

RESPON TIMULIN PADA HATI IKAN BANDENG (*Chanos chanos* Forskall) YANG TERCEMAR LOGAM TIMBAL (Pb)

Frida Alifia

Dosen Sekolah Tinggi Teknologi Kelautan Balik Diwa Makassar

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon timulin pada hati ikan bandeng sebagai biomarker akibat kerusakan sel yang disebabkan oleh tercemar logam Pb. Pengaruh interaksi Pb terhadap hati diketahui dengan melakukan paparan logam terhadap ikan bandeng melalui air laut. Konsentrasi $PbCl_2$ yang dipaparkan pada ikan bandeng adalah 0,625 mg/L, 1,25 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, dan tanpa $PbCl_2$ sebagai kontrol. Kualitas air dan sintasan diukur, dan tingkah laku ikan diamati. Perubahan yang terjadi pada hati dianalisa dengan teknik histokimia untuk melihat perubahan selular. Sedangkan ekspresi timulin pada organ hati dianalisa dengan imunofluoresen. Hasil memperlihatkan bahwa $PbCl_2$ dapat menginduksi perubahan jaringan hati sebesar 100%. Paparan $PbCl_2$ pada jaringan hati memperlihatkan ekspresi timulin dengan intensitas 181,25 pada kontrol. Terjadi peningkatan intensitas pada konsentrasi Pb 1,25 dan 20 mg/L yaitu 245 dan 244, dan penurunan pada konsentrasi 10 mg/L yaitu 94.

Kata kunci: Bandeng, Hati, Konsentrasi, Timbal, Timulin.

PENDAHULUAN

Timulin adalah peptida yang tersusun dari sembilan residu asam amino (nanopeptida). Timulin merupakan hormon timik yang dihasilkan dari sel epitelial timus. Nanopeptida ini dapat meningkatkan diferensiasi dan fungsi sel imun spesifik seperti limposit T (sel T), dapat menambah aktifitas limposit T dan sel NK, dan berperan dalam proses inflamasi (peradangan) sebagai respon terhadap toksikan.

Pb merupakan logam berat bersifat toksik di dalam perairan (Purnomo, 2007) dan paling banyak menimbulkan dampak pencemaran. Pb dapat dengan mudah terikat dengan protein di dalam jaringan tubuh sehingga mengganggu berbagai fungsi fisiologis, menurunkan sistem kekebalan tubuh, hingga mortalitas (Darmono, 1995). Logam ini dapat memberi pengaruh langsung maupun tak langsung terhadap timulin.

Pengaruh tersebut melalui *ligan binding*, detoksifikasi melalui induksi metallothionein yang mampu mempengaruhi kerja timulin (Ikebuchi, 1986), maupun melalui stimulasi proses imunotoksik yang dapat mengaktifkan timus sebagai salah satu kelenjar sentral sistem imun. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi Pb dapat mempengaruhi keberadaan dan fungsi timulin.

Pada polusi logam Pb, banyak identifikasi organ seperti pada hati yang telah dilakukan. Hal ini karena hati merupakan salah satu organ penyimpanan logam yang terakumulasi (Olojo, 2005), juga penting dalam proses detoksifikasi bahan anorganik asing yang berpotensi mengganggu metabolisme tubuh.

Aktifitas biologi timulin sangat dipengaruhi oleh zinc (Prasad, *et al.*, 1988). Hal ini ditunjukkan oleh aktifitas sirkulasi timulin

yang memperlihatkan penurunan ketika terjadi defisiensi zinc di dalam tubuh.

Tingginya nilai ekonomis ikan bandeng dan gairah masyarakat dalam membudidaya, menjadi alasan untuk melakukan penelitian guna mengetahui tingkat kesehatan ikan akibat dampak logam Pb terhadap organ hati ikan bandeng dan ekspresi timulin terhadap kerusakan yang diakibatkan oleh logam timbal.

Tujuan penelitian ini mengetahui bentuk histopatologi dan ekspresi timulin pada hati ikan bandeng (*Chanos chanos* Forsskal) yang terpapar logam timbal.

Diharapkan bermanfaat bagi penggunaan timulin sebagai biomarker atas dampak kontaminasi logam terhadap kerusakan jaringan ikan.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Oktober 2008 - April 2009 di Laboratorium Penyakit Ikan dan Lingkungan BBAP Situbondo dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan: albumin mayer, alkali yodida, amilum, aquades, entellan, eosin, eriochrome black T, etanol, formalin, FCS, fenolftalin, H₂SO₄, haematoxilin, *goat IgG fluorescein labeled* (KPL), mangan sulfat, methyl orange, Na₂EDTA, *osaka fish food* (Central Proteinaprima), paraffin, PbCl₂ (Merck), PbNO₃ (Merck), PBS, *rabbit-anti timulin* (RayBiotech), triton-X, dan xylene.

Alat yang digunakan: akuarium vol 120 liter, bak vol 15 liter, aerator, dissecting set, *convocal laser scanning microscope* (CLSM), histoembedder, mikrotom, staining jar, mikroskop DIC, GF-AAS.

Perlakuan hewan uji

Juvenil ikan bandeng (*Chanos chanos Forskal*) yang digunakan berukuran rata-rata 8-12 cm diadaptasi dalam akuarium volume 120 liter dengan suplay O₂ lebih besar dari 3 ppm, salinitas 34 ppt, dan pH air berkisar 7-8. Pakan pellet diberikan sebanyak 2 kali sehari selama 14 hari masa adaptasi dan pergantian air dilakukan setiap hari sebanyak 100%.

Pemaparan PbCl₂ dilakukan di dalam wadah ember yang berisi air laut volume 10 liter, dengan hewan uji sebanyak 8 ekor setiap unitnya. Konsentrasi PbCl₂ yang digunakan adalah 0,625 mg/L; 1,25 mg/L; 2,5 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L, 20 mg/L, dan tanpa PbCl₂ (kontrol). Air diperbaharui 100% setiap harinya. Tingkah laku dan sintasan diamati.

Analisa Kualitas Air

Kualitas air diamati sebelum dan selama pemaparan logam. Parameter yang diamati meliputi suhu, salinitas, DO, pH, alkalinitas, dan kesadahan dengan menggunakan standar Greenberg, (1985) dan SNI No. 06-6989. Sedangkan kandungan Pb dianalisa dengan menggunakan metode atomic absorption spectrometer (AAS) berdasarkan standar Greenberg (1985).

Sample preparat imunofluorescen

Ikan terlebih dahulu dianastesi dengan minyak cengkeh, lalu bagian hati diangkat.

Prosedur preparasinya menggunakan metode standar Luna (1960) dan Bancroft (1982). Terlebih dahulu spesimen dimasukkan dengan segera ke dalam fiksatif formalin 10% dan dibiarkan selama 24 jam, lalu dicuci dengan alkohol 70%.

Analisa histokimia

Teknik histokimia dilakukan untuk mengetahui bentuk histopatologi jaringan hati. Prosedurnya menggunakan metode standar Luna (1960) dan Suntoro (1983), yaitu dengan menggunakan metode paraffin dengan pewarnaan Haematoxilin-Eosin.

Tingkat kerusakan organ diklasifikasikan berdasarkan metode Mitchel (Oktavianti, 2005) yang dimodifikasi. Persentase kerusakan organ dihitung berdasarkan metode yang digunakan Kim (2006) dalam Raza'i (2008).

Analisa imunofluoresen

Ekspresi timulin pada hati ditentukan dengan menggunakan metode imunofluoresen berdasarkan standar luna (1960), Bancroft (1982), dan Rantam (2003). Spesimen dideparafinasi, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Irisan jaringan ditetesi Triton-X plus FCS pada suhu ruang, lalu dicuci PBS sebanyak 3 kali. Kemudian dilabel *rabbit-anti thymulin* selama semalam, lalu dicuci PBS sebanyak 3 kali. Irisan jaringan dilabel dengan antibody sekunder (*goat IgG fluorescein*

labeled) selama 1 jam pada, di cuci PBS sebanyak 3 kali. Tahap ini dilakukan pada ruang gelap. Kemudian dimounting dengan gliserin tetap pada ruang gelap. Irisan jaringan tersebut lalu diamati di bawah CLSM juga dalam ruang gelap, dengan perbesaran 400 kali. Intensitas timulin dicatat.

Analisis Data

Hasil analisa histokimia dan dan imunofluoresen dianalisis secara deskriptif. Data intensitas timulin dan sintasan diolah dengan analisis varian (ANOVA). Kemudian dilanjutkan pada Uji BNT untuk mengetahui perbedaan antar tiap perlakuan berdasarkan selang kepercayaan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Histopatologi Hati

Hati memiliki struktur lobular yang terdiri dari sel-sel parenkim (hepatosit) dan terdapat vena kecil ditengah lobulus. Darah dari arteri hepatica yang membawa banyak oksigen dan darah vena porta yang membawa kandungan nutrisi, masuk ke dalam hati dan bertemu di dalam kapiler yang disebut sinusoid. Darah tersebut kemudian akan mengalir ke dalam vena di tengah lobulus. Terdapat sel Kupffer pada sisi sinusoid, sedangkan sel-sel hepatosit terletak diantara sinusoid membentuk struktur berlereng dan kanal bile terletak pada tengah setiap lereng tersebut (Hibiya, 1982).

Tabel 1. Persentase Kerusakan Jaringan Hati Ikan Perlakuan

Perlakuan (mg/L)	Rataan Sel per Lapang	Jenis Kerusakan					Perubahan Refersibel (%)	Perubahan Irrefersibel (%)
		CS	DL	A	L	N		
0	869	2	8	-	-	-	1	-
0,625	837	725	9	-	-	-	88	-
1,250	1114	-	-	774	150	190	-	31
2,50	1095	339	145	-	50	561	44	56
5	958	574	-	-	-	384	60	40
10	935	-	496	-	-	439	53	47
20	962	361	-	-	-	600	38	62

Keterangan: CS= Cloudy Swelling, DL= degenerasi lemak, A= Atropi, L= Lisis, N= Nekrosis.

PbCl₂ merupakan satu dari bahan reaksi yang cukup banyak digunakan dan telah diteliti pengaruhnya terhadap sistem imun pada beberapa hewan (Nishizaki, 2003). Dibandingkan dengan kontrol (Gambar 1a), perubahan yang tergambar pada hati terdiri dari *cloudy swelling* pada konsentrasi Pb 0,625 mg/L dengan sedikit degenerasi. Pada konsentrasi 1,25 mg/L terjadi lisis, atropi, dan nekrosis. Sedangkan nekrosis pada konsentrasi 2,5 mg/L mengikuti *cloudy swelling* dan degenerasi. Begitu pula yang terjadi pada konsentrasi Pb 5, 10, dan 20 mg/L. Selain itu juga terbentuk jaringan ikat pada kapiler darah dan parenkim hati, begitu juga sentralisasi nekrosis. Penggenangan darah pada vena yang terjadi tidak dapat dibendung, masuk ke dalam sinusoid dan terjadi penyumbatan yang terlokalisasi (kongesti).

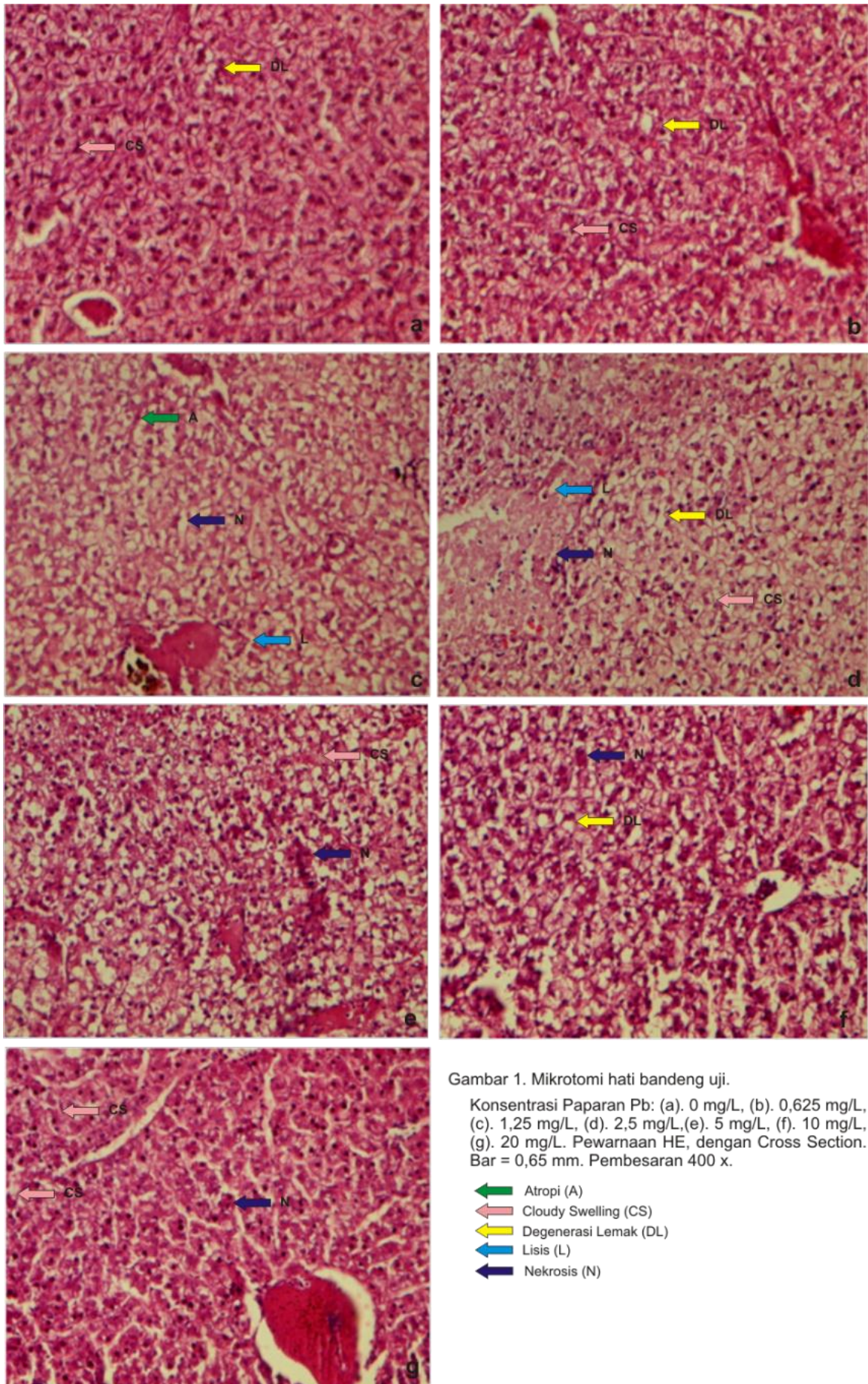
Persentase kerusakan jaringan dapat dilihat pada Tabel 1 di atas. Dari jumlah sel yang ada terlihat kerusakan semakin tinggi dan persentase kerusakan sel yang tinggi terjadi

sejak konsentrasi paparan Pb 1,25 - 20 mg/L. Hal ini menandakan bahwa seluruh sel hepatosit yang diamati mengalami perubahan (100%).

Eksresi Timulin

Metode Immunofluoresen dengan menggunakan *Rabbit Anti-Thymulin* pada organ hati, memperlihatkan pendaran yang berbeda pada tiap perlakuan, sedangkan rataan intensitas timulin tampak fluktuatif (Gambar 2). Intensitas mengalami peningkatan pada konsentrasi pemaparan Pb 1,25 dan 20 mg/L, dan penurunan terjadi pada konsentrasi 0,625 dan 10 mg/L dibandingkan kontrol.

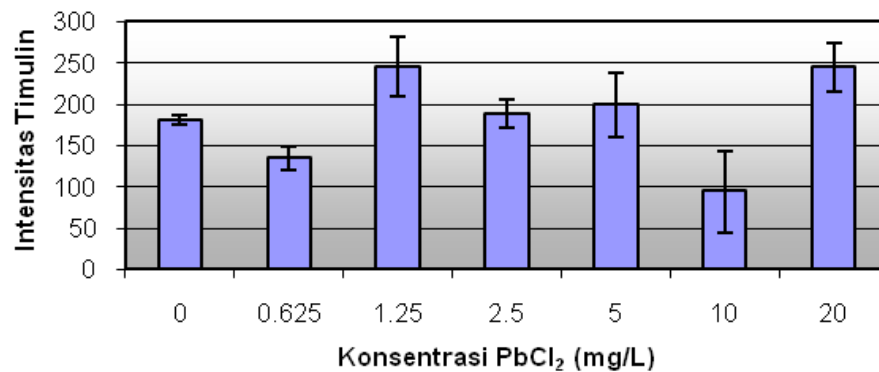
Secara normal, timulin terdapat pada jaringan hati. Diduga timbulnya respon timulin berhubungan dengan sistem pertumbuhan sel yang terjadi pada sel hati dengan melibatkan faktor-faktor pertumbuhan sel berupa *insulin-like growth factor* (IGF-1). Kematian sel dapat menstimulasi ekskresi IGF-1 dari sel hati. Faktor pertumbuhan ini akan mengatur respon sitokin dan memfasilitasi regenerasi (Sanz, 2005).



Gambar 1. Mikrotomi hati bandeng uji.
 Konsentrasi Paparan Pb: (a). 0 mg/L, (b). 0,625 mg/L, (c). 1,25 mg/L, (d). 2,5 mg/L, (e). 5 mg/L, (f). 10 mg/L, (g). 20 mg/L. Pewarnaan HE, dengan Cross Section. Bar = 0,65 mm. Pembesaran 400 x.

- ← Atropi (A)
- ← Cloudy Swelling (CS)
- ← Degenerasi Lemak (DL)
- ← Lisis (L)
- ← Nekrosis (N)

Rataan Intensitas Timulin

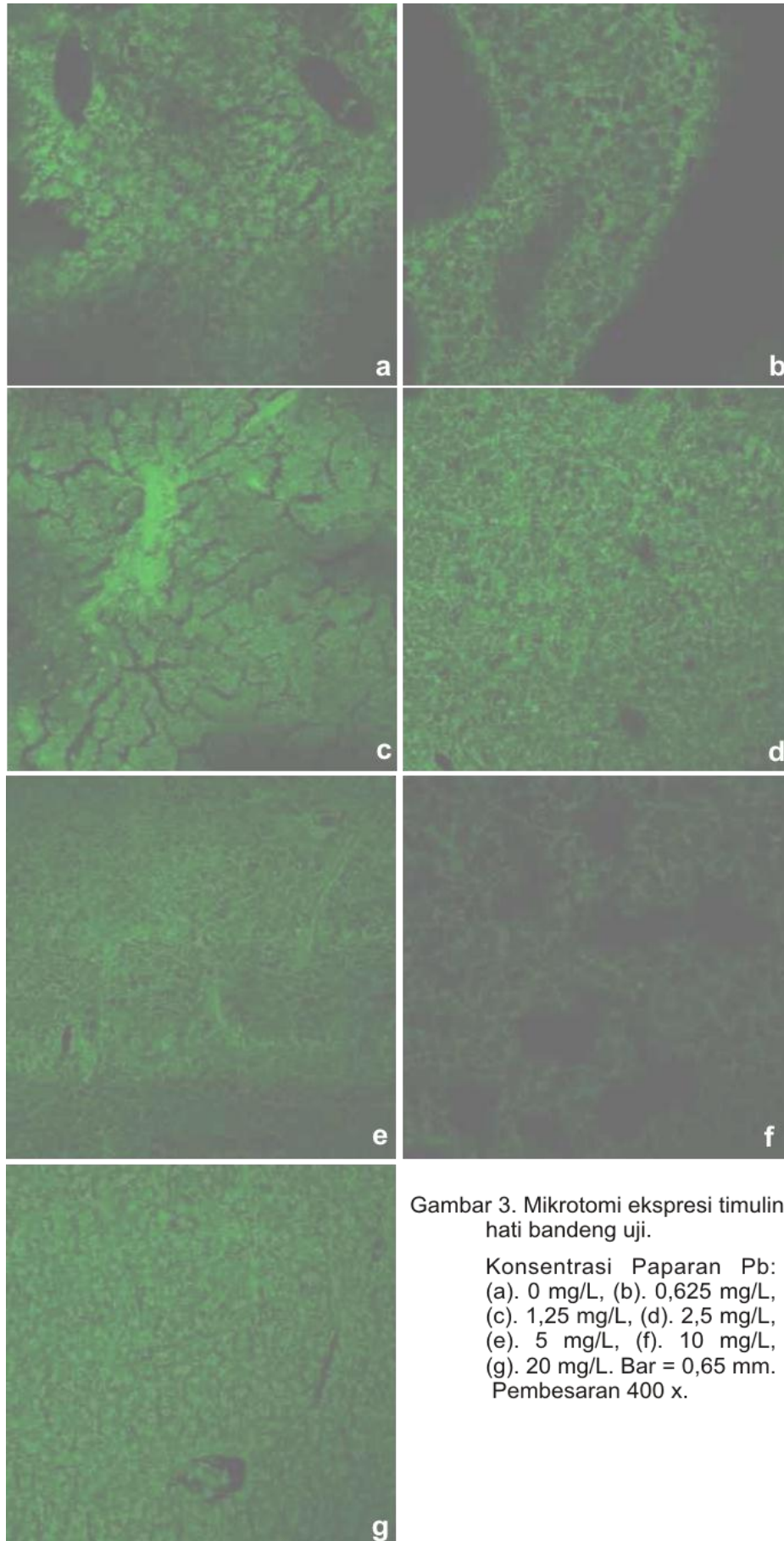


Gambar 2. Grafik rata-rata intensitas timulin pada hati bandeng uji

Penurunan dan peningkatan timulin pada hati yang terpapar logam dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya adalah respon imunitas selular dan inflamasi akibat kerusakan jaringan. Pb dapat melakukan mekanisme langsung dan tidak langsung terhadap timulin. Mekanisme langsung dapat berupa pengikatan Pb terhadap residu amino lisin (Connel, 1995), atau berkompetisi dengan Zn dalam pengikatannya terhadap timulin (Santarelli, 2005), sehingga aktifitas timulin terganggu. Mekanisme tidak langsung dapat berupa Pb merusak sel hati yang menyebabkan penurunan IGF-1 (Pine, 2006), sehingga mengurangi stimulasi sintesis timulin dan kandungan timulin menurun. IGF-1 berperan dalam mengontrol fungsi timulin (Timsit, 1992). Selain itu, diperkirakan timulin telah menstimulasi sitokin tertentu dalam menanggulangi kerusakan dan kematian sel, dalam hal ini adalah faktor-faktor inflamasi, fibrosis, dan proliferasi sel hati.

Ketika Pb masuk ke dalam kompartemen hati melalui sirkulasi, akan dapat menimbulkan berbagai respon sel. Sel Kupffer berperan sebagai pagositik selular dalam pertahanan pertama terhadap toksikan (Pangliara, 2003). Sel pagosit tersebut dapat menangkap logam yang masuk ke dalam kapiler darah. Selanjutnya sel tersebut akan memproduksi sitokin untuk menarik sel-sel imun spesifik dan pagosit lainnya seperti limfosit dan monosit ke sumber sitokin. Disamping itu, diduga sel hati berperan dalam ekskresi timulin.

Timulin dapat aktif secara biologis setelah mengikat zinc pada beberapa residu asam basa. Sekresi zinc-timulin ini dapat diregulasi oleh IL-1, IGF-1, *nerve growth factor* (NGF), atau berbagai hormon termasuk *Growth Hormone* (GH) (Masek, 2003). Diduga sitokin yang diproduksi oleh sel Kupffer berupa IL-1 juga menstimulasi ekresi timulin dari sel epitel timus. Timulin aktif tersebut juga dapat mengikat reseptor sel T melalui kontak langsung sel T terhadap sel epitelium timus, sehingga kemudian timulin



Gambar 3. Mikrotomi ekspresi timulin hati bandeng uji.

Konsentrasi Paparan Pb:
(a). 0 mg/L, (b). 0,625 mg/L,
(c). 1,25 mg/L, (d). 2,5 mg/L,
(e). 5 mg/L, (f). 10 mg/L,
(g). 20 mg/L. Bar = 0,65 mm.
Pembesaran 400 x.

dapat berperan dalam proses proliferasi sel T baik di dalam maupun di luar timus. Dengan demikian, akan banyak limfosit T yang keluar ke sistem sirkulasi menuju sumber sitokin. Demikian juga kandungan timulin pada sirkulasi dapat naik, Ketika timulin diproduksi oleh timus, hormon ini dapat mencapai sirkulasi dan berperan terhadap berbagai organ tubuh.

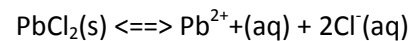
Kualitas Air

Pada Pengamatan parameter kualitas air pada tabel 2, rata-rata memiliki nilai yang masih dalam ambang batas aman. Nilai akilinitas masih dalam kategori yang baik (< 500 mg/liter CaCO₃). Sifat kesadahan air yang diperoleh sangat tinggi (>300 mg/liter CaCO₃) sehingga air dapat dikatakan sangat sadah.

Pada perairan laut, kadar timbal bersekitar 0,025 mg/L. Hasil pengamatan logam Pb pada air laut yang digunakan diperoleh nilai sebesar 0,28 mg/L. Nilai ini dapat dikatakan cukup tinggi, juga jika dibandingkan dengan kriteria baku mutu kualitas air dalam PPRI no. 20 Tahun 1990 tentang pengendalian pencemaran air yang diperuntukkan bagi keperluan perikanan dan

peternakan, yang sebesar 0,03 ppm. Namun dengan melihat tingkat kesadahan air sebagaimana di atas, nilai Pb ini tidak berbahaya bagi ikan.

Meskipun terjadi kerusakan dan perubahan yang besar pada hati, ikan tidak mengalami mortalitas yang signifikan. Diduga hal ini disebabkan oleh tingkat kelarutan PbCl₂ di dalam air lebih rendah sehingga menjadi tidak terlalu toksik jika dibandingkan jenis garam Pb yang lebih larut seperti nitrat dan halida. Kelarutan PbCl₂ dalam air adalah 9.9 g/L at 20 °C. Ketika PbCl₂ diencerkan dalam air, akan terbentuk kesetimbangan berikut:



Dengan Ksp = 1.17 x 10⁵. Toksisitas Pb dapat dipengaruhi tingkat *hardness* pada perairan. Pada perairan yang sangat sadah, kelarutan Pb makin kecil. Pb akan terikat dengan kation-kation penyusun kesadahan (kalsium dan magnesium) membentuk senyawa kompleks dengan logam tersebut, sehingga sifat toksik dari logam Pb dapat dihambat (Effendi, 2003).

Tabel 2. Data kisaran kualitas air selama pemaparan

No	Parameter	Kisaran Data Pengamatan
1	Suhu (°C)	27 - 29
2	Salinitas (ppt)	34
3	pH	7,5 - 7,9
4	DO (mg/L)	4,9 - 6
5	Alkalinitas	180 - 120
6	Kesadahan	3400 - 3000
7	Pb	0,28

Sintasan dan Tingkah Laku

Pada masa adaptasi, tingkah laku ikan memperlihatkan aktifitas yang normal baik perenang maupun pergerakan operkulum. Ikan berenang aktif berkeliling mengikuti gerak populasinya. Sedangkan pergerakan operkulum nampak normal. Beberapa terdapat ikan yang stres dan sakit. Hal tersebut ditandai dengan perenangannya yang lebih lambat, terpisah dan menjauh dari kelompoknya. Ikan yang sakit lebih sering berenang ke permukaan air atau diam pada dasar kolam. Ikan yang sakit ini kemudian dipisahkan.

Pada masa pemaparan logam, tampak tingkah laku yang variatif. Pada konsentrasi logam yang rendah, umumnya ikan aktif berenang dengan pergerakan operkulum yang normal. Pada medium yang mengandung konsentrasi yang tinggi, ikan tampak lebih lambat pergerakannya dan lebih sering diam pada dasar media, dan pergerakan operkulum yang lebih lebar. Hal ini diduga gangguan fisiologis yang mempengaruhi sistem pernafasan ikan akibat paparan timbal.

KESIMPULAN

Paparan $PbCl_2$ yang aman berdasarkan histopatologi hati pada konsentrasi 0,625 mg/L.

Jaringan hati yang terpapar timbal menimbulkan ekspresi timulin dengan intensitas 181,25 pada kontrol. Setelah paparan $PbCl_2$, intensitas meningkat pada konsentrasi 1,25 dan 20 mg/L yaitu 245 dan

244, dan penurunan pada konsentrasi 10 mg/L yaitu 94.

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai keterkaitan imunitas dengan inflamasi, dan ekspresi timulin berbagai organ tubuh. Penting untuk menandai aktifitas biologi timulin di bawah kondisi tercemar toksikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Brancoft, J.D. and Steven, A. 1982. Theory and Practice of Histological Techniques, Second Edition. Churchill Livingstone Inc. US America.
- Connel, D.W. 1995. Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran, Penerbit UI. Jakarta. 520p.
- Darmono, 1995. Logam Dalam Sistem Biologi Makhluk Hidup. UI Press. Jakarta.
- Effendi, H. 2003. Telaah Kualitas Air, Bagi Pengelolaan Sumber Daya dan Lingkungan Perairan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Greenberg. A.T., Trussell, R.R., Clesceri, L.S. 1985. Standard Methods for The Examination Water and Freshwater. American Public Health Association, Washington.
- Hibiya, T. (edited) 1982. An Atlas of Fish Histology, Normal And Pathological Features. Kodansha Ltd. Japan.
- Luna, L.G. 1960. Manual of Histologic Staining Methods, Third Edition, Institute of Pathology. McGraw Hill Inc, US America.
- Oktavianti, R., Harini, M., dan Handajani, N.S. 2005. Struktur Histologis Hepar (*Mus Musculus* L.) Setelah Pemberian Aspartam Secara Oral. *ENVIRO* 5 (1): 30 - 32. UNS Surakarta.
- Olojo, E.A.A., et al. 2005. Histopathology of The Gills and Liver Tissues of The African Cutfish *Clarias gariepinus* Exposed to Lead. *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (1) pp. 117-122

- Prasad, A. S., et al. 1988. Serum Thymulin in Human Zinc Deficiency. The American Society for Clinical Investigation, Inc vol. **82**, 1202-1210.
- Purnomo, T., dan Muchyiddin. 2007. Analisis Kandungan Timbal (Pb) pada Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) di Tambak Kecamatan Gresik. Neptunus Vol **14**, No. 1, Juli 2007: 68-77.
- Raza'i, R. S. 2008. Analisis Histopatologi Organ Insang dan Usus Ikan Kerapu (*Epinephelus coloides*) Yang Diberikan Khamir laut Sebagai Immunostimulan. Tesis. Minat Bioteknologi Perikanan dan Kelautan Jurusan Budidaya Perairan Program Pascasarjana Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, universitas Brawijaya, Malang.
- Santarelli et al. 2005. Reduced Thymulin Production During Occupational Exposure to Lead. Abstract G. Ital. Med. Lay. Ergon. Suppl **1**:68-72.
- Sanz, S., et al. 2005. Expression of Insulin Growth Factor-1 by Activated Hepatic Stellate Cells Reduces Fibrogenesis and Enhance Regeneration After Liver Injury. Gut 2005 : **54** : 134-141
- Suntoro, S.H., 1983. Metode Pewarnaan (Histologi dan Histokimia). Penerbit Bhatara Karya Aksara, Jakarta. 395 hal.
- SNI. Oksigen Terlarut Yodometri. No. 06-6989, hal 14-24.
- Timsit, J., et al. 1992. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Stimulate Hormonal.