

**Kadmium dan Efeknya terhadap Ekspresi Protein Metallothionein pada *Deadema setosum* (Echinoidea; Echinodermata)**

**D. Rumahlatu<sup>1</sup>, A. D. Corebima<sup>2</sup>, M. Amin<sup>2</sup>, F. Rachman<sup>2</sup>**

---

<sup>1</sup> Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP Universitas Pattimura, Ambon

<sup>2</sup> Program Pascasarjana Pendidikan Biologi Universitas Negeri Malang, Malang  
*e-mail: dominggus\_amq@yahoo.co.id*

**Abstrak**

Logam berat kadmium (Cd) bersifat karsinogen, mutagenik dan teratogenik pada beberapa jenis hewan. Ketika berada di dalam sel, Cd akan menginduksi berbagai jenis mekanisme signal transduksi serta mengaktifkan banyak gen. Salah satu efek langsung yang ditimbulkan oleh Cd adalah mengganggu proses homeostasis sel. Mekanisme homeostasis sel terlaksana dengan keberadaan protein metallothioneine (MT) yang berperan sebagai protein pengikat logam dan mengurangi efek toksik. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi Cd pada kompartemen tubuh *Deadema setosum* sekaligus mengkaji efek Cd terhadap ekspresi protein metallothionein pada *D. setosum*. Hasil analisa kandungan Cd dalam kompartemen tubuh *D. setosum* menunjukkan rerata kadar Cd bervariasi namun pada cangkang (0.67) < duri (0.75) < gonad (1.35) < usus (1.63). Hasil pemulasan imonohistokimia menggunakan antibodi rabi anti MT-1 *D. setosum* menunjukkan sel yang mengekspresikan MT-1 berwarna coklat. Ekspresi protein MT-1 pada gonad, usus, dan hepar menunjukkan perbedaan morfologi sel, dimana Cd yang terakumulasi pada setiap sel terikat tergantung pada jenis dan fungsi organ selnya.

Kata kunci: Kadmium, Ekspresi Protein MT, *Deadema setosum*

**The Effect of Cadmium on Metallothionein Protein Expression of *Deadema Setosum* (Echinoidea; Echinodermata)**

**Abstract**

Heavy metal cadmium (Cd) is carcinogenic, mutagenic and teratogenic in several animal species. When Cd inside the cell, it will induce various types of signal transduction mechanisms and activate many genes. One of the immediate effects caused by Cd is a disruptive process of cell homeostasis. Mechanism of cell homeostasis was restored by the presence of proteins metallothioneine (MT) which acted as metal binding proteins and reduced toxic effects. The purposes of this study were to determine the concentration of Cd in the body compartments *Deadema setosum* and to examine the effect of Cd on the expression of metallothionein protein in *D. setosum*. Results of analysis of Cd content in the body compartments *D. setosum* showed average levels vary but the shells of Cd only (0.67) < thorn (0.75) < gonads (1.35) < intestine (1.63). Results imonohistokimia staining used antibodies Rabbit anti MT-1 *D. setosum* showed that cells which expressed MT-1 was brown. MT-1 protein expression in the gonads, intestine, and liver cells showed morphological differences, where Cd accumulated at each cell target depending on the type of cell and organ function.

Keywords: Cadmium, Expression MT, *Deadema setosum*

## PENDAHULUAN

Kadmium (Cd) merupakan logam berat yang paling banyak ditemukan pada lingkungan, khususnya lingkungan perairan, serta memiliki efek toksik yang tinggi, bahkan pada konsentrasi yang rendah (Almeida *et al.*, 2009). Kadmium diketahui memiliki waktu paruh yang panjang dalam tubuh organisme hidup (Patrick, 2003) dan umumnya terakumulasi di dalam hepar dan ginjal (Flora, 2009). Pada manusia, kadmium dapat bersifat karsinogenik, merusak kelenjar endokrin, sistem kardiovaskular dan juga terdapat pada sistem saraf yang memicu kerusakan neurologis dan berasosiasi dengan kanker paru-paru, prostat, pankreas dan ginjal (Bobocea *et al.*, 2008 & Flora, 2009). Dijelaskan sebelumnya oleh Pal (2006) bahwa pada konsentrasi yang tinggi, kadmium merupakan logam berat yang bersifat karsinogen, mutagenik dan teratogenik pada beberapa jenis hewan. Hal ini menunjukkan bahwa logam berat kadmium memberikan efek terhadap proses *genomic* dan *postgenomic* pada liver, ginjal, paru-paru, dan otak. Sifat karsinogenik kadmium menyebabkan logam berat tersebut diurutkan sebagai peringkat pertama (*Class 1*) agen mutagenik bagi organisme hidup (Nordic, 2003 dan Flora *et al.*, 2008).

Jonak *et al.* (2004) menjelaskan bahwa kadmium tidak diketahui memiliki fungsi biologis di dalam sel tetapi memiliki sifat reaktif yang sangat tinggi dan dapat menginaktivkan berbagai macam aktivitas enzim yang diperlukan oleh sel. Setelah diabsorpsi, logam berat kadmium akan terakumulasi di dalam organ target yang utamanya adalah ginjal kemudian menimbulkan toksisitas (Rico *et al.*, 2002). Di dalam ginjal, akumulasi kadmium terjadi umumnya di dalam tubulus proximal serta segmen-segmen nefron lainnya yang hanya terjadi pada akhir tahap intoksifikasi (Yokouchi *et al.*, 2007). Selain itu, Ohta *et al.* (2000) melaporkan bahwa pemberian logam berat kadmium terhadap tikus putih jantan (*Male Wistar Rats*) dapat menyebabkan osteoporosis serta umumnya terdeposit di dalam organ liver dan ginjal.

Pada tingkatan biomolekuler, kadmium diabsorpsi oleh organisme dan terakumulasi di dalam sitosol melalui pembentukan kompleks metal-ligan (Dailanis & Kaloyianni, 2004). Beberapa penelitian tentang efek paparan logam berat kadmium pada hewan telah banyak dilaporkan, paparan kadmium dalam waktu yang lebih lama akan memicu peningkatan ROS sehingga memicu kematian sel (Gzyl *et al.*, 2009), memicu peroksidasi lipid (Faix *et al.*, 2005), menghambat pengambilan (*uptake*) nutrisi, menghambat aktivitas enzim, termasuk sistem antioksidan organisme hidup (John *et al.*, 2009). Almeida *et al.* (2009) juga melaporkan bahwa logam berat kadmium meningkatkan peroksidasi lipid pada liver *Nile tilapia*. Selain itu, perlekatannya dengan residu *cystein* akan memicu pembentukan ROS.

Kadmium juga dapat menginduksi kerusakan pada fungsi membran dengan merusak komposisi lipid pada membran sel (Smiri *et al.*, 2010; Dailanis & Kaloyianni, 2004). Penelitian yang dilakukan oleh El-Maraghy *et al.* (2001) dan Wlostowski *et al.* (2003) yang dirujuk dalam Faix *et al.* (2005) menyimpulkan bahwa paparan logam berat jenis kadmium menyebabkan perubahan histopatologi dan peroksidasi lipid pada organ liver dan ginjal hewan rodent. Efek lainnya yang ditimbulkan oleh logam berat kadmium adalah terjadi pengurangan berat badan rodent (Bomhard *et al.*, 1999, dalam Almeida *et al.*, 2009). Sorensen (1991, dalam Almeida *et al.*, 2010) juga menemukan bahwa paparan logam berat kadmium dapat menyebabkan retardasi (perlambatan) pertumbuhan serta menghambat pengambilan ion kalsium pada insang ikan.

Kajian tentang peran kadmium dalam menginduksi signal transduksi intraseluler dijelaskan oleh Dailanis & Kaloyianni (2004), bahwa kadmium mengaktifkan signal transduksi cascade seperti PKC, tirosin kinase dan casein kinase II. Rocheri *et al.* (2004) juga menjelaskan bahwa mitokondria merupakan salah satu target seluler dari kadmium melalui efeknya secara langsung terhadap peningkatan permeabilitas inner membran. Ketika berada di dalam sel, kadmium akan menginduksi berbagai jenis mekanisme signal

transduksi serta mengaktifkan banyak gen (Daniels & Andrews, 2003). Salah satu efek langsung yang ditimbulkan oleh kadmium ketika terakumulasi di dalam sel adalah mengganggu proses homeostasis zink (Zn). Zn merupakan elemen esensial yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan organisme yang memicu aktivasi MTF-1. Perlekatan protein MTF-1 pada MRE yang terdapat pada promotor gen metallothionine (MT) selanjutnya akan memicu transkripsi protein MT.

Berdasarkan uraian tersebut di atas dapat diprediksi bahwa logam berat kadmium di lingkungan perairan laut yang terakumulasi dalam organ tubuh *Deadema setosum* berdampak pada perubahan di tingkat sel. Mengingat, *D. setosum* memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap logam berat kadmium, tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi kadmium pada kompartemen tubuh *D. setosum* sekaligus mengkaji efek kadmium terhadap ekspresi protein metallothionein pada *D. setosum*.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi Sampel Hewan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yakni *Deadema setosum* yang dikoleksi dari perairan Pulau Ambon pada bulan Januari 2011. Koleksi sampel meliputi kompartemen tubuh *D. setosum* seperti: duri, cangkang, gonad dan usus dengan jumlah sampel untuk tiap kompartemen tubuh sebanyak 5. Dengan demikian, total sampel yang digunakan yaitu: 20 sampel.

### Preparasi Sampel, Analisis Kimia, dan Penentuan Ekspresi Protein MT-1

Individu *D. setosum* dibedah dan diambil organ duri, cangkang, hepar, gonad, dan usus, selanjutnya dimasukan ke dalam tabung *roll film*/pot sampel untuk selanjutnya dibawah ke laboratorium kimia dan fisiologi kedokteran Universitas Brawijaya untuk dianalisis kadar logam berat kadmium dan penentuan ekspresi protein MT-1.

Analisis kimia dilakukan untuk menentukan konsentrasi Cd pada sampel kompartemen tubuh *Deadema setosum* pada duri, cangkang, gonad dan usus dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectrofotometer* (AAS) yang dianjurkan oleh Bilmyer (2005).

Penentuan ekspresi protein MT-1 menggunakan *Immunohistochemistry (IHC) Kit (Biochain Intitute. Inc)*. Penentuan ekspresi protein MT-1 dalam hepar *Deadema setosum* diawali dengan pembuatan preparat spesimen hepar. Langkah-langkah pembuatan preparat spesimen hepar meliputi: 1) fiksasi jaringan, 2) pembuatan blok parafin, dan 3) pembedahan blok parafin. Untuk lebih jelasnya, langkah-langkah pembuatan preparat spesimen hepar dijelaskan sebagai berikut: (1) Fiksasi jaringan, meliputi: (a) Hepar *D. setosum* dicuci dengan PBS 1x sampai bersih, dan dimasukan dalam fiksatif selama 1 jam, kemudian hepar dipotong 1 x 1 cm. (b) Spesimen direndam kembali dalam fiksatif dengan waktu < 24 jam. (c) 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%; (2) Pembuatan blok parafin, meliputi: (a) Spesimen didehidrasi dalam alkohol 85% selama 1-2 jam, alkohol 96% selama 1-2 jam, dan alkohol 100% selama 2-3 jam. (b) 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. (c) 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. (d) Pembuatan blok dengan kertas, spesimen dimasukan dalam kotak kertas, diberi parafin cair, kemudian dilabeli. Parafin didinginkan dengan air dingin; (3) Pembedahan blok parafin, meliputi: (a) Blok paraffin yang sudah siap selanjutnya diiris dengan *rotary microtome* dan (b) Irisan jaringan hepar setebal 4 µm, selanjutnya dilakukan *mounting* pada gelas objek/slide dengan gelatin 5%.

Langkah-langkah Penentuan ekspresi Protein MT-1 mengikuti langkah-langkah, sebagai berikut. **Hari 1:** (1) Persiapan slide: (a) Deparaffinization: rendam slide jaringan dengan xilena dua kali, setiap kali selama 15 menit. (b) Rehidrasi: incubasi slide dalam seri etanol berikut: 100% I, 100% II, 95%, 90%, 80%, 70%. 5 menit untuk setiap solusi. Kemudian dinkubasi di dalam air selama 5 menit (Catatan: Langkah 1, hanya untuk slide parafin tertanam. Untuk slide beku, biarkan slide beku kering pada suhu kamar setelah dikeluarkan dari freezer, rendam slide dalam air selama 5 menit, dan lanjutkan ke langkah 2; (2) Protokol untuk Immunostaining: (a) Rendam slide dalam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% (dalam air suling) selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk bagian beku, waktu inkubasi harus 10-30 menit, dan untuk array jaringan beku, waktu inkubasi harus 5-10 menit. Bagian beku mungkin drop off pada slide jika waktu inkubasi terlalu lama. (b) Bilas slide dengan air diikuti dengan 1 x PBS (pH 7.4) sekali, lingkaran bagian jaringan dengan Pap Pen (atau Para-Pen, ImmEdge Pen). (c) Inkubasi slide dengan 1 % serum normal/PBS [Mix 1x 3,5 ml PBS, pH 7,4 dengan 1 tetes (sekitar 35 µl/drop) serum normal dalam tabung] selama 30 menit pada suhu kamar. (d) Drop dari serum normal dari slide. (3) Inkubasi bagian dengan PBS diencerkan pertama dengan antibodi (mengoptimalkan titer antibodi sebelum memulai IHC) dalam ruang lembab selama 1 jam untuk semalam pada suhu kamar. **Hari 2:** (1) Bilas slide dengan 1xPBS selama 3 kali, setiap kali selama 5 menit. (2) Inkubasikan slide dengan dinencerkan PBS Biotin-label antibodi sekunder selama 30 menit pada suhu ruang. [Mix 1.4 1xPBS pH 7,4 ml dan 1 tetes (sekitar 35 µl/drop) dari biotinylated anti-mouse MT-1 dalam sebuah tabung]. (3) Bilas slide dengan 1xPBS selama 3 kali, setiap kali selama 5 menit. (4) Persiapan larutan deteksi: Mix 1xPBS 1,33 ml, 1 tetes (sekitar 35 µl/drop) dari Solusi A, dan 1 tetes (sekitar 35 µl/drop) Solusi B dalam tabung. Inkubasi campuran pada suhu kamar selama 30 menit sebelum digunakan. (5) Tambahkan larutan deteksi disiapkan di langkah 9 ke bagian jaringan. Inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. (6) Bilas slide dengan 1xPBS selama 3 kali, setiap kali selama 5 menit. (7) Membuat larutan segar pengembangan: Mix buffer DAB 1,6 ml, dan 1 tetes (sekitar 35 µl/drop) cair DAB dalam tabung. (8) Tambahkan pengembangan solusi untuk menutupi jaringan, dan mengembangkannya selama 5-30 menit. (9) Hentikan reaksi dengan merendam jaringan dalam air. (10) Counter stain slide jika perlu (Gunakan Harris 'Hematoksilin untuk pewarnaan inti, dan menggunakan eosin Y untuk pewarnaan sitosol). (11) Dehidrasi dengan direndam dalam seri gradasi alkohol: 70% -80% -90% -95% -100%I-100% II, 3 menit untuk setiap solusi, kemudian diinkubasi di Xylene sebanyak dua kali, masing-masing 10 menit. (12) Pemasangan slide (Cat permount Fisher. # SP15-100 atau bahan mounting yang sama dapat digunakan). (13) Tambahkan 2 tetes (sekitar 35 ml / drop) dari solusi detoksifikasi menjadi solusi perkembangan yang digunakan. Inkubasi selama 1 malam. Selanjutnya dapat dibuang.

Penentuan jaringan hepar *Deadema setosum* untuk melihat ekspresi protein MT-1 mengikuti Soini *et al.* (1998). Penentuan dilakukan oleh dua orang secara terpisah. Masing-masing *slide* diperiksa dengan mikroskop pada bidang pandang dengan perbesaran 1000x dan sebanyak 15 lapang pandang yang masing-masing berisi ±1.500 sel. Hasil pemeriksaan selanjutnya difoto.

### Analisis Data

Analisis data secara deskriptif menggunakan metoda kuantitatif (Furchan, 1992). Analisis data tersebut digunakan untuk membandingkan hasil analisis logam berat cadmium dengan hasil ekspresi protein MT-1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Konsentrasi Logam Berat Cd dalam Kompartemen Tubuh *D. setosum*

Hasil analisa kandungan logam berat Cd dalam kompartemen tubuh *Deadema setosum* pada ke 4 stasiun penelitian menunjukkan bahwa rerata kadar Cd bervariasi

namun pada cangkang < duri < gonad < usus (Tabel 2). Keberadaan Cd kompartemen tubuh *D. setosum* melalui proses penyerapan dari rantai makanan. Menurut Umar dkk. (2001), bahwa logam berat yang masuk ke perairan akan mengalami pengendapan, pengenceran dan dispersi kemudian diserap oleh organisme di perairan tersebut.

**Tabel 1. Hasil Analisis Kadar Logam Berat Cd dalam Kompartemen Tubuh *Deadema setosum* (Duri, Cangkang, Gonad, dan Usus)**

Kompartemen Tubuh <i>D. setosum</i>	Kadar Logam Berat Cd (ppm)				Rerata
	St. 1	St. 2	St. 2	St. 4	
Duri	1,13 ± 0,02	1,19 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,75 ± 0,02
Cangkang	0,85 ± 0,02	0,81 ± 0,02	0,72 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,67 ± 0,02
Gonad	1,39 ± 0,02	1,37 ± 0,02	1,32 ± 0,02	1,30 ± 0,02	1,35 ± 0,02
Usus	1,95 ± 0,04	1,90 ± 0,04	1,31 ± 0,02	1,35 ± 0,02	1,63 ± 0,03

Tingginya konsentrasi Cd pada usus dibandingkan dengan gonad, duri dan cangkang disebabkan karena penyerapan (absorpsi) logam berat pada *Deadema setosum* umumnya terkonsentrasi dan terakumulasi pada usus. Warnau *et al.* (1996) melaporkan perbedaan konsentrasi logam berat Cd pada kompartemen tubuh *Paracentrotus lividus* bervariasi, yakni digestive wall > gonads > Aristotle's lantern > coelomic fluid dan berhubungan dengan unsur-unsur dari air dan makanan. Penelitian yang dilakukan oleh Temara *et al.* (1998) menemukan bahwa *Asterias rubens* membutuhkan waktu yang relatif cepat untuk mengakumulasi logam berat Cd dibanding dengan jenis logam berat Pb dan Zn serta akumulasi Pb dan Cd pada kompartemen tubuh *A. rubens* berhubungan dengan kadar logam berat tersebut pada air laut. Penelitian lainnya yang menggunakan Echinoidea jenis *P. lividus* oleh Soualili *et al.* (2007) menemukan bahwa gonad betina dapat mengakumulasi logam berat dengan konsentrasi yang tinggi dan berhubungan dengan konsentrasi logam berat dalam sedimen. Leiwakabessy (2005) juga melaporkan bahwa logam berat mempunyai sifat yang mudah mengikat bahan organik dan mengendap di dasar perairan dan bersatu dengan sedimen sehingga kadar logam berat dalam sedimen lebih tinggi dibanding dalam air. Menurut Rochyatun dan Rozak (2007) bahwa logam berat tidak dapat dihancurkan (*non degradable*) oleh organisme hidup dan terakumulasi ke lingkungan membentuk senyawa kompleks bersama bahan organik dan anorganik secara adsorpsi dan kombinasi.

Berbagai penelitian melaporkan bahwa logam berat Cd umumnya terakumulasi di dalam organ ginjal (Quig, 1998), liver (Almeida *et al.*, 2009; Shah, 2005; Vinodhini dan Narayanan, 2008), insang, otot, testis dan ovarium (Shah, 2005), dan gonad (Soualili *et al.*, 2007). Selain itu, adanya logam berat Cd pada *Deadema setosum* menunjukkan bahwa masuknya logam berat pada rantai makanan di perairan pulau Ambon. Disisi lain, jumlah logam berat yang terakumulasi dalam tubuh biota perairan bergantung pada efek kimia logam berat tersebut dan cenderung berikatan dengan protein dan lipid pada jaringan biologis (Gbrauko dan Friday, 2007). Dijelaskan oleh Gong *et al.* (2000) bahwa jenis protein yang menjadi target utama bagi perlekatan dengan logam berat adalah protein-protein yang memiliki kandungan logam pada struktur proteinnya.

### **Ekspresi Protein MT-1 Akibat Akumulasi Logam Berat Kadmium**

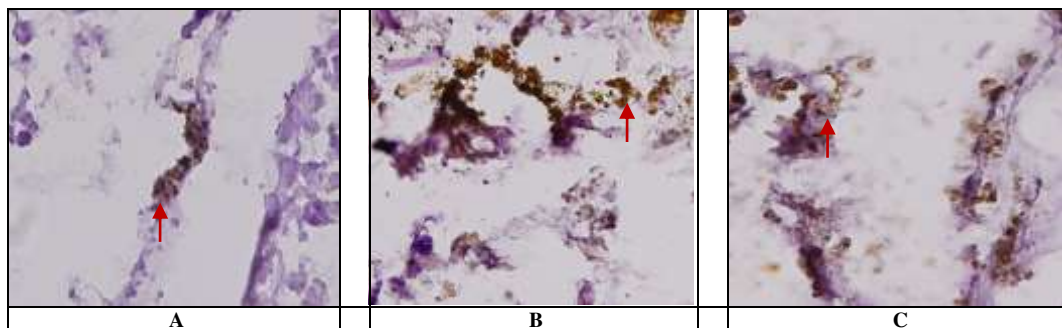
Ekspresi protein MT-1 pada gonad, usus, dan hepar ditunjukkan pada Gambar 1 berdasarkan pemulasan imonohistokimia menggunakan antibodi rabi anti MT-1 *D. setosum*. Hasil pemulasan menunjukkan sel yang mengekspresikan MT-1 berwarna coklat, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan MT-1 berwarna biru pada intinya.

Gambar 1A menunjukkan sel yang mengalami ekspresi protein MT-1 terlihat terkonsentrasi pada satu lokasi. Morfologi sel ini memperlihatkan sel tergabung dalam kelompok-kelompok sel. Gambar 1B menunjukkan sel yang mengalami ekspresi protein

MT-1 terlihat tidak menyebar merata. Morfologi sel ini memperlihatkan sel membentuk kelompok-kelompok sel dengan jumlah sel yang mengalami ekspresi lebih banyak. Gambar 1C menunjukkan sel yang mengalami ekspresi protein MT-1 terlihat menyebar merata. Morfologi sel ini memperlihatkan juga sel membentuk kelompok-kelompok sel dengan jumlah sel yang mengalami ekspresi lebih banyak.

Ekspresi protein MT-1 pada gonad, usus, dan hepar (Gambar 1B) menunjukkan perbedaan morfologi sel. Adanya perbedaan morfologi sel yang mengalami ekspresi protein MT-1 mengindikasikan bahwa logam berat Cd yang terakumulasi pada setiap sel teragat berbeda-beda tergantung pada jenis dan fungsi organ selnya. Analisis AAS menunjukkan bahwa logam berat Cd terakumulasi sangat tinggi pada usus dan gonad. Dapat diduga bahwa akumulasi tersebut menyebabkan perubahan pada struktur sel dan berkaitan dengan strategi protektif *Deadema setosum* untuk melawan stress akibat akumulasi kadmium.

Berdasarkan hasil analisis kandungan logam berat Cd (Tabel 1) pada kompartemen tubuh *D. setosum*, yakni gonad sebesar 1.35 ppm dan usus sebesar 1.63 ppm, bila dibandingkan dengan hasil pemulasan imonohistokimia (Gambar 1), maka dapat disimpulkan bahwa semakin banyak logam berat Cd yang terakumulasi dalam kompartemen tubuh *D. setosum* maka semakin banyak sel yang mengalami ekspresi protein MT-1. Kenyataan ini menunjukkan bahwa ekspresi protein MT-1 berkaitan dengan fungsinya sebagai protein pengikat logam berat dan detoksifikasi logam berat. Dijelaskan oleh Carpena *et al.*, 2007; Ogra *et al.*, 2008; Pearce *et al.*, 1999 bahwa protein MT diketahui memiliki 2 fungsi utama yaitu detoksifikasi logam berat dan *scavenger* radikal bebas. Hal ini mengindikasikan bahwa MT sebagai protein terlibat dalam metabolisme logam berat yang penting dalam menjalankan fungsi sel suatu organism. Karena itu, MT bukan hanya mengikat jumlah logam di dalam sebuah sel, tapi juga mengembalikan kemampuan fungsi protein yang tidak aktif akibat logam kadmium.



**Gambar 1 Hasil Pemulasan Imonohistokimia Menggunakan Antibodi rabbit anti MT-1 *D. setosum*. Pengamatan dengan mikroskop olympus untuk pemotretan slide biasa dengan pembesaran 1000x zoom. A: Ekspresi protein MT-1 pada sel Gonad. B: Ekspresi protein MT-1 pada sel Usus. C: Ekspresi protein MT-1 pada sel Hepar. Ekspresi protein MT-1 ditandai dengan tanda panah, dimana sel berwarna kecoklatan.**

Terkait dengan penggunaan antibody MT-1 dalam penelitian ini, Nielsen *et al.* (2006) menjelaskan bahwa MT-1 memberikan efek menghambat, efek stimulasi, dan memberikan homeostasis. Efek menghambat yang dimiliki MT-1 berkaitan dengan proses menetralkan dan memecah ROS, menghambat sitokin pro-inflamasi, makrorag dan limfosit T, dan menghambat apoptosis (cytochrome c, p53 dan caspase). efek stimulasi MT-1 berkaitan dengan perannya dalam meningkatkan anti-inflamasi parameter neuroprotektif pada CNS, meningkatkan nitrogen, gen penghambat apoptosis dan faktor

pertumbuhan, serta meningkatkan proses recovery fungsional. Mekanisme homeostasis MT-1 berkaitan dengan pengontrolan dan regulasi racun dan logam berat.

Selain itu, hasil penelitian menunjukkan akumulasi logam berat cadmium yang tinggi pada gonad dan usus (Tabel 1) dan memperlihatkan perubahan pada tingkatan sel (Gambar 1). Walaupun tidak menunjuk langsung pada usus dan gonad, tetapi sel yang terakumulasi cadmium menunjukkan perubahan pada struktur histopatologinya. Faix *et al.* (2005) mengungkapkan bahwa peningkatan akumulasi cadmium pada sel akan memicu perubahan histopatologi dan menyebabkan peroksidasi lipid pada organ liver dan ginjal. Ohta *et al.* (2000) menemukan bahwa logam berat kadmium dapat menyebabkan osteoporosis serta umumnya terdeposit di dalam organ liver dan ginjal pada tikus. Hal ini diduga berkaitan dengan terlepasnya logam berat Cd dari protein MT yang memicu akumulasi logam berat cadmium sehingga berpengaruh terhadap organel-organel sel.

Terkait dengan ekspresi protein MT-1 akibat adanya logam berat cadmium di dalam sitoplasma, Thirumoorthy (2007) mengungkapkan bahwa protein MT yang terdiri dari isoform MT-1 dan MT-2 pada hewan memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap keberadaan logam berat. Ekspresi protein MT diinduksi oleh radikal bebas (*Reactive Oxygen Species/ROS*), *glukokortikoid* (GC) dan beberapa sitokin (Kimura & Itoh, 2008). Mekanisme kontrol sintesis protein MT umumnya melibatkan protein *Metal Transcription Factor-1* (MTF-1) (Carpene *et al.*, 2007) yang merupakan sensor Zn dalam sitoplasma (Formigari *et al.*, 2008) dan memiliki keterkaitan dengan gen-gen yang berperan dalam proses homeostasis Zn. Menurut Langmade *et al.* (2000), MTF-1 yang teraktivasi, setelah terjadinya akumulasi Zn, akan mengalami translokasi ke dalam nukleus dan berikatan dengan *Metal Response Element* (MRE) yang terletak pada promotor gen MT sehingga memicu ekspresi protein tersebut. Smith *et al.* (2008) menjelaskan bahwa ion  $Zn^{2+}$  merupakan komponen penting dalam berbagai protein regulator dan sekaligus juga merupakan subjek dalam pengontrolan homeostasis intraseluler. Wei *et al.* (2008) menjelaskan bahwa zink merupakan elemen esensial yang dibutuhkan oleh sekitar 300 enzim untuk melakukan aktivitas biologisnya, salah satunya kekurangan zink dalam sel akan menyebabkan penghambatan pertumbuhan. Hal ini berarti bahwa zink merupakan elemen esensial yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan organisme.

## KESIMPULAN

Kadar Cd yang terakumulasi pada cangkang, duri, gonad dan usus bervariasi berturut-turut sebesar 0,67; 0,75; 1,35 dan 1,63 ppm.

Hasil pemulasan imonohistokimia, menunjukkan sel yang mengekspresikan MT-1 berwarna coklat, sedangkan sel yang tidak mengekspresikan MT-1 berwarna biru pada intinya. Ekspresi protein MT-1 pada gonad, usus, dan hepar menunjukkan perbedaan morfologi sel.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami haturkan kepada Prof. Dr. Rasid, M.Sc selaku pimpinan laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memfasilitasi kami dalam penggunaan laboratorium dan kepada semua pihak yang telah membantu jalannya penelitian hingga tahap akhir penulisan artikel ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almeida, J. A., Barreto, R. E., Novelli, L. B., Castro, F. J., and Moron, S. E., 2009. Oxidative Stress Biomarkers and Aggressive Behavior in Fish Exposed to Aquatic Cadmium Contamination. *Neotropical Ichthyology*, Vol 7, pp. 103-108, 2009.
- Bobocea, A.C., Fertig, E.T., Pislea, M., Seremet, T., Katona, G., Magdalena Mocanu, I.O., Doagă, I.O., Radu, E., Horváth, J., Tanos, E., Katona, L., and Katona, E., 2008. Cadmium and Soft Laser Radiation Effects on Human T Cells Viability and Death Style Choices. *Romanian J. biophys*, Vol. 18, pp, 179–193.
- Carpene, E., Andreani, G., and Isani, G. 2007. Metallothionein Functions And Structural Characteristics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- Daniels, P.J and Andrews, G. K., 2003. Dynamics of the Metal-Dependent Transcription Factor Complex in Vivo at the Mouse Metallothionein-I Promoter. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31.
- Faix, S., Faixova, Z., Boldizarova, K., and Javorsky, P., 2005. The effect of long-term high Heavy Metal Intake on Lipid Peroxidation of Gastrointestinal Tissue in Sheep. *Vet. Med-Czech*, Vol 50, pp. 401-405.
- Flora, S.J.S., Mittal, M., and Mehta, A., 2008. Heavy Metal Induced Oxidative Stress & Its Possible Reversal by Chelation Therapy. *Indian J. Med. Res* Vol. 128. pp. 501-523.
- Flora, S. J. S., 2009. Metal Poisoning: Treatment and Management. Review Article. *Al Ameen. J. Med. Sci*, Vol 2, pp. 4-26.
- Formigari, A., Alberton, P., Cantale, V., De Nadal, V., Feltrin, M., Ferronato, S., Santon, A., Schiaovon, L., and Irato, P., 2008. Relationship between Metal Transcription Factor-1 and Zinc in Resistance to Metals Producing Free Radicals. *Current Chemical Biology*, Vol 2, pp. 256-266.
- Furchan, A., 1982. *Pengantar Penelitian Dalam Pendidikan*. Surabaya: Usaha Nasional.
- Gong P, Ogra Y, and Koizumi S., 2000. Inhibitory effects of heavy metals on transcription factor Sp1. Short Communication. *Industrial Health*, Vol 38, pp. 224-227.
- Gzy, J., Rymer, K., & Gwozdz, E.A. 2009. Differential Response of Antioxidant Enzymes to Cadmium Stress in Tolerant and Sensitive Cell Line of Cucumber (*Cucumis sativus* L). *Acta Biochemica Polonica*, Vol. 56, pp. 723-727.
- John, R., Ahmadb, P., Gadgila, K., and Sharmab, S. 2009. Heavy Metal Toxicity: Effect on Plant Growth, Biochemical Parameters and Metal Accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, Vol. 3.
- Jonak, C., Nakagami, H., and Hirt, H. 2004. Heavy Metal Stress. Activation Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways by Copper and Cadmium. *Plant Physiology*, October, 2004. Vol. 136, pp. 3276-3283.
- Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J., and Andrews. 2000. The regulation factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 275.
- Leiwakabessy F. 2005. Logam Berat di Perairan Pantai Pulau Ambon dan Korelasinya dengan Kerusakan Cangkang, Rasio Seks, Ukuran Cangkang, Kepada Individu dan Indeks Keragaman Jenis Siput Nerita (Neritidae: Gastropoda). Disertasi. Tidak dipublikasikan. Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Nielsen, A.E., Bohr, A., & Penkowa M. 2006. The Balance Between Life and Death of Cell: Role of Metallothioneins. *Biomarker Insights*, Vol 1, pp. 99-111.
- Nordic. 2003. Cadmium Review. Denmark: Prepared by COWI A/S on behalf of the Nordic Council of Ministers.



- Ogra, Y., Onishi, S., Kajiwara, A., Atsuko Hara., & Suzuki, K.T. 2008. Enhancement of Nuclear Localization of Metallothionein by Nitric Oxide. *Journal of Health Science*, Vol 54, pp. 339-342, 2008.
- Ohta, H., Yamauchi, Y., Nakakita, M., Tanaka, H., Asami, S., Seki, Y and Yoshikawa, H. 2000. Relationship between Renal Dysfunction and Bone Metabolism Disorder in Male Rats after Long-Term Oral Quantitative Cadmium Administration. *Industrial Health*, Vol 38, pp. 339–355.
- Pal, M., Horvarth, E., Janda, T., Paldi, E., and Szalai, G. 2006. Physiological Changes and Defense Mechanisms Induced by Cadmium Stress in Maize. Review article. *J. Plant. Nutr. Soil Sci*, Vol 159, 230-246, 2006.
- Patrick, L. 2003. Toxic Metals and Antioxidants. Part II the Role of Antioxidant in Arsenic and Cadmium Toxicity – Toxic Metals part II. *Alternative Medicine Review*.
- Pearce, L.L., Gandley, R.E., Han, W., Wasserloos, K., Stitt, M., Kanai, A.J., McLaughlin, M.K., Pitt, B.R., and Levitan, E.S. 2008. Role of Metallothionein in Nitric Oxide Signaling as Revealed by a Green Fluorescent Fusion Protein. *PNAS*, Vol. 97. pp. 477–482.
- Quig, D. 1998. Cysteine Metabolism and Metal Toxicity. *Alternative Medicine Review*. Volume 3, Number 4, 1998.
- Rico, L.G., Felix, C.F., Burguenso, R.R., and Marini, M.J. 2002. Determination of Cadmium And Zinc and Its Relationship to Metallothionein Level in Swine Kidney. *Rev. In. Contant Ambient*, Vol 18, pp. 157-162.
- Rochyatun, E dan Rozak, A. 2007. Pemantauan Kadar Logam Berat dalam Sedimen di Perairan Teluk Jakarta. *Makara Sains*. Vol. 11. No. 1. April 2007.
- Shah, S.L. 2005. Effects of heavy metal accumulation on the 96-h LC<sub>50</sub> values in *Tenacibarca tinca*. L., 1758. Research article. *Turk. J. Vet. Anim Sci*. Vol. 29, pp. 139-144.
- Smiri, M., Chaoui, A., & Ferjani, E.E. 2010. Interaction between heavy metals and thiol-linked redox reactions in germination. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, Vol 13, pp. 877-883.
- Smith, P J., Wilthshire, M., Furon, E., Beattie, J.H., and Errington, R. J. 2008. Impact of Overexpression of Metallothionein-1 on Cell Cycle Progression and Zinc Toxicity. *Am. J. Physiol Cell*, Vol. 295, pp. 1399-1408.
- Soualili, D., Dubois, P., Gosselin, P., Pernet, P., and Guillou, M. 2007. Assessment of Seawater Pollution by Heavy Metals in the Neighbourhood of Algiers: use of sea urchin, *Paracentrotus lividus*, as Bioindicator.
- Soini, Y., Paakko, P., and Lehto, V-P. 1998. Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer. *American Journal of Pathology*, Vol. 153.
- Temara, A., Skei J.M., Gillan, D., Warnau, M., Jangoux, M., and Dubois, P. 1998. Validation of the Asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) as a Bioindicator of Spatial and Temporal Trends of Pb, Cd, and Zn Contamination in the Field. *Marine Environmental Research*, Vol. 45, pp. 341-356.
- Thirumorthy N, Kumar KT M, Sundar A S, Panayappan L, Chatterjee. 2007. Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 13, pp. 993-996.
- Umar, M.T., Meagaung, W.M., Fachrudi, L. 2001. Kandungan Logam Berat Tembaga (Cu) pada Air, Sedimen dan Kerang *Marcia* sp. di Teluk Parepare, Sulawesi Selatan. *Schi & Tech*, Vol. 2.
- Vinodhini, R., & Narayanan, M. 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *Int. J. Environ. Sci. Tech*, Vol. 5, pp. 179-182.

- Warnau, M., Teyssie, J.L., and Fowler, S.W. 1996. Biokinetics of selected heavy metals and radionuclides in the common Mediterranean echinoid *Paracentrotus lividus*: sea water and food exposures. *Mar Ecol Prog Ser*, Vol 141, pp. 83-94.
- Wei, H., Desouki, M.M., Lin, S., Xiao, D., Franklin, R.B., and Feng, P. 2008. Differential Expression of Metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in Response to Zinc Treatment in Human Prostat Normal and Malignant Cells and Tissues. *Molecular cancer*. Vol. 7, pp. 1-7
- Yokouchi, M., Hiramatsu, N., Hakayawa, R., Kasal, A., Takano, Y., Yao, J and Kitamura, M. 2007. Atypical, bidirection regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death and Differentiation*, Vol 14, pp.1467-1474.