

HISTOPATOLOGIS HEPAR DAN MIKROANALISIS UNSUR LOGAM BERAT DAGING IKAN NILA, *Oreochromis niloticus* SEBAGAI BIOMARKER KONTAMINAN DI KOLAM PASCA TAMBANG BATUBARA

Sudrajat¹⁾, Lariman²⁾, Rudi Kartika³⁾, Widha Prahastika⁴⁾

^{1,2,3,4)} Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam UNMUL

Jl. Barong Tongkok, Kampus Unmul Gn Kelua, Samarinda

email: sudrajat.fmipa@gmail.com

Abstract

*Biomarkers in fish are considered to be one indicator of the level of exposure and response to pollutants in a body of water. The purpose of this study was to evaluate the histopathological structure of the liver and bioaccumulation of heavy metal elements in Tilapia meat as a biomarker of environmental pollution in post coal mining ponds. Tilapia samples come from three different post-mining ponds, namely from the control pond, Godlstar pit (10 years old) and Senong pit (5 years). Heavy metal content in fish meat was analyzed using Sanning Electron Microscopy combined with an Energy Dispersive tool X-ray (SEM-EDX). The results showed that the level of accumulation of heavy metals (K, Cu, Zn) in fish samples with the highest percentage of metal elements was Cu between 1.48-1.74%; Zn between 0,80-1.17% and K between 1.58-2.43% and all of these percentages are greater than those of the control fish. Histological lesions in the liver of Tilapia, *O. niloticus* are in line with the accumulation of metals in meat. The levels of Cu and K in meat are more low in longer ponds, higher Zn percentage in old ponds. These results provide evidence that microanalysis of metal elements in tissue with SEM-EDX and fish liver histopathology as pollutant biomarkers can be a sensitive indicator of pollutant exposure in post-coal mine land waters. The findings of this study are expected to be used as consideration in the aspect of diagnostic methods in monitoring fish health status and quality of fish products originating from post-mining ponds.*

Keywords: Biomarkers, histopathology, heavy metals, SEM-EDX, Oreochromis niloticus

PENDAHULUAN

Polusi logam telah menjadi masalah lingkungan di banyak negara selama beberapa dekade, dan ada kebutuhan besar untuk memahami bioakumulasi dan toksisitas logam dalam organisme akuatik (Wang et al 2008). Mineral termasuk beberapa logam memiliki kunci dan peran penting dalam evolusi biokimia. Beberapa elemen itu diketahui melakukan fungsi-fungsi penting untuk kehidupan meliputi: Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Cr dan Zn. Jenis logam lainnya sangat beracun (mis. Cd, Pb dan Hg) dan mekanisme homeostatis diperlukan untuk mengontrol kadarnya di dalam sel. Kehidupan organisme yang hidup sangat bergantung pada regulasi penyerapan yang tepat, kompartemen intraseluler dan kemudian logam ditranslokasikan (Guerinot and Salt, 2001).

Dalam kegiatan pemanfaatan kolam pasca tambang batubara untuk budidaya perairan, masyarakat dihadapkan terhadap adanya kandungan logam berat Fe, Al, Pb, Zn, Cd dan Cu yang tinggi di air dan sedimen (Wahyuni dkk., 2013). Hasil penelitian Tjakrawidjaja, dkk (2001), melaporkan bahwa di dalam budidaya ikan nila merah di lahan pasca tambang berumur 25 tahun dengan pola jaring terapung menyebabkan daging ikan mengandung logam Pb, Cu, Zn, Hg, Cd dan Sn di bawah nilai ambang batas, namun tetap menyebabkan terjadinya kerusakan organ hati.

Meningkatnya kontaminasi logam akan menyebabkan berbagai perubahan morfologis, fisiologis, dan biokimiawi pada organisme akuatik. Logam berat yang terlarut dalam badan perairan pada konsentrasi tertentu akan menjadi sumber racun bagi organisme di perairan. Pencemaran logam berat diduga dapat memicu kerusakan secara struktural dan fungsional pada berbagai organ ikan. Salah satu organ yang sensitif terhadap pencemaran adalah hati. Hati melakukan fungsi penting yang berkaitan dengan detoksifikasi senyawa toksis di dalam tubuh sehingga dapat dijadikan indikator adanya pencemaran perairan.

Dampak bioakumulasi logam berat di berbagai organ ikan dengan studi ultrastruktural dapat memainkan peran penting dalam diagnosis penyakit ikan yang disebabkan oleh logam berat (Zeitoun dan Mehana, 2014; Aldoghachi, 2016). Biomarker pada ikan dianggap sebagai parameter yang relevan untuk menyediakan indikator tingkat keterpaparan dan / atau efek pencemar yang terintegrasi dalam lingkungan akuatik (Miranda et al., 2008) dan dapat berfungsi sejak dini sinyal peringatan degradasi lingkungan (Lam and Gray, 2003).

Biomarker histologis memberi informasi tentang perubahan pada struktur jaringan, yang mungkin memiliki hubungan fungsional penting dengan fungsi fisiologis penting dalam organ-organ penting. Tergantung pada intensitas respons, variasi struktur histopatologis dapat menginformasikan secara baik respons adaptif terhadap lingkungan yang berubah atau, dalam kasus perubahan kondisi yang parah, ditunjukkan oleh sel yang rusak dan kematian (Au 2004; Vandeputte et al 1994).

Adanya upaya pemanfaatan secara besar-besaran kolam bekas tambang batubara untuk dimanfaatkan sebagai kegiatan budidaya perikanan, memerlukan informasi dasar jenis-jenis ikan yang dapat bertahan hidup dan sehat. Namun, hingga saat ini sangat sedikit kegiatan penelitian yang mengembangkan metode histopatologis sebagai salah satu teknik analisis dalam penentuan kelayakan kegiatan budidaya perikanan di dalam Danau bekas tambang. Hal ini mendorong untuk melakukan penelitian mengenai kondisi histopatologi organ hati dan mikroanalisis kandungan unsur logam berat di dalam jaringan sebagai salah satu biomarker di dalam mendiagnosa status kesehatan ikan yang dipelihara di dalam kolam pasca tambang batubara. Temuan penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan di dalam aspek metode diagnosa dalam studi kelayakan pemanfaatan danau pasca tambang batubara untuk kegiatan budidaya ikan.

METODE PENELITIAN

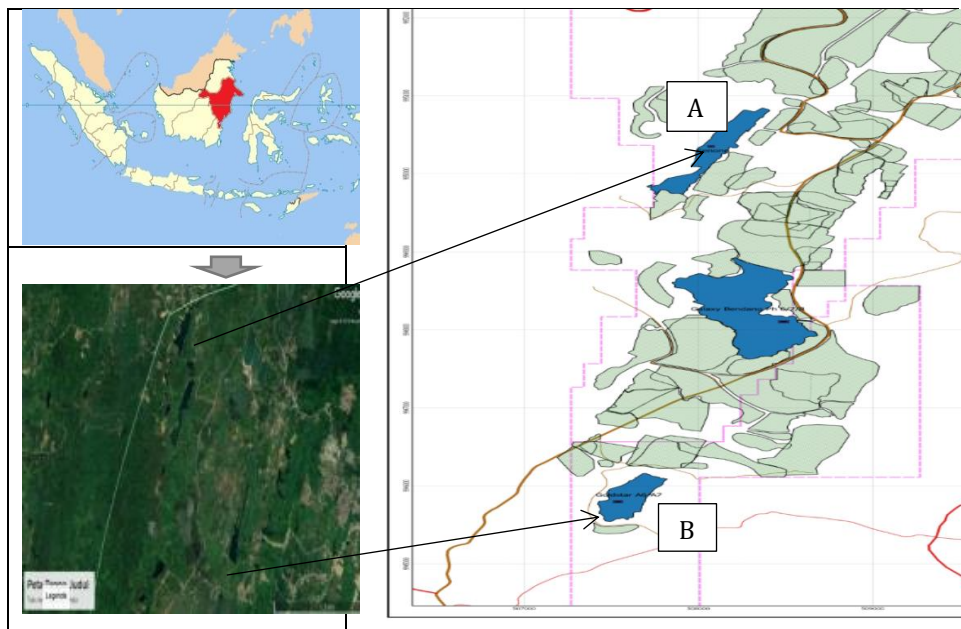
Bahan dan Alat

Ikan contoh ditangkap dari tiga lokasi kolam pasca tambang yakni kolam pasca tambang Pit 1 Senong(5 tahun), kolam Pit 2 Goldstar(10 tahun) dan kontrol (Lihat Gambar 1).Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sampel ikan nila, akuades, dan beberapa bahan kimia yang mencakup asam nitrat (HNO_3), asam perklorat (HClO_4) (Merck), larutan fikasif, methanol, ethanol, toluol, xylol, HE staining.

Alat yang digunakan adalah jaring insang, alat bedah, labu ukur 50 ml (Pyrex), oven (Memmert), kertas saring, hot plate, desikator, erlenmeyer (Iwaki Pyrex), pipet volumetrik (Pyrex), bulb, mortar, cawan petri, staining jar, mikrofograf, dan SEM yang dikombinasi dengan EDS.

Sampel Ikan

Sampel ikan nila, *O.niloticus* berukuran antara 15–17cm panjang total, diambil masing masing sebanyak 10 ekor dari setiap keramba. Ikan dibiuis dan kemudian dibedah dengan sayatan memanjang di sepanjang sisi ventral. Ikan bagian perut dibedah, diambil daging dan heparnya dan kemudian dipotong-potong kecil, dan segera diproses untuk studi.



Gambar 1. Lokasi Penelitian

Keterangan; 1. Kolam Pasca Tambang Pit A Senong
2. Kolam Pasca Tambang Pit B Goldstar

Preparasi analisis histologis

Potongan organ hepar difiksasi dalam larutan Bouin selama 12-16 jam. Setelah fiksasi, jaringan dicuci dengan etanol 70%, didehidrasi dalam seri etanol bertingkat, dan dibersihkan dalam xylene. Kemudian jaringan diinfiltrasi dalam lilin parafin di 56-58° C di dalam oven selama 1 jam dan diproses dengan metode parafin block. Parafin block kemudian dipotong dengan menggunakan rotary microtome dengan ketebalan 4 μ m. Setelah pemrosesan pembuatan slide, kemudian dilakukan deparafinisasi dan pewarnaan dengan Hematoxylin-Eosin (HE). Slide diperiksa difoto di bawah mikroskop dan kemudian didokumentasi.

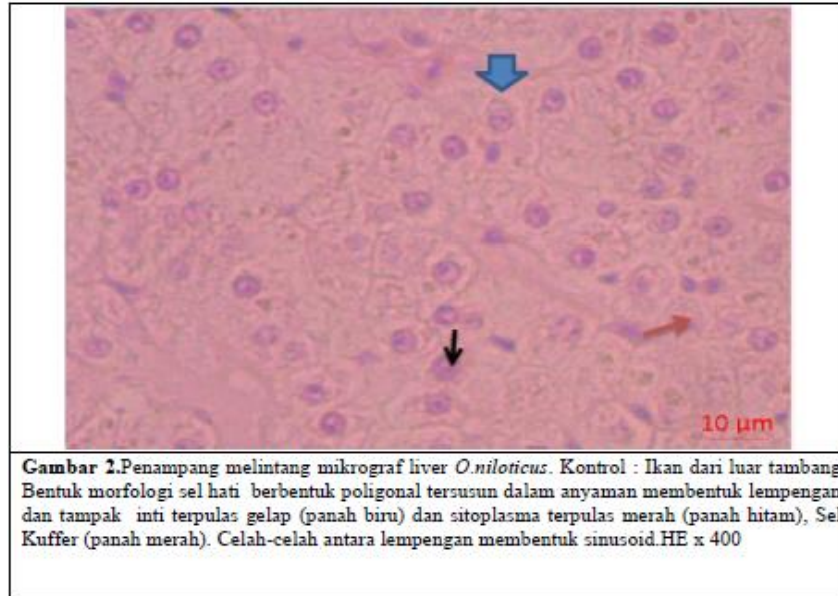
Analisis Komposisi Kimia Logam dalam Daging dengan SEM dan dikombinasi EDX

Untuk keperluan analisis komposisi kimia sampel daging ikan dipersiapkan sesuai prosedur preparasi sampel padatan yang dikembangkan Laboratorium Uji Material Pusat Sains dan Teknologi Bahan Maju BATAN(PSTBM-BATAN).Pengujian SEM dilakukan dengan JEOL JSM-6510LA yang dilengkapi dengan perangkat Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS).Daging ikan nilai dipotong kecil-kecil berukuran 0.5cm x 0.5cm dan dikeringkan hingga suhu 60°C hingga kadar airnya turun hingga 95%.Kemudian sampel dibuat serbuk dengan mortar dan kemudian disimpan dalam botol gelas. Serbuk daging ikan perlu dilapisi dengan bahan konduktif, yakni lapisan tipis paladium emas (20 nm tebal) dan kemudian dianalisis menggunakan SEM dan EDS..

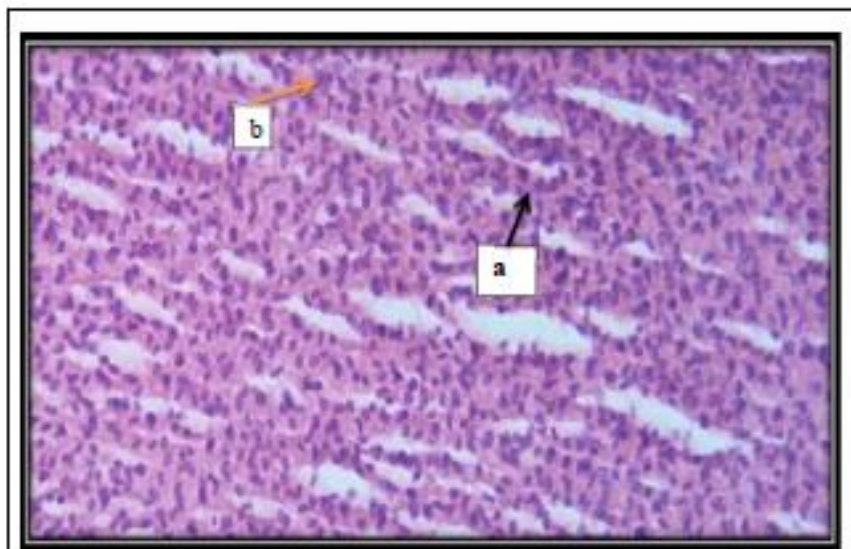
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Analisis Histopatologis Hepar

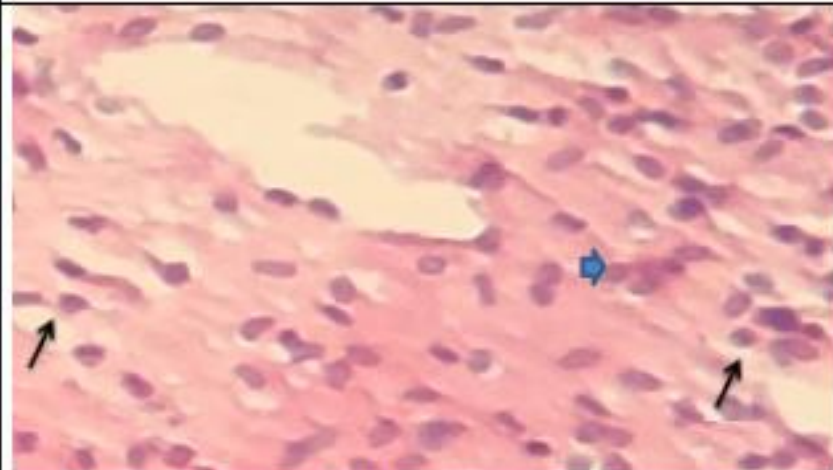
Jaringan hepar ikan kontrol, ditandai dengan hepatosit berukuran besar, berbentuk polyhedral nukleus bulat dengan satu atau lebih nukleolus (Gambar 2).



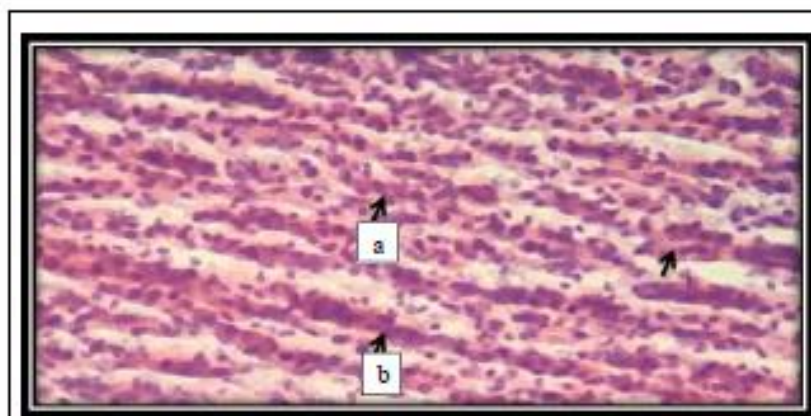
Gambar 2.Penampang melintang mikrograf liver *O.niloticus*. Kontrol : Ikan dari luar tambang
Bentuk morfologi sel hati berbentuk poligonal tersusun dalam anyaman membentuk lempengan
dan tampak inti terpulas gelap (panah biru) dan sitoplasma terpulas merah (panah hitam), Sel
Kuffer (panah merah). Celah-celah antara lempengan membentuk sinusoid.HE x 400



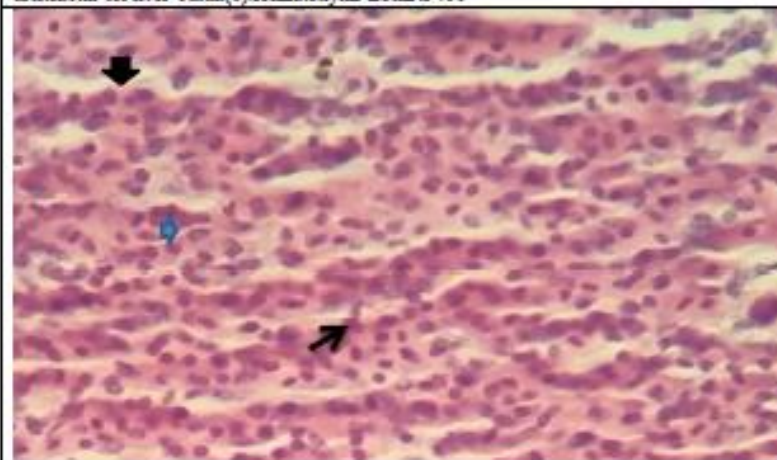
Gambar 3: Penampang melintang mikroskop liver *O. niloticus* dari Pit Semong (umur 5 tahun). menunjukkan sel hepar abnormal. Sel hepar dengan bentuk inti yang pleomorfik menunjukkan inti membesar, sitoplasma menyempit dan butir butir kromatin terpusat biru(a) dan mengalami karyorrhexis(b). Hematoxylin-Eosin x 400



Gambar 4: Penampang melintang mikroskop liver *O. niloticus* dari Pit Semong (umur 5 tahun). Terlihat adanya pelebaran jarak antara hepatosit dan pelebaran sinusoid (tanda panah hitam). Beberapa hepatosit dengan inti mengalami hipertofi dan terpusat sangat biru (heterochromatin yang melimpah dan sedikit euchromatin) (panah biru) sebagai indikasi sel kurang aktif. Hematoxylin-Eosin x 1000



Gambar 5: Pemampang melintang makrograf liver *Oniloticus* dari Pit Goldstar (umur 10 tahun, menunjukkan sel liver abnormal. Sel hepar dengan bentuk pleomorfik/inti membesar, sitoplasma menyempit dan butir-butir kromatin terdispersi dalam sitoplasma(a), tampak arsitektur sel liver rusak(b). Hematoxylin-Eosin x 400



Gambar 6: Batas sel antara hepatosit tidak terlalu berbeda (tanda panah biru), dan beberapa hepatosit dengan inti mengalami hipertrofi terpusat sangat biru (heterochromatin yang melimpah dan sedikit euchromatin) (panah hitam kecil) sebagai indikasi sel kurang aktif. Terjadi pelebaran jarak antara hepatosit dan pelebaran sinusoid (tanda panah hitam). Hematoxylin-Eosin x 1000

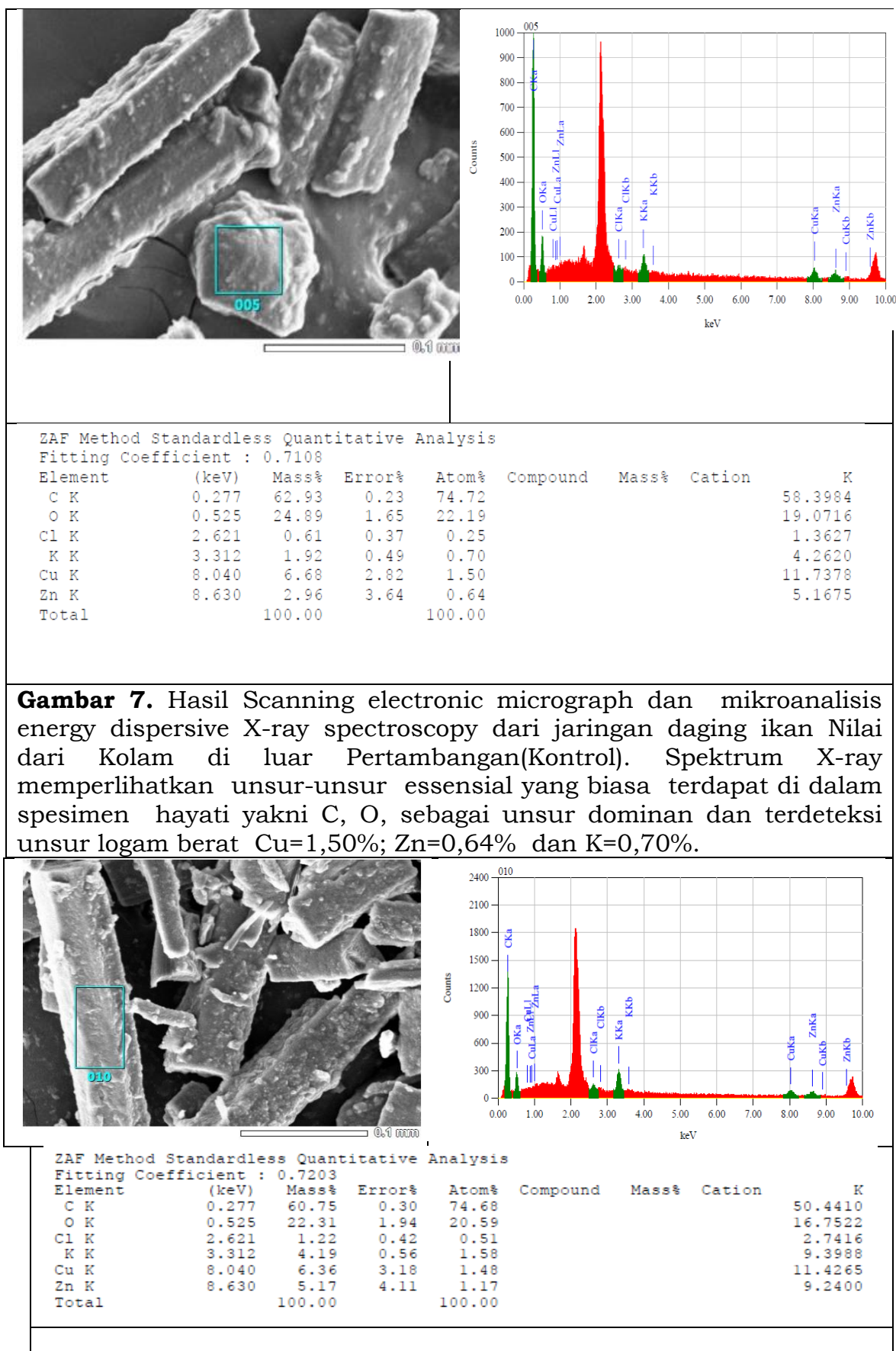
Gambaran histopathologis hepar dari ikan yang berasal dari kolam pasca tambang terlihat sel-sel hepatosit terpulas sangat biru dan hypertrophy (tanda panah) dan arsitektur hepatosit tidak teratur. Hepar merupakan organ yang mempunyai kemampuan untuk melakukan detoksikasi xenobiotic yang masuk ke dalam tubuh organisme. Hepar memiliki metabolizing-enzyme, yang apabila bekerja dapat mematikan sel-sel disekitarnya, termasuk sel-sel hepar itu sendiri. Oleh sebab itu, apabila hepar terus menerus menerima tekanan xenobiotik yang masuk dan melampaui kemampuan fisiologisnya, liver akan mengalami degenerasi atau kerusakan berat dan dapat bersifat inaktif.

Hasil Mikroanalisis Unsur Logam di dalam Daging Ikan

Hasil Scanning electronic micrograph spectroscopy dari Otot Ikan

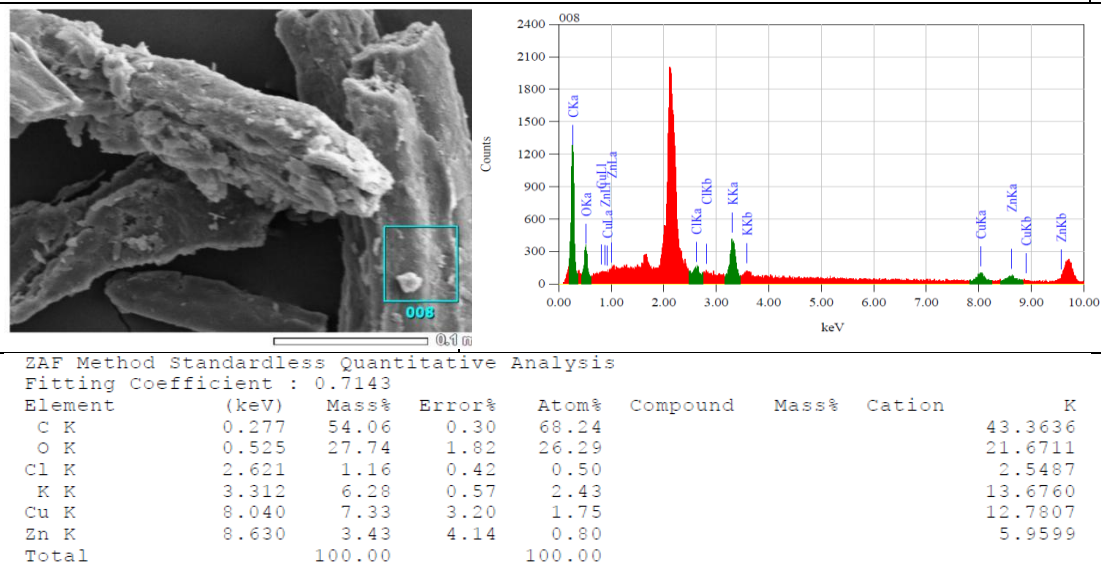
Hasil komposisi elemen hati yang diperoleh dari dispersi X ray microanalysis (EDX) mencatat sedikit peningkatan persentase berat logam dalam sampel yang diolah dibandingkan sampel kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa logam mampu menumpuk di permukaan jaringan otot. Pemeriksaan sampel kontrol oleh EDX dalam pemindaian mikroskop elektron menunjukkan terdeteksi adanya unsur logam Cu, Zn dan K di dalam daging ikan (Gbr. 7,8,9) dan Tabel 1.

Hasil Mikroanalisis Unsur Logam dengan Metode SEM-EDX dalam Otot Ikan Kontrol



Gambar 7. Hasil Scanning electronic micrograph dan mikroanalisis energy dispersive X-ray spectroscopy dari jaringan daging ikan Nilai dari Kolam di luar Pertambangan(Kontrol). Spektrum X-ray memperlihatkan unsur-unsur essensial yang biasa terdapat di dalam spesimen hayati yakni C, O, sebagai unsur dominan dan terdeteksi unsur logam berat Cu=1,50%; Zn=0,64% dan K=0,70%.

Gambar 8. Hasil Scanning electronic micrograph dan mikroanalisis energy dispersive X-ray spectroscopy dari jaringan daging ikan Nilai dari Kolam Pasca Tambang Goldstar. Spektrum X-ray memperlihatkan unsur-unsur essensial yang biasa terdapat di dalam spesimen hayati yakni C, O, sebagai unsur dominan dan terdeteksi unsur logam berat Cu=1,48%; Zn=1,17% dan K=1,58%.



Gambar 9. Hasil Scanning electronic micrograph dan mikroanalisis energy dispersive X-ray spectroscopy dari jaringan daging ikan Nilai dari Kolam Pasca Tambang Senong. Spektrum X-ray memperlihatkan unsur-unsur essensial yang biasa terdapat di dalam spesimen hayati yakni C, O, sebagai unsur dominan dan terdeteksi unsur logam berat Cu=0,80%; Zn=1,75% dan K=2,43%.

Tabel 1. Rekapitulasi Hasil Mikroanalisis dengan Metode SEM-EDX Kandungan Unsur Logam Berat di dalam Daging Ikan Nila yang dipelihara di Kolam Pasca Tambang Batubara, Kecamatan Sungai Kunjang, Kota Samarinda

| Asal Lokasi | Unsur Logam | Kandungan Unsur Logam(%) |
|--------------------------|-------------|--------------------------|
| Kontrol | Cu | 1,50 |
| | Zn | 0,64 |
| | K | 0,70 |
| Kolam Goldstar(10 Tahun) | Cu | 1,48 |
| | Zn | 1,17 |
| | K | 1,58 |
| Kolam Senong(5 Tahun) | Cu | 1,75 |
| | Zn | 0,80 |
| | K | 2,43 |

Berdasarkan hasil penelitian ini, kita harus waspada karena efek toksis logam berat dalam kadar yang rendah tidak langsung terlihat setelah beberapa tahun karena sifatnya yang cenderung terakumulasi pada makhluk hidup. Sifat akumulasi inilah yang menyebabkan efeknya menjadi lebih berbahaya untuk manusia. Bila manusia mengkonsumsi ikan yang

tercemar logam terus menerus, akan terjadi akumulasi atau penumpukan logam berat tersebut dalam tubuh. Lama-kelamaan kadar logam berat ini dalam tubuh manusia mencapai tingkat yang menimbulkan keracunan yang dapat membahayakan kesehatan bahkan kematian.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Gambaran histopathologis hepar ikan Nila menunjukkan telah terjadi gangguan lingkungan (pencemaran), dan sel hepar ikan sampel ditandai dengan pleomorfik, inti membesar, sitoplasma menyempit, butir butir kromatin terdispersi ke dalam sitoplasma dan arsitektur hepatocyte mengalami atrofi.
2. Di dalam daging Ikan Nila yang berasal dari budidaya keramba pasca tambang batubara terdeteksi unsur logam berat Cu sebesar 1,48 s.d 1,74%; Zn sebesar 0,80 s.d. 1,17% dan K sebesar 1,58 s.d. 2,43%. Komposisi unsur Cu terdeteksi dan K lebih besar persentasenya pada kolam berumur 5 tahun dan sebaliknya unsur Zn lebih besar persentasenya pada ikan yang berumur 10 tahun.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifin, Zainal. Beberapa Unsur Mineral Esensial Mikro Dalam Sistem Biologi dan Metode Analisisnya. Jurnal Litbang Pertanian 2008;(27)3:99-105.
- Au, D.W., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. Mar. Pollut. Bull. 48 (9-10), 817-834.
- Guerinot, M.L., Salt, D.E., 2001. Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. Plant Physiol. 125, 164-167.
- Heidel, J. and C. Smith. 2007. General Histopathology and Neoplasia. Fish Histology manual. V4.
- Lam, P.K., Gray, J.S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull. 46, 182-186. [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6).
- Miranda, A.L., Roche, H., Randi, M.A.F., Menezes, M.L., Oliveira Ribeiro, C.A., 2008. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish
- Hoplias malabaricus: histopathological, physiological, and immunological findings. Environ. Int. 34 (7), 939-949. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2008.02.004>.
- Tjakrawidjaja dan Harun. 2001. Uji coba budidaya ikan nila merah dengan pola jaring terapung di lahan bekas galian timah pulau singkep. Laporan teknik. proyek pengkajian dan pemanfaatan sumber daya hayati. Bidang zoology, puslit biologi. LIPI: Bogor.
- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G., 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. Cell Biol. Toxicol. 10 (5-6), 415-421.
- Wang, W.X., Rainbow, P.S., 2008. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. Comp. Biochem. Physiol., Part C 148 (2008), 315-323.

- Wahyuni H, Sasongko SB, Sasongko DP. 2013. *Kandungan Logam Berat pada Air, Sedimen dan Plankton di Daerah Penambangan Masyarakat Desa Batu Belubang Kabupaten Bangka Tengah*. Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan: 489-494
- Widowati, Wahyu. *Efek Toksik Logam: Pencegahan dan Penanggulangan Pencemaran*. Yogyakarta: Penerbit Andi, 2008.
- Zeitoun, M.M. and Mehana, E.E. 2014. Impact of water pollution with heavy metals on fish health: Overview and Updates. *Global Veterinaria*, 12(2): 219-231