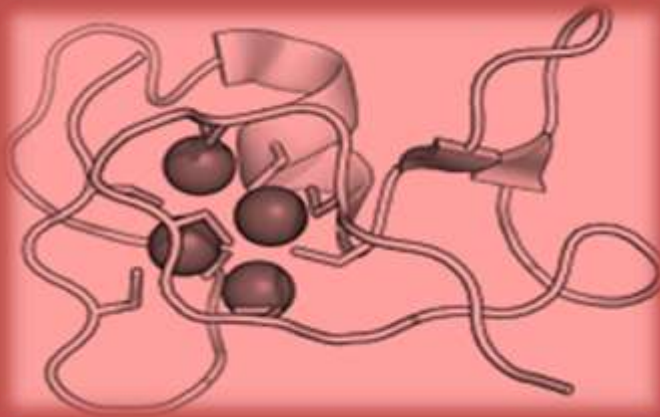


BUKU REFERENSI

Hasil Riset Penulis

Biomarker Gen Metallothionein pada Bivalva dan Bioremediasi Perairan Tercemar



Penyusun:

Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.

Dr. Wahyu Prihatini, M.Si.

Dr. Tri Panji, M.S.

**Penerbit : Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat
Universitas Pakuan**

Jalan Pakuan No.1 P.O. BOX 452, Ciheuleut Bogor

Telp. (0251) 8380137 Email lppm@unpak.ac.id

**Biomarker Gen Metallothionein pada Bivalva
dan Bioremediasi di Perairan Tercemar**

Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.

Dr. Wahyu Prihatini, M.Si.

Dr. Tri Panji, M.S.

Penerbit:

**Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat
Universitas Pakuan**

BUKU REFERENSI
Hasil Riset Penulis

**Biomarker Gen Metallothionein pada Bivalva
dan Bioremediasi di Perairan Tercemar**

Edisi Cetak Pertama , 2021

Penyusun : Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.
Dr. Wahyu Prihatini, M.Si.
Dr. Tri Panji, M.S.

Editor : Dr. Oom Komala, M.S.

Desain Sampul : Richard Raditiyo S.

Penerbit : Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada
Masyarakat Universitas Pakuan

Alamat : Jalan Pakuan No.1, Ciheuleut, Kelurahan
Tegallega, Kecamatan Bogor Tengah, Kota
Bogor - 16143 P.O. BOX 452

Email : lpmm@unpak.ac.id

ISBN : 978-623-91228-5-0

Hak Cipta dilindungi Undang-undang

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, secara elektronik maupun mekanis memfotocopy, merekam atau dengan teknik perekaman lainnya tanpa izin tertulis dari penerbit.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
DAFTAR ISI	iv
PENGANTAR PENULIS.....	8
1. Identifikasi Respons Molekuler Akibat Cekaman	
Lingkungan: Protein dan Gen Metallothionein (MT)	10
2. Pustaka Identifikasi Respons Molekuler	12
3. Metode Uji Karakterisasi Protein dan Ekspresi Gen MT	23
4. Hasil Uji Karakterisasi Protein dan Ekspresi Gen MT	30
5. Kesimpulan Uji Karakterisasi Protein dan Ekspresi	
Gen MT	34
6. Bahan Bacaan	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengelompokan protein <i>metallothionein</i> (MT).....	14

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur gen metallothionein.....	16
2. Daerah promotor gen MT-1 tikus	18
3. Model mekanisme induksi gen MT	21
4. Lokasi pengambilan sampel <i>Pilsbryconcha exilis</i>	
Di Sungai Cikaniki.....	25
5. Ukuran protein MT dari hepatopankreas <i>P. exilis</i>	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Riwayat hidup penulis	38
2. Sertifikat Kompetensi Penulis (BNSP)	40

PENGANTAR PENULIS

Buku berjudul ***Biomarker Gen Metallothionein pada Bivalva dan Bioremediasi di Perairan Tercemar*** ini diharapkan menjadi salah satu referensi bagi dosen dan peneliti dalam meningkatkan kemampuan akademik khususnya dalam bidang ilmu Biologi Molekuler dan Toksikologi Lingkungan.

Buku referensi ini merupakan hasil riset yang dilakukan oleh penulis selama tiga tahun (2017 - 2019) dengan pendanaan DPRM Kemenristekdikti. Terbitnya buku ini diharapkan dapat membantu kompetensi mahasiswa untuk mendalami biologi molekuler kerang air tawar famili Uninodae dan kemampuannya untuk mendetoksifikasi logam berat limbah yang dibuang ke dalam perairan. Buku ini juga dilengkapi dengan uji karakterisasi protein serta uji ekspresi gen metallothionein (MT).

Kami menyadari masih terdapat kekurangan dalam penyusunan buku ini, untuk itu kritik dan saran terhadap penyempurnaan buku ini sangat diharapkan. Semoga buku ini dapat memberi manfaat khususnya bagi dosen dan peneliti yang membutuhkannya.

Bogor, 2 September 2021

Tim Penulis

RINGKASAN

Pencemaran sungai di Indonesia seringkali terjadi sebagai dampak negatif kegiatan manusia, yang mengakibatkan penurunan kualitas perairan sungai. Salah satu kasus pencemaran sungai yang sangat membahayakan kondisi kehidupan biota air dan manusia, adalah limbah merkuri dari kegiatan pertambangan emas. Sebagai contoh, kasus pencemaran Sungai Cikaniki, anak Sungai Cisadane di Kabupaten Bogor. Di bagian hulu Sungai Cikaniki terdapat pertambangan emas resmi milik negara, dan beberapa pertambangan tidak resmi yang disebut pertambangan emas tanpa ijin (PETI), sementara bagian hilir sungai Cisadane menjadi bahan baku air minum oleh PDAM Kota Bogor dan Tangerang. Sungai Cikaniki yang tercemar merkuri menyebabkan kematian pada ikan baung, serta membahayakan kesehatan pekerja tambang di sungai tersebut. Respons biota terhadap akumulasi logam berat adalah dengan melakukan detoksifikasi secara fisiologis, namun sebenarnya respons lebih awal terjadi pada level molekuler. Respons molekuler dapat diidentifikasi, antara lain dari sintesis protein metallothionein (MT), ketika biota mengalami cekaman lingkungan. Ekspresi gen MT berupa sintesis protein MT teridentifikasi pada kerang laut *Anadara antiquata* yang diinduksi merkuri, *Anadara granosa* yang diinduksi tembaga, dan kerang air tawar *Anodonta woodiana* yang diinduksi timbal. Potensi kerang air tawar *Anodonta woodiana* sebagai biofilter merkuri telah diteliti. Kerang air tawar lainnya yaitu *Pilsbryconcha exilis* tersebar luas di Indonesia dan dapat dimanfaatkan untuk biofiltrasi, maupun bioremediasi perairan tercemar.

1. IDENTIFIKASI RESPONS MOLEKULER AKIBAT CEKAMAN LINGKUNGAN: PROTEIN DAN GEN METALLOTHIONEIN (MT)

Pencemaran sungai di Indonesia seringkali terjadi sebagai dampak negatif kegiatan manusia, yang mengakibatkan penurunan kualitas perairan sungai. Salah satu kasus pencemaran sungai yang sangat membahayakan kehidupan biota air dan manusia, adalah limbah merkuri dari kegiatan pertambangan emas. Sebagai contoh, kasus pencemaran Sungai Cikaniki, anak Sungai Cisadane di Kabupaten Bogor. Di bagian hulu Sungai Cikaniki terdapat pertambangan emas resmi milik PT Aneka Tambang (ANTAM), dan beberapa pertambangan tidak resmi yang disebut pertambangan emas tanpa ijin (PETI), sementara bagian hilir sungai Cisadane menjadi bahan baku air minum oleh PDAM Kota Bogor dan Tangerang. Sungai Cikaniki yang tercemar merkuri (Suryono *dkk.*, 2010) menyebabkan kematian pada ikan baung, dan insekta (Yoga *dkk.*, 2014; Paryono *dkk.*, 2007), serta membahayakan kesehatan pekerja tambang di sungai tersebut (Junita, 2013).

Respons biota terhadap akumulasi logam berat adalah dengan melakukan detoksifikasi secara fisiologis, namun sebenarnya respons lebih awal terjadi pada level molekuler (Gupta & Singh, 2011). Respons molekuler dapat diidentifikasi, antara lain dari sintesis protein metallothionein (MT), ketika biota mengalami cekaman lingkungan. Ekspresi gen MT berupa sintesis protein MT teridentifikasi pada kerang laut *Anadara antiquata* yang diinduksi merkuri (Prihatini, 2013),

Anadara granosa yang diinduksi tembaga (Kok-Kee *et.al.* 2009), dan kerang air tawar *Anodonta woodiana* yang diinduksi timbal (Kartikaningsih *dkk.*, 2013).

Potensi kerang air tawar *Anodonta woodiana* sebagai biofilter merkuri telah diteliti oleh Khasyar *dkk.* pada tahun 2012. Kerang air tawar lainnya yaitu *Pilsbryconcha exilis* tersebar luas di Indonesia dan belum banyak dimanfaatkan untuk biofiltrasi, maupun bioremediasi perairan tercemar. Penelitian ini bertujuan memaksimalkan pemanfaatan *P. exilis* untuk bioremediasi perairan tercemar merkuri, dan mengidentifikasi ekspresi gen MT sebagai biomarker untuk pemantauan perairan tercemar merkuri. Penelitian ini merupakan bagian dari peta jalan penelitian tentang aspek-aspek ekofisiologi dan biomolekuler kerang, untuk kurun waktu tahun 2010-2020.

2. PUSTAKA IDENTIFIKASI RESPONS MOLEKULER

Protein *metallothionein* (MT)

Protein *metallothionein* (MT) dijumpai pada berbagai jaringan tubuh dari berbagai species organisme, dan mudah diinduksi oleh beberapa stimuli. Protein MT mengandung banyak sulfur, mampu mengikat logam berat, memiliki berat molekul kecil (4-10 kDa), mengandung 26-33% *cysteine* (cys) yang mampu mengikat dan menimbun ion-ion logam dengan ikatan kovalen, serta tidak memiliki asam amino aromatik atau *histidin* (Baird *et al.* 2006; Gagné *et al.* 2007). Protein MT berperan penting dalam detoksifikasi logam berat (Viarengo *et al.* 1999). Proses detoksifikasi diawali oleh pengikatan ion logam pada permukaan sel, yang terjadi karena ion positif terikat pada sisi reaktif muatan negatif polimer ekstraseluler (seperti R-Coo⁻ dan PO₄). Tahap selanjutnya dalam detoksifikasi logam berat adalah transportasi ion logam ke dalam sitoplasma, dan diakumulasi oleh protein MT (Bernal-Hernandez *et al.* 2010).

Mekanisme proteksi terhadap dampak logam berat oleh MT, dipengaruhi derajat paparan logam ke jaringan, namun respon MT bukan satu-satunya mekanisme fisiologis perlawanan terhadap logam berat pada bivalvia (Bernal-Hernandez *et al.* 2010; Amiard *et al.* 2008; Metian *et al.* 2008). Pada paparan logam konsentrasi rendah, MT mengikat logam-logam esensial untuk memelihara homeostasis di dalam sel. Pada paparan konsentrasi tinggi (misalnya mendekati level

toksik dan letal), MT mengikat logam dari protein dengan berat molekul tinggi, dan konsentrasi MT diketahui berkorelasi nyata dengan konsentrasi logam di jaringan terpapar (Gagné *et al.* 2007).

Afinitas MT terhadap logam-logam berat bervariasi; merkuri mempunyai afinitas paling kuat dibandingkan logam lain seperti tembaga, kadmium, perak, dan zink. Dengan kemampuannya mengikat logam-logam esensial dan nonesensial, MT membatasi distribusi logam berat ke tempat-tempat yang tidak diinginkan, dan memberi perlindungan terhadap toksisitas logam (Amiard *et al.* 2008). MT diketahui mengatur tiga proses fundamental, yaitu: 1) pelepasan gas perantara seperti radikal hidroksil atau oksida nitric, 2) mematikan sel-sel yang tidak lagi berfungsi (*apoptosis*), serta 3) pengikatan dan pertukaran logam. Akumulasi MT pada tingkat sel dipengaruhi antara lain oleh ekspresi gen, dan degradasi protein (Jenny *et al.* 2004). Pada manusia, terdapat empat kelompok (*isoform*) MT dengan fungsi spesifik (Tabel 1).

MT-I dan MT-II sangat mudah diinduksi oleh logam berat, hormon, inflamasi, stres akut, dan berbagai bahan kimia (Lee & Koh 2010). Protein MT-I dan MT-II dapat dijumpai pada banyak species tumbuhan, hewan (vertebrata dan avertebrata), maupun manusia (Roesijadi 1994; Baird *et al.* 2006; Boateng *et al.* 2010). Meskipun fungsi MT secara tepat masih terus diteliti, namun bukti-bukti menunjukkan bahwa MT mengatur atau mengendalikan kemampuan intraseluler, baik terhadap logam-logam esensial seperti Cu dan Zn,

maupun logam nonesensial seperti Hg, dan Pb. MT mampu mendonasikan Cu dan Zn kepada reseptor yang sesuai (misal metaloenzim dan faktor transkripsi), sehingga dapat mengendalikan aktivitas metabolik melalui interaksi molekuler yang sangat spesifik (Jenny *et al.* 2004).

Tabel 1. Pengelompokan protein *metallothionein* (MT)*

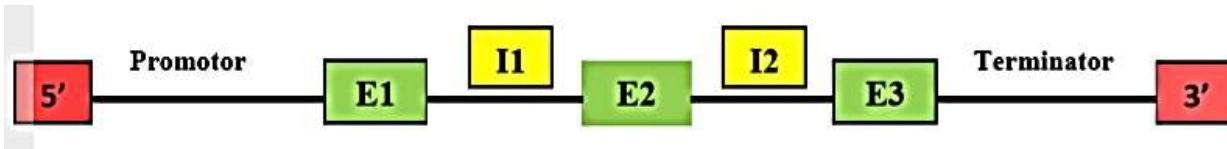
	MT-I dan MT-II	MT-III	MT-IV
Distribusi	Seluruh sel tubuh, terutama mukosa usus.	Terutama di sel-sel otak, pankreas, dan usus.	Terutama di sel-sel epitel kulit, lidah, dan saluran pencernaan atas.
Jumlah asam amino	61 (20 cystein)	68 (20 cystein); 4 Cu dan 3 Zn	62 (20 cystein)
Ukuran protein	3 - 30 kDa		
Fungsi	- regulasi Zn & Cu - transkripsi - detoksifikasi logam - sistem imun - proses pencernaan	- inhibisi pertumbuhan neuron - perkembangan, organisasi, apoptosis sel otak	- regulasi pH asam lambung - indera perasa - proteksi matahari

Keterangan *) pada manusia (Roesijadi 1994; Baird *et al.* 2006)

Pemanfaatan MT sebagai *biomarker* didasarkan pada fakta bahwa logam-logam dapat tersekap di jaringan tubuh karena kerja MT. Banyaknya kandungan asam amino *cys* menyebabkan protein MT memiliki kelompok '*thiol*' (*sulfhydryl*, -SH) dalam jumlah besar. Kelompok ini mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien. Residu -SH dari *cys* mampu mengikat logam; satu ion logam (misal Cd, Zn, Hg) dengan tiga residu -SH, atau satu ion logam dengan

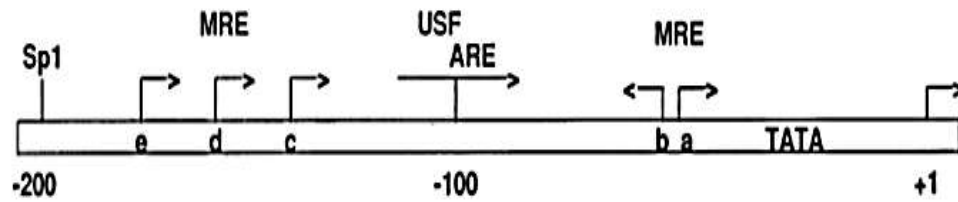
dua residu –SH. (Baird *et al.* 2006; Lee & Koh 2010). Ikatan MT dengan logam sangat kuat, namun juga dapat mudah bertukar dengan protein lain, karena ikatan MT-logam memiliki stabilitas termodinamik tinggi, namun stabilitas kinetiknya rendah. Kondisi ini menyebabkan MT mempunyai fungsi biologis sebagai distributor, dan mediator intraseluler dari logam-logam yang diikatnya (Shutkova *et al.* 2012; Rovolova *et al.* 2011).

Pemanfaatan MT sebagai *biomarker* didasarkan pada fakta bahwa logam-logam dapat tersekap di jaringan tubuh karena kerja MT. Banyaknya kandungan asam amino cys menyebabkan protein MT memiliki kelompok 'thiol' (*sulfhydryl*, -SH) dalam jumlah besar. Kelompok ini mengikat logam-logam berat dengan sangat kuat dan efisien. Residu -SH dari cys mampu mengikat logam; satu ion logam (misal Cd, Zn, Hg) dengan tiga residu -SH, atau satu ion logam dengan dua residu –SH. (Baird *et al.* 2006; Lee & Koh 2010). Ikatan MT dengan logam sangat kuat, namun juga dapat mudah bertukar dengan protein lain, karena ikatan MT-logam memiliki stabilitas termodinamik tinggi, namun stabilitas kinetiknya rendah. Kondisi ini menyebabkan MT mempunyai fungsi biologis sebagai distributor, dan mediator intraseluler dari logam-logam yang diikatnya (Shutkova *et al.* 2012; Rovolova *et al.* 2011). Struktur gen metallothionein (Patricia & Branco 2011) tercantum dalam Gambar 1.



Gambar 1. Struktur gen metallothionein (Patricia & Branco 2011)

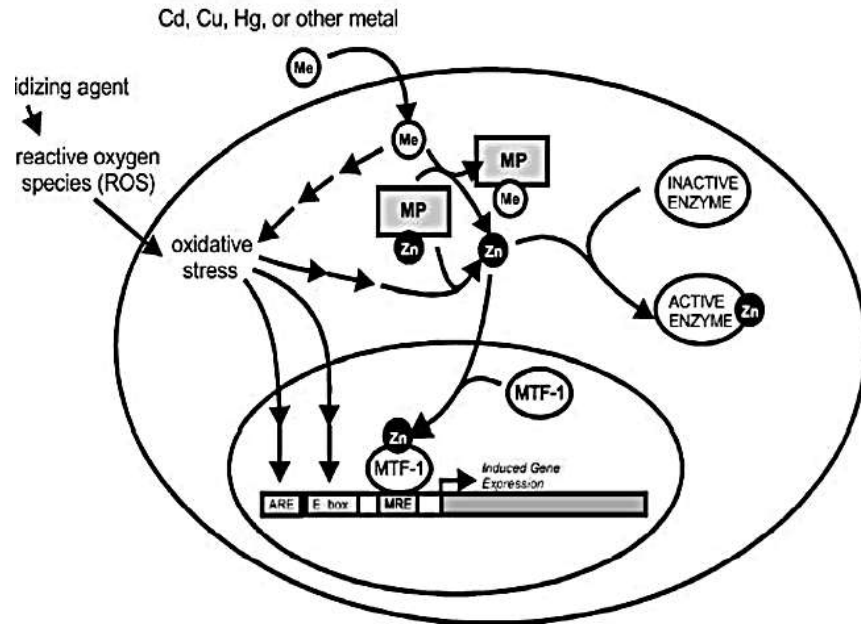
Area promotor dari gen MT berisi beberapa sekuen spesifik, yaitu MRE (*metal regulatory element*), ARE (*antioxidant regulatory element*) atau disebut juga *electrophile response element*, dan TATA box (Gambar 2). Regulasi ion logam oleh gen MT dilakukan melalui perantara, yaitu sekuen spesifik MRE yang berulang-ulang di area promotor (Patricia & Branco 2011). Daerah promotor gen MT-1 tikus (Patricia & Branco 2011) termuat dalam Gambar 2.



Gambar 2. Daerah promotor gen MT-1 tikus (Patricia & Branco 2011)

Eksresi gen MT diinduksi oleh beberapa faktor, antara lain logam berat, dan agen pengoksidasi. Di sitoplasma sel terdapat *metalloregulatory protein* (MP) yang mampu mengenali ketersediaan (bioavailabilitas) ion-ion logam, kemudian mengaktifasi protein MTF-1, suatu protein bebas Zn yang bertanggungjawab mengendalikan transkripsi gen MT, dan selalu dijumpai di inti sel (Gambar 3). Pada kondisi sel terpapar logam, atau mengalami stres, MTF-1 berikatan dengan MRE di area promotor gen MT. Protein MTF-1 berinteraksi dengan komponen-komponen transkripsi, melakukan pengaturan transkripsi. Ikatan MTF-1 dengan MRE terjadi setelah diaktivasi oleh Zn (Patricia & Branco 2011). MRE mengikat faktor transkripsi, dan menunjukkan peran penting dalam merespon logam berat, serta terlibat dalam perkembangan jaringan, maupun reaksi fisiologis. Induksi gen MT yang diakibatkan oleh cekaman oksidatif dapat terjadi pada berbagai tipe sel (Lee & Koh 2010; Bernal-Hernandez *et al.* 2010). Pada kerang biru *Mytilus edulis* ditemukan 9 isoform, yang merupakan bagian dari gen MT-10 (kelompok MT-III) dan gen MT-20 (kelompok MT-IV), masing-masing menunjukkan ekspresi berbeda terhadap paparan logam berat (Fasulo *et al.* 2008). Transkripsi gen MT-10 diinduksi terutama oleh Cd, Zn, Cu, dan sedikit Hg. Sebaliknya, transkripsi gen MT-20 ternyata rendah, di bawah kondisi basal, meskipun mRNA meningkat drastis merespon paparan Cd. Sedikit paparan Hg diketahui menghasilkan ekspresi mRNA yang mirip dengan MT-10 (Dondero *et al.* 2005). Karena besarnya peran gen MT dalam regulasi kemampuan bivalvia merespon lingkungan perairan yang

tercemar logam berat, maka karakterisasi dan ekspresi gen ini penting untuk diketahui secara tepat. Model mekanisme induksi gen MT (Patricia & Branco 2011) tercantum dalam Gambar 3.



Gambar 3. Model mekanisme induksi gen MT (Patricia & Branco 2011)

Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan menyediakan pilihan solusi mengatasi masalah strategis berskala nasional, yaitu penanganan sungai tercemar merkuri.

Manfaat penelitian

Penelitian ini berdampak positif, antara lain memaksimalkan pemanfaatan *P. exilis* untuk bioremediasi limbah merkuri di sungai, sehingga dapat memulihkan keamanan bahan pangan dari perairan tersebut; serta penerapan biomarker metallothionein dalam program pemantauan dan penilaian perairan sungai yang tercemar merkuri di Indonesia.

BAB 3. METODE UJI KARAKTERISASI PROTEIN DAN UJI EKSPRESI GEN MT

Sampling kerang *Pilsbryconcha exilis*

Sampel kerang bulu *A. antiquata* diambil dari Sungai Cikaniki, Kabupaten Bogor (Gambar 4). Sampel-sampel kerang dibagi dua kelompok; kelompok pertama diambil organ hepatopankreas untuk keperluan analisis protein MT. Kelompok sampel kerang lainnya diaklimatisasi dalam akuarium berisi air laut bersih selama 72 jam. Usai proses aklimatisasi, kerang uji diinduksi dengan gradien konsentrasi merkuri, kemudian dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan RNA total, dilanjutkan dengan sintesis cDNA untuk amplifikasi gen GAPDH dan gen MT.

Induksi merkuri

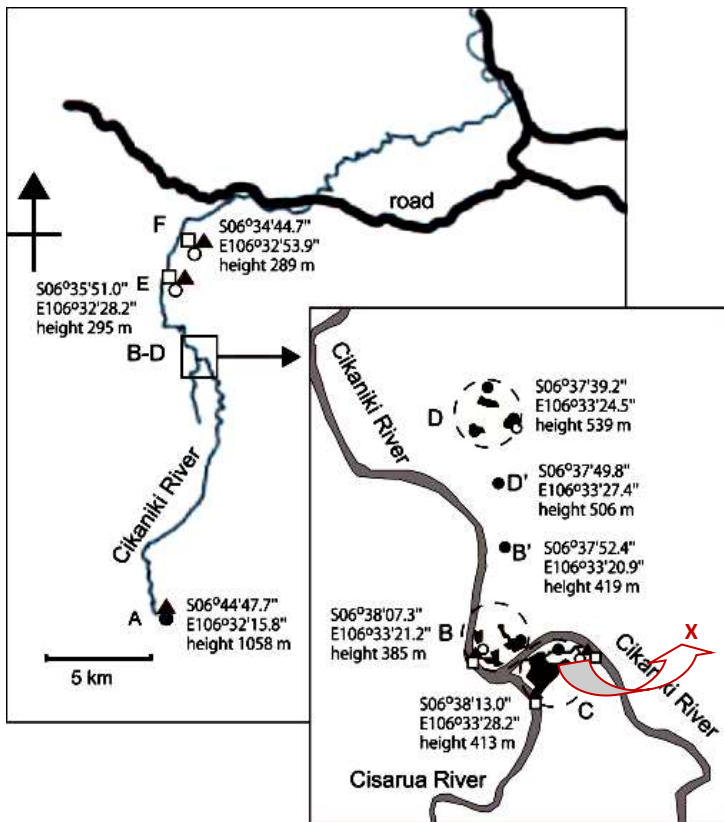
Sampel *A. antiquata* yang telah diaklimatisasi selama 72 jam, kemudian dipindahkan ke akuarium percobaan, dan dipaparkan merkuri dengan empat tingkat konsentrasi, yaitu 0,0025; 0,005; 0,01; dan 0,02 ppm dalam lima liter air laut bersih pada akuarium terpisah. Kerang yang digunakan sebanyak enam ekor untuk setiap perlakuan konsentrasi. Pengambilan contoh jaringan insang diambil pada hari ke 2, ke 4, dan ke 6 induksi merkuri, masing-masing memakai dua kerang uji.

Karakterisasi protein MT

Jaringan hepatopankreas *A. antiquata* diambil 0,1 mg, kemudian diekstraksi menggunakan kit *Tissue Extraction Reagent I* (Invitrogen),

dengan prosedur mengikuti manual pabrik. Hasil ekstraksi dimurnikan dengan cara disaring menggunakan Sephadex 50, kemudian hasil filtrasi dimigrasikan bersama dengan *PageRuler™ Unstained Low Range Protein Ladder* (Fermentas) dalam medium gel *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS PAGE) pada alat elektroforesis *Protein II Biorad*. Pada penelitian ini digunakan gel bertingkat 5% dan 15%, dengan komposisi gel mengacu pada Shagger (2006).

Sebagai gel buffer digunakan larutan Tris-Tricine-SDS pH 8,25; sedangkan untuk buffer elektroforesis digunakan larutan Tris HCl pH 8,9. Gel yang telah selesai dielektroforesis lalu diwarnai dengan menggunakan *PageBlue Protein Staining Solution* (Fermentas), mengikuti prosedur manual pabrik. Hasil pewarnaan gel kemudian diamati di bawah sinar lampu pembaca gel.



Gambar 4. Lokasi pengambilan sampel *Pilsbryconcha exilis* di sungai Cikaniki: titik merah X ($S06^{\circ}38'07.3''$ $E106^{\circ}32'21.2''$ tinggi 385 m) dan situs yang terdeteksi (sumber: dimodifikasi dari Takashi Tomiyasu et al., 2013).

Isolasi RNA total

Insang diekstraksi untuk mendapatkan RNA total, menggunakan *RNEasy Mini Kit* (Qiagen), dengan prosedur sesuai manual pabrik. Integritas RNA hasil isolasi diperiksa dengan migrasi sampel RNA dalam gel agarose 1,2% selama 30 menit pada alat elektroforesis. Hasil elektroforesis kemudian diamati dengan alat UV transluminator. Kuantitas dan kemurnian isolat RNA total diukur dengan alat Nanodrop (Qiagen). Penelitian tahun ke tiga yaitu menganalisis ekspresi gen MT pada *P. exilis* yang diinduksi merkuri. Perlakuan induksi HgCl₂ dan pengambilan contoh insang kerang, dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Pakuan. Ekstraksi RNA total, sintesis cDNA (RT-PCR), amplifikasi *house-keeping gene* GAPDH dan gen target MT, mengacu pada Prihatini (2013). Analisis RNA akan dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler, IPB.

a. Aklimatisasi kijing dan induksi merkuri.

Seluruh kerang *P. exilis* dari lapang diaklimatisasi selama 48 jam, dalam akuarium besar berisi 100 liter air bersih. Kerang lalu dipilah menjadi tiga kelompok perlakuan HgCl₂, masing-masing 10 ekor, sehingga total jumlah kerang yang digunakan 30 ekor. Masing-masing kelompok kerang uji dipindahkan ke akuarium percobaan terpisah, berisi 5L air bersih yang telah dipaparkan HgCl₂ dengan konsentrasi 0,1; 0,2; dan 0,4 ppm. Pengambilan contoh insang kerang untuk ekstraksi RNA, dilakukan pada hari ke 1, 2, 4, 6, 8 setelah induksi HgCl₂, masing-masing memakai 2 ekor kerang. Sebagai perbandingan,

digunakan 3 ekor kerang yang tidak dipaparkan HgCl_2 . Contoh insang dari setiap kelompok diberi label, dan disimpan dalam freezer.

b. Isolasi RNA total

Ekstraksi RNA total menggunakan *RNEasy Mini Kit* (Qiagen), dengan prosedur mengikuti manual pabrik. Integritas isolat RNA diperiksa dengan cara dimigrasikan dalam gel agarose 1,2% selama 30 menit, dan hasilnya diamati dengan UV transluminator. Kuantitas dan kemurnian isolat RNA total diukur dengan alat Nanodrop (Qiagen).

c. Transkripsi balik RNA (sintesis cDNA)

Proses transkripsi balik RNA (sintesis cDNA) dengan metode Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) menggunakan kit RevertAid Transcriptase (Thermo-Scientific Inc.). Prosedur RT-PCR diawali dengan membuat larutan mix: ddH₂O 7 μl , 5x buffer 4 μl , RNA 4 μl , 10 mM dNTP 2 μl , oligoDT, ribolocs, dan RevertAid enzyme masing-masing 1 μl . Larutan diinkubasi pada 420C selama 60 menit, dilanjutkan suhu 700C selama 5 menit. Hasil sintesis cDNA menjadi cetakan (template) untuk mengamplifikasi house keeping gene GAPDH, dan gen target MT.

d. Amplifikasi cDNA house-keeping gene (gen GAPDH)

Sebagai kontrol positif kualitas RNA template, dilakukan amplifikasi gen GAPDH sebagai house-keeping gene (Prihatini, 2013). Pasangan primer gen GAPDH (Sense-GAPDH dan Antisense-GAPDH) didesain dari sekuen GAPDH manusia dengan produk PCR sebesar 496 bp (Thermo Scientific).

Komposisi bahan untuk PCR GAPDH dengan kit BioLab (Qiagen) sebagai berikut: ddH₂O 7,8 µl, 5x Q5 buffer 5 µl, 5x enhancer 5 µl, 25 mM MgCl₂ 1 µl, dNTP 1 µl, primer GAPDH-F 1 µl, primer GAPDH-R 1 µl, cDNA 3 µl, Taq polymerase 0,2 µl (total 25 µl). Kondisi pra denaturasi 940C 3 menit, denaturasi 940C 45 detik, penempelan 580C 1,5 menit, dan pemanjangan 700C 1 menit. PCR dilakukan dalam 35 siklus. Kondisi pasca PCR pada suhu 700C 7 menit, dan pendinginan 200C 5 menit. Produk PCR dimigrasikan dalam gel agarose 1,2% selama 60 menit, dan hasilnya diperiksa dengan UV transluminator.

e. **Amplifikasi cDNA gen MT**

Primer gen MT hasil desain berdasarkan sekuen MT-2 mRNA *Anadara granosa* GenBank. Sekuen primer F.sequence: 5'-GAATTCGGCAAACCTT-3'; dan R.sequence: 5'-AGATGACTAGCCGTTA-3'. Produk PCR primer berukuran 356 bp. Komposisi PCR gen MT dengan kit BioLab (Qiagen) yaitu: ddH₂O 5,8 µl, 5xQ5 buffer 5 µl, 5x enhancer 5 µl, 25 mM MgCl₂ 1 µl, dNTP 1 µl, primer MT-2 F 1 µl, primer MT-2 R 1 µl, cDNA 5 µl, Taq polymerase 0,2 µl (total 25 µl). Kondisi pra denaturasi pada suhu 940C selama 3 menit, denaturasi 940C selama 45 detik, fase penempelan pada suhu 550C selama 1,5 menit, dan fase pemanjangan pada 700C selama 1 menit. PCR dilakukan 35 siklus. Kondisi pasca PCR pada suhu 700C selama 7 menit, dan pendinginan pada 200C selama 5 menit. Produk PCR dielektroforesis dalam gel agarose 1,2% selama 60 menit, dan hasilnya diperiksa dengan UV transluminator.

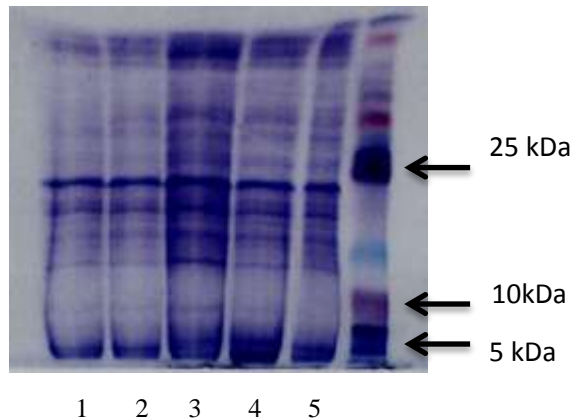
f. Sekuensing cDNA dan analisis sekuen

Proses sekuensing lengkap dengan primer depan dan primer belakang dilakukan di PT Genetika Science, Singapura. Pensejajaran gen MT menggunakan program MEGA-4. Jarak genetik dihitung berdasarkan p-distance value dari pasangan nukleotida dan asam amino (Tamura et al., 2007).

4. HASIL UJI KARAKTERISASI PROTEIN DAN EKSPRESI GEN MT

Ukuran protein metallothionein (MT) *Pilsbryconcha exilis*

Hasil elektroforesis SDS-PAGE menunjukkan adanya variasi ukuran dari protein MT yang berhasil diisolasi dari jaringan hepatopankreas *P. exilis*. Protein MT yang diperoleh berukuran 5 kDa; 10 kDa; dan 25 kDa (Gambar 5). Selain itu didapat juga protein berukuran besar (> 30 kDa), yang diduga merupakan anggota kelompok protein terkait dengan pengendalian stres, yaitu *heat shock protein* (Hsp).



Gambar 5. Ukuran protein MT dari hepatopankreas *P.exilis* (Rahayu and Prihatini, 2020)

Protein metallothionein (MT)

Dalam penelitian ini diperoleh protein MT-I berukuran 5; 10; dan 25 kDa, selain itu juga didapatkan beberapa protein lain berukuran besar (Gambar 29), yang diduga merupakan anggota

kelompok protein stres, misalnya *heat shock protein* (Hsp). Terdeteksinya protein MT menunjukkan bahwa *A. antiquate* memberikan respon biologis terhadap peningkatan gradien konsentrasi dan lamanya paparan merkuri. Lee & Koh (2010) menyebutkan bahwa dalam kondisi cekaman oksidatif akibat akumulasi merkuri, MT berfungsi sebagai antioksidan dalam sistem pertahanan oksidan secara non-enzimatik.

Protein MT hewan diketahui memiliki empat isoform, yaitu MT-I, MT-II, MT-III dan MT-IV. Isoform MT-I dan MT-II terdistribusi pada berbagai jaringan, terutama hati, pankreas, intestin dan ginjal. Protein MT-III dan MT-IV ditemukan terutama pada otak dan kulit vertebrata (Amiard *et al.* 2006). Dalam penelitian ini, berhasil diperoleh pita protein MT berukuran 5; 10, dan 25 kDa, yang merupakan isoform MT-I dan MT II (Roesijadi 1994). Isoform protein MT-I dan MT II sangat mudah diinduksi oleh logam berat, hormon, inflamasi, stres akut, dan berbagai bahan kimia, serta dijumpai pada berbagai species hewan, baik avertebrata maupun vertebrata. MT memengaruhi tingkat toleransi dan hepatotoksisitas terhadap logam berat, juga bertindak sebagai pembasmi radikal bebas yang melindungi dari kerusakan oksidatif (Lee & Koh 2010; Machreki-Ajmi & Hamza-Chaffai 2008).

Jaringan tubuh yang terlibat langsung dalam pengambilan, penyimpanan, dan ekskresi logam berat, memiliki kapasitas yang besar dalam mensintesis protein MT. Pada moluska dan krustasea, umumnya protein MT dijumpai di hepatopankreas dan insang; khusus

pada bivalvia diketahui bahwa konsentrasi protein MT lebih tinggi di organ hepatopankreas dibandingkan insang (Amiard *et al.* 2008). Karakteristik biologis juga memengaruhi sintesis protein MT. Dilaporkan terjadi sintesis MT pada cairan tubuh kerang darah *Anadara granosa* yang diinduksi Cd (Chan *et al.* 2002), pada hepatopankreas remis *Mytilus* Gen MT *galloprovincialis* yang diinduksi Pb (Pavicic *et al.* 1993), dan pada insang kerang biru *Mytilus edulis* yang diinduksi Hg (Roesijadi *et al.* 1988). Berbagai rujukan tersebut mendukung pemilihan metode kerja, dan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini. Kijing lokal *Pilsbryconcha exilis* yang digunakan dalam penelitian ini, diambil dari perairan Bojonegara yang tercemar berat logam Cd, Pb, dan Hg (hasil penelitian topik 3 dalam disertasi ini), sehingga diduga kuat tubuh *Pilsbryconcha exilis* telah beradaptasi terhadap cekaman tersebut dengan mensintesis protein MT sebagai bentuk respon biologisnya. Pemilihan organ hepatopankreas yang dianalisis dalam penelitian ini sesuai dengan tujuan yang diharapkan, karena bivalvia diketahui mensintesis lebih banyak protein MT di hepatopankreas dibandingkan di insang (Amiard *et al.* 2008).

Sintesis protein MT bukan merupakan satu-satunya mekanisme fisiologis perlawanan terhadap akumulasi logam berat, pada bivalvia (Bernal-Hernandez *et al.* 2010; Amiard *et al.* 2008). Terdapat beberapa protein lain yang juga berfungsi sebagai *cellular stress respons* (CSR), antara lain *heat shock protein* (Hsp) dan *cytokines* (Baird *et al.* 2006). Pendapat ini mendukung hasil yang diperoleh

dalam penelitian ini, yaitu munculnya pita protein berukuran cukup besar (> 50 kDa), yang diduga merupakan protein Hsp.

Hal ini juga diperkuat dengan temuan Butet (2013), yang mendapati terekspresinya gen Hsp 70 (untuk sintesis protein Hsp berukuran 70 kDa), dengan induksi merkuri pada kerang darah *Anadara granosa*. Perubahan fisiologis pada kerang yang sedang melakukan detoksifikasi, antara lain tampak dari meningkatnya laju filtrasi, respirasi, aktivitas makan, pertumbuhan, dan reproduksi, juga perubahan metabolisme dan biokimia (Amiard *et al.* 2008). Proses detoksifikasi dilakukan protein MT dengan mengikat ion-ion logam, lalu diakumulasi ke dalam suatu granula tak berbentuk (disebut vesikel coklat) dengan cara yang tidak beracun (Zarogian & Yevich 1994). Pengamatan struktur histologis akibat akumulasi logam berat, penting dilakukan sebelum timbulnya dampak *irreversible* pada hewan.

5. KESIMPULAN HASIL UJI KARAKTERISASI PROTEIN DAN EKSPRESI GEN MT

Pada akhir penelitian, telah dilakukan karakterisasi tahap akhir dari protein MT dari organ hepatopankreas *Pilsbryconcha exilis* yang berasal dari perairan tercemar logam berat. Hasil ini diharapkan dapat menegaskan peran protein MT dalam regulasi detoksifikasi merkuri pada tubuh kerang, yang memungkinkan mereka mampu beradaptasi, dan kemudian memperbaiki perairan yang tercemar merkuri.

6. BAHAN BACAAN

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 160–202.
- Baird SK, Kurz T, Brunk UT. 2006. Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochem. J.* 394 : 275–283.
- Bernal-Hernandez YY, Medina-Diaz IM, Robledo-Marenco ML, Velazquez- Fernandez JB, Giron-Perez MI, Ortega-Cervantes L, Maldonado-Vasquez WA, Rojaz-Garcia AE. 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostrea corteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific Estuary. *Ecotoxicology* 19: 819-825.
- Boateng AD, Obirikorang KA, Amisah S. 2010. Bioaccumulation of Heavy Metals in the Tissue of the Clam *Galatea paradoxa* and Sediments from the Volta Estuary, Ghana. *Int. J. Environ. Res.* 4 (3): 533-540.
- Butet NA. 2013. Genotypic plasticity and blood clam phenotype (*Anadara granosa*) in response to environmental pollution. Case study in Banten coastal waters. Dissertation. Bogor Agricultural University Postgraduate School, Bogor. 15-26, 39-42.
- Chan MK, Othman R, Zubir D, Salmijah S. 2002. Induction of a putative metallothionein gene in the blood cockle *Anadara granosa* exposed to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. C* 131: 123–132.

- Gagné F, Gagnon C, Turcotte P, Blaise C. 2007. Changes in Metallothionein Levels in Freshwater Mussels Exposed to Urban Wastewaters: Effects from Exposure to Heavy Metals? *Biomarker Insights* 2 : 107–116.
- Gupta SK, Singh J. 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system. *The IIOAB Journal* (ISSN:0976-3104). Review Article. Vol. 2. Issue 1: 49-57.
- Jenny MJ, Ringwood AH, Schey K, Warr GW, Chapman RW. 2004. Diversity of metallothioneins in the American oyster, *Crassostrea virginica*, revealed by transcriptomic and proteomic approaches. *Eur. J. Biochem.* 271: 1702–1712.
- Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Arakawa K, Nagamine T. 2008. The Changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals* 21: 71-81.
- Lee JS, Koh JY. 2010. Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Molecular Brain* 3: 30.
- Machreki-Ajmi M, Hamza-Chaffai A. 2008. Assessment of sediment/water contamination by in vivo transplantation of the cockles *Cerastoderma glaucum* from a non-contaminated to contaminated area by cadmium. *Ecotoxicology* 17: 802-810.
- Metian M, Warnau R, Cosson F, Obberhansli P, Bustamante. 2008. Bioaccumulation and detoxification processes of Hg in the scallop *Pecten maximus*: field and laboratory investigations. *Aquat. Toxicol.* 90(3): 204-213.
- Roesijadi G, Unger ME, Morris JE. 1988. Immunochemical quantification of metallothionein of a marine mollusc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1257–1263.

- Roesijadi G, Unger ME, Morris JE. 1988. Immunochemical quantification of metallothionein of a marine mollusc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45: 1257–1263
- Ryvolova MR, Krizkova S, Adam V, Beklova M, Trnkova L, Hubalek J, Kizek R. 2011. Analytical Methods for Metallothionein Detection. *Current Analytical Chemistry* 7: 243-261.
- Rahayu, S.Y.S and Prihatini, W. 2020. Characterization of metallothionein protein from hepatopancreas organ of *Pilsbryoconcha exilis* collected from Cikaniki River, Western Java, Indonesia. *Nusantara Bioscience* (12)1: 1-5.
- Shagger H. 2006. Tricine gels protocol for low mw proteins (< 25,000 Da) and peptides. *Nature Protocols* 1 (1): 16-23.
- Shutkova H, Babula P, Stiborova M, Eckschlager T, Irkova L, Provaznik I, Hubalek J, Kizek R, Adam V. 2012. Structure, Polymorphisms and Electrochemistry of Mammalian Metallothioneins. A Review. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7: 12415 – 12431.
- Tomiyasu T, Kono Y, Kodamatani H, Hidayati N, Rahajoe J.S.. 2013. The distribution of mercury around the small-scale gold mining area along the Cikaniki river, Bogor, Indonesia. *Environmental Research* 125: 12-19.
- Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 277 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 46) : R1612-R1619.
- Zarogian G, Yevich P. 1994. The nature and function of the brown cell in *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 37: 355-373.

Riwayat hidup penulis
Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.



Penulis lahir tanggal 4 November 1972 dan mulai berkarir sebagai dosen dan peneliti di Universitas Pakuan pada tahun 2000. Meraih gelar sarjana dari Institut Pertanian Bogor pada tahun 1996. Menyelesaikan studi magister di Institut Teknologi Bandung pada tahun 1999. Pada tahun 2011, penulis meraih gelar Doktor major Biosains Hewan dari Institut Pertanian Bogor. Penulis juga aktif sebagai dosen di sekolah vokasi IPB dan menjadi *tutor online* di Universitas Terbuka di Bogor. Penulis pernah meraih predikat dosen berprestasi peringkat I (2012 dan 2020) di Universitas Pakuan dan sebagai kandidat tingkat Jawa Barat (2012). Hingga saat ini penulis telah menyelesaikan Riset Hibah Bersaing (2013-2015), Hibah Riset Terapan (2017-2018), Hibah Riset Kompetitif Nasional (2016-2019) dan Hibah Penelitian Tesis Magister (2020) serta Hibah Pengabdian Kepada Masyarakat (2016-2018). Penulis mendiseminasikan hasil riset ke Jepang & Amerika Serikat (2013-2016). Publikasi dan HAKI berupa jurnal internasional terindeks *Scopus* dan *Web of Science* serta Paten *granted* dari Kemenkumham RI pada tahun 2019, 2020 & 2021. Penulis juga aktif sebagai anggota asosiasi profesi Perhimpunan Biologi Indonesia (PBI) dan Masyarakat Biodiversitas Indonesia (MBI) hingga kini.


Dr. Wahyu Prihatini, M.Si.



Penulis lahir pada 7 November 1963, dan mulai berkarir sebagai dosen PNS di Program Studi Biologi FMIPA Universitas Pakuan sejak tahun 1988. Penulis meraih gelar sarjana Sarjana Biologi FMIPA Universitas Padadjaran pada tahun 1987, Magister biologi dari Institut Pertanian Bogor pada tahun 1999 dan Doktor Bio sains Hewan dari Institut Pertanian Bogor pada tahun 2013. Sampai saat ini penulis aktif sebagai penilai materi biologi buku teks dan non teks pelajaran SMP dan SMA/SMK bersama bersama Pusat Kurikulum dan Perbukuan Kemdikbudristek. Penulis pernah meraih predikat dosen berprestasi peringkat I di Universitas Pakuan tahun 2014. Sampai dengan 2020 penulis telah menyelesaikan riset Hibah Bersaing (2012-2013), Hibah PUPT (2018-2019), Hibah Riset Kompetitif Nasional (2016-2019) dan Hibah internal Pengabdian Masyarakat dari LPPM Universitas Pakuan (2020) serta mendiseminasikan hasil riset di berbagai seminar nasional, *international conference*, jurnal internasional terindeks Web of Science dan Hak Cipta dari Kemenkumham RI pada tahun 2019. Penulis juga merupakan anggota aktif sebagai asosiasi profesi Perhimpunan Biologi Indonesia (PBI) dan Masyarakat Biodiversitas Indonesia (MBI) hingga kini.

Sertifikat Kompetensi Penulis (BNSP)

4785177



BADAN NASIONAL
SERTIFIKASI PROFESI
INDONESIAN PROFESSIONAL
CERTIFICATION AUTHORITY

SERTIFIKAT KOMPETENSI CERTIFICATE OF COMPETENCE

No. 58110 26411 0 0000177 2019

Dengan ini menyatakan bahwa,
This is to certify that,

Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.

No. Reg. KOM.1446.00177 2019

Telah memenuhi persyaratan dan kompeten pada kualifikasi:
Met the requirements and competent for the below qualification:

**Penulisan Buku Nonfiksi
Non-fiction Book Writing**

Pada Bidang Pekerjaan:
In the area of:


**Penulis Buku Nonfiksi
Non-fiction Book Writer**

Sertifikat ini berlaku untuk: 3 (tiga) Tahun
This certificate is valid for: 3 (three) Years


Jakarta, 7 Juni 2019

Atas Nama Badan Nasional Sertifikasi Profesi
On Behalf of Indonesian Professional Certification Authority

Lembaga Sertifikasi Profesi Penulis dan Editor Profesional
Professional Certification Body for Professional Writer and Editor



Bambang Trimansyah
Direktur
Director



4785175



BADAN NASIONAL
SERTIFIKASI PROFESI
INDONESIAN PROFESSIONAL
CERTIFICATION AUTHORITY

SERTIFIKAT KOMPETENSI
CERTIFICATE OF COMPETENCE

No. 58110 26411 0 0000175 2019

Dengan ini menyatakan bahwa,
This is to certify that,

Dr. Wahyu Prihatini, M.Si.

No. Reg. KOM.1446.00175 2019

Telah memenuhi persyaratan dan kompeten pada kualifikasi:
Meet the requirements and competent for the below qualification:

Penulisan Buku Nonfiksi
Non-fiction Book Writing

Pada Bidang Pekerjaan:
In the area of:

Penulis Buku Nonfiksi
Non-fiction Book Writer

Sertifikat ini berlaku untuk: 3 (tiga) Tahun
This certificate is valid for: 3 (three) Years

Jakarta, 7 Juni 2019

Atas Nama Badan Nasional Sertifikasi Profesi
On Behalf of Indonesian Professional Certification Authority

Lembaga Sertifikasi Profesi Penulis dan Editor Profesional
Professional Certification Body for Professional Writer and Editor


PENULIS/EDITOR
PROFESIONAL
Bambang Trimansyah

Direktur
Director





encemaran sungai di Indonesia pada umumnya terjadi sebagai dampak negatif kegiatan manusia, yang mengakibatkan penurunan kualitas perairan sungai. Salah satu kasus pencemaran sungai yang sangat membahayakan kondisi kehidupan biota air dan manusia, adalah limbah merkuri dari kegiatan pertambangan emas. Sebagai contoh, kasus pencemaran Sungai Cikaniki, anak Sungai Cisadane di Kabupaten Bogor. Sungai Cikaniki yang tercemar merkuri menyebabkan kematian pada ikan baung, serta membahayakan kesehatan pekerja tambang di sungai tersebut. Respons biota terhadap akumulasi logam berat adalah dengan melakukan detoksifikasi secara fisiologis, namun sebenarnya respons lebih awal terjadi pada level molekuler. Respons molekuler dapat diidentifikasi, antara lain dari sintesis protein metallothionein (MT), ketika biota mengalami cekaman lingkungan. Ekspresi gen MT berupa sintesis protein MT teridentifikasi pada kerang laut *Anadara antiquata* yang diinduksi merkuri, *Anadara granosa* yang diinduksi tembaga, dan kerang air tawar *Anodonta woodiana* yang diinduksi timbal. Potensi kerang air tawar *Anodonta woodiana* sebagai biofilter merkuri telah diteliti. Kerang air tawar lainnya yaitu *Pilsbryconcha exilis* tersebar luas di Indonesia dan dapat dimanfaatkan untuk biofiltrasi, maupun bioremediasi perairan tercemar.

ISBN 978-623-93208-5-0

