

Pengaruh Logam Berat Kadmium (Cd) Terhadap Ekspresi GEN cGnRH-II Pada Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) Jantan

Effect Of The Heavy Metal Cadmium (Cd) On cGnRH-II Gene Expression In Male Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V)

¹Norman Ari Prayogo, ¹Asrul Siregar, ¹Heri Wijaya, ²Purnama Sukardi, dan ^{*2}Ren Fitriadi

¹Program Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman.

²Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Jenderal Soedirman,

Jl. Dr Soeparno, Purwokerto Utara, Banyumas 53122, Jawa Tengah, Indonesia

*¹e-mail korespondensi : renfitriadi@yahoo.com

Abstract. *The heavy metal cadmium in waters generally has toxic properties and is harmful to living organisms, although some of them are needed in small amounts. Cd is a very dangerous heavy metal because it cannot be destroyed (non-degradable) by living organisms and can accumulate into the organism's body through the food chain. The purpose of this study was to determine the effect of Cd on the reproduction of male Nilem fish (*Osteochilus hasselti* C.V). The procedure was for the test animals to be kept in four fiber tubs containing Cd levels (0 mg/L [control]; 2 mg/L [low]; 4 mg/L [medium]; 6 mg/L [high]) for 4 weeks. The impact of Cd on Nilem reproduction was evaluated by the level of expression of the cGnRH-II gene. The results showed that the effect of cadmium treatment for 4 weeks on the expression value of the cGnRH-II gene had an average range between 0.0036 - 0.3470. The effect of treatment during weeks 2 and 4 did not have a significant effect ($P > 0.05$) in reducing the value of cGnRH-II gene expression in male Nilem, along with increasing cadmium concentration and length of exposure time.*

Keywords : Cadmium, cGnRH-II Gene Expression, Male Nilem Fish

Abstrak. Logam berat kadmium di perairan pada umumnya mempunyai sifat toksik dan berbahaya bagi organisme hidup, walaupun beberapa diantaranya diperlukan dalam jumlah kecil. Cd merupakan logam berat yang sangat berbahaya karena tidak dapat dihancurkan (non-degradable) oleh organisme hidup dan dapat terakumulasi ke tubuh organisme melalui rantai makanan. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh Cd pada reproduksi ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) jantan. Prosedurnya hewan uji disimpan di empat bak fiber yang mengandung Cd dengan kadar (0 mg/L [kontrol]; 2 mg/L [rendah]; 4 mg/L [sedang]; 6 mg/L [tinggi]) selama 4 minggu. Dampak dari Cd terhadap reproduksi ikan Nilem dievaluasi dengan tingkat ekspresi gen cGnRH-II. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan kadmium selama 4 minggu terhadap nilai ekspresi gen cGnRH-II memiliki kisaran rata-rata antara 0,0036 - 0,3470. Pengaruh perlakuan selama minggu ke-2 dan ke-4 tidak memberikan pengaruh yang signifikan ($P > 0,05$) dalam menurunkan nilai ekspresi gen cGnRH-II pada ikan Nilem jantan, seiring dengan meningkatnya konsentrasi kadmium serta lamanya waktu pemaparan.

Kata kunci : Kadmium, Ekspresi Gen cGnRH-II, Ikan Nilem Jantan.

PENDAHULUAN

Logam berat di perairan pada umumnya mempunyai sifat toksik dan berbahaya bagi organisme hidup, walaupun beberapa diantaranya diperlukan dalam jumlah kecil (Supriatno dan Lelifajri, 2009). Peningkatan kadar logam berat dalam perairan akan mengakibatkan logam berat yang semula dibutuhkan untuk berbagai proses metabolisme akan berubah menjadi racun bagi organisme. Logam berat juga akan terakumulasi dalam sedimen dan biota melalui proses gravitasi, biokonsentrasi, bioakumulasi dan biomagnifikasi oleh biota air (Priyanto et al., 2008). Pencemaran logam berat di perairan perlu diperhatikan agar lingkungan dan biota didalamnya tetap terjaga. Beberapa sungai di Banyumas rawan terjadi pencemaran karena adanya pembuangan limbah industri serta banyaknya penggunaan pestisida pada pertanian (Rahmawati, 2018). Laporan pengujian kualitas air dan sumber air Kabupaten Banyumas tahun 2010, kegiatan industri, pertanian, dan penambangan liar merupakan sumber utama pencemaran logam berat di sepanjang Sungai Serayu (Suwarsito dan Sarjanti, 2014).

Pencemar logam berat yang ada di perairan salah satunya adalah Kadmium (Cd). Cd merupakan logam berat yang sangat berbahaya karena tidak dapat dihancurkan (non-degradable) oleh organisme hidup dan dapat terakumulasi ke lingkungan, terutama mengendap di dasar perairan membentuk senyawa kompleks bersama bahan organik dan anorganik secara adsorpsi dan kombinasi (Rumahlatu, 2012). Penyebarannya luas serta memiliki waktu paruh (biological life) yang panjang dalam tubuh organisme hidup yaitu sekitar 10-30 tahun karena tidak dapat didegradasi (Rumahlatu, 2012). Logam berat Cd masuk ke perairan dapat mengakibatkan terganggunya kehidupan biota seperti ikan (Priyanto et al., 2008). Logam berat yang ada di air akan mengendap di dasar dengan lumpur seiring berjalannya proses sedimentasi (Siregar et al., 2019). Menurut Hediando dan Setyadewi (2003), secara umum penyerapan logam

berat seperti Cd oleh ikan adalah melalui air, pakan, dan sedimen. Dampak dari Cd diantaranya pengaruh lethal disebabkan gangguan pada saraf pusat sehingga menyebabkan kematian. Pengaruh sublethal terjadi pada organ-organ tubuh, menyebabkan kerusakan pada hati, penurunan jumlah darah, mengurangi potensi untuk reproduksi, pertumbuhan dan sebagainya (Prayogo et al., 2016).

Kadmium yang ada diperairan masuk melalui insang kemudian terbawa ke dalam sistem pernafasan sampai akhirnya akan menembus sel epitel endothelial kapiler darah untuk masuk ke dalam darah lalu ke otak ikan. Cd yang masuk ke otak dapat mengganggu kinerja dari GnRH (gonadotropin-releasing hormone). Jenis GnRH pada ikan nillem yaitu cGnRH-II berperan dalam pematangan gonad dan neuromodulator (neuron penghantar sinyal), sedangkan sGnRH hanya sebagai neuromodulator (Andersen dan Klungland. 1993). Kedua hormon tersebut berperan penting dalam proses reproduksi ikan (Kang et al., 2011). Logam berat dapat menghambat proses transkripsi saat ekspresi gen cGnRH-II dan dapat meniru efek hormon androgen pada ikan. Selain itu dapat menurunkan LH (luteinizing hormone) sehingga menurunkan kadar testosterone (Prayogo et al., 2016). Proses reproduksi pada ikan akan terganggu akibat masuknya logam berat seperti pematangan seksual dan spermatogenesis (Dietrich et al., 2011).

Ikan nillem (*Osteochilus hasselti*) adalah salah satu ikan spesies asli yang masih banyak ditemukan di perairan umum seperti Kabupaten Banyumas. Ikan ini juga digunakan sebagai ikan konsumsi, sehingga banyak petani ikan yang membudidayakan ikan nillem (Prayogo et al., 2016). Akan tetapi, berdasarkan penelitian Susanto dan Fadlilah (2017) rasio kelamin ikan nillem jantan dan betina tidak seimbang, jumlah ikan nillem jantan diperairan Banyumas lebih sedikit dibandingkan dengan ikan betina. Hal tersebut perlu diperhatikan agar populasi ikan nillem tetap terjaga. Menurut penelitian sharifuddin (2010), menyatakan bahwa saat penelitian ditemukan jumlah ikan betina lebih banyak dari jantan. Hal ini diduga karena sifat ikan betina yang cenderung bergerombol pada saat musim pemijahan. Penelitian tentang pengaruh logam berat Cd terhadap ekspresi gen cGnRH- II pada ikan nillem jantan masih sangat terbatas. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek logam berat Cd terhadap ekspresi gen cGnRH- II pada ikan nillem jantan. Informasi ini sekiranya dapat digunakan di dalam usaha mengkonservasi ikan nillem sebagai ikan.

METODOLOGI PENELITIAN

Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini digunakan metode eksperimen dengan menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan yaitu PK (0 ppm), P1 (2 ppm), P2 (4 ppm), dan P3 (6 ppm). Konsentrasi tersebut ditentukan dari sekitar 0%; 30%; 60%; dan 90% dari nilai LC_{50} pada penelitian Shah dan Altindag (2005) dengan nilai LC_{50} sebesar 6,5 ppm untuk melihat efek sublethal dari logam berat kadmium. Masing-masing perlakuan terdiri dari 60 ekor ikan nillem. Perlakuan dilakukan selama 4 minggu dengan pengambilan sampel setiap 2 minggu sekali, dan diambil sebanyak 3 ikan dari masing-masing perlakuan. Variabel yang diamati adalah aktivitas hipofisis pada ikan nillem jantan. Aktivitas hipofisis diukur dengan mengukur ekspresi gen cGnRH-II pada ikan uji dengan berbagai perlakuan pemberian kadmium selama 4 minggu.

Parameter Penelitian

Parameter utama penelitian ini adalah ekspresi gen cGnRH-II pada ikan nillem jantan. Parameter pendukung adalah kualitas air pada setiap perlakuan dilakukan setiap pengambilan sampel. Parameter kualitas air yang diukur adalah suhu, pH, dan kandungan oksigen terlarut.

Prosedur Penelitian

Persiapan Penelitian

Bak percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 buah bak fiber bundar dengan 1 buah bak untuk kontrol (tanpa perlakuan logam berat) dan 3 buah bak untuk perlakuan kadmium. Masing-masing bak diisi dengan 300 L air dan dilengkapi dengan sistem sirkulasi tertutup untuk menjamin ketersediaan oksigen di dalam air. Ikan yang digunakan sebagai hewan uji adalah ikan nillem berumur 4 bulan yang berukuran 4-5 cm dan berasal dari 1 induk. Pertama, disiapkan ikan nillem sebanyak 240 ekor. Kemudian ikan diaklimasi dalam bak fiber selama 1 hari. Lalu ikan dipindahkan ke bak fiber yang sudah disiapkan masing-masing sebanyak 60 ekor ikan.

Pemberian Perlakuan

Selama masa percobaan pemaparan kadmium, media bak fiber yang digunakan untuk penelitian diberikan kadmium dengan dosis yang berbeda. Percobaan dilakukan pada 4 buah bak fiber, yaitu bak pertama sebagai kontrol tidak diberikan perlakuan kadmium, bak kedua diberikan perlakuan kadmium sebanyak 2 ppm, bak ketiga diberikan perlakuan kadmium sebanyak 4 ppm, dan bak keempat diberikan perlakuan kadmium sebanyak 6 ppm. Rumus pengenceran kadmium menurut Suparjo (2010) yaitu:

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

Keterangan :

N_1 = konsentrasi kadmium dalam larutan stok

N_2 = konsentrasi kadmium yang diinginkan dalam media air

V_1 = volume larutan stok yang akan diambil

V_2 = volume media air perlakuan yang diinginkan

Pemberian pakan sebanyak 1 kali sehari yaitu sore hari.

Pengambilan Sampel

Perlakuan diberikan selama 4 minggu dengan pengambilan sampel setiap 2 minggu. Pada setiap pengambilan data, diambil 3 ekor ikan jantan pada masing-masing perlakuan. Pengambilan hipotalamus ikan nilem jantan dari masing-masing perlakuan dilakukan setiap 2 minggu sekali selama 4 minggu. Pengambilan hipotalamus dilakukan dengan cara membedah kepala ikan. Setelah didapatkan sampel hipotalamus harus segera disimpan dalam *tube* 1,5 mL dan dimasukkan ke dalam *ice box*. Kemudian sampel hipotalamus disimpan di dalam pendingin dengan suhu -80°C sampai dilakukan pengukuran aktivitas gen cGnRH-II.

Isolasi RNA

Isolasi RNA menggunakan produk dari Geneaid yaitu *Total RNA Mini-Kit*. Isolasi RNA dilakukan dengan cara mengambil seluruh hipotalamus ikan, kemudian sampel ditambah 400 μL RB Buffer dan diberi 4 μL β -*Mercaptoethanol* di dalam 1,5 mL lalu otak dihancurkan dengan *Micropestle*. Setelah itu dihomogenkan menggunakan *vortex*, diamkan selama 3 menit di dalam suhu ruang. Suspensi dipindahkan ke Filter Column dan 600 μL *Collection Tube* yang disatukan. Lalu *centrifuge* selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Setelah sampel larutan tersaring, larutan yang berada di *Collection Tube* diberi 400 μL alkohol 70%, lalu dihomogenkan dengan *vortex* (Geneaid, 2017).

Sampel dipindahkan ke RB Column menyatu dengan 2 ml *Collection Tube*, *centrifuge* selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan yang berada di *Collection Tube* dibuang, lalu pasang kembali dengan RB Column, ditambahkan 400 μL W1 Buffer ke RB Column, lalu *centrifuge* kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan yang berada di *Collection Tube* dibuang, pasang kembali dengan RB Column. *Wash Buffer* 600 μL ditambahkan, lalu *centrifuge* kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan yang berada di *Collection Tube* dibuang, pasang kembali dengan RB Column. Ditambahkan 600 μL *Wash Buffer*, lalu *centrifuge* kembali selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan yang berada di *Collection Tube* dibuang, pasang kembali dengan RB Column. Kemudian *centrifuge* kering selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. RB Column dipasangkan dengan 1,5 ml, lalu tambahkan 50 μL *RNase-Free Water* ditengah *matrix column*, didiamkan selama 2 menit memastikan *RNase-Free Water* diserap oleh *matrix*, lalu *centrifuge* selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm untuk mengelusi RNA murni (Geneaid, 2017).

RNA di DNase Treatment

Tabel 1. Komponen DNase Treatment

Komponen	Jumlah
RNA	1 μL
10X reaction buffer with MgCl_2	1 μL
DNase I, Rnase-free (#EN0521)	1 μL
DEPC-treated Water (#R0601)	to 10 μL

DNase Treatment menggunakan produk dari *Thermo Scientific* yaitu DNA free™ *Thermo Scientific-Kit*. DNase Treatment dilakukan dengan menambahkan semua komponen DNase ke tabung. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, pemanasan suhu 37°C dilakukan dengan menggunakan kompor yang diukur dengan termometer. Lalu, ditambahkan 1 mL 50 mM EDTA dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. RNA siap dipakai sebagai template untuk *reverse transcriptase*, kemudian sampel di RT-PCR (*Thermo Scientific*, 2016).

Pengukuran Konsentrasi RNA

Pengukuran konsentrasi RNA menggunakan *Nano Spectrophotometer* merek IMPLN. Pertama alat tersebut dinyalakan tekan tombol on/off, kemudian dilakukan pemilihan pengaturan untuk mengukur konsentrasi RNA. Dipilih dengan menekan tombol ok, dengan ketentuan Lid Factor 10 lalu unit dalam satuan mg/mL. Setelah selesai dengan pengaturan alat, lalu dimulai pengukuran yang sebelumnya ditetaskan blanko (akuabides) menggunakan mikropipet sebanyak 4 μL pada kuvet, tombol sample (berwarna hijau) ditekan. Kemudian pada layar setelah menunjukkan semua nilai 0, kuvet dibersihkan dengan tisu. Siapkan sampel diambil dengan mikropipet sebanyak 4 μL , lalu ditetaskan ke kuvet, ditekan tombol sample (berwarna hijau). Setelah dilayar muncul nilai konsentrasi, dicatat kemudian kuvet

kembali dibersihkan dengan tisu beserta penutup kuvet. Dilanjutkan sampel berikutnya. Setelah semua sampel diukur, dipilih tombol escape sampai kembali pada menu awal. Tombol on/off ditekan kembali (IMPLEN, 2011).

Pengambilan dan Pengukuran Parameter Penelitian

Pengukuran Ekspresi Gen cGnRH-II menggunakan KAPA™ SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kit. Sampel RNA dari masing-masing perlakuan kadmium yang berbeda selama 4 minggu kemudian dievaluasi ekspresi gen penyandi cGnRH-II dengan menggunakan KAPA™ SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Kit (Tabel 2).

Pembuatan Master Mix qPCR

Tabel 2. Komponen Master Mix qPCR

Komponen	Konsentrasi Akhir	20 µL r x n
Nuklease bebas air hingga 20 µL		Sebagaimana diisyaratkan
KAPA™ SYBR® FAST One-Step qRT-PCR (2X)	1x	10 µL
Forward Primer (10 M)	200 nM	0,4 µL
Reverse Primer (10 M)	200 nM	0,4 µL
dUTP (10 mM)	200 nM	0,4 µL
ROX Low	Lihat prosedur	0,4 µL
KAPA RT Mix (50x)	1x	0,4 µL
RNA Template	1 µg	5 µL

Pengaturan One Step qPCR

Pengaturan One Step qPCR dimulai dari mensintesis cDNA pada suhu 42°C selama 5 menit, lalu menonaktifkan RT pada suhu 95°C selama 2-5 menit. Selanjutnya proses denaturasi pada suhu 95°C selama 3 detik dan aneling pada suhu 60°C selama ≥ 20 detik sebanyak 40 siklus. Langkah terakhir adalah proses ekstensi selama 5 menit. Primer yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan primer real time yang spesifik mengamplifikasi gen GnRH pada ikan Nilem. Primer yang digunakan untuk menguji ekspresi GnRH adalah F2 dan R2. Sedangkan untuk *house keeping* gene menggunakan primer Beta actin yaitu FA dan RA (KAPABIOSYSTEM, 2017).

Tabel 3. Desain Primer yang digunakan dalam Real Time PCR (Prayogo et al., 2016)

No	Nama/Kode Primer	Sekuens Komplemen DNA (primer)	Tm	Produk PCR
1.	Forward Real Time cGnRH-II (F2)	CATCTGCAGGCTGTTTGTGG	62,81	75 bp
2.	Reverse Real Time cGnRH-II (R2)	TGCTGAGAGCTGGCAAACCTG	62,83	
3.	Forward β-actin (FA)	GAGCTATGAGCTCCCTGACGG	58,3	53 bp
4.	Forward β-actin (RA)	AAACGCTCATTGCCAATGGT	55,6	

Keterangan: A=Adenine; T=Thymine; C=Cytosine; G=Guanine.

Hasil amplifikasi menggunakan *Real Time* PCR kemudian digunakan untuk membandingkan jumlah molekul DNA hasil amplifikasi gen penyandi cGnRH-II dengan hasil amplifikasi gen β-actin. Nilai perbandingan yang didapatkan kemudian akan dibandingkan kembali dengan kelompok ikan perlakuan berbagai konsentrasi kadmium menurut Forlenza *et al.* (2012) dengan rumus:

$$\Delta\Delta CT = (Ct_{cGnRH-II} - Ct_{actin})_{sampel} - (Ct_{cGnRH-II} - Ct_{actin})_{Kalibrator}, R_{cGnRH-II} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Keterangan:

$\Delta\Delta Ct$ = Siklus Threshold

Ct_{cGnRH} sampel = nilai $Ct_{cGnRH-II}$ sampel ke-i

$Ct_{\beta-actin}$ sampel = nilai $Ct_{\beta-actin}$ sampel ke-i

$Ct_{cGnRH-II}$ kalibrator = nilai $Ct_{cGnRH-II}$ sampel dengan $\beta-actin$ tertinggi

$Ct_{\beta-actin}$ kalibrator = nilai $Ct_{\beta-actin}$ terendah hasil amplifikasi

$R_{cGnRH-II}$ = Tingkat ekspresi gen cGnRH-II

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2019-Januari 2020 di Laboratorium Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, dan Laboratorium Genetika dan Molekuler, Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman.

Analisis Data

Adapun data kuantitatif berupa ekspresi gen penghasil cGnRH-II pada masing-masing perlakuan. Pengaruh kadmium terhadap ekspresi gen cGnRH-II pada ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) jantan dilakukan dengan analisis deskriptif komparatif. *One Way ANOVA* untuk mengetahui konsentrasi kadmium yang dapat mengganggu ekspresi gen

cGnRH-II pada ikan Nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) jantan, apabila berbeda nyata maka akan dilanjutkan dengan uji BNT apabila berbeda nyata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi gen merupakan proses transkripsi materi genetika (DNA) di dalam sel menjadi RNA dan selanjutnya ditranslasi menjadi polipeptida yang spesifik (Madigan *et al.*, 2009). Menurut Dorland (2002), menyatakan bahwa ekspresi gen adalah proses aliran informasi genetik dalam penentuan sifat suatu individu melalui mekanisme transkripsi dan translasi. Transkripsi yaitu proses penyalinan kode genetik yang ada pada DNA menjadi molekul RNA, sedangkan translasi yaitu proses penerjemahan urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA menjadi rangkaian asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein (Ilmanafia, 2018). Salah satu gen yang terekspresi dalam tubuh ikan yaitu GnRH. GnRH pada ikan umumnya dibagi menjadi 2 macam yaitu cGnRH II (*chicken gonadotropin-releasing hormone* II), sGnRH (*salmon gonadotropin-releasing hormone*) (Yorio *et al.*, 2019). Pada ikan air tawar ditemukan 2 macam GnRH yaitu cGnRH-II dan sGnRH, keduanya berperan dalam menstimulasi pelepasan LH di kelenjar hipofisis. Hasil pengamatan menyatakan bahwa peran cGnRH-II lebih besar dibandingkan dengan sGnRH dalam proses reproduksi. Gen cGnRH-II terekspresi sejak 4 hari setelah penetasan, sedangkan sGnRH terekspresi sejak 7 hari setelah penetasan (Fornies, *et al.*, 2003).

Ekspresi gen dapat dianalisis dengan menggunakan *Real Time* PCR atau qPCR. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk memperbanyak DNA suatu organisme (Pertiwi, *et al.* 2015). Pengukuran nilai ekspresi gen cGnRH-II pada ikan Nilem jantan yang terpapar logam berat kadmium dapat dilihat dari nilai R cGnRH-II yang diperoleh dari hasil perhitungan rumus delta CT (Prado, *et al.*, 2013). Menurut Rahardianti dan Nur (2017), menyatakan bahwa gen kontrol yang digunakan dalam qPCR adalah gen *housekeeping* yang terekspresi secara konstitutif, seperti β -aktin. Perlakuan pemaparan kadmium dilakukan selama 4 minggu dan terdiri dari empat perlakuan dengan masing-masing perlakuan kontrol (PK) mengandung 0 ppm, perlakuan 1 (P1) mengandung 2 ppm, perlakuan 2 (P2) mengandung 4 ppm, dan perlakuan 3 (P3) mengandung 6 ppm. Hasil pengukuran nilai ekspresi gen cGnRH-II pada ikan Nilem jantan yang telah diberikan perlakuan logam berat kadmium dapat dilihat pada **Tabel 4**.

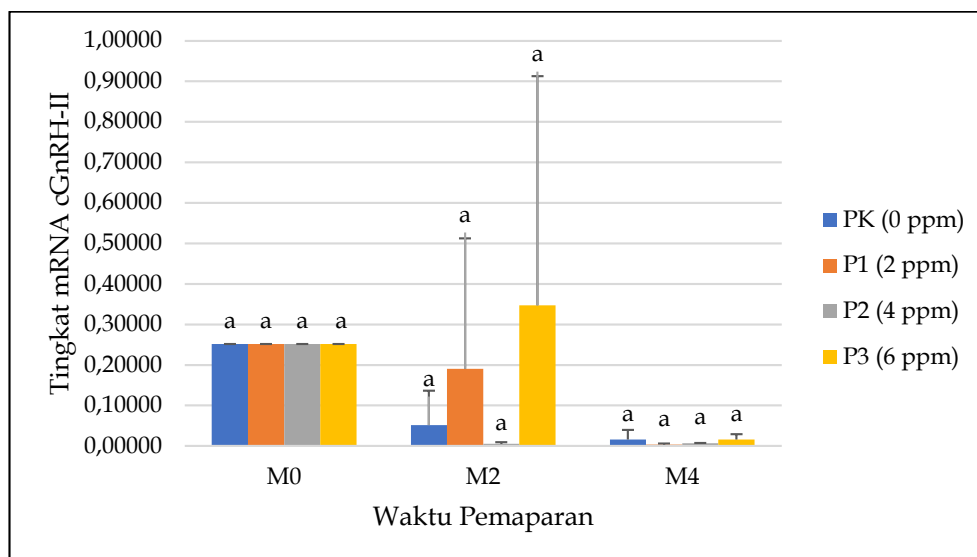
Tabel 4. Nilai Ekspresi Gen cGnRH-II pada Ikan Nilem Jantan yang Terpapar Kadmium

Waktu Pemaparan	Nilai Ekspresi Gen cGnRH-II			
	PK (0 ppm)	P1 (2 ppm)	P2 (4 ppm)	P3 (6 ppm)
M0	0,2517	0,2517	0,2517	0,2517
M2	0,0515	0,1904	0,0057	0,3470
M4	0,0162	0,0036	0,0067	0,0163

Berdasarkan tabel diatas nilai ekspresi gen cGnRH-II selama 4 minggu pemaparan dengan logam berat kadmium memiliki kisaran rata-rata 0,0036-0,3470. Hasilnya dapat dilihat bahwa pada minggu ke-0 nilai ekspresi gen cGnRH-II rata-rata sebesar 0,2517. Pada minggu ke-2 nilai ekspresi gen cGnRH-II rata-rata berkisar antara 0,0057-0,3470. Pada minggu ke-4 nilai ekspresi gen rata-rata berkisar antara 0,0036-0,0163. Pada setiap perlakuan, nilai gen cGnRH-II terekspresi selama pemberian perlakuan sampai minggu ke-4. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen cGnRH-II tetap diproduksi setiap minggu. Menurut Fornies *et al.* (2003), menyatakan bahwa gen cGnRH-II pada ikan mulai terekspresi sejak 4 hari setelah penetasan. Kemudian, Gen cGnRH-II tetap terekspresi pada hipofisis ikan yang belum matang gonad meskipun kadarnya sangat rendah.

Ekspresi Gen cGnRH-II Ikan Nilem Jantan yang Terpapar Cd

Fluktuasi nilai ekspresi gen cGnRH-II dari ikan Nilem pada setiap perlakuan, mulai dari minggu ke-0, minggu ke-2, dan minggu ke-4 dapat dilihat pada **Gambar 5**.



Gambar 1. Tingkat mRNA cGnRH-II (\pm SD) Ikan Nilem yang Dipelihara pada Media Mengandung Logam Berat Kadmium Selama 4 Minggu

Berdasarkan **Gambar 1**, menunjukkan adanya fluktuasi nilai ekspresi gen cGnRH-II ikan nilem, pada setiap perlakuan mulai dari minggu ke-0 sampai minggu ke-4. Perbedaan nilai ekspresi gen cGnRH-II pada ikan nilem didasarkan pada besarnya konsentrasi logam berat kadmium yang digunakan dan jangka waktu pemaparan. Pada minggu ke-0 menunjukkan bahwa nilai ekspresi gen cGnRH-II ikan nilem jantan memiliki nilai yang sama yaitu 0,2517. Hal ini disebabkan karena pada minggu ke-0, belum diberikan perlakuan logam berat kadmium. Sehingga nilai ekspresi gen cGnRH-II pada ikan nilem jantan sama pada setiap perlakuan dan tidak terjadi fluktuasi. Pada minggu ke-0 ikan masih dapat tumbuh dengan baik karena tidak ada bahan toksik yang menghambat metabolisme tubuhnya (Rahayu *et al.*, 2017).

Pada minggu ke-2, nilai ekspresi gen cGnRH-II pada perlakuan kontrol (PK) hingga perlakuan 3 (P3) menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa pada minggu ke-2 pemberian perlakuan logam berat kadmium belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap fluktuasi penurunan ekspresi gen cGnRH-II. Faktor yang mempengaruhi kadmium terhadap ekspresi gen yaitu umur hewan uji, konsentrasi yang rendah, dan waktu pemaparan yang singkat. Selain itu, dimungkinkan karena ikan nilem telah beradaptasi dengan logam berat kadmium yang diberikan selama waktu pemaparan (Prayogo *et al.*, 2016). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Foran *et al.* (2002) yaitu menggunakan ikan medaka (*Oryzias latipes*) sebagai hewan uji. Konsentrasi kadmium yang digunakan sebesar 0-10 ppb dengan waktu pemaparan selama 2 minggu. Tujuannya yaitu untuk mengetahui pengaruh pemaparan kadmium terhadap fungsi endokrin dan reproduksi. Pemaparan selama 2 minggu dengan konsentrasi kadmium 0-10 ppb hasilnya tidak berbeda nyata. Hal tersebut menandakan bahwa konsentrasi kadmium sebesar 0-10 ppb dengan pemaparan selama 2 minggu tidak berpengaruh terhadap fungsi endokrin dan reproduksi pada ikan.

Jenis dan umur hewan uji juga sangat menentukan pengaruh ekspresi gen cGnRH-II pada ikan. Pada penelitian Foran *et al.* (2002), dijelaskan bahwa ikan yang digunakan sebagai hewan uji yaitu ikan medaka dewasa. Sehingga tingkat perubahan hormon yang berperan dalam sistem endokrin dan reproduksi tidak terganggu akibat pemaparan kadmium karena lebih toleran. Selain itu tingginya hormon steroid pada ikan menyebabkan metabolisme ikan tetap berjalan. Hal tersebut menyebabkan ekspresi gen cGnRH-II yang berfungsi dalam sistem reproduksi tidak terpengaruh oleh pemaparan kadmium. Menurut Pait dan Nelson (2002), menyatakan bahwa waktu pemaparan logam berat kadmium selama 2 minggu dengan konsentrasi kadmium yang sangat rendah belum memberikan pengaruh yang signifikan.

Pada minggu ke-4, nilai ekspresi gen cGnRH-II pada perlakuan kontrol (PK) hingga perlakuan 3 (P3) menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Berdasarkan hasil tersebut, dapat diketahui bahwa pada minggu ke-4 pemberian perlakuan logam berat kadmium belum memberikan pengaruh yang signifikan terhadap tingkat ekspresi gen cGnRH-II. Hal ini memungkinkan bahwa ikan telah beradaptasi dengan lingkungan yang mengandung logam berat. Akumulasi kadmium dalam tubuh ikan dipengaruhi oleh jenis hewan uji, jenis logam berat, konsentrasi, dan waktu pemaparan dari logam berat tersebut (Vinodhini dan Narayan, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Kozak *et al.* (2018) dengan menggunakan salah satu jenis ikan mas. Konsentrasi kadmium yang digunakan yaitu sebesar 0,4 ppm dan 4 ppm dengan pemaparan selama 1-5 bulan. Tujuannya adalah untuk mengetahui efek kadmium terhadap reproduksi dan pematangan gonad pada ikan mas. Pada bulan pertama dengan pemaparan kadmium sebesar 0,4 ppm

hasilnya yaitu tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal tersebut menandakan bahwa kadmium tidak mempengaruhi ekspresi gen GnRH karena sistem reproduksi dan pematangan gonad pada ikan tidak terpengaruh. Pada penelitian ini akumulasi kadmium dalam otak hanya sedikit, karena konsentrasi kadmium yang digunakan rendah.

Tingkat konsentrasi, waktu pemaparan, dan jenis logam berat sangat menentukan pengaruh terhadap ekspresi gen cGnRH-II pada ikan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Prayogo *et al.* (2016), menggunakan ikan nilem sebagai hewan uji. Logam berat yang digunakan yaitu HgCl dengan konsentrasi 0 ppm; 0,025 ppm; 0,05 ppm; dan 0,1 ppm dan waktu pemaparan selama 8 minggu. Berdasarkan penelitian tersebut hasilnya yaitu berbeda nyata ($P < 0,05$), karena pada minggu ke 2, 4, 6, dan 8 terjadi penurunan ekspresi gen cGnRH-II. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa jenis logam berat HgCL dengan berbagai konsentrasi dan waktu pemaparan berpengaruh pada ekspresi gen ikan nilem. Menurut Murtini *et al.* (2008), menyatakan bahwa urutan toksisitas logam berat dari yang tertinggi ke yang paling rendah terhadap ikan pada lingkungan yang tercemar yaitu $Hg^{2+} > Cd^{2+} > Ag^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > As^{2+} > Zn^{2+}$. Dapat disimpulkan bahwa logam berat Hg lebih toksik dibandingkan dengan Cd.

Keberadaan logam berat kadmium di sekitar perairan Banyumas seperti di Sungai Serayu memiliki kisaran kadar logam berat kadmium sebesar 0,045-0,079 ppm (Suwarsito dan Sarjanti, 2014). Kadar logam berat kadmium di sungai tersebut sudah melewati batas baku mutu air yang sudah ditentukan menurut PP No. 82 tahun 2001 yaitu sebesar 0,01 ppm. Air yang digunakan oleh masyarakat untuk budidaya ikan di Banyumas bersumber dari sungai-sungai yang ada di sekitarnya. Berdasarkan hal tersebut, air yang digunakan untuk budidaya ikan sudah tercemar logam berat kadmium. Hal tersebut dapat menyebabkan ikan yang ada di Banyumas sudah beradaptasi dengan lingkungannya sehingga ikan tidak terpengaruh terhadap perlakuan logam berat kadmium yang diberikan pada saat penelitian (Suwarsito dan Sarjanti, 2014).

KESIMPULAN

Logam berat kadmium tidak memberikan pengaruh terhadap ekspresi gen cGnRH-II pada ikan nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) jantan. Berbagai konsentrasi logam berat kadmium tidak mengganggu terhadap ekspresi gen cGnRH-II pada ikan nilem (*Osteochilus hasselti* C.V) jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, O., and Klungland, H. 1993. The Salmon GnRH Encoding Gene in Teleost Fish. *International Review of Cytology*, 147: 165-191.
- Dietrich, M.A., Grzegorz, D.J., Hilwa, P., Ciereszko, A. 2011. Carp Transferrin Can Protect Spermatozoa Against Toxic Effects of Cadmium Ions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 153(4): 422-429.
- Dorland. 2002. Kamus Kedokteran. EGC. Jakarta.
- Foran, C.M., Peterson, B.N., Benson, W.H. 2002. Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133(3): 345-354.
- Forlenza, M., Kasier, T., Savelkuol, H.F.J., Wiegertjes, G.F. 2012. The Use of Real-Time Quantitative PCR for the Analysis of Cytokine mRNA Levels. *Cytokine Protocol*, 7-23.
- Fornies, M.A, Carrillo, M., Mananos, E., Sorbera, L.A., Zohar, Y., Zanuy, S. 2003. Relative potency of the forms of GnRH and their analogs on LH release in sea bass. *Journal of Fish Biology*, 63 (1): 73-89.
- Geneaid. 2017. Total RNA Mini Kit Protocol. Geneaid Biotech Ltd. New Taipei, Taiwan.
- Hedianto, S., dan Setyadewi, N.M. 2003. Analisis Kandungan Logam Berat Dari Beberapa Jenis Ikan Hasil Budidaya Karamba Sebagai Sumber Olahan Pangan. *Majalah Blam*, 10(1): 8-15.
- Ilmanafia. 2018. Transkripsi dan Translasi. <https://www.slideshare.net/ilmanafia13/transkripsi-translasi>. Diakses pada tanggal 20 Agustus 2020.
- IMPLEN. 2011. NanoPhotometer® P-Class User Manual P 300/P 330/P 360 Version 2.1. Implen Inc, Los Angeles Country, USA. 1-70p.
- Kang, K.S., Shimizu, K., Azuma, M., Ui, Y., Nakamura, K. 2011. Gonadotropin- Releasing Hormone II (GnRH II) Mediates the Anorexigenic Actions Of α Melanocyte-Stimulating Hormone (α MSH) And Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) In Goldfish. *Peptides*, 32(1): 31-35.
- KAPABIOSYSTEM. 2017. KAPA SYBR® FAST One-Step qRT-PCR Master Mix (2X) Kit protocol. Manufacturing, R&D Cape Town, South Africa.
- Kozak, E.D., Socha, M. Gosiewski, G., Trojnar, E.L., Chyb, J., Popek, W. 2018. Protective effect of melatonin on cadmium-induced changes in some maturation and reproductive parameters of female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(10): 9915-9927.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2009. *Biology of Microorganisms*. 12th ed. Prentice Hall International. New York.
- Murtini, J.T., Kurniawan, A.D., Dewi, E.N. 2008. Pengaruh Waktu Perendaman dan Konsentrasi Karboksimetil Kitosan untuk Menurunkan Kandungan Logam Berat Hg, Cd, dan Pb pada Kerang Hijau (*Perna viridis* Linn.). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3(1): 37-44.

- Pait, A.S and J.O. Nelson. 2002. Endocrine Distruption in Fish an Assesment of Recent Research and Result. NOAA Tech Memo. Silver Spring MD. Center For Coastal Monitoring and Assessment 55pp.
- Pertiwi, N.P.D., Mahardika, I.G.N.K., Watiniasih, N.L. 2015. Optimasi Amplifikasi DNA Menggunakan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) pada Ikan Karang Anggota Famili Pseudochromidae (Dottyback) untuk Identifikasi Spesies secara Molekular. *Jurnal Biologi*, 19(2): 53-57.
- Prado, M., Boix, A., Holst, C.V. 2013. Development of A Real-Time PCR Method for The Simultaneous Detection of Mackerel and Horse Mackerel. *Food Control*, 34 : 19-23.
- Prayogo, N.A., Hidayati, A., Siregar, A.S., Yunasfi. 2016. Uji Toksisitas Letal dan Subletal Logam Berat Merkuri (Hg) Terhadap Ikan Nilem (*Osteochilus hasselti*). *OmniAkuatika*, 12(1): 86-94.
- Prayogo, N.A., Siregar, A.S., Sukardi, P. 2016. The Disruptive Effect Mercurychloride (HgCl) on Gene Expression of cGnRH-II, sGnRH, and Estradiol Level in Silver Sharkminnow (*Osteochillus hasseltii C.V.*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(4): 1003-1009.
- Priyanto, N., Dwiyitno, Ariyani, F. 2008. Kandungan Logam Berat (Hg, Pb, Cd, Dan Cu) Pada Ikan, Air, dan Sedimen Di Waduk Cirata, Jawa Barat. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 3(1): 69-78.
- Rahardianti, R., dan Nur, E.M. 2017. Akurasi Metode Real PCR Untuk Analisis Ekspresi Gen PmVRP15. *Prosiding Pertemuan Teknis Teknisi Litkayasa Lingkup BBPBAP Jepara*. Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. 166 hal.
- Rahayu, N.I., Rosmaidar, Hanifah, M., Karmil, T.F., Helmi, T.Z., Daud, R. 2017. Pengaruh Paparan Timbal (Pb) terhadap Laju Pertumbuhan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *JIMVET*, 01(4): 658-665.
- Rahmawati, R.F. 2018. *Kajian Tingkat Pencemaran Air Sungai Logawa di Kabupaten Banyumas*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Purwokerto.
- Rumahlatu, D. 2012. *Biomonitoring: Sebagai Alat Asesemen Kualitas Perairan Akibat Logam Berat Kadmium Pada Invertebrata Perairan*. *Saintis*, 1(1): 10-34.
- Shah, L.S., and Altindag, A. 2005. Effect of Heavy Metal Accumulation on The 96-h LC 50 Values in Tench *Tinca tinca L.*, 1758. *Turk J Vet Anim Sci*, 29: 139-144.
- Sharifuddin, B.A.O. 2010. Aspek Reproduksi Ikan Nilem, *Osteochilus vittatus* (Valenciennes, 1842) di Danau Sidenreng, Sulawesi Utara. *Jurnal Iktiologi Indonesia*, 10(2): 111-122.