berat pada terumbu karang di Indo-Pasific dan Mediterania (Warnau dkk., 1995; Flammang dkk., 1997). Temara dkk. (1998) memberikan gambaran terkait dengan penentuan status tingkat pencemaran dengan indikator berat kering *Asterias rubens*. Bielmeyer dkk. (2005) dalam penelitiannya menggunakan dua tahap perkembangan *D. antillarum* tahap embrio dan dewasa sebagai bioindikator logam berat dan menunjukkan sensitivitas yang tinggi terhadap logam berat Cu pada level kontaminasi yang rendah. Rumahlatu (2011) juga melaporkan bahwa *D. setosum* merupakan spesies bioindikator pencemaran lingkungan perairan dan dapat digunakan sebagai spesies biomonitoring logam berat kadmium di perairan.

Kamrin (2004) dan Zhou dkk. (2008) menjelaskan bahwa biomonitoring merupakan teknik evaluasi lingkungan untuk mengukur jumlah bahan kimia berdasarkan analisis pada jaringan dan molekul organisme yang terpapar logam berat. Menurut Angerer dkk. (2006), biomonitoring merupakan pengukuran terhadap biomarker pada unit-unit spesifik seperti darah, urin atau jaringan suatu individu. Berdasarkan pendapat tersebut maka monitoring toksisitas merupakan suatu pengukuran kualitas lingkungan berdasarkan respons molekul-molekul yang dapat digunakan sebagai biomarker. Ayeni dkk. (2010) menjelaskan bahwa organisme yang digunakan sebagai pemonitor logam berat, harus dapat mengakumulasi logam berat dalam jumlah yang tinggi, memiliki kemampuan hidup yang panjang sehingga memungkinkan untuk dibandingkan perbedaan antar umur, dan mudah dipelihara pada kondisi laboratorium. Berdasarkan hal tersebut, maka organisme yang memiliki kemungkinan digunakan sebagai pemonitor

pencemaran logam berat pada lingkungan perairan adalah bulu babi dari filum Echinodermata.

D. setosum merupakan salah satu jenis bulu babi dari kelas Deademetidae yang memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap logam berat kadmium, dan dikenal sebagai spesies indikator dari lingkungan laut yang tercemar (Flammang dkk., 1997; Danis dkk., 2005; Rumahlatu, 2011). Dilaporkan oleh Russo dkk. (2003) bahwa pemaparan yang kontinyu terhadap embrio *Paracentrotus lividus* dengan konsentrasi Cd yang tinggi, menyebabkan sejumlah abnormalitas, seperti penundaan perkembangan, penurunan perpanjangan perut, dan cacat tulang. Menurut Ayeni dkk. (2010), biomarker berhubungan dengan respons di dalam tubuh organisme terhadap tingkatan pencemaran yang berbeda. Selain itu, biomarker dalam kerang seperti glutathione (GSH) dan metallothionein (MT) *Paracentrotus lividus* juga telah digunakan untuk mengevaluasi kontaminasi logam berat Cd di Perairan (Rainbow dkk., 2000; Russo dkk., 2003). Roccheri dkk. (2004) melaporkan bahwa paparan logam berat Cd dengan konsentrasi tinggi menyebabkan perlambatan perkembangan embrio bulu babi *Paracentrotus lividus* dan meningkatnya respons biomolekuler berupa ekspresi protein HSP60 dan HSP70. Menariknya, Faix dkk. (2005) mengungkapkan bahwa Cd juga memicu perubahan histopatologi dan menyebabkan peroksidasi lipid pada organ liver dan ginjal rodent.

Hasil penelitian Ros dkk. (1990), Quartacci dkk. (2001) yang dirujuk dalam Hall (2002) dan Smiri (2010) menunjukkan bahwa perlakuan dengan logam berat jenis Cu dan Cd berpengaruh terhadap komposisi lipid pada membran plasma, sedangkan Fodor dkk. (1995) dalam Hall (2002) juga menjelaskan bahwa logam berat jenis Cd akan mereduksi aktivitas ATPase pada membran plasma pada akar tanaman gandum dan bunga matahari (*sunflower*). Tosepu (2012) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa logam berat Cd pada lingkungan perairan memberikan dampak negatif bagi lingkungan perairan itu sendiri, namun kadar logam berat di perairan akan berkurang dengan menggunakan *Cyperus papyrus* sebagai bioakumulator lingkungan karena akar *Cyperus papyrus* memiliki struktur kimia yang baik dalam menetralkan polutan perairan. Pada sisi lain, Agnello & Roccheri (2010) mengungkapkan bahwa apoptosis terjadi di bawah pengaruh sinyal internal atau eksternal yang berasal dari lingkungan mikro dan juga dipicu untuk merespon stimuli lingkungan untuk menghilangkan sel yang rusak akibat stress kimia,

fisik, dan mekanis pada berbagai organisme. Selain itu, Dwipoyono (2007), Zhang dkk. (2002) dan Nagata (1997) menjelaskan bahwa *caspase-3* berperan dalam proses regulasi dan eksekusi proses apoptosis. Dijelaskan oleh Agnello dkk. (2007) bahwa akumulasi protein HSP berperan sebagai signal transduksi terhadap respons stres dan mengaktivasi terjadinya apoptosis. Itulah sebabnya penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efek perlakuan logam berat Cd terhadap apoptosis melalui aktivasi protein *caspase-3* bulu babi *D. setosum* sebagai satu alternatif biomonitoring pencemaran perairan laut oleh logam berat Cd pada tingkat seluler.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen nonfaktorial dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) 6 level dengan 7 ulangan selama 4 minggu. Sampel dalam penelitian ini adalah 42 individu *D. setosum* hasil penangkaran pada Balai LIPI Ambon. Urutan pelaksanaan penelitian dijelaskan sebagai berikut.

Penyediaan Hewan Uji

Penyediaan hewan uji dimulai dengan tahapan budidaya pada Balai LIPI Ambon, Indonesia. Tahapan budidaya *D. setosum* menggunakan sistem air mengalir, yakni tahap pemijahan, tahap larva, tahap pendedaran dan tahap pembesaran. Tahapan pemijahan dilakukan pada kolam pemijahan dimulai dari pemilihan induk, peneluran, pembuahan hingga penetasan telur. Tahapan larva ini dilakukan di wadah terkontrol (bak semen atau *fiberglass*). Fase sejak telur menetas hingga mencapai umur 12-15 hari. Pada tahap pendedaran, pemeliharaan benih *D. setosum* dilakukan di bak semen atau *fiberglass* selama 1 bulan. Tahap pembesaran merupakan fase membesarkan benih yang dilakukan selama 3-8 bulan di bak semen atau *fiberglass* sampai individu *D. setosum* mencapai lingkaran tubuh 10-25 cm dan berat tubuh 40-160 g.

Penentuan Hewan Uji

Penentuan individu *D. setosum* untuk digunakan dalam perlakuan, yakni sampel individu *D. setosum* yang dipelihara selama 8 bulan dengan berat tubuh 90 g dan lingkaran tubuh 15 cm sebanyak 42 individu yang dibagi menjadi 6 kelompok untuk 6 tingkatan konsentrasi logam berat Cd, dan pada masing-masing kelompok digunakan 7 individu sehingga total unit analisis adalah 42. Sampel

individu selanjutnya dimasukkan ke dalam bak aquarium berukuran 100 x 60 x 70 cm, dimana setiap bak ditempati 7 individu *D. setosum* dan dilakukan fase adaptasi selama 1 minggu pada kondisi laboratorium.

Perlakuan

Tahapan perlakuan paparan kadmium pada individu *D. setosum* mengikuti langkah-langkah sebagai berikut. Sebanyak 42 individu *D. setosum* yang telah melalui proses kapasitasi, selanjutnya dibagi menjadi 6 kelompok sesuai dengan tingkatan konsentrasi logam berat, yaitu 0, 1, 3, 6, 9, dan 12 µg/L Cd terlarut selama 4 minggu dalam bak aquarium yang berisikan air laut 200L dengan sirkulasi udara bak perlakuan menggunakan aerator listrik. Semua perlakuan diulang sebanyak 7 kali. Selama perlakuan, dilakukan pengukuran faktor fisika kimia pada bak perlakuan berupa suhu, pH, salinitas, dan oksigen terlarut pada waktu pagi, siang dan sore hari. Selama 4 minggu perlakuan, dilakukan pergantian air aquarium 1 kali dalam 1 minggu. Pemberian pakan berupa lamun dilakukan setiap pagi dengan cara mengikat lamun pada bongkahan karang dan diletakkan dalam bak perlakuan serta menebarkan lamun pada permukaan air bak perlakuan.

Setelah 4 minggu perlakuan, dilakukan pembedahan terhadap 42 individu *D. setosum* untuk diambil organ hati. Organ hati yang telah dibedah, dimasukkan ke dalam pot sampel untuk pemeriksaan apoptosis dan pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* di Laboratorium Fisiologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Pemeriksaan Apoptosis dengan Pengecatan Hematoxilen-Eosin (HE)

Pemeriksaan apoptosis pada hepar *D. setosum*, diawali dengan pembuatan preparat spesimen hepar. Langkah-langkah pembuatan preparat spesimen hepar dijelaskan sebagai berikut.

Tahapan fiksasi jaringan diawali dengan pencucian Hepar *D. setosum* dengan PBS 1x sampai bersih, dan dimasukkan dalam fiksatif selama 1 jam, kemudian hepar dipotong 1 x 1 cm. Spesimen direndam kembali dalam fiksatif dengan waktu < 24 jam. Spesimen dicuci dengan alkohol 50% secara berulang tanpa memegang serta memencet spesimen. Bila disimpan > 24 jam, spesimen direndam dalam alkohol 70%, setelah itu dicuci lagi dengan alkohol 70%. Tujuan dari fiksasi adalah untuk meminimalis atau menghentikan proses autokatalik dari jaringan.

Langkah selanjutnya adalah pembuatan blok parafin. Spesimen didehidrasi dalam alkohol 85% selama 1-2 jam, alkohol 96% selama 1-2 jam, dan alkohol 100% selama 2-3 jam. Spesimen dijernihkan dengan xylol:alkkohol 100% = 1:3 selama 1 jam, xylol:alkkohol 100% = 2:2 selama 1 jam, xylol:alkkohol 100% = 3:1 selama 1 jam, xylol murni I selama 1 jam, dan xylol murni II selama 1 jam. Infiltrasi spesimen dikerjakan dalam oven dengan xylol:parafin 1:1 (45-50 °C) selama 1 jam, parafin I (65-70 °C) selama 1 jam, parafin II (65-70 °C) selama 1 jam. Tujuan dari proses ini untuk membersihkan jaringan dari sisa-sisa alkohol agar mudah untuk menempel digunakan *mounting* medium. Pembuatan blok dengan kertas, spesimen dimasukkan dalam kotak kertas, diberi parafin cair, kemudian dilabeli. Parafin didinginkan dengan air dingin. Pengeblokan dengan parafin ini bertujuan untuk memudahkan pengirisan jaringan dengan mikrotom dengan ketebalan 5-10 mikron.

Selanjutnya adalah langkah pemotongan blok parafin. Blok parafin yang sudah siap selanjutnya diiris dengan *rotary microtome*. Irisan jaringan hepar setebal 4 µm, selanjutnya dilakukan *mounting* pada gelas objek/slide dengan gelatin 5%.

Tahapan pewarnaan dilakukan berikutnya. Setelah blok parafin diiris, lalu diletakkan di atas gelas slide (*object glass*). Lapisan yang terjadi masih terlapisi paraffin, maka perlu dihilangkan dulu dengan cara merendamnya dalam larutan dehidrasi (alkohol, xylol). Masih dalam rangka rangkaian dehidrasi, dilakukan pewarnaan supaya jaringan yang diamati tampak jelas. Larutan yang digunakan adalah haemotoksilin eosin.

Sel hati yang mengalami apoptosis diamati menggunakan mikroskop Olympus dengan pemotretan slide blot pada lapang pandang perbesaran 400x. Sel yang mengalami apoptosis diamati berdasarkan ciri sel shrinkage, nukleus mengalami kondensasi, dan pembentukan *apoptotic bodies*.

Pengukuran Konsentrasi Caspase-3 dengan Caspase Colorimetric Assay Kit

Penentuan konsentrasi *caspase-3* mengikuti Slee dkk. (1999), yaitu penghalusan jaringan hepar *D. setosum* kemudian ditambahkan lysis buffer, selanjutnya divortek dan diinkubasi 30 menit pada 4 °C. Sampel kemudian disentrifuse pada 2000 rpm dan supernatan disimpan. Supernatan (ekstrak sitosol) dipindahkan ke dalam tabung segar dan diletakkan di es. Perlakuan assay pada konsentrasi protein dengan

metode standar. Setiap ekstrak sitosol diencerkan sampai konsentrasi 50-200 µg protein per 50 µL Cell Lysis Buffer (1-4 mg/mL). Jumlah sampel diukur dan dilakukan aliquot 2x pereaksi buffer secukupnya ke dalam tabung kaca (diasumsikan 50 µL 2x Reaction Buffer per sampel). Selanjutnya ditambahkan DTT ke 2x Reaction Buffer segera sebelum digunakan (10 mM konsentrasi akhir; ditambahkan 10 µL 1,0 stok DTT per 1 mL 2x Reaction Buffer). Ke dalam sampel ditambahkan 50 µL 2x Reaction Buffer (berisi 10 mM DTT) ke setiap sampel. Selanjutnya ditambahkan 5 µL substrat 4 mM (200 µM konsentrasi akhir) dan inkubasikan pada 37 °C selama 1-2 jam. Simpan sampel dalam gelap selama inkubasi. Absorbansi sampel dibaca dalam 400 nm atau 405 nm dengan microplate reader. Peningkatan aktivitas *caspase-3* ditentukan melalui perbandingan langsung dengan level kontrol non-induksi.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif menggunakan metode kuantitatif dalam bentuk persentase untuk menggambarkan jaringan hepar *D. setosum* yang mengalami apoptosis.

Selain itu, digunakan statistik inferensial ANOVA satu jalur (*One Way Anova*) untuk mengkaji efek perlakuan logam Cd terhadap konsentrasi protein *caspase-3* dan dilakukan uji lanjut dengan Duncan 0,05 untuk melihat perbedaan rata-rata konsentrasi paparan logam berat terhadap konsentrasi protein *caspase-3* pada organ hepar *D. setosum*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

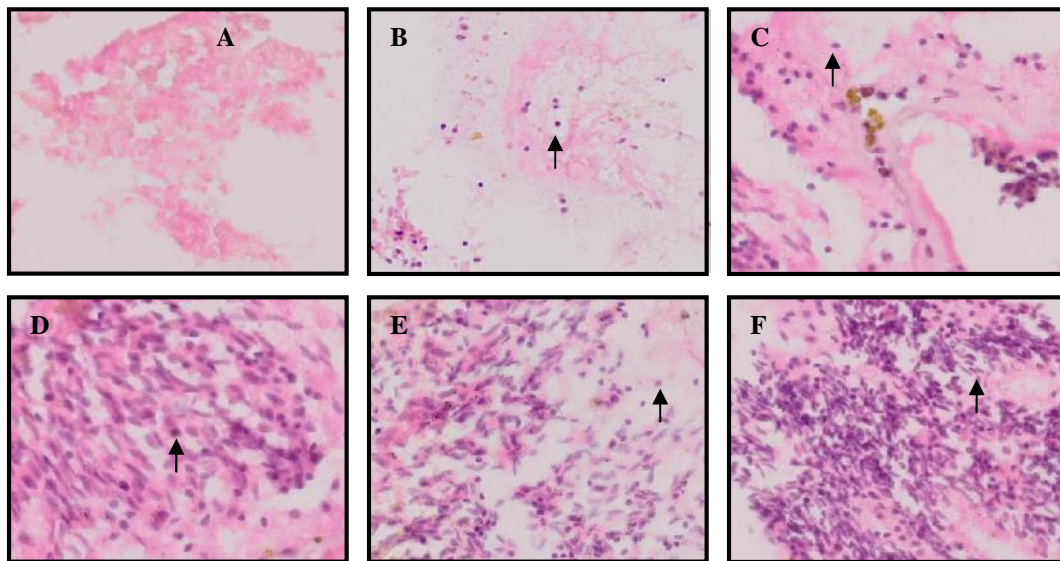
Apoptosis pada *D. setosum* akibat Paparan Logam Berat Cd

Hasil pengamatan untuk memberikan gambaran mengenai histologi hepar yang mengalami apoptosis sebagai respons fisiologi *D. setosum* akibat terpapar logam berat Cd, terlihat adanya noktah berwarna ungu (Gambar 1). Noktah berwarna ungu yang ditunjukkan dengan tanda panah hitam menunjukkan adanya apoptosis pada jaringan hepar *D. setosum*. Jaringan hepar yang mengalami apoptosis, nukleus selnya mengalami kondensasi dan pembentukan *apoptotic bodies*. Semakin tinggi paparan konsentrasi logam berat Cd, maka sel yang mengalami apoptosis juga semakin tinggi. Peningkatan apoptosis jaringan hepar *D. setosum* dapat terungkap, kadarnya meningkat berturut-turut dari rendah ke tinggi, yakni pada bak 1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6. Hal ini berarti bahwa konsentrasi logam berat Cd meningkatkan apoptosis.

Keberadaan apoptosis mengindikasikan bahwa sel hepar *D. setosum* melakukan mekanisme homeostasis untuk mempertahankan lingkungan internal selnya dari paparan logam berat Cd, terlihat infiltrasi sel-sel radang jaringan hepar diduga terkait dengan adanya respons terhadap akumulasi logam berat Cd pada sel hepar. Dijelaskan oleh Agnello dan Roccheri (2010) bahwa apoptosis terjadi di bawah pengaruh sinyal internal atau eksternal yang berasal dari lingkungan mikro dan juga dipicu untuk merespon stimuli lingkungan untuk menghilangkan sel yang rusak akibat stress kimia, fisik dan mekanis pada berbagai organisme. Keadaan ini menunjukkan bahwa sel-sel hepar *D. setosum* memberikan respons dengan melakukan homeostasis untuk mempertahankan lingkungan internal selnya dari paparan logam berat Cd. Menurut Saputra dkk. (2012) kejadian kerusakan sel terjadi akibat adanya penurunan ATP dalam mitokondria. Penurunan ATP tersebut akan berakibat peningkatan ion Ca^{2+} dalam mitokondria, Ca^{2+} akan mengaktifkan beberapa enzim yaitu *phospholipase*, yaitu enzim yang dapat merusak membran) dan *protease* adalah enzim yang dapat merusak membran dan protein sitoskeletal serta *endonuclease* ialah enzim yang bertanggung jawab terhadap fragmentasi DNA dan kromatin, dimana kerusakan membran sel merupakan tanda awal kejadian nekrosis. Hal ini terjadi karena adanya tekanan fisiologi akibat meningkatnya akumulasi

logam berat Cd di dalam hepar *D. setosum*. Dijelaskan oleh Huang dkk. (2003) bahwa hal tersebut berkaitan dengan pelepasan berbagai jenis senyawa biokimia, seperti beberapa jenis hormon glukokortikoid dan sitokin. Sitokin yang dilepaskan berperan penting dalam upaya tubuh mempertahankan homeostasis akibat stress. Selama terjadi akumulasi logam berat Cd pada hepar *D. setosum*, dapat diduga sekresi sitokin meningkat. Hal ini, menurut Caspani dkk. (2004) dapat meningkatkan respons inflamasi. Disisi lain, paparan logam berat yang tinggi menyebabkan sel tidak dapat mempertahankan homeostasisnya, sehingga menyebabkan beberapa jenis protein seluler mengalami kerusakan, sehingga kejadian apoptosis jaringan juga meningkat (Katschinski, 2004). Dijelaskan oleh Dailanis & Kaloyianni (2004); Smiri dkk. (2010) bahwa kadmium dapat menginduksi kerusakan pada fungsi membran dengan merusak komposisi lipid pada membran sel. Penelitian yang dilakukan oleh El-Maraghy dkk. (2001); Wlostowski dkk. (2003) dan Faix dkk. (2005) menyimpulkan bahwa paparan logam berat jenis kadmium menyebabkan perubahan histopatologi dan peroksidasi lipid pada organ liver dan ginjal hewan rodent.

Hasil penelitian ini telah menunjukkan fenomena apoptosis akibat akumulasi logam berat Cd. Hal ini cukup menarik mengingat hasil

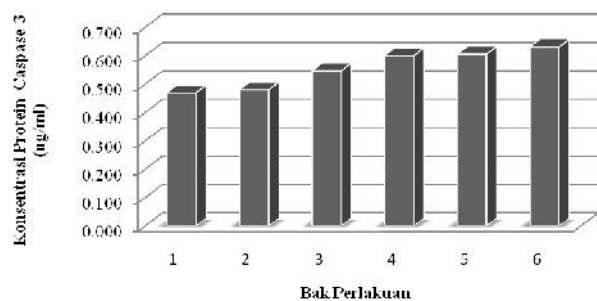


Gambar 1. Hasil pemulasan jaringan hepar *D. setosum* dengan pengecatan *Hematoxilen-Eosin* (HE). Pengamatan dengan mikroskop olympus untuk pemotretan slide blot dengan pembesaran 400x zoom. Gambar dengan Notasi (a) kontrol; (b) konsentrasi 1,0 µg/L Cd; (c) 3,0 µg/L; (d) 6,0 µg/L; (e) 9,0 µg/L; dan (f) 12,0 µg/L. Tanda panah menunjukkan sel hepar yang mengalami apoptosis.

penelitian apoptosis ini dapat dijadikan sebagai model biomonitoring paparan logam berat Cd pada tingkatan seluler dengan menggunakan *D. setosum* sebagai spesies biomonitoring. Dijelaskan oleh Roccheri dkk. (2005) bahwa over-expressed dalam sel-sel yang terpapar logam berat berperan penting untuk mencegah terjadinya kematian sel dan memberikan kontribusi terhadap respon pertahanan seluler akibat stres dan dapat digunakan sebagai model biomonitoring paparan logam berat. Dengan demikian, hasil penelitian pada kasus apoptosis jaringan hepar *D. setosum* dapat digunakan sebagai model biomonitoring seluler paparan logam berat Cd.

Pengaruh Konsentrasi Logam Berat Cd terhadap Konsentrasi Protein Caspase-3 pada Organ Hepar *D. setosum*

Hasil pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* dengan metode *caspase colorimetric assay kit* (Gambar 2) menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi dengan semakin tingginya paparan logam berat Cd. Terlihat bahwa konsentrasi protein *caspase-3*, kadarnya meningkat berturut-turut dari rendah ke tinggi, yakni pada bak 1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 6. Dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi kadar logam berat yang terakumulasi di dalam jaringan hepar *D. setosum* sebagai suatu respons terhadap stress oksidatif oleh adanya logam berat Cd sehingga mengaktifkan dan meningkatkan konsentrasi *caspase-3*.



Gambar 2. Konsentrasi protein *caspase-3* dalam jaringan hepar *D. setosum* akibat paparan konsentrasi logam berat Cd.

Pada sisi lain, hasil pengujian hipotesis dengan *One Way Anova* (Tabel 1), yakni konsentrasi logam berat Cd berpengaruh sangat signifikan terhadap konsentrasi protein *caspase-3* pada organ hepar *D. setosum*, dimana nilai signifikansi lebih kecil dari 0.05 ($p < 0.05$). Selanjutnya, hasil analisis varians yang menunjukkan pengaruh sangat signifikan, kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan 0,05 (Tabel 2), dimana terlihat adanya perbedaan notasi. Perbedaan yang teramati pada kelompok perlakuan konsentrasi Cd menunjukkan pengaruh paparan konsentrasi Cd terhadap konsentrasi protein *caspase-3* pada hepar *D. setosum*.

Konsentrasi Cd secara signifikan meningkatkan konsentrasi protein *caspase-3*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi Cd yang dipaparkan maka konsentrasi protein *caspase-3* yang teraktivasi pada *D. setosum* juga semakin tinggi.

Secara kuantitatif dengan uji *caspase colorimetric assay kit* (Gambar 2) menunjukkan bahwa konsentrasi protein *caspase-3* meningkat seiring dengan semakin tingginya paparan konsentrasi logam berat Cd. Terlihat konsentrasi protein *caspase-3* pada perlakuan konsentrasi 12 $\mu\text{g/L}$ Cd adalah yang paling tinggi dibanding kontrol, dengan tingkat konsentrasi yang paling tinggi. Selain itu, berdasarkan hasil analisis varians (Tabel 1.) menunjukkan bahwa konsentrasi logam berat Cd berpengaruh sangat signifikan ($p < 0.05$) terhadap konsentrasi protein *caspase-3* pada organ hepar *D. setosum*. Di sisi lain, hasil uji lanjut Duncan (Tabel 2.) menunjukkan adanya perbedaan rerata pada kelompok tingkatan konsentrasi Cd. Hasil ini menunjukkan bahwa respons biomolekuler *D. setosum* berupa konsentrasi protein *caspase-3* diaktifkan oleh adanya akumulasi logam berat Cd, dan dapat dikatakan bahwa peningkatan konsentrasi *caspase-3* mengaktifkan terjadinya apoptosis pada hepar *D. setosum* seperti yang terlihat pada Gambar 1. Hal ini berarti bahwa logam berat Cd menginduksi apoptosis lewat aktivasi *caspase-3*.

Tabel 1. Hasil analisis varian, pengaruh konsentrasi logam berat Cd terhadap konsentrasi protein *Caspase-3* pada organ hepar *D. setosum*

Sumber varians		Sum of squares	df	Mean square	Nilai F	Sig. (Nilai p)
Kons. Protein <i>Caspase-3</i>	Between groups	0,165	5	0,033	2,485	0,049
	Within groups	0,477	36	0,013		
	Total	0,642	41			

Tabel 2. Hasil uji Duncan dari hasil analisis varian terdapat pengaruh yang signifikan konsentrasi logam berat Cd terhadap konsentrasi protein *Caspase-3* pada organ hepar *D. setosum* (N = 7).

Konsentrasi logam berat Cd	Rerata konsentrasi protein <i>caspase-3</i> pada organ hepar <i>D. setosum</i>	Notasi Duncan
0.0 (kontrol)	0,46886	a
1,0 µg/L Cd	0,47957	a
3,0 µg/L Cd	0,54643	ab
6,0 µg/L Cd	0,60014	ab
9,0 µg/L Cd	0,60543	ab
12,0 µg/L Cd	0,63086	b

Dijelaskan oleh Dwipoyono (2007); Zhang dkk. (2002) dan Nagata (1997) bahwa *caspase-3* berperan dalam proses regulasi dan eksekusi proses apoptosis. Disisi lain, berdasarkan hasil pengamatan (Gambar 1) terlihat adanya sel hepar *D. setosum* yang mengalami apoptosis. Hasil ini sejalan dengan hasil pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* (Gambar 2), dimana semakin tinggi konsentrasi logam berat Cd yang dipaparkan, maka protein *caspase-3* yang mengaktifasi terjadinya apoptosis menunjukkan hasil yang tinggi. Nagata (1997) menjelaskan bahwa aktivasi *caspase-3* dapat menyebabkan terjadinya apoptosis dan menghasilkan apa terlihat sebagai apoptosis pada Gambar 1.

Peningkatan konsentrasi protein *caspase-3* dapat dikatakan sebagai salah satu mekanisme protektif di dalam sel sehingga mengakibatkan terjadinya apoptosis yang diinduksi oleh logam berat Cd. Logam berat Cd yang meningkatkan konsentrasi protein *caspase-3* memiliki potensi sebagai biomonitoring akumulasi logam berat Cd pada tingkat seluler. Dijelaskan oleh Allen dan Moore (2004) bahwa pengukuran langsung terhadap biomarker paparan logam berat dilakukan untuk menilai perubahan proses kimia dan fisiologi pada tingkatan organisasi. Hal ini berarti bahwa pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* pada *D. setosum* dapat menjadi penanda biologi sekaligus biomonitoring akumulasi logam berat Cd pada tingkat seluler. Dijelaskan oleh Schoettger (1996) bahwa respons yang timbul pada organisasi seluler memang diperlukan untuk memastikan keberadaan logam berat di lingkungan. Russo dkk. (2003) menjelaskan bahwa invertebrata laut memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap tekanan (*stressor*)

logam berat dan memiliki kemampuan untuk merespons kontaminasi logam berat.

KESIMPULAN

Hasil pengukuran konsentrasi protein *caspase-3* dengan *caspase colorimetric assay kit* dan pemeriksaan apoptosis dengan teknik pengecatan HE menunjukkan adanya peningkatan dengan semakin tingginya konsentrasi logam berat Cd. Di sisi lain, *D. setosum* dapat dipakai sebagai alat biomonitoring pencemaran logam berat Cd di laut. Hal ini didasarkan pada hasil analisis pengaruh perlakuan logam berat Cd terhadap protein *caspase-3* pada *D. setosum* yang menunjukkan pengaruh yang sangat signifikan. Kondisi ini mengindikasikan bahwa *caspase-3* pada *D. setosum* dapat digunakan sebagai biomonitoring pencemaran logam berat di laut pada tingkat seluler.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kepala UPT Balai Konservasi Biota Laut LIPI Ambon beserta staf, kepada Kepala Laboratorium Fisiologi dan Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, kepada Prof. Shalihuddin Djalal Tanjung, Ph.D Dosen Ekologi dan Ilmu Lingkungan Fakultas Biologi UGM. Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada Ditjen Dikti Kemendiknas yang telah memberikan BPPS kepada penulis untuk menyelesaikan Program Doktor (S3) Pendidikan Biologi di Program Pascasarjana Universitas Negeri Malang tahun 2010/2011, dan kepada para *reviewer* yang telah mengkoreksi artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnello, M., dan Roccheri, M.C., 2010. Apoptosis: Focus on Sea Urchin Development. *Cell death Res.* 15(3):322-330.
- Agnello, M., Filosto, S., Scudiero, R., Rinaldi, A.M., dan Roccheri, M.C., 2007. Cadmium Induces an Apoptotic Response in Sea Urchin Embryos. *Cell Stress & Chaperones*, 12(1):44-50.
- Allen, J.I., dan Moore, M.N., 2004. Environmental Prognostics: is The Current Use of Biomarkers Appropriate for Environmental Risk Evaluation. *Marine Environ. Res.* 58:227-232.
- Angerer, J., Bird, M.G., Burke, T.A., Doerrer, N.G., Needham, L., Robinson, S.H., Sheldon, L., dan Zenick, H., 2006. Strategic Biomonitoring Initiatives: Moving The Science Forward. *Toxicol. Sci.* 93:3-10.
- Ayeni, O.O., Ndakidemi, P.A., Snyman, R.G., dan Odendaal, J.P., 2010. Chemical, Biological and Physiological Indicators of Metal Pollution in Wetlands. *Scientific Res. & Essays*, 5(15):1938-1949.
- Bielmyer, G.K., Brix, K.V., Capo, T.R. dan Grosell, G., 2005. The Effects of Metals on Embryonal and Adult Life Stages of The Sea Urchin, *Deadema antillarum*. *Aquatic Toxicol.* 74:254-263.
- Caspani, M.L., Savioli, M., Crotti, S., Buzzone, P., dan Gattmoni, L., 2004. Heat Stress: Characteristics, Pathophysiology And Avoidable Mistakes. *Minerva Anesthesiol.*, 70: 617-624.
- Dailianis, S., dan Kaloyianni, M., 2004. Cadmium Induces both Pyruvate Kinase and Na⁺/H⁺ Exchanger Activity Through Protein Kinase C Mediated Signal Transduction, in Isolated Digestive Gland Cellss of *Mytilus galloprovincialis* (L.). *J. Exp. Biol.*, 207:1665-1674.
- Danis, B., Cotret, O., Teyssié, J.L., Bustamante, P., Fowler, S.W., dan Warnau, M., 2005. Bioaccumulation of PCBs in The Sea Urchin *Paracentrotus lividus*: Seawater and Food Exposures to a 14C-radiolabelled Congener (PCB#153). *Environ. Pollut.* 135(1):11-16.
- Dwipoyono, B., 2007. Aktivitas Caspase 3 sebagai Indikator Apoptosis Pada Sel Kanker Ovarium. *Indo. J. Cancer*, 2:63-72.
- El-Maraghy, S.A., Gad, M.Z., Fahim, A.T., dan Hamdy, M.A., 2001. Effect of Cadmium and Aluminum Intake on The Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Rat Tissues. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15:207-221.
- Faix, S., Faixova, Z., Boldizarova, K., dan Javorsky, P., 2005. The Effect of Long-Term High Heavy Metal Intake on Lipid Peroxidation of Gastrointestinal Tissue in Sheep. *Vet. Med-Czech*, 50(9):401-405.
- Flammang, P., Warnau, M., Temara, A., Lane, D.J.W., dan Jangoux, M., 1997. Heavy Metals in *Deadema setosum* (Echinodermata Echinoidea) from Singapore Coral Reefs. *J. Sea Res.* 38:35-45.
- Hall, J.L., 2002. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *J. Exp. Botany*, 53(366):1-11.
- Hall, J.L dan Lorraine, E.W., 2003. Transition Metal Transporters in Plants. *J. Exp. Botany*, 54(393):2601-2613.
- Huang, K.L., Wu, C.P., Chen, Y.L., Kang, B.H., dan Lin, Y.C., 2003. Heat Stress Attenuates Air Bubble-Induced Acute Lung Injury: A Novel Mechanism of Diving Acclimatization. *J. Appl Physiol.* 94:1485-1490.
- Kamrin, M.A., 2004. Biomonitoring Basics. A Report from biomonitoringinfo.org. *Environmental Health Research Foundation*.
- Katschinski, D.M., 2004. On Heat and Cells and Proteins. *News Physiol. Sci.* 19: 11-15.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by Death Factor. *Cell*, 88:355-365.
- Nordic, N., 2003. *Cadmium Review*. Denmark: Prepared by COWI A/S on behalf of the Nordic Council of Ministers.
- Pal, M., Horvarth, E., Janda, T., Paldi, E., dan Szalai, G., 2006. Physiological Changes and Defense Mechanisme Induced by Cadmium Stress in Maize. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 159:230-246.
- Roccheri, M.C., Agnello, M., Bonaventura, R., dan Matranga, V., 2004. Cadmium Induces The Expression of Specific Stress Proteins in Sea Urchin Embryos. *Elsevier*. (online). www.elsevier.com. Diakses 4 September 2010.
- Rumahlatu, D., 2011. Konsentrasi Logam Berat Kadmium Pada Air, Sedimen, dan *Deadema setosum* (Echinodermata; Echinoidea) di Perairan Pulau Ambon. *Ilmu Kelautan-Indo. J. Marine Sci.* 16(2):78-85.
- Rainbow, P.S., Wolowicz, M., Fialkowski, W., Smith, B.D., dan Sokolowski, A., 2000. Biomonitoring of Trace Metals in The Gulf of Gdansk, Using Mussels (*Mytilus trossulus*) and

- Barnacles (*Balanus improvisus*). *Water Res.*, 34:1823-1829.
- Russo, R., Bonaventura, R., Zito, F., Schroder, H., Muller, I., Muller, W.E.G., dan Matranga, V., 2003. Stress to Cadmium Monitored by Metallothionein Gene Induction in Paracentrotus Lividus Embryos. *Cell Stress & Chaperones*, 8(3):232-231.
- Saputra, D., Astuti, E.R., dan Budhy, T.I., 2012. Apoptosis and Necrotic Oral Mucosa Cell Induced by Conventional Dental X-Ray Radiation. *Dental Journal*, 3(1):36-40.
- Schoettger, R.A., 1996. Problems of Aquatic Toxicology, Biotesting and Water Quality Management. *Proceedings of USA-Rusia Symposium, Borok, Jaroslavl Oblast*, Juli 21-23 1996. Published by Ecosystems Research Division Athens.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green D.R., dan Martin, S.J., 1999. Ordering the Cytochrome Cinitiated Caspase Cascade: Hierarchical Activation of Caspase-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in A Caspase-9-Dependent Manner. *J. Cell Biol.* 144:281-292.
- Smiri, M., Chaoui, A., dan Ferjani, E.E., 2010. Interaction between Heavy Metals and Thiol-Linked Redox Reactions in Germination. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 13(18):877-883.
- Soualili, D., Dubois, P., Gosselin, P., Pernet, P., dan Guillou, M. 2007. Assessment of Seawater Pollution by Heavy Metals in the Neighbourhood of Algiers: Use of Sea Urchin, *Paracentrotus lividus*, as Bioindicator. Email: mguillou@univ-brest.fr. Diakses 8 September 2010.
- Temara, A., Skei, J.M., Gillan, D., Warnau, M., Jangoux, M., dan Dubois, P., 1998. Validation of the Asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) as A Bioindicator of Spatial and Temporean Trends of Pb, Cd, and Zn Contamination in the Field. *Marine Environ. Res.*, 45(4/5):341-356.
- Tosepu, R., 2012, Laju Penurunan Logam Berat Plumbum (Pb) dan Cadmium (Cd) oleh Eichornia crassipes dan Cyperus papyrus. *Jurnal Manusia dan Lingkungan*, 19(1):37-45.
- Warnau, M., Ledent, G., Temara, A., Bouquegneau, J.M., Jangoux, M., dan Dubois, P., 1995. Heavy Metals in *Posidonia oceanic* and *Paracentrotus lividus* from Seagrass Beds of Northwestern Mediterranean. *Sci. Total Environ.*, 171:95-99.
- Wlostowski, T., Krasowska A., dan Bonda E., 2003. An Ironrich Diet Protects The Liver and Kidneys Against Cadmium-Induced Injury in The Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicol. & Environ. Safety*, 54:194-198.
- Zhang, X., Chen, J., Graham, S.H., Du, L., Kochanek, P.M., Draviam, R., Guo, F., Nathaniel, P.D., Szabo, C., dan Watkins, S.C., 2002. Intranuclear Localization of Apoptosis-Inducing Factor (AIF) and Large Scale DNA Fragmentation after Traumatic Brain Injury in Rats and in Neuronal Cultures Exposed to Peroxynitrite. *J. Neurochem.*, 82:181-191.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., dan Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An Appealing Tool for Assessment of Metal Pollution in The Aquatic Ecosystem. *Anal. Chim. Acta*, 606:135-150.