

**Monograf**



# **Metoda Ekotoksikologi Perairan Laut Terumbu Karang**

**NOORSALAM R. NGANRO, Ph.D.**

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati  
Institut Teknologi Bandung

**BANDUNG, 2009**

## Kata Pengantar

Setelah sekian lama sejak 1992, disertasi PhD yang berjudul "*The Development of Tropical Marine Water Quality Bioassay Using Symbiotic Coelenterates*", dinyatakan lulus dari Departement of Marine Sciences & Coastal Management (at the Centre for Tropical Coastal Management Studies), di Universitas Newcastle upon Tyne, England. Saya baru pertengahan tahun 2009 ini berkesempatan membaca ulang dan meminta juga mantan murid saya untuk membaca dan menterjemahkannya dalam bahasa Indonesia. Terimakasih banyak kepada Moekti, Angga dan Nuri atas bantuannya yang sangat berharga. Mereka menyarankan agar metoda ekotoksikologi yang pernah dikembangkan ini, sebaiknya segera disebarluaskan, karena teknik dan informasi ilmiahnya masih sangat relevan dengan kondisi perkembangan permasalahan kualitas lingkungan perairan laut pesisir kita di Indonesia. Apalagi isu ini menjadi perhatian masyarakat dunia sejak diselenggarakan dengan sukses Konferensi Samudara Dunia, di Manado, dan issue Perubahan Iklim Dunia, Pemanasan Global yang mempunyai implikasi signifikan pada ekosistem terumbu karang kita di Indonesia masa kini dan ke depan, sebagai ancaman serius terhadap pusat segitiga keanekaragaman karang tertinggi dunia (*coral triangle of the world*). Metoda-metoda dalam buku ini diharapkan dapat dipergunakan oleh siapa saja yang berminat untuk penelitian, pemantauan, penilaian dampak dan evaluasi terhadap kualitas lingkungan perairan laut pesisir, khususnya pada ekosistem terumbu karang.

Karena metoda ini banyak dirujuk dalam jurnal-jurnal internasional biologi/ekologi laut dan dalam *Annual Review Ecotoxicology of Tropical Marine Ecosystems*, maka saya teringat untuk menuliskan ulang dalam bentuk Monograf, dibagi dalam delapan Bab, dalam bahasa Indonesia, mudah diakses secara elektronik, dengan judul "**Metoda Ekotoksikologi Perairan Laut Terumbu Karang**". Semoga buku ini dapat menambah rujukan ilmiah bagi mahasiswa, peneliti, professional pengambil keputusan, konsultan lingkungan, terutama yang tertarik untuk memperkaya informasi dan data ilmiah, serta dapat mengembangkan terus penelitian dan aplikasinya pada kondisi ekosistem terumbu karang Indonesia dalam negara kepulauan tropis terbesar di dunia. Sekaligus melaksanakan amanat Undang-Undang Republik Indonesia No 27 Tahun 2007 tentang Pengelolaan Wilayah Pesisir dan Pulau-Pulau Kecil, dan Undang-Undang Republik Indonesia No 32 Tahun 2009 tentang Perlindungan dan Pengelolaan Lingkungan Hidup, demi pembangunan berkelanjutan.

Salam sejahtera, selamat & sukses bekerja!

Bandung, November 2009

Noorsalam Rahman Nganro (email: noor@sith.itb.ac.id),

Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

## PENGEMBANGAN BIOASSAY KUALITAS AIR LAUT MENGGUNAKAN SIMBIOSIS COELENTERATA

### ABSTRAK

Bioassay telah digunakan secara ekstensif di perairan temperata dalam kurun waktu terakhir, namun sejauh ini pengembangan teknik untuk mendeteksi polusi di perairan tropis relatif masih sedikit. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengevaluasi sejumlah parameter fisiologi pada coelenterata laut, yang dapat digunakan dalam teknik bioassay kuantitatif sehingga dapat diaplikasikan di perairan tropis.

Indeks-indeks biologi yang digunakan pada coelenterata temperata *Anemonia viridis* setelah terdedah pada konsentrasi tembaga ( $0,01-0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ ) diantaranya adalah assay pada tingkat molekuler, seluler, dan organisma, misalnya produksi protein-protein yang merespon stress/cekaman (35, 39, 69, dan 127 kDa) pada hewan/inang setelah terdedah tembaga selama 2 jam dengan konsentrasi  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ ; penurunan yang signifikan dari konsentrasi klorofil (chl)-a dan chl-c<sub>2</sub> dan kenaikan rasio chl-a : chl-c<sub>2</sub> pada zooxanthellae simbiotik setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 72 jam; penurunan yang signifikan dari nilai *Mitotic Index* (MI) pada zooxanthellae setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,01 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 6 jam, serta respon *hormesis* dalam laju pembelahan zooxanthellae setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 30 menit; lepasnya zooxanthellae secara signifikan setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 60 jam; kontraksi tentakel dan produksi mukus setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 5 hari, serta respon mortalitas setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  selama 5 hari.

Bukti yang didapatkan dari anemone *A. viridis* setelah terdedah tembaga dengan konsentrasi  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  mengkonfirmasi kejadian respon *bleaching* pada simbiosis coelenterata yang mengalami cekaman; hasil-hasil yang didapatkan meliputi hilangnya zooxanthellae dan konsentrasi klorofil yang menurun pada zooxanthellae. Disarankan bahwa pengukuran chl-c<sub>2</sub> atau rasio chl-a : chl-c<sub>2</sub> pada zooxanthellae dapat menjadi indikator potensial dari respon *bleaching* pada coelenterata yang mengalami cekaman dan bersimbiosis dengan alga. Indeks yang digunakan pada zooxanthellae dari *Anemonia* yang terdedah tembaga lebih sensitif daripada pengukuran total chl-a dan hilangnya zooxanthellae.

Pengukuran bentuk-bentuk mitosis zooxanthellae yang terdapat pada *Anemonia* menggunakan teknik *squash* dan *Feulgen staining reaction*, memberikan hasil yang jelas dan tidak ambigu jika dibandingkan dengan teknik *cell plate*. Hasil yang didapatkan dari teknik *Feulgen* menunjukkan nilai indeks 2-3 kali lebih tinggi daripada hasil metode *cell plate*. Teknik *Feulgen* memberikan hasil yang dapat langsung dinyatakan sebagai *mitotic indices* (MI) daripada hasil yang diberikan dari metode *cell plate*, yang lebih dapat dideskripsikan sebagai pengukuran pembelahan sel. Penggunaan teknik *Feulgen stain* dapat secara sukses diaplikasikan pada anemon tropis *Heteractis sp.* yang berasal dari Teluk Jakarta, untuk pengukuran mitosis pada zooxanthellae simbiotik. Pengukuran MI pada zooxanthellae dari *Anemonia* yang terdedah tembaga cenderung lebih sensitif dibandingkan teknik lain yang digunakan hingga saat ini.

Logam berat yang bersifat kontaminan (Pb, Cu, Cd, Fe, Zn, dan Mn) yang dianalisa pada *Padina tenuis* menunjukkan tingginya tingkat polusi logam berat Zn dan Mn di perairan Teluk Jakarta. Konsentrasi logam berat yang tercatat pada alga *P. tenuis* dan bivalvia *Isognomon isognomon* mengindikasikan bahwa perairan Teluk Jakarta memiliki tingkat pencemaran logam berat yang relatif tinggi.

Bioassay eksperimental dengan *Heteractis* dari dua lokasi yang berbeda menunjukkan respon-respon yang berbeda dalam MI pada zooxanthellae ketika anemon itu didedahkan pada konsentrasi tembaga yang sama (yakni pada  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Anemon yang berasal dari lokasi dengan tingkat polusi lebih rendah menunjukkan respon yang lebih sensitif jika didedahkan pada tembaga dibandingkan dengan anemon yang berasal dari lokasi dengan tingkat polusi yang lebih tinggi. Zooxanthella pada anemon yang berasal dari kedua lokasi di Teluk Jakarta telah menunjukkan respon *hormesis* yang jelas, yang masing-masing memiliki potensi untuk menaksir tingkat polusi pada perairan pesisir.

Sebagai tambahan, cukup jelas bahwa mengukur protein-protein yang muncul ketika terjadi cekaman (*stress proteins*) pada *Anemonia* dapat menawarkan pengetahuan mengenai cara menaksir polusi lingkungan dan kesehatan umum dari coelenterata, karena anemon yang diberi perlakuan *heat shock* dan pendedahan terhadap tembaga memproduksi *stress proteins* yang serupa. Hubungan antara produksi *stress proteins* dan hilangnya zooxanthellae masih harus diklarifikasi lebih lanjut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pekerjaan ini disponsori oleh World Bank XVII–Indonesian University Projects, pada tahun 1987-1992. Saya berterima kasih kepada semua pihak yang dalam satu atau banyak hal telah memungkinkan bagi saya untuk melakukan penelitian pada University of Newcastle upon Tyne.

Dengan tulus saya ucapkan terima kasih pada *supervisor* saya, Dr. Barbara Brown, untuk bantuannya yang tidak ternilai, dorongannya baik pada awal dan selama studi ini berlangsung, serta untuk membaca dan mengoreksi manuskrip.

Saya ucapkan terima kasih pula kepada Dr. David Miller, St. James Hospital, University of Leeds, untuk bantuannya dan bimbingannya dalam analisis *shock protein*.

Terima kasih dengan tulus saya ucapkan pada Prof. Dr. Soelaksono Sastrodihardjo, Direktur dari Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati, Institut Teknologi Bandung, Indonesia untuk dukungan serta dorongannya.

Terima kasih dengan tulus juga saya ucapkan pada Dr. A.R.D. Stebbing (untuk sarannya pada bioassay eksperimental); Dr. C.V. Givan (untuk sarannya pada analisis klorofil); Dr. S.A. Haroun (untuk teknik *Feulgen stain* miliknya); Dr. Jeremy Thomason dan Dr. Martin Le Tissier, untuk bantuannya dan pembacaan draft; Mr. Watt (untuk analisis logam berat dengan AAS); Mr. Bob Hewit (untuk foto-fotonya); Dr. A.J. Edwards, Dr. N.V.C. Polunin, Mrs. Carol Weiss di Centre for Tropical Coastal Management Studies, untuk bantuan mereka; staf dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanografi, Laboratorium Penelitian Perikanan Kelautan, dan Gelanggang Samudera, Ancol, Jakarta, yang dengan baik telah mengizinkan saya untuk menggunakan fasilitas-fasilitas mereka untuk eksperimen saya; Pak Soemarno untuk bantuannya selama di lapangan; kolega saya Mr. Tony Harland, Mr. Vince Sharp, dan Ms. Evi Zamani, untuk kolaborasi mengagumkannya; dan saya meminta maaf pada mereka yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu dalam daftar ini.

Akhirnya, saya terutama sekali berhutang pada istri saya, Nelly, untuk dukungannya tanpa henti, pengertiannya yang hebat serta untuk menjaga kedua putri kami, Riri dan Nabila, selama masa studi saya di UK, jauh dari rumah selama 5 tahun, serta pada orang tua saya untuk dukungan dan dorongannya. Pekerjaan ini didedikasikan untuk siapa saja yang tertarik dengan pengembangan bioassay kualitas perairan laut tropis menggunakan coelenterata.

Note: LULUS PhD pada Januari 1992.

## DAFTAR ISI

Abstrak

Ucapan Terima Kasih

Daftar Isi

<b>Bab I</b>	Tinjauan Pustaka
	1. Terumbu Karang sebagai Sumber Daya Alam yang berada dalam Tekanan.
	2. Efek Ekologis dan Fisiologis Coelenterata dari Logam Berat.
	3. Coelenterata sebagai Indikator Polusi Logam Berat.
	4. Penggunaan Coelenterata Laut dalam Bioassay
<b>Bab II</b>	Hilangnya Zooxanthellae pada Anemon <i>Anemonia viridis</i> sebagai Respon terhadap Kisaran Konsentrasi Tembaga
<b>Bab III</b>	<i>Mitotic Index</i> dari Zooxanthellae pada Anemon <i>Anemonia viridis</i>
<b>Bab IV</b>	Konsentrasi Klorofil dari Zooxanthellae pada Anemon <i>Anemonia viridis</i> sebagai Hasil dari Pendedahan terhadap Tembaga
<b>Bab V</b>	<i>Molecular Stress Markers</i> pada Anemon <i>Anemonia viridis</i>
<b>Bab VI</b>	Tingkat Logam Berat Lingkungan di Perairan Teluk Jakarta
<b>Bab VII</b>	<i>Mitotic Index</i> dari Zooxanthellae pada Anemon Tropis <i>Heteractis sp.</i> Sebagai Respon terhadap Pendedahan Tembaga
<b>Bab VIII</b>	Kesimpulan
	Referensi

## **Bab I**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

Bioassay telah digunakan secara ekstensif pada perairan temperata dalam kurun waktu terakhir, namun sejauh ini pengembangan teknik untuk mendeteksi polusi pada perairan tropis relatif masih sedikit. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengevaluasi sejumlah parameter fisiologi pada coelenterata laut, yang dapat digunakan dalam teknik bioassay kuantitatif sehingga dapat diaplikasikan pada perairan tropis.

Coelenterata dipilih sebagai organisme yang dipelajari mengingat kelimpahannya dan pentingnya organisme tersebut pada zona pesisir tropis, terutama di Indonesia dimana banyak terdapat terumbu karang *fringe* yang tersebar pada 13.000 pulauanya. Pada awalnya, dalam pekerjaan ini, coelenterata temperata telah dipelajari namun pada akhirnya pekerjaan ini diperluas pada anemon laut tropis yang terdapat di Teluk Jakarta, Indonesia, sebuah area yang beban polusinya terdokumentasikan dengan baik (Ongkosongo, 1990).

Pada bagian ini, sejumlah literatur yang relevan ditinjau berdasarkan urutan berikut :

1. Terumbu Karang sebagai Sumber Daya Alam yang berada dalam Tekanan.
2. Efek Ekologis dan Fisiologis Coelenterata dari Logam Berat.
3. Coelenterata sebagai Indikator Polusi Logam Berat.
4. Penggunaan Coelenterata Laut dalam Bioassay.

#### **I.1. Terumbu Karang sebagai Sumber Daya Alam yang Berada dalam Tekanan.**

Terumbu karang memiliki fungsi biologi dan fisik yang penting dalam zona pesisir tropis; terumbu karang memproteksi garis batas pesisir dari sebuah pulau dan benua dari ombak samudera; terumbu karang juga memberikan kesempatan bagi perkembangan basin bersedimen dangkal dan mangrove yang terkait, serta komunitas lamun. Sebagai hasil dari tingkat produktivitasnya yang tinggi, terumbu karang telah menjadi basis dari penghidupan, keamanan, dan budaya masyarakat pesisir serta komunitas laut pada wilayah tropis (Craik *et al.* 1990).

Terumbu karang merupakan salah satu dari komunitas dunia yang memiliki tingkat produktivitas tertinggi, beragam secara taksonomi, dan bernilai estetis (Barnes, 1980; Johannes, 1983). Dalam terminologi produktivitas primer pada ekosistem tropis, terumbu karang menempati urutan kedua dalam produksi karbon ( $985-7300 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ) setelah hutan hujan tropis ( $5000-8000 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ); berada satu urutan dibawah terumbu karang adalah mangrove ( $350-5000 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ), padang lamun ( $120-320 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ) dan lautan tropis ( $50-75 \text{ g C m}^{-2} \text{ y}^{-1}$ ) (Mann, 1985).

Secara taksonomi, terumbu karang dikenal memiliki 7500 spesies terumbu dan menutupi area seluas  $2 \times 10^6 \text{ km}^2$  di lautan tropis sekeliling dunia (Achtuv dan Dubinsky, 1990). Sebagai bentuk geologis yang masif, terumbu karang menyediakan perlindungan ombak secara ekstensif sepanjang garis pantai; produksi biologis terumbu karang menghasilkan komoditi pangan seperti ikan-ikan, molluska, lobster, dan udang.

Craik *et al.* (1990) mengungkapkan bahwa produksi perikanan yang berasal dari area terumbu karang tergolong tinggi; hasil panen ikan dan udang-udangan per unit area terumbu di Great Barrier Reef, Australia (termasuk terumbu dan landas hingga kedalaman 200 m) adalah sekitar  $4-6 \text{ ton km}^{-2} \text{ y}^{-1}$ .

Ekosistem terumbu juga merupakan area fokus utama untuk olahraga selam, memancing, serta koleksi kerang, yang berkontribusi pada perkembangan industri pariwisata.

Manfaat lain dari terumbu karang adalah kemampuannya menciptakan dan memberikan keindahan putih pada pasir pantai tropis sebagai hasil dari fragmentasi dan transportasi materi-materi kalsium karbonat yang berasal dari rangka terumbu dan organisme terumbu lainnya; produksi material seperti ini telah diperkirakan sebesar 500 ton per-are per tahun (Johannes, 1983).

Sayangnya, ekosistem terumbu karang di seluruh dunia tengah berada dibawah tekanan yang kian meningkat saat ini, beberapa lokasi bahkan menunjukkan persentase penutupan yang semakin berkurang akibat gangguan yang terjadi secara alamiah maupun oleh manusia (untuk jelasnya lihat Johannes 1975, 1983; Brown dan Howard 1985a; Brown 1987b; Grigg dan Dollar, 1990).

Fenomena alamiah yang menyebabkan kematian masif dari terumbu karang yang mencakup area yang luas, diantaranya adalah badai yang hebat, erupsi vulkanik, El Nino, ledakan populasi dari bintang laut *Acanthaster planci* (*Crown of thorns starfish*); faktor-faktor alamiah lainnya yang dapat mempengaruhi terumbu karang pada skala lokal termasuk penyakit, surut yang terlampau rendah, *red tides*, suhu rendah dan tinggi (untuk pembahasan detail lihat Brown dan Howard, 1985a).

Efek yang disebabkan oleh campur tangan manusia pada terumbu karang (Craik *et al.*, 1990) setidaknya dapat terjadi melalui dua cara. Cara yang pertama, adalah dengan memindahkan secara langsung sumber daya hayati maupun non-hayati dengan cara menambang, mengeruk, maupun metode memancing yang bersifat destruktif lainnya; cara yang kedua adalah melalui dampak polutan, banyak diantaranya yang berasal dari aktivitas manusia meskipun berada jauh dari lokasi terumbu karang yang terkena dampak polutan tersebut.

Akibat dari polutan pada terumbu karang telah didiskusikan oleh Brown dan Howard (1985a); pada ringkasan ini, efek *sublethal* dari polutan dan gangguan dideskripsikan. Efek tertentu termasuk diantaranya inhibisi pertumbuhan jaringan dan rangka batu kapur karang, penurunan laju metabolisme, hilangnya zooxanthellae, respon perilaku termodifikasi, produksi mukus berlebih, serta kemampuan reproduktif yang melemah.

Menurut Grigg dan Dollar (1990), sumber utama gangguan yang berasal dari manusia, yang dapat memiliki efek jangka panjang maupun efek skala besar pada terumbu karang diantaranya adalah (1) sedimentasi (dari pengerukan, *run-off* erosi, lumpur hasil pengeboran, limbah tebu); (2) limbah yang berasal dari anak sungai atau polutan lainnya yang menyebabkan terjadinya eutrofikasi; (3) tumpahan minyak atau deterjen yang digunakan untuk mencuci; dan (4) panas yang berasal dari pembangkit listrik. Gangguan lainnya yang menyebabkan kerusakan lokal adalah pemancingan dengan menggunakan dinamit, pengambilan cangkang kerang, dan penambangan karang.

Teknik memancing menggunakan pukat dapat pula menyebabkan kerusakan terumbu karang secara ekstensif. Ekstraksi sumber daya yang berasal dari terumbu karang kian meningkat seiring dengan eksploitasi terhadap ikan-ikan *demersal* dan *pelagic*, kura-kura, gurita, moluska (kerang, *Trochus*, tiram, dan cangkang ornamental), echinodermata, krustasea (udang, lobster, dan kepiting), serta ikan akuarium (Craik *et al.*, 1990).

Peningkatan sedimentasi dapat menimbulkan efek yang mengganggu terumbu karang (lihat Johannes 1975, 1983; Brown dan Howard, 1985a). Contohnya, pertumbuhan pada karang terutama dibantu oleh simbiosis mikroalga membutuhkan cahaya yang disebut zooxanthellae, yang biasanya hidup pada jaringan hewan penyusun terumbu karang; sedimen terlarut dapat mengurangi penetrasi cahaya, sehingga pertumbuhan terumbu karang terhambat (Johannes, 1975).

Peningkatan jumlah endapan sedimen pada terumbu karang dapat membunuhnya dalam hitungan hari apabila lapisannya terlampau tebal (Johannes, 1983). Namun, terumbu karang dapat memiliki kapabilitas respon yang berbeda terhadap beban sedimen. Brown dan Howard (1985a) mengungkapkan bahwa terumbu karang dengan bentuk bercabang memiliki keuntungan jika dibandingkan dengan terumbu karang dengan bentuk pipih dalam hal kapabilitas respon terhadap beban sedimen. Terumbu karang bercabang dapat terkena dampak akibat keterbatasan cahaya saja, sementara terumbu karang pipih terkena dampaknya yang lebih hebat karena morfologinya dan pada beberapa kasus terdapat kurangnya kapabilitas penolakan terhadap sedimen yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian.

Limbah dapat dikatakan sebagai polutan utama bagi terumbu karang (Johannes, 1983). Limbah yang berasal dari anak sungai dapat mengandung pestisida, herbisida, klorin, logam berat, dan limbah organik lainnya dalam jumlah yang signifikan. Material ini menyebabkan tingginya nilai BOD (*Biological Oxygen Demand*) sehingga menyebabkan efek merusak pada organisme laut. Limbah dapat pula berperan sebagai stimulus nutrien yang menyebabkan peningkatan biomassa alga yang berkompetisi dengan terumbu karang untuk cahaya dan ruang, sehingga dapat mengubah struktur komunitas secara keseluruhan.

Contoh yang paling baik mengenai efek limbah pada komunitas terumbu karang adalah sebagaimana yang dipaparkan oleh Smith (1977) di Teluk Kaneohe, Hawaii. Dari tahun 1963 hingga 1977, limbah dari tiga muara yang telah mengalami perlakuan sekunder dibuang ke Teluk dengan nilai debit puncak  $1,9 \times 10^4 \text{ m}^3$  per hari.

Pada tahun 1978, limbah tersebut dialihkan ke muara yang menuju ke laut dalam. Pada waktu tersebut tidak ada terumbu karang hidup yang dijumpai pada area pembuangan terdahulu, mungkin karena kondisi anaerobik pada sedimen yang memicu dilepaskannya Hidrogen Sulfida. Pada beberapa bagian dari Teluk, nutrien tambahan yang berasal dari limbah mendorong terjadinya pertumbuhan rapat dari alga hijau bergelembung *Dictyosphaeria cavernosa*, yang menutupi sebagian besar terumbu karang dan hewan lainnya (Smith *et al.*, 1983). Pada tahun 1983, 5 tahun setelah terjadinya pengalihan lokasi pembuangan limbah, persentase penutupan terumbu karang secara keseluruhan telah meningkat, kelimpahannya bertambah hampir dua kali lipat, dan alga *Dictyosphaeria* telah menurun hingga 75% (lihat Grigg dan Dollar, 1990).

## **I.2. Efek Ekologis dan Fisiologis Coelenterata dari Logam Berat.**

Dari sejumlah efek polusi logam berat terhadap coelenterata yang diketahui, terdapat sejumlah studi yang terbatas yang telah ditinjau ulang oleh Dodge dan Szmant-Froelich (1984); Howard dan Brown (1984); Brown (1985, 1987a). Para peninjau tersebut menyimpulkan bahwa sumber utama logam berat pada perairan laut tropis berasal dari aktivitas penambangan dan pengerukan; proses peleburan; pengeboran lepas pantai; instalasi desalinisasi yang berada pada anak sungai; pembuangan panas dari pembangkit listrik yang berada pada anak sungai dan pembuangan limbah.

Respon-respon terumbu karang terhadap lumpur hasil pengeboran dapat bervariasi, baik itu pada spesimen berbeda namun berasal dari satu spesies, jenis terumbu karang yang berbeda, maupun jenis lumpur yang berbeda (Dodge dan Szmant-Froelich, 1984). Para penulis ini menyebutkan bahwa lumpur yang sebagian besar terdiri dari barite, bentonite, dan air dapat memiliki tingkat racun yang lebih rendah bagi terumbu karang jika dibandingkan dengan lumpur yang berasal dari proses pengeboran lanjut yang mengandung sejumlah besar FCLS (*ferrochrome lignosulfate*) serta bahan tambahan lainnya seperti bahan bakar diesel.

Sebagai contoh, pada sebuah percobaan di laboratorium, Thompson dan Bright (1977) membandingkan kemampuan tiga spesies karang yang berbeda (*Diploria strigosa*, *Montastrea annularis*, dan *M. cavernosa*) dalam memindahkan empat tipe sedimen dari permukaan mereka. Empat tipe sedimen yang digunakan pada perlakuan secara individu ini adalah lumpur pengeboran, barite, bentonite, dan  $\text{CaCO}_3$ . Lumpur hasil pengeboran terdiri atas barite, bentonite, dan bahan tambahan lainnya seperti kapur, lignite, FCLS, aluminium stearate dan deterjen. Percobaan dilakukan dengan menambahkan 25 ml adukan sedimen pada permukaan karang. Hasil mengindikasikan bahwa tingkat pembersihan karang bervariasi dari satu spesies ke spesies lainnya. Semua karang pada perlakuan individual dapat membersihkan barite, bentonite, dan  $\text{CaCO}_3$  secara efektif. Namun, tidak satupun spesies yang dapat membersihkan lumpur hasil pengeboran secara keseluruhan.

Thompson dan Bright (1977) mengajukan bahwa komponen terlarut dan toksik pada lumpur tersebut yang memiliki pengaruh merusak pada terumbu karang. Mereka mengamati perilaku anomali seperti penarikan kembali polip, efek fisiologis seperti tingkat pemberian makan yang melambat, pengapuran yang menurun, kandungan zooxanthellae yang menurun, serta laju fotosintesis yang menurun dan bahkan akhirnya kematian.

Lebih lanjut lagi, Dodge dan Szmant-Froelich (1984) mengajukan bahwa efek dari adanya lumpur hasil pengeboran pada terumbu karang telah dapat dipastikan bersifat sinergis memicu pada interaksi efek dari sedimentasi dan unsur toksik yang potensial.

Aspek lainnya dari operasi kilang gas dan minyak lepas pantai dapat berdampak pada adanya jejak logam pada lingkungan. Adanya proses pembuatan bangunan bagan pada aktivitas produksi minyak memberikan dampak pemasukan barium, kadmium, kromium, tembaga, mangan, timah, strontium, dan zinc pada sedimen (selengkapnya lihat Howard dan Brown, 1984).

Pada studi mengenai efek terkait penambangan dan pengerukan pada terumbu karang yang dilakukan oleh Brown dan Holley (1982), ditemukan empat level yang berbeda dari tembaga, zinc, timah, juga besi (Brown dan Kumar, 1990) yang terdapat pada fraksi endapan lumpur *silt* pada sedimen terumbu yang berdekatan dengan lokasi peleburan timah di Ko Phuket, Thailand. Analisis biota laut seperti tiram *Saccostrea*, bivalvia *Isognomon*, serta alga *Padina* yang berasal dari terumbu yang di sekitar lokasi peleburan itu, menunjukkan kadar logam yang cenderung meningkat pada keseluruhan lokasi pencuplikan jika dibandingkan dengan kontrol. Beban logam yang paling utama terdapat dalam bentuk partikulat, bukan dalam bentuk terlarut.

Walaupun demikian, Brown dan Holley (1982) melaporkan bahwa aktivitas peleburan tidak memiliki efek yang jelas pada luas penutupan dan keragaman terumbu karang yang berbentuk papan. Studi terkini mengenai terumbu karang papan intertidal ini menunjukkan bahwa aktivitas peleburan dapat mempengaruhi dominasi karang tertentu, struktur populasi karang, serta tingkat pertumbuhan karang berbentuk cabang dan masif (Brown dan Howard, 1985b). Para penulis ini melaporkan bahwa struktur komunitas terumbu karang intertidal pada peleburan timah didominasi oleh karang *faviid* dan *Porites spp.* Jika dibandingkan dengan terumbu karang kontrol dengan kondisi fisik yang serupa, tampak spesies berbentuk bercabang menunjukkan persentase penutupan yang lebih tinggi. Luas penutupan karang bercabang pada lokasi peleburan timah lebih kecil jika dibandingkan dengan lokasi kontrol (Brown dan Holley, 1982).

Salah satu karang dominan yang terdapat pada terumbu karang datar adalah *Goniastrea favulus*, juga menunjukkan bahwa struktur populasi terumbu karang pada lokasi peleburan timah berbeda dengan terumbu karang pada lokasi kontrol (Brown dan Howard, 1985b) – faktor yang terhubung efek lebih pada peningkatan sedimentasi daripada peningkatan kadar logam di lingkungan.

Studi terkait mengenai efek logam berat dari aspek fisiologis coelenterata, terutama pada karang, saat ini masih minim (selengkapnya lihat Howard dan Brown, 1984). Para penulis ini menekankan beberapa parameter fisiologis yang dapat dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi logam pada terumbu karang. Parameter ini termasuk tingkat pertumbuhan yang terhambat, peningkatan mortalitas, penurunan laju metabolisme, dan kemampuan reproduktif yang menurun. Howard dan Brown mencatat respon perilaku termodifikasi seperti ekstrusi filamen mesenterial, retraksi polip, produksi mukus, pengeluaran secara paksa zooxanthellae dan efek histologis yang teramati pada respon pendedahan terhadap logam.

Karya terkini (Brown *et al.* belum terpublikasi) menunjukkan bahwa laju pertumbuhan (terukur as *linear extension*) dari *Acropora aspera* dan *A. pulchra* menurun secara signifikan pada lokasi peleburan timah di Ko Phuket, Thailand ketika dibandingkan dengan karang pada lokasi kontrol. Perbedaan kadar akresi CaCO<sub>3</sub> antara lokasi peleburan timah dengan kontrol juga signifikan bagi *A. pulchra*.

Hudson dan Robbin (1980) bermaksud untuk menentukan efek jangka panjang yang mungkin dari lumpur pengeboran pada tingkat pertumbuhan *Montastrea annularis*. Faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan karang setelah diberi lumpur tersebut adalah barium, FCLS seperti halnya pasir dan silt yang ditemui pada kolom air. Karang yang mendapatkan perlakuan konsentrasi barite yang tinggi menunjukkan level barium yang berasosiasi dengan rangka batu kapur karang yang tinggi dengan konsentrasi sekitar 1200 ppm. Konsentrasi barium sebesar 11-13 ppm pada *M. annularis* ditemukan oleh Livingston dan Thompson (1971 dalam Hudson dan Robbin, 1980).

Dodge (1982) mendedahkan karang Karibia *M. annularis* pada suspensi lumpur pengeboran dalam sistem mengalir selama enam minggu, kemudian menemukan tingkat pertumbuhan karang yang cacat pada konsentrasi lumpur 100 ppm. *Corallites* karang pada perlakuan ini menunjukkan penurunan kedalaman *fossa* (sebagai index relief vertikal *corallites*). Diusulkan bahwa efek ini dapat menurunkan tingkat kapabilitas penolakan karang terhadap penutupan sedimen, yang masih dapat efektif berfungsi untuk beberapa waktu setelah periode pendedahan pada lumpur.

Pendedahan terhadap lumpur tersuspensi dapat menyebabkan mortalitas pada karang apabila suspensi tersebut memiliki konsentrasi yang cukup. Thompson *et al.* (1980) melaporkan bahwa tiga spesies yang diamati (*Montastrea annularis*, *Agaricia agarites*, dan *Acropora cervicornis*) terbunuh pada konsentrasi lumpur pengeboran 1000 µl.l<sup>-1</sup>. Setelah terdedah selama 65 jam. Namun empat spesies karang lainnya (*Porites astreoides*, *P. divericata*, *P. furcata*, dan *Dichocoenia stokesii*) tidak terbunuh pada konsentrasi lumpur manapun (100, 316, dan 1000 µl.l<sup>-1</sup>). Satu-satunya efek pada karang-karang tersebut adalah peningkatan signifikan pada retraksi polip untuk setiap spesimen, seperti halnya tampak memproduksi mukus.

Dodge dan Szmant-Froelich (1984) menyimpulkan bahwa kematian karang yang terdedah dari cairan pengeboran, hampir dalam setiap kasus, diikuti oleh hilangnya zooxanthellae dan sekresi mukus yang intens. Kematian karang pada beberapa contoh diatas kemungkinan disebabkan oleh kondisi *anoxic* pada permukaan jaringan karang yang ditimbulkan oleh bakteri yang tumbuh pada lapisan mukus berlebih.

Pada kasus lainnya, lumpur pengeboran dapat memiliki efek drastis pada terumbu karang, terutama apabila mengandung level racun terlarut yang tinggi, seperti biosida toksik yang tinggi dan bahan lainnya seperti barite, kuarsa, micaillite, montmorillonite, kaolinite-chlorite, plagioclase, microclime, dan calcite (Shinn *et al.*, 1980). Penulis-penulis ini menganggap bahwa kuantitas padatan terlarut pada lumpur pengeboran hasil produksi eksplorasi sumur merupakan hal yang kritis dalam proses evaluasi efek polutan pada organisme laut.

Howard *et al.* (1980) membuat beberapa metode untuk menentukan baik efek racun akut maupun kronis dari logam pada karang menggunakan kisaran tembaga yang berbeda ( $0,01 - 1,00 \text{ mg l}^{-1}$ ) pada *Montipora verrucosa* dalam sistem air laut mengalir, di Hawaii Institute of Marine Biology. Parameter fisiologis yang diukur adalah respirasi, pengambilan dan ekskresi nutrien, hilangnya pigmen zooxanthellae, serta mortalitas (sebagai LC50 96h).

Para penulis (*op. cit.*) menemukan bahwa *coral bleaching* (terukur sebagai jumlah zooxanthellae yang hilang) menunjukkan bahwa ada proporsi respon terhadap konsentrasi tembaga yang digunakan: konsentrasi tembaga yang tinggi menimbulkan tingkat *bleaching* yang lebih tinggi dengan jumlah zooxanthellae lepas dari karang. Klorofil yang terdapat pada karang yang terdedah pada tembaga (II) sebanyak  $1,00 \text{ mg l}^{-1}$  secara signifikan berbeda dibandingkan dengan karang pada kontrol. Jumlah zooxanthellae yang lepas yang telah kehilangan pigmennya juga menurun proporsinya secara signifikan seiring dengan penambahan konsentrasi tembaga.

Pengamatan lain pada respirasi dan pengambilan/ekskresi nutrien pada karang menunjukkan perbedaan yang signifikan setelah terdedah pada semua konsentrasi tembaga (II) selama 1 hingga 24 jam percobaan. (Howard *et al.*, 1986). Pemeriksaan histologis sayatan *Montipora* juga menunjukkan kerusakan pada jaringan kolumnar ektodermal dari karang yang terdedah pada tembaga (II) sebanyak  $1,00 \text{ mg l}^{-1}$ ; LC50 96h yang digunakan adalah  $0,048 \text{ mg l}^{-1}$  tembaga (II).

Karena LC50 bertepatan dengan *bleaching* dan lepasnya zooxanthellae yang teramati, disimpulkan bahwa pendedahan karang pada konsentrasi polutan tembaga pada kadar yang rendah dalam jangka waktu yang lama, dapat menyebabkan efek merusak. Terhambatnya reproduksi dan pertumbuhan karang dapat dinyatakan pula terjadi pada level komunitas (Howard *et al.*, 1986).

### **I.3. Coelenterata sebagai Indikator Polusi Logam Berat.**

Selama dekade terakhir telah ditunjukkan bahwa *scleractinian corals* memiliki pola pelapisan rangka (skeleton karang) lingkaran tahunan yang dapat digunakan sebagai indikator lingkungan jangka panjang (Dodge dan Vaisnys, 1975; selengkapnya lihat Brown dan Howard, 1985a).

Nilai potensial karang sebagai perekam kimia dari polusi logam telah didemonstrasikan dalam dua studi yang berbeda terhadap kronologi polusi logam timbal yang terkandung pada lapisan rangka karang (Dodge dan Gilbert, 1984; Shen dan Boyle, 1987).

Dodge dan Gilbert (1984) melaporkan konsentrasi timbal pada *Montastrea annularis* yang berasal dari terumbu karang terpolusi berkisar sekitar lima kali lebih besar daripada konsentrasi timbal pada karang yang berasal pada lokasi yang tidak terkena dampak polusi. Kronologi dari dua karang yang berasal dari St. Croix, U.S. Virgin Island menunjukkan bahwa terdapat peningkatan konsentrasi timbal selama 26 tahun terakhir (1954-1980). Karena terjadi peningkatan konsentrasi timbal dari waktu ke waktu pada karang yang berasal dari lokasi alami, para penulis (*op. cit.*) menganggap bahwa catatan timbal pada rangka karang yang ada direpresentasikan sebagai peningkatan keberadaan timbal dalam kaitannya dengan polusi global logam timbal.

Shen dan Boyle (1987) menggunakan kandungan timbal yang terdapat pada lapisan lingkaran tahunan karang (misalnya *Diploria strigosa* dan *Montastrea annularis*, yang didapatkan dari Samudera Atlantik Utara; *Pavona clavus*, *Hydnophora microconos*, *Platygyra rustica*, *Favia speciosa*, *Porites lobata*, dan *P. australiensis* yang dikumpulkan dari Samudera Pasifik dan *P. rustica* yang dikumpulkan dari Mauritius di Samudera Hindia), membuktikan kronologi polusi timbal yang detail sebagai akibat dari industrialisasi global pada abad kedua puluh. Pengukuran pola-pola geometris terikat timbal pada lapisan lingkaran skeleton karang dari karang yang dikumpulkan di daerah barat

Atlantik Utara, menunjukkan bahwa gangguan yang ditimbulkan polusi timbal telah muncul sebagai respon langsung terhadap revolusi industri, serta sebagai dampak dari introduksi penambahan alkil timbal pada bensin (Shen dan Boyle, 1988).

Penyidikan lainnya yang melibatkan analisis Kadmium (Cd) pada skeleton karang *Diploria strigosa* yang berasal dari Bermuda, telah menyediakan catatan sejarah mengenai *upwelling* dan buangan industri (Shen *et al.*, 1987). Elemen lain selain Cd dapat berikatan pada skeleton karang; contohnya adalah tembaga, besi, zinc, kobalt, dan nikel (St. John, 1973).

Walaupun penggunaan *scleratinian coral* untuk memonitor perubahan lingkungan pada level logam telah diusulkan oleh beberapa peneliti (seperti St. John, 1973; Barnard *et al.*, 1974), kesulitan dijumpai terutama pada proses penganalisaan skeleton karang karena sifat afinitasnya yang rendah terhadap logam berat menyebabkan sulit untuk melakukan monitoring rutin (Denton dan Burdon-Jones, 1986). Terdapat pula sejumlah bukti yang mendukung bahwa beberapa spesies *scleratinian* yang dapat mengontrol konsentrasi beberapa elemen logam penting, baik pada skeleton maupun pada jaringan lunak karang, seperti zinc, tembaga, dan besi (Brown dan Holley, 1982; Brown dan Howard, 1985). Jalur yang memungkinkan bagi pengikatan logam dengan karang telah dideskripsikan oleh beberapa peneliti (selengkapnya lihat Howard dan Brown, 1984).

Brown dan Howard (1985b) melaporkan bahwa baik anemon laut temperata *Actinia equina* (non-zooxanthellae) dan *Anemonia viridis* (zooxanthellae) menunjukkan kemampuan untuk mengambil logam ketika terdedah dengan tembaga dan zinc pada konsentrasi yang berkisar antara 0,02 hingga 0,20 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> selama 7 hari. Namun, penulis tersebut mengungkapkan bahwa karang dapat pula mengalami penurunan pendedahan logam secara internal karena terdapat lapisan mukus yang dapat memerangkap partikulat logam dan berikatan dengan mineral terlarut sehingga mencegah masuknya logam pada jaringan lunak karang.

Howard dan Brown (1986) menemukan bahwa konsentrasi Al, Fe, Cr, Cu, La, Mo, Ni, dan Zn pada karang *Fungia fungites* yang dikoleksi sampelnya dari Phuket, Thailand, menunjukkan perbandingan logam pada jaringan lunak karang yang lebih tinggi dibandingkan dengan pada sistem skeletonnya. Konsentrasi logam pada jaringan *Pocillopora damicornis* yang berasal dari lokasi yang sama dengan *Fungia fungites* dibandingkan sampel jaringannya, kemudian ditemukan bahwa jaringan *P. damicornis* mengandung konsentrasi Al, Fe, Cr, Cu, La, Mo, Ni, dan Zn yang lebih tinggi dibandingkan dengan *F. fungites*. Namun *F. fungites* memiliki konsentrasi Mg, K, dan Ba yang lebih tinggi.

Pada tahun 1987, penulis yang sama melaporkan bahwa konsentrasi sepuluh logam berat yang terdapat pada jaringan lunak (Ca, Sr, Zn, Cr, Co, Mo, Ni, Mg, Na, dan K) pada karang *P. damicornis* yang berasal dari lokasi yang tercemar (batas peleburan timah), lebih tinggi secara signifikan ketika dibandingkan dengan karang yang berasal dari terumbu karang kontrol.

Level logam pada karang dapat berbeda antar spesies (contoh telah disebutkan diatas). Gambaran pertama dari toleransi terhadap logam pada karang jenis *scleratinian* telah didokumentasikan (Harland dan Brown, 1989). Mereka menemukan bahwa pendedahan terhadap karang *Porites lutea* pada konsentrasi besi yang berbeda (0,005; 0,01; dan 0,05 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>) memberikan dampak hilangnya zooxanthellae. Karang yang dikumpulkan dari lokasi tidak terdedah secara rutin terhadap konsentrasi tinggi besi pada lingkungan menunjukkan hilangnya zooxanthellae dalam jumlah yang cukup besar jika dibandingkan dengan karang yang berasal dari lokasi lain, yang mengalir limbah besi.

Karena hilangnya zooxanthellae merupakan indikator sensitif dari cekaman, hilangnya simbiosis alga ini dari karang pada lokasi yang tercemar dibandingkan dengan spesimen kontrol membawa Harland dan Brown (1989) pada ide bahwa karang mungkin dapat mengembangkan toleransi tertentu terhadap

logam. Harland dan Nganro (1990), menggunakan anemon temperata *anemonia viridis* yang didedahkan pada 0,05 dan 0,2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> mengungkapkan bahwa anemon mungkin mampu meregulasi tembaga dengan melepaskan zooxanthellae yang mengakumulasi logam.

#### I.4. Penggunaan Coelenterata Laut dalam Bioassay.

Bioassay dapat dideskripsikan sebagai metode biologi yang disediakan oleh ilmuwan peneliti untuk digunakan sebagai alat yang dapat membantu ahli teknik air untuk memonitor efek toksik dari buangan limbah atau dalam rangka mengukur polusi lingkungan. Perkembangan bioassay telah diintroduksi pada lingkungan industri yang dapat mencemari air sebagai suatu alat yang semestinya sensitif, murah, serta cepat responnya (Stebbing, 1988) untuk mengukur kualitas air.

Menurut Stebbing *et al.* (1990), terminologi bioassay dapat pula didefinisikan sebagai penaksiran kualitas biologi dari air dengan menggunakan respon organisme yang sesuai melalui percobaan yang dilakukan di laboratorium atau di lapangan secara langsung. Keuntungan dan kerugian dari penggunaan coelenterata laut pada percobaan ekotoksikologi telah didiskusikan oleh Stebbing dan Brown (1984), baik dalam terminologi eksperimen yang dilakukan di laboratorium maupun referensi mengenai relevansinya di lapangan.

Coelenterata dikelompokkan menjadi dua filum, yaitu Cnidaria dan Ctenophora. Ctenophora dianggap sebagai organisme yang tidak sesuai untuk pengerjaan ekotoksikologis karena sifatnya yang relatif rapuh, pelagik, serta sulit untuk dipelihara di laboratorium. Cnidaria, seperti misalnya Hydrozoa (hydroids), Scyphozoa (ubur-ubur), serta Anthozoa (karang dan anemon), merupakan organisme yang potensial untuk pengerjaan studi ekotoksikologis (Stebbing dan brown, 1984).

Sebagai contoh, pada tahun-tahun terakhir bioassay menggunakan hydroids telah dianggap mampu mengestimasi secara sukses beberapa sampel air lingkungan yang mengandung konsentasi logam tertentu (Stebbing, 1976; 1979; 1980; 1981; Stebbing *et al.*, 1980; 1984). Dengan menggunakan hydroid *Campanularia flexosa*, respon terhadap kisaran material toksik telah dievaluasi; parameter yang diukur antara lain adalah laju pertumbuhan, inhibisi pertumbuhan koloni, indeks sitokimia (peningkatan aktivitas enzim autolisis), serta peningkatan frekuensi *gonozoid*.

Seperti yang dilaporkan oleh Spangenberg *et al.* (1980), fase larva pada scyphozoa ubur-ubur *Aurelia aurita* (misalnya scyphistoma) telah digunakan pada teknik bioassay untuk menentukan efek dari polutan-polutan. Tes bioassay yang digunakan adalah berdasarkan retardasi inisiasi strobilasi selama masa perkembangan larva dari ubur-ubur yang terdedah hidrokarbon yang berbeda.

Anthozoa merupakan kelas cnidaria yang paling besar. Anemon (Ordo Actinaria) merupakan hewan berpolip, tetapi tidak seperti hydrozoa. Polipnya berukuran besar dan hidup soliter. Anemon merupakan organisme laut yang paling mudah dipelihara di laboratorium, namun studi mengenai toksikologi pada organisme ini masih sangat terbatas sejak 1983 (selengkapnya lihat Stebbing dan Brown, 1984; Brown, 1988a). satu-satunya studi terkini menggunakan anemon melibatkan perbandingan respon pengambilan logam dari spesies temperata (Brown dan howard, 1985b); perkembangan bioassay laut untuk pendispersi minyak (Corexit 9527) menggunakan simbiosis alga/coelenterata temperata (Goh, 1988) dan produksi sel mukus oleh *Anemonia viridis* (Nganro, 1988).

Efek dari tiga konsentrasi (10, 20, dan 40 ml. l<sup>-1</sup>) dari Corexit 9527 telah dipelajari pada produksi sel mukus dan retraksi tentakel *Anemonia*. Nganro (1988) menemukan bahwa peningkatan konsentrasi dispersan menghasilkan peningkatan produksi sel mukus yang signifikan pada anemon. Hasil dari observasi histologis menggunakan TEM (Transmission Electron Microscope), menunjukkan

membran, jaringan, serta sel mukus yang hancur pada konsentrasi dispersan 40 ml. l<sup>-1</sup> setelah didedahkan selama 24 jam. Respon perilaku pada anemon yang terdedah diantaranya adalah retraksi tentakel pada keseluruhan perlakuan selama 24 jam; serta ekstrusi filamen mesenterial anemon pada konsentrasi 40 ppm. Perbandingan dari dua teknik bioassay yang dilakukan itu menunjukkan bahwa respon sel mukus lebih sensitif dan secara kuantitatif lebih potensial sebagai parameter yang lebih akurat daripada retraksi tentakel untuk mengukur cekaman lingkungan pada coelenterata.

Pada studi lain menggunakan konsentrasi yang sama dari dispersan Corexit dan pada spesies anemon yang sama, namun yang dilakukan adalah pengukuran respon alga, Goh (1988) menemukan bahwa indeks mitosis dan persentase zooxanthellae yang terdegenerasi pada inang anemon, serta jumlah lepasnya zooxanthellae, meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi Corexit. Indikator yang paling sensitif dari cekaman, setelah pendedahan terhadap dispersan pada studi ini, merupakan persentase dari zooxanthellae yang ada pada anemon. Efek yang signifikan teramati pada konsentrasi corexit 10 ml. l<sup>-1</sup> setelah 24 jam; dimana indeks mitosis zooxanthellae tidak terpengaruhi hingga konsentrasi Corexit 20 ml. l<sup>-1</sup> setelah periode pendedahan 48 jam. Jumlah sel zooxanthellae yang lepas dari anemon juga menunjukkan pengukuran yang sensitif, namun tidak sesensitif parameter yang telah disebutkan sebelumnya.

Karang *scleratinian* merupakan kelompok anthozoa utama yang mendominasi perairan dangkal dari pesisir tropis. Mereka merupakan elemen hewan penting yang membangun terumbu karang (dalam bentuk hermatypic), yang mengandung zooxanthellae, serta hidup berdekatan dengan daratan, dimana mereka kini terancam, baik karena polusi yang diakibatkan oleh manusia maupun kerusakan yang terjadi secara alamiah (selengkapnya lihat Howard dan Brown, 1984; Brown dan Howard, 1985; Grigg dan Dollar, 1990). Karang ahermatypic yang bukan merupakan elemen hewan pembangun terumbu karang dan tidak memiliki zooxanthellae, hidup terutama di daerah perairan temperata, namun dapat dijumpai di semua laut pada semua kedalaman.

Karang sulit untuk dipelihara dalam jangka waktu yang cukup panjang dalam laboratorium, sehingga mereka bukan merupakan bahan eksperimen yang baik, namun ukuran dan sifat sesil mereka merupakan keuntungan tersendiri dalam studi ekotoksikologi *in situ*. Oleh karenanya, diperlukan pengembangan teknik yang sesuai untuk memprediksi kemampuan pengaruh kekebalan karang terhadap pencemar laut, dalam usaha untuk menjaga ekosistem terumbu karang (Stebbing dan Brown, 1984).

Teknik bioassay terkini yang telah digunakan untuk menaksir toksisitas logam berat terhadap karang telah dilakukan oleh Howard *et al.* (1986); Harland dan Brown (1990), dan Heyward (1990). Heyward (1990) mempelajari efek inhibisi dari tembaga dan zinc sulfat pada fertilisasi karang. Beliau melaporkan bahwa konsentrasi tembaga sulfat sebesar 0,10 ml. l<sup>-1</sup> menghasilkan kesuksesan fertilisasi sebanyak 45,7% untuk karang *Favites chinensis* serta kurang dari 10% fertilisasi untuk *Platygyra ryukyuensis*, sementara perlakuan kontrol memiliki persentase kesuksesan fertilisasi sebesar 89,5% untuk *Favites chinensis* serta 83,5% untuk *Platygyra ryukyuensis*. Konsentrasi zinc sulfat sebesar 1,00 ml. l<sup>-1</sup> menghasilkan kesuksesan fertilisasi kurang dari 10% untuk kedua spesies karang tersebut. Fertilisasi yang sukses dievaluasi berdasarkan persentase embrio yang membelah yang dihitung sebagai proporsi total telur yang teramati. Ambang batas penerimaan konsentrasi tembaga dan zinc untuk inhibisi fertilisasi pada karang berkisar antara 0,001 hingga 0,10 ml. l<sup>-1</sup>.

Dalam terminologi sensitivitas, teknik Heyward dapat dianggap kurang sensitif dibandingkan indeks sensitivitas yang dikembangkan oleh Stebbing (selengkapnya lihat Stebbing dan Brown, 1984). Salah satu kerugian lainnya menggunakan bioassay berdasarkan telur adalah ketersediaannya. Di Great Barrier Reef dan sebagian wilayah Karibia (misalnya Bermuda), produk reproduksi karang yang

berasal dari spesies tertentu mungkin hanya tersedia sekali dalam jangka waktu setahun, sementara di Samudera Hindia dan Laut Merah, terdapat sekitar tiga kesempatan telur-telur tersedia dalam setahun. Namun spesies karang lunak memproduksi planulae setiap bulan dan merepresentasikan sumber yang bermanfaat untuk materi pengetesan ekotoksikologis.

Parameter fisiologi lainnya, yang melibatkan pengukuran pengaturan energi untuk karang, dapat pula menyediakan indeks yang sensitif untuk mengukur cekaman lingkungan. Teknik eksperimen seperti itu telah dikembangkan oleh Davies (1984) juga Edmund dan Davies (1986). Penelitian ini membolehkan pembuatan persamaan untuk 'pertumbuhan' dan perkembangan indeks yang lebih sensitif terhadap tingkat kesehatan pertumbuhan karang di lapangan (selengkapnya lihat Brown dan Howard, 1985a; Brown, 1988a).

Terkait dengan hal ini, metode yang lebih baru yang diungkapkan oleh Davies (1989), merupakan teknik penimbangan dari estimasi pertumbuhan karang. Penggunaan metode ini memungkinkan untuk mendapatkan indeks cekaman dalam periode jangka pendek yang lebih akurat. Walaupun demikian, sejauh ini respon dari alga simbiotik (zooxanthellae) pada coelenterata tampak lebih sensitif terhadap cekaman lingkungan dibandingkan parameter lainnya yang terukur hingga kini (Brown, 1988a).

Isu istimewa dari jurnal Coral Reefs, telah diabdikan untuk *coral bleaching* (Brown, 1990). Respon yang terkait melibatkan lepasnya zooxanthellae dan atau hilangnya pigmen fotosintesis dari zooxanthellae. Banyak peneliti telah mencatat *coral bleaching* di lapangan dan berbagai faktor (kenaikan suhu, pemancaran cahaya) telah memberikan dampak akibat kejadian *global bleaching*. Bagaimanapun, *bleaching* juga dihasilkan dari berbagai gangguan, seperti sedimentasi, *run off*, serta limbah panas (Brown dan Howard, 1985). Apapun sebabnya, hilangnya zooxanthellae jelas merupakan indikator yang sensitif dari cekaman terhadap terumbu karang.

## Bab II

# LEPASNYA ZOOXANTHELLAE PADA ANEMON *Anemonia viridis* SEBAGAI RESPON TERHADAP KISARAN KONSENTRASI TEMBAGA

### II.1 PENDAHULUAN

Zooxanthellae merupakan simbiosis alga yang bersifat fotosintetik dan uniseluler, biasanya berwarna coklat dan umumnya berperan sebagai endosimbion pada kisaran invertebrata laut yang luas termasuk filum Porifera, Cnidaria, dan Mollusca. Dengan demikian, zooxanthellae dianggap sebagai komponen dari salah satu asosiasi endosimbion terpenting pada lingkungan laut bentik (Trench, 1979; Smith dan Douglas, 1987; Davies in press).

Simbiosis alga yang dikenal paling memiliki sebaran yang luas adalah anggota dari Coelenterata. Ditemukan pada tiga kelas seperti Hydrozoa (misalnya Hydroids, Siphonophora, serta karang penyengat Milleporina); anemon, zoanthids, karang *scleratinian* serta octocorals) (Trench, 1987).

Asosiasi alga ini ditemukan baik pada daerah temperata maupun tropis, serta ekspresi maksimumnya ditemukan pada terumbu karang perairan tropis yang dangkal (Davies in press). Coelenterata yang mengandung zooxanthellae pada perairan temperata relatif jarang; termasuk beberapa jenis anemon laut seperti *Anthopleura elegantissima*, yang ditemukan di daerah barat dan timur laut Amerika Serikat serta *Anemonia viridis* atau *A. sulcata* yang ditemukan di daerah barat dan timur laut Inggris (Trench, 1987).

Menurut Trench (1971), hampir semua simbiosis zooxanthellae bersifat intraseluler dan terbatas pada lapisan gastrodermal dari inang. Sel-sel zooxanthellae dipisahkan dari sitoplasma inang oleh membran vakuola hewan. Alga berbentuk *spherical* atau *coccoid* serta ukurannya berkisar antara 7-12  $\mu\text{m}$  (diameter) tergantung kepada spesies hewan inang (Wilkerson *et al.*, 1988).

Dalam terminologi taksonomi, zooxanthellae yang terisolasi dari spesies inang coelenterata yang berbeda dianggap sebagai 'strains' dari satu spesies, *Symbiodinium microadriaticum* (= *Gymnodinium microadriaticum* = *Zooxanthella microadriatica*) (selengkapnya lihat Smith dan Douglas, 1987). Walaupun demikian, strain dapat memiliki morfologi yang berbeda, karakteristik biokimia serta karyotype yang berbeda pula. Terdapat sejumlah sanggahan bahwa perbedaan diantara beberapa strain terlalu besar untuk dikategorikan sebagai satu spesies yang sama (Blank dan Trench, 1985; Trench, 1987).

Studi terkini dari Rowan dan Powers (1991a) melibatkan studi genetika molekuler dari zooxanthellae yang diisolasi dari alga yang terdiri dari 131 individu pada 22 taksa coelenterata inang. Studi tersebut mengungkap bahwa genus *Zooxanthella* memiliki hubungan kekerabatan yang kuat diantara taksa inang yang diteliti (berdasarkan analisis subunit RNA atau ssRNA pada ribosomnya yang berukuran kecil), dimana genus *Symbiodinium* (*Gymnodinium*) menunjukkan variabilitas yang tinggi dari sekuen ssRNANYA. Rowan dan Powers (1991b) mengusulkan bahwa terdapat keanekaragaman zooxanthella yang tinggi diantara inang jika dibandingkan keanekaragaman zooxanthellae dalam inang tersebut.

Mengikuti klasifikasi yang dibuat oleh Dodge (1982) berdasarkan morfologi tingkat motil alga, alga simbiotik *Anemonia viridis* merupakan anggota dari Filum Dinophyta; Kelas Dinophyceae; Ordo Gymnodiniales; Famili Laphodimiaceae dan Genus *Zooxanthella*. Alga berbentuk menyerupai bola ini memiliki karakteristik seperti adanya kloroplas, pyrenoid yang berjumlah satu atau dua batang

(Suharsono, 1990); sel non-motil dengan dinding sel yang tebal. Namun, zooxanthellae sebagai dinoflagellata memiliki hubungan yang kuat dengan Ciliata (Chromophyta); keduanya memiliki moyang yang sama, berdasarkan studi filogenetik sekuen ssRNA keduanya (selengkapnya lihat Dodge, 1989).

Fenomena hilangnya zooxanthellae atau yang lebih dikenal dengan istilah *bleaching* yang terjadi karena dilepaskannya zooxanthella atau hilangnya klorofil dari coelenterata (seperti pada karang) karena pengaruh cekaman, telah dilaporkan dalam berbagai literatur (selengkapnya lihat Brown, 1987; Jokiel dan Coles, 1990). Hilangnya zooxanthella secara umum dianggap sebagai respon terhadap kondisi cekaman. Hal ini dapat diinduksi oleh bencana alam (seperti badai); perubahan pencahayaan; salinitas yang rendah; peningkatan suhu serta gangguan lainnya. Sebagai contoh, salinitas yang rendah karena terjadinya banjir akibat hujan selama terjadi Badai Flora menyebabkan sejumlah besar coelenterata mengalami *bleaching* di lokasi perairan dangkal Jamaika timur tahun 1963 (Goreau, 1964).

Dalam eksperimen laboratorium, efek dari kelaparan dan perubahan penyinaran terhadap karang telah menyebabkan hilangnya zooxanthellae (Yonge dan Nicholls, 1931). Anemon tropis *Aiptasia tagetes* (Steele, 1975); anemon *Anthopleura elegantissima* (Pearse, 1979) serta *Anemonia viridis* (Gates dan Brown, 1985) yang kesemuanya didedahkan pada suhu yang semakin meningkat, menunjukkan hilangnya zooxanthellae.

Bagi karang jenis *scleratinian* pada pesisir Eniwetak Atoll di tahun 1979, hilangnya zooxanthellae muncul sebagai respon terhadap cekaman suhu (berlebih sebesar 36°C) (Fankboner dan Reid, 1981). *Bleaching* secara ekstensif serta kematian karang sebagai akibat dari fenomena El Nino, yang menyebabkan peningkatan suhu air laut sebesar 2-3°C diatas suhu rata-rata tahun 1982/3, telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Contohnya termasuk di daerah Teluk Panama, Mexico (Glynn, 1983; 1984); Florida Keys, AS (Jaap, 1985); Teluk Discovery, Jamaika (Gates, 1990); Pulau Pari, Indonesia (Suharsono, 1984; Brown dan Suharsono, 1990). Respon *bleaching* coelenterata terhadap perubahan kimiawi seperti logam berat dan limbah minyak, telah disebutkan pada Bab I disertasi ini.

Secara keseluruhan, dalam terminologi studi fisiologis dan histologis, penyebab langsung fenomena *bleaching* dan alasan kerentanan beberapa spesies terhadap *coral bleaching* masihlah belum jelas. Salah satu masalahnya adalah bukti yang berkaitan dengan definisi dari *bleaching*, yang secara umum merupakan deskripsi fisiologis (misalnya hilangnya alga dan atau pigmen klorofilnya). Dalam survei lapangan, pengamatan yang dilakukan dengan kasat mata untuk mengukur hal tersebut tidaklah memungkinkan. Variabilitas alami dalam warna karang merupakan masalah utama dalam proses penaksiran tingkatan *bleaching*.

Dalam terminologi mekanisme, telah diusulkan bahwa pelepasan yang cepat dari zooxanthellae dapat terjadi secara langsung dari sel endodermal menuju ke coelenteron (Steen dan Muscatine, 1987; Brown, 1988a; Suharsono, 1990) dibandingkan melalui filamen mesenterial seperti yang diajukan sebelumnya (Yonge, 1930). Sebagai tambahan, mungkin juga terdapat respon biokimia tertentu (seperti 'stress proteins') yang menginduksi kontraksi seluler pada sel inang sehingga zooxanthellae dapat lepas dengan cepat, terutama ketika inang berada dalam cekaman (lihat Bab V).

Brown (1988a) menyatakan bahwa hilangnya zooxanthellae dianggap sebagai indikator potensial terhadap stress dan karenanya merupakan alat indikator potensial dalam bioassay. Tiga pertimbangannya adalah (1) fenomena tersebut tidak merepresentasikan kematian hewan. Karang yang mengalami hilangnya zooxanthellae dapat pulih dengan mendapatkan komplemen zooxanthellae ketika kondisi lingkungan membaik; (2) respon tersebut merupakan generalisasi dari cekaman yang luas, seperti salinitas, peningkatan atau penurunan suhu, pencemaran logam, dan karenanya memiliki

nilai yang masih dapat ditawarkan sebagai teknik bioassay; (3) fenomena tersebut sejalan dengan studi kuantitatif seperti pengukuran indeks mitosis, jumlah zooxanthella, analisis klorofil, dan sebagainya.

Studi ini bertujuan untuk mengestimasi jumlah zooxanthellae yang dilepaskan sebagai respon terhadap cekaman logam berat. Simbiosis alga/anemon yang diselidiki merupakan yang tampak pada anemon temperata *Anemonia viridis*.

## II.2. BAHAN DAN CARA KERJA

### II. 2. 1 Koleksi dan pemeliharaan anemon

Sampel dari *Anemonia viridis* Forskal dikumpulkan dari pantai berbatu intertidal di pesisir baratdaya Inggris, Teluk Wembury, Plymouth. Anemon diangkat dan dipelihara di laboratorium dalam air laut dengan suhu sebesar 12-13°C, teraerasikan dengan baik dan diresirkulasikan, juga diberi filter dengan lama periode penyinaran selama 12 jam : 12 jam periode gelap. Lampu fluoresens siang hari (Durolit truelite) 20 W digunakan untuk menyinari hewan tersebut.

Anemon ini disimpan selama dua minggu dalam kondisi laboratorium dengan tujuan aklimatisasi sebelum eksperimen berlangsung. Selama periode ini, anemon diberi makan *Mytilus edulis* segar (kurang lebih 1 gram/anemon) sekali seminggu hingga dua hari menjelang eksperimen. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa kebutuhan akan nutrisi dari anemon bukan merupakan faktor cekaman tambahan yang dapat mempengaruhi hasil bioassay.

### II. 2. 2 Persiapan larutan eksperimen

Cangkir plastik transparan dengan kapasitas 300 ml dengan tutup yang rapat digunakan untuk memantau pelepasan zooxanthellae. Seluruh perangkat plastik yang digunakan telah direndam terlebih dahulu setidaknya selama satu hari dalam air laut yang telah difiltrasi dilanjutkan dengan pencucian menggunakan asam sebelum digunakan untuk mencegah penyerapan sisi-sisi dari wadah tersebut. Seluruh air laut yang digunakan telah melalui proses filtrasi melalui filter milipori berukuran 0,45 µm.

Tiga konsentrasi tembaga yang berbeda digunakan dalam bioassay. Larutan standar dibuat dengan mencampurkan 1 ml  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  (menggunakan larutan standar AAS Cu, BHD) dalam 100 ml air laut. Larutan standar ditambahkan pada masing-masing dari 3 perlakuan sehingga konsentrasi akhir Cu (II) sebesar 0,05; 0,1; dan 0,2 mg.  $\text{l}^{-1}$  dalam volume akhir dari larutan sejumlah 250 ml. Larutan kontrol yang terpisah, menggunakan air laut yang telah difiltrasi tanpa tambahan tembaga, juga disiapkan. Seluruh eksperimen dilakukan pada suhu konstan sebesar 12°C ( $\pm 1$  °C).

### II. 2.3 Pelepasan Zooxanthellae

Satu anemon ditempatkan pada masing-masing bejana inkubasi berukuran 300 ml yang berisi 250 ml larutan tes ataupun kontrol. Lima replikasi perlakuan dan kontrol dilakukan secara bersamaan menggunakan teknik bioassay statis dengan mengganti larutan setiap 12 jam selama 5 hari. Larutan yang digunakan dalam eksperimen disiapkan setiap hari.

Zooxanthellae diekstraksi dari larutan tes dan kontrol sejumlah 250 ml dengan cara sentrifugasi (5000 putaran per 10 menit) sehingga zooxanthella terkumpul dalam bentuk pellet (endapan). Kemudian pellet tersebut diencerkan kembali menggunakan 2 ml formaldehida 2% yang dilarutkan dalam air laut yang telah difiltrasi menggunakan *vortex mixer*.

Sel-sel zooxanthellae yang didapatkan dihitung dalam sepuluh kotak *Sedgewick rafter slide* kemudian diamati secara acak dibawah mikroskop kontras dengan perbesaran 20 kali. Pada akhir eksperimen, anemon dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 36 jam dan beratnya dicatat. Hasil

penghitungan sel-sel zooxanthellae dan berat keringnya kemudian digunakan untuk menaksir jumlah sel zooxanthellae yang dilepaskan per mg berat kering untuk setiap anemon yang digunakan dalam eksperimen. Dengan cara ini, dapat diketahui estimasi jumlah zooxanthellae yang dilepaskan dalam setiap larutan eksperimental yang dianalisa setiap hari selama 5 hari pengamatan.

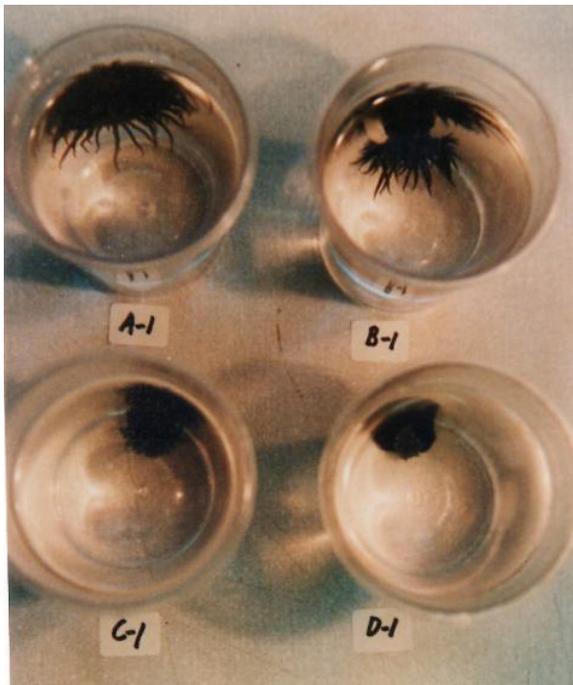
## II. 3 HASIL

Semua anemon yang diuji masih hidup pada akhir hari kelima eksperimen. Peningkatan bertahap pada retraksi tentakel dan kuantitas mukus yang menutupi tentakelnya teramati sejalan dengan peningkatan konsentrasi tembaga pada masa pendedahan dalam eksperimen. (Gambar 2.3.1).

Jumlah rata-rata zooxanthellae yang dilepaskan oleh *Anemonia* yang terdedah pada tiga konsentrasi tembaga dan anemon pada perlakuan kontrol dibuat grafik terhadap fungsi waktu selama durasi 5 hari eksperimen (Gambar 2.3.2). Perbedaan yang signifikan (ANOVA multifaktorial  $p < 0,001$ ) secara jelas terlihat pada jumlah zooxanthellae yang dilepaskan baik berdasarkan fungsi waktu maupun perlakuan (yaitu  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ ,  $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ ,  $0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ , dan kontrol).

Jumlah kumulatif zooxanthellae yang dilepaskan pada ketiga perlakuan tembaga dan kontrol disajikan pada Gambar 2.3.3 yang mengilustrasikan peningkatan bertahap pada jumlah total zooxanthellae yang dilepaskan akibat peningkatan konsentrasi tembaga. Indeks pelepasan (release index) dihitung dengan cara membagi jumlah kumulatif dari zooxanthellae yang dilepaskan karena pengaruh konsentrasi

tembaga terhadap anemon dengan jumlah kumulatif zooxanthellae yang dilepaskan pada anemon kontrol. Indeks untuk *Anemonia* yang didedahkan pada  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$  adalah sebesar 1,5; sementara nilai indeks 5,9 dan 9,5 tercatat pada anemon yang didedahkan pada konsentrasi tembaga  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  dan  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ .



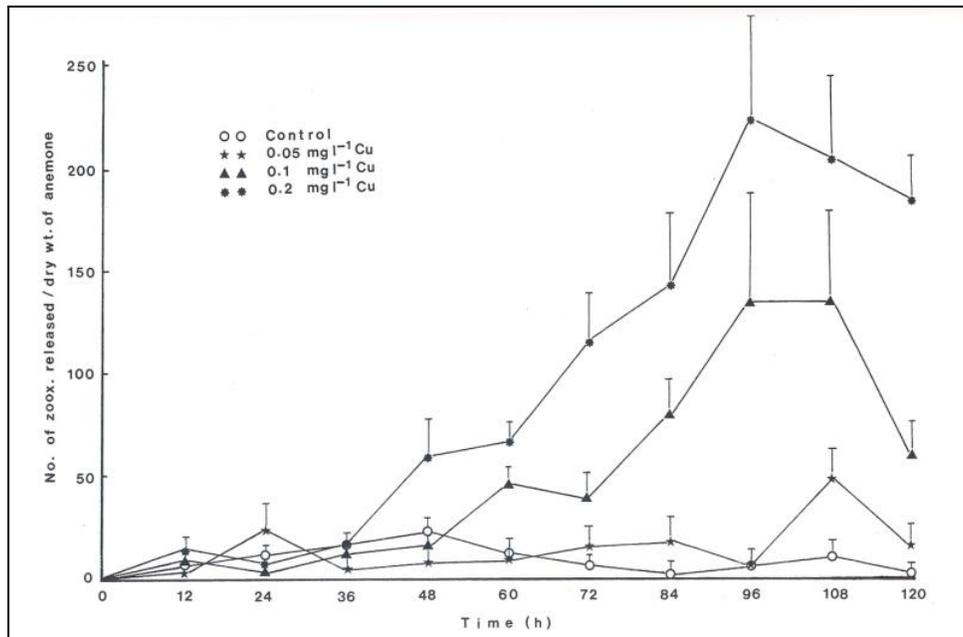
Gambar 2.3.1 Peningkatan bertahap dari retraksi tentakel pada *Anemonia viridis* dan kuantitas mukus yang menyelimuti permukaan tentakelnya, teramati seiring dengan pendedahan anemon terhadap konsentrasi tembaga tertentu, selama 5 hari eksperimen berlangsung. Gambar ini menunjukkan kontrol dan hewan yang terdedah tembaga setelah 120 jam.

A-1 = kontrol

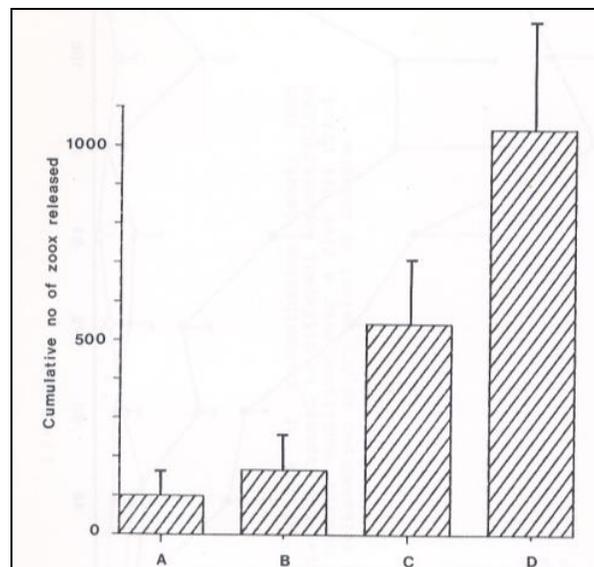
B-1 =  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ .

C-1 =  $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ .

D-1 =  $0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ .



Gambar 2.3.2 Lepasnya zooxanthellae (zoox) dari *Anemonia viridis* ketika didedahkan pada konsentrasi tembaga yang berbeda dan kondisi kontrol selama periode 5 hari. Jumlah zoox yang terlepas per mg berat kering anemon. (h = hour atau jam)



Gambar 2.3.3 Jumlah rata-rata kumulatif dari zooxanthellae yang terlepas dari *Anemonia* eksperimental selama periode 5 hari.

A-1 = kontrol

B-1 = 0,05 mg l<sup>-1</sup> Cu.

C-1 = 0,1 mg l<sup>-1</sup> Cu.

D-1 = 0,2 mg l<sup>-1</sup> Cu.

Jumlah zooxanthellae (zoox) yang dilepaskan per mg berat kering anemon.

Dalam rangka mengidentifikasi perbedaan antara perlakuan tembaga dan kontrol, dilakukan *multiple range test* yang disarikan pada lampiran A. Hasil tes mengungkapkan bahwa pada dua perlakuan tembaga ( $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$  dan  $0,2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$ ), jumlah zooxanthellae yang dilepaskan secara signifikan lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$  dan kontrol setelah periode 60 jam pendedahan ( $p < 0,01$  Tukey test). Jumlah zooxanthellae yang dilepaskan pada perlakuan  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$  tidak berbeda secara nyata dari kontrol pada akhir hari kelima eksperimen ( $p > 0,05$  Tukey test).

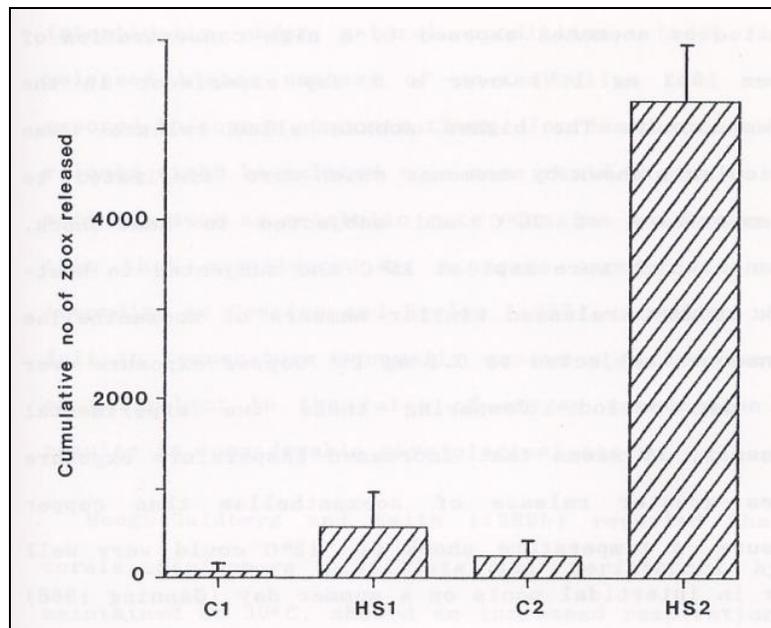
## II. 4 PEMBAHASAN

Zooxanthellae dilepaskan dari *Anemonia viridis* pada keseluruhan konsentrasi ( $0,05$ ;  $0,1$ ;  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ). Pendedahan terhadap konsentrasi tembaga yang tinggi menghasilkan hilangnya sel-sel alga dalam jumlah yang besar. Pada karang Hawaii *Montipora verrucosa*, Howard *et al.* (1986) menemukan bahwa jumlah zooxanthellae yang dilepaskan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi tembaga di atas  $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ . Esquivel (1986) melakukan bioassay tembaga pada planulae dari karang *Pocillopora damicornis*; ketika planulae didedahkan pada konsentrasi tembaga yang berkisar antara  $0,01$  hingga  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ , zooxanthellae dilepaskan serta lendir dihasilkan.

Karena terdapat peningkatan respon lepasnya alga oleh *A. viridis* sejalan dengan peningkatan konsentrasi logam, maka akan menjadi menarik untuk membandingkan parameter ini dengan indeks cekaman (indices of stress) yang dihasilkan dari pendedahan terhadap logam, yaitu konsentrasi klorofil dari alga (Howard *et al.*, 1986); indeks mitosis (Gates dan Brown, 1985; Wilkerson *et al.*, 1988) serta respon lainnya yang teramati pada tingkat molekuler (selengkapnya lihat Bab V).

Dua eksperimen dimana *A. viridis* didedahkan terhadap 2h heat shock dan 4h recovery (sekuen temperatur  $15-28-15^{\circ}\text{C}$  dan  $20-32-20^{\circ}\text{C}$ ) memberikan hasil lepasnya zooxanthellae dalam jumlah yang besar dibandingkan kontrol yang dipelihara pada suhu  $15^{\circ}\text{C}$  dan  $20^{\circ}\text{C}$  (sharp, 1991; lihat Gambar 2.4.1). teknik yang digunakan pada pekerjaan terakhir untuk mengukur pelepasan zooxanthellae merupakan teknik yang sama seperti yang telah dideskripsikan pada bagian bahan dan cara kerja Bab ini.

Pada sebuah studi yang dilakukan oleh Sharp, pendedahan 2h heat shock terhadap *Anemonia* menghasilkan jumlah zooxanthellae yang dilepaskan lebih tinggi dibandingkan dari anemon yang mengalami pendedahan terhadap konsentrasi tembaga ( $0,2 \text{ mg l}^{-1}$ ) selama 5 hari eksperimen pada studi ini. Jumlah zooxanthellae terlepas yang lebih tinggi ditunjukkan pada anemon yang mengalami aklimatisasi pada suhu  $20^{\circ}\text{C}$  dan mengalami perlakuan heat-shock. Anemon yang dipelihara pada suhu  $15^{\circ}\text{C}$  dan mengalami perlakuan heat-shock pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  melepaskan jumlah zooxanthellae yang sama dengan anemon yang mengalami perlakuan  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  tembaga selama periode 5 hari. Dari perbandingan dua stressor pada dua eksperimen tersebut, tampak bahwa pendedahan terhadap peningkatan suhu mengakibatkan jumlah zooxanthellae yang dilepaskan lebih banyak daripada pendedahan terhadap tembaga. Temperature shock sebesar  $12^{\circ}\text{C}$  dapat muncul pada kondisi alamiah di kolam intertidal pada suatu hari di musim panas (Ganning, 1966) namun konsentrasi  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  tembaga jarang sekali muncul tetapi pada perairan ada yang mengalami polusi tingkat tinggi.



Gambar 2.4.1 Jumlah kumulatif rata-rata zooxanthellae yang dilepaskan *Anemonia* yang mengalami perlakuan 2h heat shock dan 4h recovery serta anemon kontrol.

C1 = anemon kontrol yang dijaga pada suhu 15°C.

HS1 = anemon 2h heat-shock, mengalami 4h recovery pada suhu 15°C, dengan sekuen suhu 15-28-15°C.

C2 = anemon kontrol yang dijaga pada suhu 20°C.

HS2 = anemon 2h heat-shock, mengalami 4h recovery pada suhu 20°C, dengan sekuen suhu 20-32-20°C.

Jumlah zooxanthellae (zoox) yang dilepaskan per mg berat kering anemon.

Efek yang ditimbulkan tembaga pada anemon dapat tertunda sebagai hasil dari kapabilitas hewan untuk memproduksi mukus yang dapat mengikat ion tembaga. Sebagai tambahan, atau alternatif lainnya, anemon mungkin memiliki kemampuan untuk meregulasi pengambilan logam dengan sekuestrasi tembaga pada zooxanthellae yang setelah itu dilepaskan (Harland dan Nganro, 1990), atau detoksifikasi logam dengan cara menyimpan pada granula penyimpan logam seperti yang dijumpai pada jaringan invertebrata lainnya (Brown, 1982).

Walaupun anemon yang mengalami perlakuan heat-shock terdedah pada perubahan suhu yang sangat tinggi yang hanya mungkin muncul pada zona intertidal pada kondisi alami, hewan ini dapat melepaskan jumlah zooxanthellae yang lebih tinggi daripada anemon yang didedahkan pada konsentrasi tembaga tertentu. Peningkatan jumlah zooxanthellae yang dilepaskan mungkin dapat terkait dengan perubahan yang lebih cepat dari aktivitas hewan seperti laju metabolisme (Cossins dan Bowler, 1987) daripada anemon yang terdedah pada konsentrasi tembaga. Menurut Cossins dan Bowler (1987), peningkatan atau penurunan secara tiba-tiba dari suhu secara umum mengakibatkan konsumsi oksigen yang melampaui ambang batas, baik naik maupun turun sebagai hasil dari cekaman fisiologis yang tinggi.

Hoegh-Guldberg dan Smith (1989b) melaporkan bahwa karang *Stylophora pistillata* dan *Seriatopora hystrix* yang dipelihara pada suhu 30°C, menunjukkan peningkatan laju respirasi serta penurunan laju

fotosintetik dari zooxanthellae ketika dibandingkan dengan nilai yang didapatkan apabila karang dipelihara pada kisaran suhu 27-28°C. ketika dua jenis karang didedahkan pada 7h kenaikan suhu (30-32°C), respon *bleaching* ditandai dengan sejumlah besar zooxanthellae yang hilang dari inang; konsentrasi total klorofil-a pada zooxanthellae tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ketika dibandingkan dengan karang pada kontrol. Hoegh-Guldberg dan Smith (1989b) mengusulkan agar warna pucat (sebagai hasil dari respon *bleaching*) pada karang disebabkan terutama karena hilangnya zooxanthellae, bukan karena penurunan jumlah pigmen klorofil.

Pada studi ini, pemindahan anemon pada bejana eksperimental dapat menyebabkan peningkatan jumlah zooxanthellae yang lepas pada hari pertama dalam seluruh perlakuan konsentrasi tembaga serta kontrol. Namun, tampak bahwa jumlah zooxanthellae dilepaskan yang tinggi dijumpai pada anemon yang mengalami perlakuan pendedahan terhadap konsentrasi tembaga dibandingkan dengan anemon kontrol; indeks pelepasan dari zooxanthellae yang didapatkan dari anemon yang mengalami perlakuan tembaga juga menunjukkan peningkatan sejalan dengan peningkatan konsentrasi tembaga. Indikasi yang serupa (*expulsion rate*) telah digunakan oleh peneliti lainnya untuk menaksir cekaman pada karang, melalui pengukuran fluoresensi klorofil pada sampel air laut yang mengandung zooxanthellae yang dilepaskan. Hoegh-Guldberg dan Smith (1989b) menemukan bahwa 'specific *expulsion rate*' merupakan pengukuran yang sangat sensitif untuk penaksiran karang yang berada di bawah cekaman. Karang-karang (*S. pistillata* dan *S. hystrix*) yang didedahkan pada suhu yang meningkat dengan kisaran 30-32°C selama 7h menunjukkan *specific expulsion rate* >1000 kali lipat daripada karang yang ada pada perlakuan kontrol.

Pada eksperimen ini, di akhir hari kelima masa eksperimen, jumlah zooxanthellae yang dilepaskan telah turun pada anemon, dalam dua perlakuan tembaga (0,1 dan 0,2 mg l<sup>-1</sup>). Investigasi histologis pada eksperimen menunjukkan bahwa jumlah zooxanthellae pada jaringan *A. viridis* menurun selama periode 5 hari; terdapat jumlah zooxanthellae yang lebih sedikit pada anemon yang didedahkan pada 0,2 mg l<sup>-1</sup> tembaga ketika dibandingkan dengan anemon yang didedahkan pada 0,05 mg l<sup>-1</sup> tembaga (Harland, 1990).

Contoh dari *Anemonia* yang didedahkan pada stressor seperti logam pada studi ini, heat shock (Sharp, 1991), dan *oil dispersant* (Goh, 1988), secara jelas mendemonstrasikan bahwa lepasnya zooxanthella dari anemon merupakan respon yang umum terhadap cekaman. Ketika simbiosis coelenterata terdedah pada kisaran stressor lingkungan tertentu, secara umum coelenterata memberikan respon *bleaching*; warnanya menjadi pucat bahkan putih atau transparan, *bleaching* dihasilkan dari hilangnya asosiasi simbiotik dan pelepasan alga yang pada kasus ekstrem dapat pula terlihat pada mulut di untaian mukus (Davies in press dan observasi personal).

Selain dari Hoegh-Guldberg dan Smith (1989a,b), beberapa upaya telah dilakukan untuk menghitung jumlah zooxanthellae yang dilepaskan oleh simbiosis coelenterata dalam cekaman. Tampak pada pekerjaan yang dilakukan dengan tentakel yang dilumatkan, oleh peneliti yang menghitung zooxanthella pada jaringan coelenterata, bahwa terdapat variasi dan 'noise' dalam pengukuran sejenis (Gates, 1990). 'Noise' yang lebih sedikit didapatkan dari pengukuran jumlah aktual zooxanthellae yang dilepaskan ke air laut dalam kondisi cekaman yang menentukan serta direkomendasikan bahwa tes bioassay apapun yang akan dilakukan pada masa yang akan datang harus mengarah pada pengukuran jumlah aktual dari zooxanthellae yang dilepaskan daripada jumlah *in situ* alga pada jaringan hewan.

## Bab III

### INDEKS MITOSIS DARI ZOOXANTHELLAE PADA ANEMON

#### *Anemonia viridis*

#### III.1. PENDAHULUAN

Karakteristik dasar dari makhluk hidup adalah kemampuannya untuk tumbuh. Pada tingkat seluler, pertumbuhan terjadi melalui sintesis tambahan atas protein, karbohidrat, lemak, dan komponen seluler lainnya. Ketika sel tumbuh, membran plasma meluas, dan memungkinkan terjadinya peningkatan volume internal sel. Meskipun begitu, sel tidak dapat membesar tanpa henti karena adanya batasan pada rasio luas permukaan/volume-nya.

Karena itu, pertumbuhan sel biasanya diikuti oleh pembelahan sel; satu sel membelah untuk menghasilkan dua sel anak yang merupakan duplikasi genetik dari orangtuanya (Becker 1986, De Robertis & De Robertis 1987). Pada makhluk uniseluler, pembelahan sel menghasilkan peningkatan jumlah individu dalam populasi. Pada makhluk multiseluler, pembelahan sel dilakukan untuk mengganti sel mati dan meningkatkan jumlah sel penyusun makhluk hidup.

Terkait dengan pembentukan sel, De Robertis & De Robertis (1987) menyatakan bahwa setiap sel memiliki siklus hidup, yang terdiri atas periode non-pembelahan (interfase) dan periode pembelahan (umum dikenal dengan mitosis). Periode interfase terdiri atas fase sintesis (S), dimana duplikasi DNA terjadi; diikuti oleh jeda (*gap*, fase G1 & G2), dimana dibuat “keputusan” mengenai kapan terjadinya pembelahan sel (Becker, 1986).

De Robertis dan De Robertis (1987) juga menyatakan bahwa “mitosis, secara morfologi, biasa dijelaskan melalui empat fase, berdasarkan tampilan dan perilaku kromosomnya. Empat fase tersebut meliputi (1) profase, terjadi ketika kromosom tampak seperti gulungan tipis yang terbentuk akibat proses kondensasi DNA di dalam nukleus. Kata ‘mitosis’ (dari bahasa Yunani *mitos* : gulungan) menjelaskan fenomena tersebut; (2) Metafase (Yunani *meta* : di antara), ditunjukkan dengan terlihatnya kromosom di sepanjang garis ekuatorial; (3) anafase (Yunani *ana* : mundur), ditunjukkan dengan Bergeraknya kromosom anak ke arah kutub; (4) telofase (Yunani *telo* : akhir), ditunjukkan dengan terjadinya proses rekonstruksi untuk membentuk nukleus anak.

Sitokinesis atau pembelahan sitoplasmik biasanya dimulai saat anafase akhir atau telofase, ketika kromosom mulai mengurai kembali. Pada sel tumbuhan, tahap telofase akhir dapat dilihat melalui terbentuknya lempeng sel, atau lekuk pembelahan pada sel hewan (Becker 1986).

Pembelahan sel pada dinoflagellata umumnya dilakukan dengan pembelahan biner, yaitu terpisahnya satu sel menjadi dua, yang terjadi setelah pembelahan inti (Dodge, 1982). Membran sel terus menerus dihasilkan selama tahap mitosis dari sel induk, dan akibatnya membran ini dapat menyelimuti sel-sel anaknya. Bentuk motil telanjang dari *Gymnodinium* sp diketahui membelah dalam garis yang melengkung di sepanjang sel. Pada beberapa spesies dari genus ini, mitosis terjadi secara asimetris, menghasilkan sel-sel anak yang memiliki jumlah kromosom yang berbeda satu sama lain atau terhadap sel induk (untuk review lihat Pfiester dan Anderson, 1987).

Pada simbiosis, sel-sel dinoflagellata tetap berada pada bentuk coccoid-nya (tidak bergerak) dengan kromosom yang tetap terkondensasi dan membelah melalui pembelahan biner (Smith & Douglas 1987). Studi in-situ dari kimia sel dan ultrastruktur dari *Zooxanthella* pada *Anemonia* yang dilakukan Taylor (1968) menunjukkan bahwa alga-alga ini mengalami pembelahan sel melalui pembelahan biner. Kromosom alga tersebut jelas terlihat pada saat interfase; kondensasi dari kromatinnya nampak

pada saat metafase dan anafase, meskipun struktur dari nukleusnya tidak dapat dilihat pada zooxanthellae hidup. Penelitian terbaru mengenai ultrastruktur dari alga simbiotik pada *Anemonia* yang dilakukan Suharsono (1990) juga menunjukkan adanya zooxanthella yang membelah dengan lempeng sel.

Pada zooxanthellae yang hidup di dalam sel endodermis dari coelenterata, kemungkinan terdapat perbedaan dalam kepadatan populasinya jika dibandingkan antara tiap bagian anatomi yang berbeda pada inangnya (lihat Trench 1979). Pada kondisi normal, mekanisme pengontrolan perbanyakan alga di dalam inang belum diketahui dengan pasti. Meskipun demikian, Trench (1987) mengajukan beberapa hipotesis yang menunjukkan bahwa komponen aktif dalam pengaturan tersebut ditentukan terutama oleh inang; Trench mengajukan tiga kemungkinan mekanisme tercapainya pengaturan tersebut : (1) melalui mekanisme, baik yang diatur oleh inang ataupun alga, yang merangsang sinkronisasi pembelahan inang dan alga; (2) melalui eksositosis dan pengeluaran sel alga berlebih ketika rasio biomassa terlalu tinggi; dan (3) melalui pengaturan inang terhadap laju pembelahan alga melalui pembatasan ketersediaan nutrisi (Trench, 1987).

Menurut Davies (in press), hipotesis pertama belum diselidiki kebenarannya. Hipotesis kedua telah dibuktikan oleh beberapa percobaan. Sebagai contoh, Steele (1976) dan Hoegh-Gulberg dkk (1987) menunjukkan bahwa zooxanthellae sehat secara terus menerus dikeluarkan oleh beberapa spesies inang. Pada *Stylophora pistillata*, laju pertumbuhan spesifik alga lebih besar dari pertumbuhan jaringan hewan, dan karenanya pengeluaran zooxanthellae menjadi perlu untuk menjaga rasio biomassa alga dan jaringan hewan tetap konstan (Muscatine dkk., 1985).

Meskipun demikian, hipotesis kedua tidak menjelaskan bagaimana inang dapat mengetahui tingkat kepadatan populasi alga dimana pengeluaran harus dilakukan (Davies, in press). Hipotesis ketiga mungkin terkait juga dengan pandangan Cook dan D'Elia (1987) yang mengusulkan bahwa biomassa zooxanthellae dapat dikendalikan dengan membatasi ketersediaan nutrisi, khususnya nitrogen, bagi zooxanthellae.

Satu cara untuk mempelajari aktivitas mitosis dari sel adalah dengan mengukur indeks mitosis ('mitotic index', MI). Parameter ini dapat dihitung sebagai persentase kehadiran sel pada fase tertentu dalam mitosis, seperti misalnya MI profase, metafase, anafase, atau telofase (lihat Becker, 1986). Teknik ini telah banyak digunakan oleh para sitologis yang mempelajari pergerakan kromosom di bawah mikroskop (lihat Mitchison, 1989).

Saat ini peneliti dapat menggunakan teknik kimia sel modern yang menggunakan pewarnaan khusus DNA. Proses ini dinamakan reaksi Feulgen; pewarnaan akan terlihat pada nukleus, tetapi tidak pada sitoplasma (Boon & Drijver 1986, De Robertis & De Robertis 1987).

Hasil pengukuran indeks mitosis pada sel tumbuhan telah banyak dilaporkan. Para peneliti tersebut umumnya bekerja dengan sel akar yang memberikan materi sensitif untuk mengukur pertumbuhan. Sebagai contoh, mereka menemukan bahwa kekeringan dan stress menghambat aktivitas mitosis dan sintesis DNA pada bunga matahari *Helianthus annuus* (Robertson dkk, 1990) ; Perlakuan dengan Natrium Florida menyebabkan pelebaran siklus mitosis pada 'jack pine' *Pinus banksiana* (Zwiasek & Shay 1988) ; Aluminium sulfat menyebabkan penurunan mitosis dan sel abnormal pada bawang *Allium sativum* (Roy dkk., 1989) ; suatu herbisida diketahui menghambat pembelahan mitosis dan penurunan aktivitas DNA/RNA pada bawang *Allium cepa* dan kacang babi *Vicia faba* (Badr & Ibrahim 1987). Selain itu, pada ragi *Saccharomyces cerevisiae* yang diberi perlakuan dengan 12 bahan kimia, terjadi penurunan aktivitas mitosis (Whittaker dkk. 1990).

Pada sel mamalia, penelitian untuk kepentingan komersial terkait dengan indeks mitosis dan pengamatan atas gangguan kromosom telah banyak dilakukan, seperti misalnya penyediaan

metodologi untuk mengamati kesesuaian sel mamalia untuk kultur (Parry dkk 1990). Contoh lain adalah analisis terhadap kelainan kromosom sebagai bagian dari studi sitotoksik pada limfosit manusia yang hidup di daerah yang terkena polusi Cadmium (Tang dkk. 1990). Penelitian ini merupakan bagian dari program monitoring lingkungan, yang mana penggunaan metode sitogenetika untuk studi toksikologi diusulkan oleh Landolt & Kocan (1983), Ono (1988), Niebor & Show (1988).

Pada simbiosis alga di beberapa coelenterata, indeks mitosis dari zooxanthellae telah digunakan untuk mengukur perubahan pada respons alga terhadap kondisi alami dan eksperimental yang berbeda. Pada *Hydra*, MI dari *Chlorella* simbiotik menurun pada inang yang kelaparan, tapi meningkat pada inang yang telah diberi makan (McAuley 1982, 1985a). MI dan laju pertumbuhan zooxanthellae simbiotik dari berbagai inang diketahui dipengaruhi oleh konsentrasi nutrisi (Wilkerson dkk. 1983, Szmant-Froelich & Pilon 1984); selain itu, laju pertumbuhan alga pada inang yang lapar lebih rendah dibandingkan pada inang yang telah diberi makan (lihat Cook & D'Elia 1987, Cook dkk. 1988).

Faktor lain yang diketahui mempengaruhi MI pada alga simbiotik adalah iradiasi (McAuley 1985b, Muller-Parker 1987, Steen 1987), kedalaman (Wilkerson dkk 1988), suhu (Gates & Brown 1985, Gates 1990, Suharsono 1990) dan perlakuan minyak mentah terhadap inang (Michel & Fitt 1984) serta persebaran minyak (Goh 1988).

Teknik yang banyak digunakan oleh para peneliti untuk memperkirakan MI dari alga simbiotik adalah dengan metode homogenasi dimana tentakel dari anemon/karang dihomogenisasi pada medium yang mengandung senyawa fiksatif (contoh : Formalin) ; selanjutnya dilakukan penghitungan jumlah alga yang memiliki lempeng sel dan jumlah sel yang sedang membelah, sebagai proporsi terhadap keseluruhan sel yang dihitung, dengan nilai persentasenya dinyatakan sebagai indeks mitosis (Wilkerson, Muller-Parker, & Muscatine 1983). Terdapat beberapa kekurangan/kerugian atas metodologi ini, termasuk kesulitan dalam menentukan sel yang memang memiliki lempeng sel.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menghitung nilai dari indeks mitosis sebagai indeks stress atas polusi pada coelenterata simbiotik. Hingga saat ini, penelitian telah dilakukan dengan memberi perlakuan tembaga (Cu) pada anemon temperata *Anemonia viridis* dalam laboratorium untuk melihat respons MI dari alga simbiotiknya. Pada studi ini, dilakukan dua teknik untuk mengevaluasi MI, yaitu (1) metode homogenasi yang telah digunakan oleh peneliti sebelumnya, dimana penghitungan lempeng sel digunakan untuk mengetahui pembelahan sel; dan (2) penekanan jaringan dimana sel yang membelah diidentifikasi dari adanya gambaran proses mitosis dengan menggunakan reagen Feulgen.

## **III.2. BAHAN DAN METODE KERJA**

### **III.2.1. Koleksi dan pemeliharaan anemon**

*Anemonia viridis* (Forskal) dikoleksi dari pantai Kames, pulau Cumbrae, Skotlandia pada musim panas 1989, dimana suhu air rata-rata pada daerah karang adalah  $\sim 15^{\circ}\text{C}$  (dengan kisaran  $13 - 18^{\circ}\text{C}$ ). Di laboratorium, anemon dipelihara dalam tangki-tangki dengan aerasi baik dan diresirkulasi dengan air laut buatan (menggunakan TROPIC MARIN), dengan kadar garam 35 ‰ pada suhu  $15^{\circ}$  dan pencahayaan 12 jam siang : 12 jam malam. Lampu cahaya siang fluorescent (Durolite truelite) 20 W digunakan untuk menyinari hewan tersebut. Anemon dipelihara selama 10 hari pada kondisi tersebut agar terjadi aklimatisasi sebelum dilakukan percobaan. Selama periode ini, anemon diberi pakan *Mytilus edulis* segar ( $\sim 1$  gram/anemon) sekali seminggu.

### III.2.2. Desain eksperimental

Sebanyak 54 hewan digunakan untuk mengevaluasi indeks mitosis dari zooxanthellae. Semua anemon yang digunakan berukuran 25 – 35 mm sepanjang lempeng basal. Empat ruang plastik diisi dengan 5 liter air laut buatan yang diaerasi dan dipertahankan pada suhu konstan 15°C menggunakan water bath. Sebanyak 18 anemon ditempatkan pada ruang kontrol (tanpa penambahan Cu), 18 anemon pada 0,05 mg/l Cu, 9 anemon pada 0,03 mg/l Cu, dan 9 anemon pada 0,01 mg/l Cu. Tembaga ditambahkan menggunakan larutan tembaga nitrat (British Drug House standard, BDH Chemicals Ltd.).

Sebanyak satu anemon disisihkan dari kondisi kontrol sebelum perlakuan tembaga dan lima tentakel diambil untuk mengukur MI dari zooxanthellae ; tentakel yang tersisa digunakan untuk analisis klorofil (lihat Bab 4). Setelah 30 menit dari perlakuan awal terhadap tembaga, satu anemon dari tiap ruang disisihkan. Cuplikan diambil tiap 3 jam selama 24 jam waktu eksperimen pada semua konsentrasi tembaga dan tiap 6 jam selama 72 jam berikutnya pada 0,05 mg/l tembaga dan kontrol saja. Pengukuran hanya dilakukan pada periode 24 jam awal untuk anemon dalam 0,01 dan 0,03 mg/l karena terbatasnya ketersediaan anemon. Air laut dan larutan logam diperbaharui setiap 12 jam dalam 72 jam eksperimen.

### III.2.3. Latar belakang ringkas tentang penggunaan reaksi Feulgen dan teknik homogenisasi

#### Reaksi Feulgen (Pantin 1962, Boon dan Drijver 1986, De Robertis & De Robertis 1987).

DNA di dalam nukleus dapat dipelajari dengan melihat reaksi nukleus, teknik yang dikembangkan pada 1924 oleh Feulgen dan Rossenbeck. Hidrolisis asam digunakan untuk menyisihkan RNA, tetapi tidak DNA. Reaksi berlangsung dalam tahapan berikut: (1) hidrolisis asam menghilangkan purin (basa nitrogen pada asam nukleat), dan menghasilkan grup aldehyd (-CHO) bebas dari DNA; (2) aldehyd bebas tersebut bereaksi dengan reagen Schiff untuk membentuk leucofuchsin (senyawa fuchsin-asam sulfat), yang terlihat berwarna ungu. Reagen Schiff dibuat dengan mencampur fuchsin dasar, yang mengandung parafuchsin (triamino-triphenyl-methan Klorida), dengan asam sulfat, yang kemudian memberi warna ketika direaksikan dengan aldehyd yang ada pada sel atau jaringan. Di dalam nukleus, dengan adanya pewarnaan, tumpukan kromatin yang terkondensasi memberi reaksi yang sangat positif. Hasil dari metode ini pada zooxanthellae dapat dilihat pada Gambar 3.2.1.

#### Metode Homogenisasi (digunakan oleh Wilkerson, Muller-Parker, dan Muscatine 1983, dengan menghitung sel yang membelah berdasarkan kehadiran lempeng sel)

Menghitung lempeng sel pada zooxanthellae yang mengalami pembelahan sel dengan menggunakan metode homogenisasi sangatlah sulit. Metode ini dijalankan sebagai berikut : tentakel yang diambil dari anemon dihomogenisasi dan difiksasi dalam formalin 5%; zooxanthellae diisolasi dengan sentrifugasi dan supernatan dibuang; zooxanthellae diamati di bawah mikroskop cahaya seperti dapat dilihat pada Gambar 3.2.2.

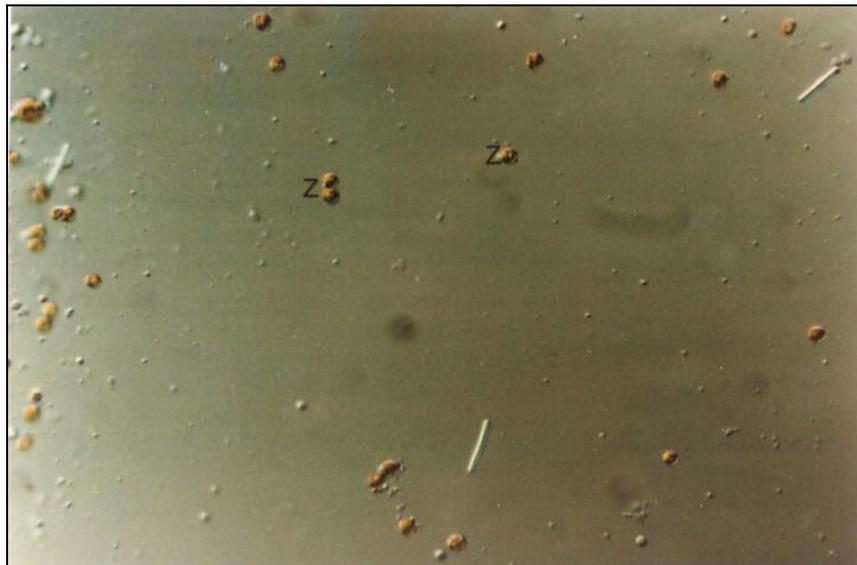


Gambar 3.2.1. Zooxanthellae mengalami mitosis yang digunakan untuk menentukan indeks mitosis. Zooxantella diperoleh dari remukan tentakel *Anemonia viridis*. Perbesaran 460 x.

Z = zooxanthellae

N = nukleus yang berwarna merah muda menggunakan pewarna Feulgen

D = sel yang membelah



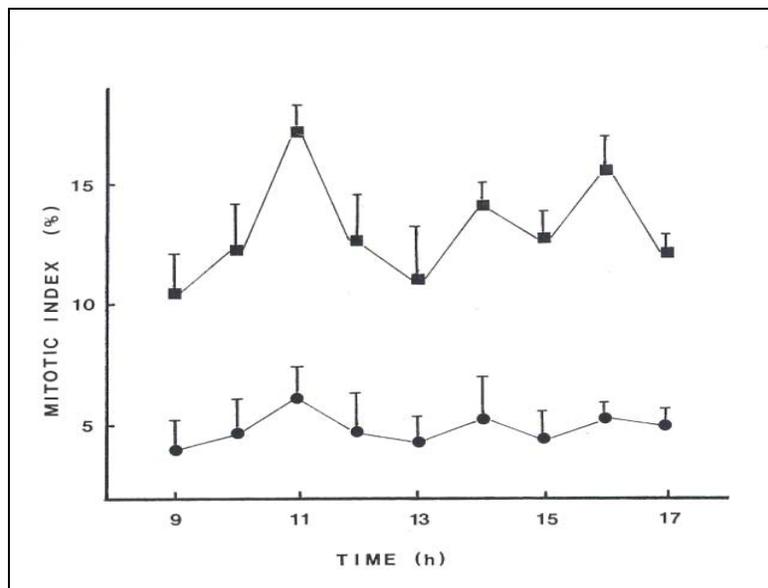
Gambar 3.2.2. Zooxanthellae yang diperoleh dari metode homogenisasi. Perbesaran 40x.

Z = Zooxanthellae

Kerugian menggunakan metode homogenisasi ini adalah : (1) warna kuning-hijau dari zooxanthellae menyulitkan penentuan lempeng sel (tapi hidrolisis asam dari metode Feulgen menghilangkan pigmen tersebut sehingga pengamatan lebih mudah dilakukan) ; (2) prosedur homogenisasi dan sentrifugasi pada metode homogenisasi dapat menyebabkan kerusakan sel (kerusakan tersebut dapat dikurangi pada teknik pewarnaan yang dilakukan dengan metode Feulgen) ; (3) penggunaan haemositometer/ sel Sedgewick pada metode homogenisasi memiliki perbesaran terbatas (maksimum 40 x) untuk

mengamati sel di bawah mikroskop cahaya, sementara dengan perbesaran lebih tinggi (100 x) dapat dilakukan menggunakan metode Feulgen ; (4) saat sel zooxhantellae menggumpal, seperti yang terjadi pada metode homogenisasi, sulit untuk membedakan sel yang tumpang tindih dan sel yang memiliki lempeng sel. Sebagai perbandingan, penampakan sel dengan gambaran mitosis lebih jelas terlihat pada **squash** yang diwarnai dengan reagen Feulgen.

Ketika teknik lempeng sel dibandingkan dengan metode pewarnaan mitosis dari anemon kontrol (Gambar 3.2.3), terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,001$  ANOVA) dari MI zooxhantellae yang dihitung (Zamani 1991). Nilai MI dari teknik lempeng sel berkisar 2 – 3 kali lebih rendah dari indeks yang diperoleh menggunakan teknik Feulgen.



Gambar 3.2.3. Indeks mitosis pada zooxhantellae dari *Anemonia viridis* di suhu 15°C. MI ditentukan dari penghitungan lempeng sel (bulat) dan pewarnaan Feulgen pada mitosis di sel yang membelah yang kemudian dihitung menggunakan metode yang telah dijelaskan (kotak). Nilai rata-rata  $\pm$  standar deviasi ditunjukkan ( $n = 5$ ).

Karena ahli fisiologi tumbuhan mendefinisikan indeks mitosis sebagai perhitungan sel yang mengalami mitosis (bukan sel yang memiliki lempeng sel) dan karena teknik pewarnaan Feulgen ini lebih mudah dan lebih akurat untuk dilakukan dibandingkan penghitungan lempeng sel pada metode homogenisasi, dengan alasan yang dijelaskan di atas, maka semua pengukuran MI selanjutnya dilakukan menggunakan teknik perusakan jaringan menggunakan reagen Feulgen.

#### III.2.4. Metode pewarnaan yang digunakan untuk memperkirakan indeks mitosis dari zooxhantellae

Indeks mitosis dihitung sebagai persentase sel zooxhantellae pada tahap anafase akhir atau telofase dalam pembelahan mitosisnya dari 500 sel yang dihitung.

##### A) Persiapan sitologis

- (1) Tentakel yang dipotong difiksasi dengan 3 : 1 alkohol : asam asetat glasial selama 30 menit. Pemfiksasi mempertahankan DNA dengan baik di dalam nukleus, tetapi menyebabkan sel membengkak (Boon & Drijver 1986).

- (2) Cuplikan disimpan dalam pendingin pada suhu 4°C dalam 70% alkohol sampai dibutuhkan.
  - (3) Cuplikan dihidrolisis dalam 1 M HCl dalam oven pada suhu 60°C selama 25 – 30 menit, kemudian dipindahkan ke suhu ruangan selama 10 menit
  - (4) Cuplikan dicuci secara bertahap dengan air, dua kali tiap 5 menit.
  - (5) Cuplikan ditempatkan dalam pewarna Feulgen selama 3,5 – 4 jam untuk memperoleh aktivitas pewarnaan lengkap (NB. Pewarna Feulgen disiapkan sebagai larutan segar setiap hari karena larutan tersebut rusak dalam penyimpanan)
  - (6) Tentakel yang diwarnai dipotong menjadi ukuran kecil dan ditempatkan pada slide, sambil diteteskan 1 tetes asam asetat glasial 45%, lalu ditekan di bawah kaca penutup.
  - (7) Slide diamati di bawah mikroskop cahaya dengan lensa yang telah diberi minyak imersi, atau perbesaran 400 x.
- B) Persiapan pewarna Feulgen (atau reagen Schiff)
- (1) 1 gram tepung fuchsin dasar untuk Schiff Feulgen (atau pararosalin Klorida), BDH, Prod. No.34318) disiapkan dalam 200 ml air suling mendidih
  - (2) Saat larutan fuchsin mendingin pada suhu 50°C, larutan disaring dan 30 ml dari 1 M HCl dan 3 gram Kalium metabisulfit ditambahkan ; hasil campuran disimpan dalam tempat gelap sepanjang malam
  - (3) Larutan ditambahkan pada karbon aktif dan disaring hingga berwarna kuning pucat atau bening.
  - (4) Reagen ini disimpan dalam botol gelap pada pendingin di suhu 4°C hingga dibutuhkan (NB : reagen ini dapat disimpan hingga 6 bulan jika tidak terkena cahaya)

Teknik yang dijelaskan di atas diadaptasi dari pewarnaan sel tumbuhan (Badr dkk.1987, Haroen *pers.comm.*) dan selanjutnya dimodifikasi untuk penggunaan dengan zooxantellae. Prosedur ini pertama kali dimodifikasi dalam hal waktu untuk hidrolisis dan pewarnaan dioptimasi setelah uji coba awal dan berdasarkan referensi dari praktek teoritis (Pantin 1962, Boon & Drijver 1986, De Robertis & De Robertis 1987).

### III.3. HASIL

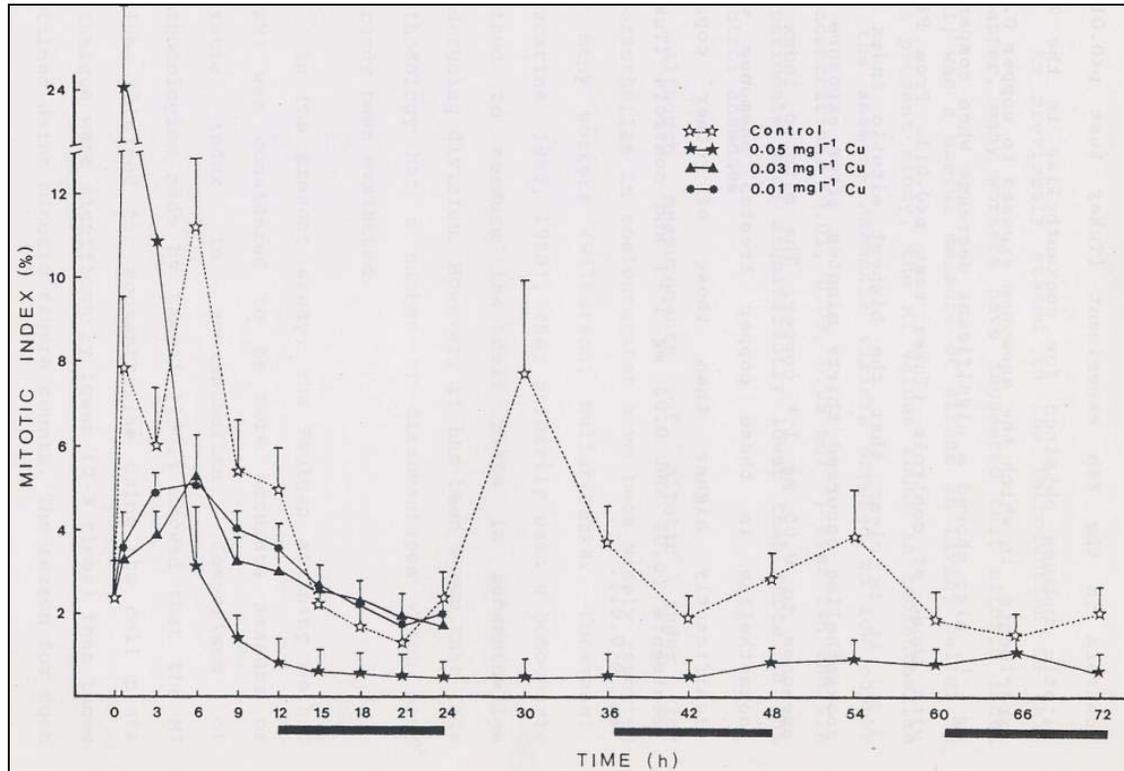
Indeks mitosis rata-rata untuk zooxantellae dengan perlakuan tembaga dan kontrol ditampilkan pada Lampiran B. Persentase yang diperoleh dari MI diubah menggunakan log transformasi (x+1) di mana x = MI. Data yang telah diubah ini digunakan dalam analisis statistik parametrik.

Indeks mitosis rata-rata dari zooxantellae diplot terhadap waktu (Gambar 3.3.1) untuk menggambarkan fluktuasi siklis dari nilai MI yang diamati pada anemon kontrol. Pada anemon kontrol, terlihat perbedaan signifikan pada MI (uji Tukey  $p < 0,01$ ) antara zooxantellae yang diambil pada periode terang dan periode gelap. Sebagai perbandingan, MI dari zooxantellae pada anemon yang terkena 0,05 mg/l tembaga tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara cuplikan terang dan gelap.

Perbedaan signifikan (ANOVA multifaktorial  $p < 0,001$ ) terlihat jelas pada indeks mitosis dari zooxantellae yang diamati sepanjang waktu dan perlakuan (yaitu 0,01 mg/l, 0,03 mg/l, 0,05 mg/l dan kontrol).

Untuk mengidentifikasi perbedaan antara konsentrasi tembaga dan kontrol, uji **multi-range** dilakukan dan hasilnya ditampilkan pada Lampiran B. hasil uji menunjukkan bahwa pada ketiga perlakuan, indeks mitosis untuk zooxantellae menurun secara signifikan jika dibandingkan dengan kontrol pada percobaan 24 jam (uji Tukey  $p < 0,01$ ). Indeks mitosis zooxantellae pada percobaan 72 jam, dengan

perlakuan 0,05 mg/l tembaga terhadap anemon, juga menunjukkan penurunan signifikan jika dibandingkan dengan kontrol (uji Tukey  $p < 0,01$ ). Dari gambar 3.3.1, jelas ditunjukkan bahwa indeks mitosis tertinggi dari zooxantellae terjadi pada 30 menit setelah anemon diberi perlakuan 0,05 mg/l tembaga. Indeks mitosis dari zooxantellae pada perlakuan tembaga ini lebih tinggi secara nyata dibandingkan perlakuan tembaga lainnya (0,01 mg/l dan 0,03 mg/l) serta kontrol (uji Tukey  $p < 0,01$ ).



Gambar 3.3.1. Indeks mitosis dari zooxantellae pada *Anemonia viridis* dalam konsentrasi tembaga yang berbeda dan kontrol air laut selama 24 jam dan 72 jam percobaan. Garis vertikal = standar deviasi (n = 5) --- = periode gelap

### III.4. DISKUSI

Seperti telah disebutkan pada pendahuluan Bab ini, banyak peneliti telah mengusulkan bahwa indeks mitosis merupakan ukuran yang berguna untuk menunjukkan stress pada sel hidup. Pada penelitian ini, indeks mitosis yang diukur pada zooxantellae dari anemon *Anemonia viridis* yang terkena konsentrasi tembaga rendah (0,01, 0,03, 0,05 mg/l) selama 24 jam dan 72 jam percobaan secara signifikan lebih rendah dari nilai pada anemon kontrol.

Meskipun pengukuran indeks mitosis zooxantellae pada coelenterata telah banyak dilaporkan oleh peneliti (Wilkerson, Muller-Parker, Kobayashi, Muscatine, 1983, 1988), penelitian tersebut umumnya masih menggunakan metode homogenisasi untuk mengukur lempeng sel pada zooxantellae yang mengalami pembelahan. Meskipun demikian, telah ditunjukkan bahwa metode ini memiliki beberapa kekurangan.

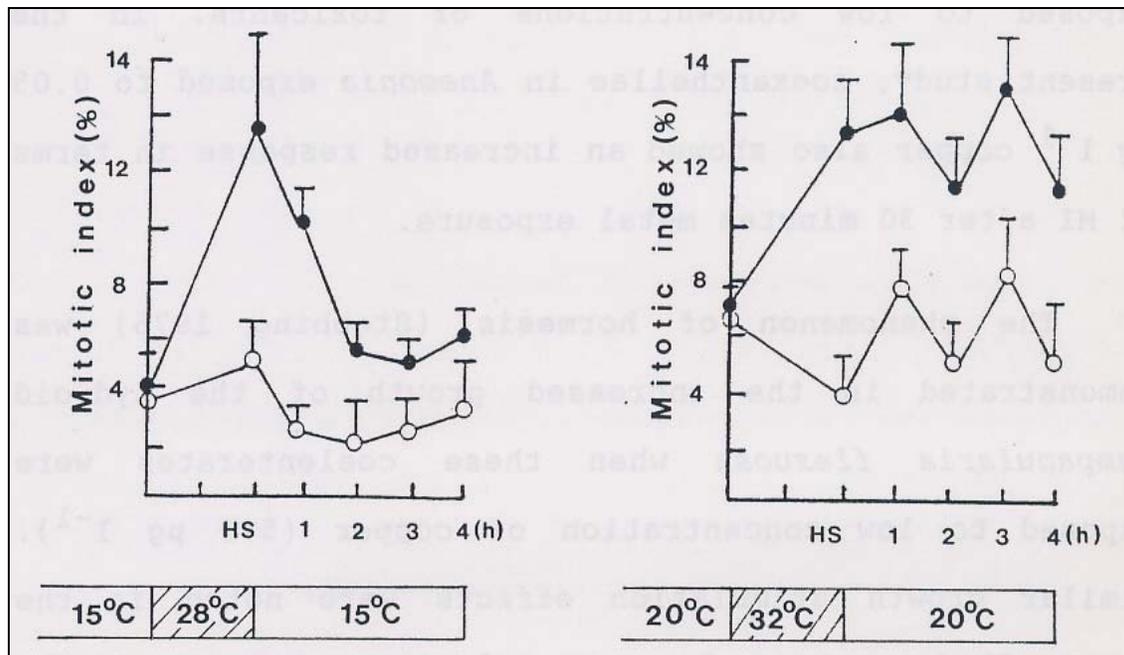
Pada penelitian ini, metode pewarnaan Feulgen (*Feulgen staining method, FSM*) dianggap lebih akurat dalam mengukur indeks mitosis zooxantellae. Perbandingan metodologi yang kemudian dilakukan juga oleh Zamani (1991) menunjukkan bahwa nilai MI zooxantellae hasil penghitungan

dengan teknik lempeng sel lebih rendah secara nyata (hingga 2 – 3 kali) dibandingkan dengan penghitungan gambaran mitosis. Alasan atas perbedaan hasil ini karena kenyataan bahwa sel menunjukkan kondisi mitosis dalam periode yang lebih lama dibandingkan kondisi pembentukan lempeng sel. Karena itu sel akan terdeteksi membelah lebih awal dengan menggunakan FSM dibandingkan dengan teknik lempeng sel. Dengan kata lain, teknik lempeng sel memberikan estimasi yang lebih rendah atas sel yang sedang terlibat dalam proses mitosis.

Dalam penelitian lain seperti yang dilakukan kemudian oleh Sharp (1991), telah diaplikasikan teknik FSM untuk mengukur indeks mitosis dari zooxantellae pada *Anemonia* yang diinduksi kejutan panas selama 2 jam (15–28°C dan 20-32°C). Penelitian ini telah menunjukkan peningkatan mendadak dari laju pembelahan mitosis zooxantellae pada anemon yang dipelihara pada suhu 15°C dan diberi kejutan 13°C. Hasil penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.4.1.

Pada penelitian Sharp, anemon juga dipelihara selama lima bulan pada suhu tinggi (20°C) dan diberi perlakuan dengan perubahan suhu mendadak selama 2 jam (20 – 32°C). Mitosis zooxantellae tetap tinggi dan kecenderungan ini tetap berlangsung selama 4 jam pasca-induksi. Pada penelitian lain oleh Gates (1990) dan Suharsono (1990), respon serupa juga ditemukan ; laju pembelahan zooxantellae pada *Anemonia* meningkat ketika anemon diberi perlakuan dengan peningkatan suhu. Laju pembelahan yang meningkat pada zooxantellae ini kemungkinan merupakan konsekuensi metabolisme langsung atas kenaikan suhu (Cossin & Bowler 1987) yang mengakibatkan **turnover** sel yang tinggi.

Hal yang menarik adalah bahwa pada anemon yang diberi kejutan panas 15-28-15°C selama 2 jam (hasil Sharp), respons mitosis zooxantellae tampak menunjukkan hormesis atau kompensasi berlebih dari mekanisme kontrol biologis normal (Stebbing 1981). Ketika anemon dikembalikan pada kondisi normal setelah perlakuan panas, indeks mitosis zooxantellae kembali pada laju dasarnya. Fenomena hormesis ditunjukkan oleh Stebbing (1976) pada pertumbuhan hydroid *Campanularia flexuosa* ketika hydroid ini diberi perlakuan racun konsentrasi rendah. Pada penelitian ini, zooxantellae dari *Anemonia* dengan perlakuan 0,05 mg/l tembaga juga menunjukkan peningkatan respon MI setelah 30 menit perlakuan.



Gambar 3.4.1. Indeks mitosis dari zooxanthellae pada *Anemonia viridis*, setelah perlakuan panas 2 jam (15-28°C dan 20-32°C) dan 4 jam periode pemulihan pada suhu 15°C dan 20°C (o), dan kontrol (●). HS = kejutan panas selama 2 jam ; garis vertikal = standar deviasi (n = 3)

Fenomena hormesis (Stebbing 1976) ditunjukkan pada peningkatan pertumbuhan dari hydroid *Campanularia flexuosa* ketika coelenterata ini diberi perlakuan tembaga konsentrasi rendah (5,0 µg/l). Efek stimulasi pertumbuhan serupa juga terjadi pada ragi *Rhodotorula rubra* yang terkena Cadmium dan hydroid *Campanularia* yang terkena timah tributil konsentrasi rendah dan senyawa pembersih lainnya (lihat Stebbing 1981, Stebbing & Brinsley 1985).

Kajian Stebbing menggarisbawahi respons tersebut pada banyak filum yang terkena agen racun, dari mulai mikroalga hingga ikan. Hormesis yang terjadi pada banyak organisme yang merespon konsentrasi agen racun ini menunjukkan bahwa fenomena ini dapat digunakan untuk menunjukkan gejala racun pada level rendah, selain juga memberi indeks yang berguna atas efek tersebut. Efek hormesis itu sendiri karenanya dapat memiliki nilai penting dalam menghitung stress dan dapat menjadi perangkat yang berguna untuk penelitian-penelitian bioassay ke depannya.

## Bab IV

# KONSENTRASI KLOORIFIL PADA ZOOXHANTELLAE DARI ANEMON *Anemonia viridis* SEBAGAI HASIL DARI PERLAKUAN TEMBAGA

### IV.1. PENDAHULUAN

Klorofil adalah pigmen dasar yang berperan dalam penyerapan cahaya dan fotokimia, dan ditemukan baik pada tumbuhan tinggi, alga, dan bakteri fotosintetik (Meeks 1974, Becker 1986). Banyak jenis klorofil yang memiliki struktur molekular yang tersusun atas senyawa tetrapirrol siklik dengan elemen Magnesium terletak pada bagian tengah cincin (Kirk 1986), sementara klorofil lain yang tidak memiliki Magnesium biasa disebut phaeophytin (Hall & Rao 1989).

Menurut Becker (1986), klorofil tersusun di dalam organel sel yang disebut kloroplas ; plastida besar yang mengandung senyawa kimia seperti enzim, koenzim NADP<sup>+</sup> (Nicotinamide Adenine Dinucleotide phosphate), serta pigmen penyerap cahaya lainnya seperti karotenoid, fikobilin, dsb. Pada kloroplas, reaksi fotosintesis berlangsung; proses ini didorong oleh adanya cahaya, dimana karbondioksida dan air digunakan untuk menghasilkan karbohidrat dan senyawa organik lainnya. Dari sana, semua kehidupan diturunkan.

Telah lama diketahui bahwa zooxantellae merupakan produsen primer dominan di komunitas terumbu di daerah tropis (untuk review lihat Muscatine 1980, 1990 ; Davies, *in press*). Karena zooxantellae merupakan organisme yang memiliki klorofil seperti pada tumbuhan, mereka mampu menangkap radiasi matahari sebagai sumber energi yang kemudian diubah menjadi energi kimia. Energi ini sangat penting bagi pertumbuhan karang. Muscatine (1990) menyatakan bahwa energi kimia diturunkan dari fotosintesis melalui fiksasi karbon anorganik dari air laut yang mengandung bikarbonat yang tinggi, serta dari karbondioksida yang dihasilkan oleh hewan inang. Karbon terikat ini kemudian digunakan untuk mensintesis zooxantellae baru, untuk respirasi, dan translokasi.

Karbon yang telah ditranslokasi ini kemudian digunakan untuk respirasi hewan, untuk mensintesis biomassa hewan baru, dan dilepaskan dari hewan dalam bentuk partikulat atau karbon organik terlarut, seperti lendir, matriks organik (Pearse & Muscatine 1971; Rinkevich & Loya 1983). Telah diperkirakan bahwa sekitar 91% dari energi hasil fotosintesis pada karang scleractinian *Porites porites* ditranslokasikan; alokasi utama dari energi adalah untuk respirasi bagi jaringan hewan, dengan hanya sedikit saja penggunaan untuk pertumbuhan dan reproduksi (Edmunds & Davies 1986).

Menurut Meeks (1974), distribusi pigmen klorofil bervariasi di antara famili alga. Klorofil (chl) – a dianggap sebagai pigmen fotosintesis utama pada banyak famili alga, sementara klorofil lain seperti chl – b, c (c1 & c2) dan d memiliki distribusi terbatas dan dianggap sebagai pigmen fotosintesis sekunder atau tambahan.

Chl-b adalah ciri dari tumbuhan hijau dan ditemukan pada alga dari famili Chlorophyceae, Parasinophyceae, dan Euglenophyceae (Lewin 1974, Meeks 1974) dan pada beberapa tumbuhan tinggi (Jeffrey & Humphrey 1975, Becker 1986). Chl-b berperan sebagai pigmen pemanen cahaya, mentransfer energi cahaya yang diserap ke chl-a untuk fotosintesis primer (Govindjee & Braun 1974). Rasio Chl-a : Chl-b umumnya berkisar antara 2 : 1 sampai 3 : 1 pada fitoplankton (lihat Meeks 1974).

Chl-c ditemukan pada organisme yang tergolong tumbuhan coklat seperti Cryptophyceae, Dinophyceae, Rhaphidophyceae, Chrysophyceae, Haptophyceae, Bacillariophyceae, Xanthophyceae,

dan Phaeophyceae (Meeks 1974). Chl-c terdiri atas tiga komponen yang berbeda berdasarkan spektrum cahayanya, yaitu chl-c1, c2, dan c3 (Jeffrey 1969, 1972, 1989).

Chl-c2 selalu ada pada Dinophyceae (alga bebas dan simbiotik), tetapi c1 dan c3 tidak terdeteksi (Jeffrey 1989). Chl-c berperan sebagai pigmen tambahan dalam fotosistem (Meeks 1974, Govindjee & Braun 1974). Meskipun begitu, pemahaman penuh mengenai jalur kimia dan biosintetik dari chl-c pada alga membutuhkan lebih banyak penelitian (Jeffrey 1989). Rasio chl-a : chl-c pada alga laut berkisar dari 1,2 : 1 sampai 5,5 : 1 (Jeffrey 1972). Persentase total dari klorofil a dan c pada dinoflagellata mencapai 63% dan 37% (secara berurutan) pada *Amphidinium carteri*, 67% dan 33% pada *Gymnodinium simplex*, 77% dan 23% pada *Prorocentrum micans* (Jeffrey 1972). Chl-d adalah komponen minor pada ekstrak banyak jenis Rhodophyceae. Fungsi dari pigmen ini belum diketahui (Meeks 1974).

Pigmen fotosintesis dari zooxantellae telah diketahui. Zooxantellae dari organisme simbiotik yang berbeda seperti kerang tridacnid, zoantharian, karang alcyonaria dan hydrozoa memiliki pigmen yang identik dengan dinoflagellata *Amphidinium* sp., mengandung klorofil a dan c, beta karoten, peridinin, neoperidinin, dinoxanthin, diadinoxanthin dan beberapa xanthofil lain yang tidak teridentifikasi (Taylor 1967 ; Jeffrey dan Haxo 1968 ; lihat Muscatine 1980 dan Trench 1987). Meskipun demikian, klorofil c yang terdapat pada zooxantellae yang diisolasi dari *Tridacna crocea* mengandung hanya klorofil c2 (Jeffrey 1969).

Terkait dengan efek logam berat terhadap alga secara umum, Rai dkk (1984) secara komprehensif menunjukkan bahwa logam berat seperti raksa, Cadmium, timbal, nikel, perak, dan logam lain yang berperan sebagai mikronutrien (tembaga, seng, molibdenum, mangan) merupakan racun bagi alga pada konsentrasi tinggi. Hal yang menjadi karakter umum dalam toksisitas logam berat adalah inaktivasi dari sistem enzim. Banyak proses fisiologis dan biokimia, seperti fotosintesis, respirasi, sintesis protein, sintesis klorofil, dsb, terpengaruh oleh konsentrasi logam berat secara cukup parah.

Meski kajian Rai (*op.cit.*) umumnya terfokus pada alga bebas, efek logam pada alga simbiotik pada karang juga telah dilaporkan oleh Howard dkk (1986). Studi tersebut menunjukkan bahwa perlakuan tembaga ionik terhadap karang *Montipora verrucosa* menyebabkan kerusakan fisiologis dan biokimia seperti *bleaching* atau hilangnya zooxantellae, serta pengurangan jumlah pigmen zooxantella (chl-a).

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui kemungkinan penggunaan kandungan klorofil dari zooxantellae sebagai indeks sensitif atas stress pada anemon *Anemonia viridis* yang diberi perlakuan ion tembaga pada konsentrasi rendah (0,05 mg/l). Pada konsentrasi ini tidak ada efek tembaga yang nyata secara statistik ditunjukkan dalam bentuk peningkatan jumlah zooxantellae yang dilepas pada percobaan pertama (lihat Bab II).

Kandungan klorofil yang diukur adalah chl-a dan chl-c2 karena, seperti disebutkan di atas, chl-a hadir pada semua organisme fotosintesis, termasuk zooxantellae, sedangkan chl-c terdapat pada alga yang termasuk ke dalam Dinophyta (Jeffrey 1989). Pengurangan chl-a dan c pada zooxantellae telah banyak dilihat untuk mengetahui respon *bleaching* dari karang sebagai akibat dari perlakuan panas (lihat Jokiel dan Coles 1990).

## IV.2. BAHAN DAN METODE KERJA

### IV.2.1. Protokol percobaan

Sebanyak 36 *Anemonia viridis* digunakan dalam analisis kandungan klorofil dari zooxantellae. Sebanyak 18 anemon digunakan sebagai kontrol (tanpa penambahan tembaga) ; dan 18 lainnya diberi perlakuan 0,05 mg/l tembaga. Percobaan ini dilakukan secara paralel dengan analisis indeks mitosis dari zooxantellae (dijelaskan pada Bab III). Satu ekor anemon disisihkan dari kontrol dan 18 tentakel diambil ; sebanyak 15 tentakel digunakan dalam analisis klorofil, dengan tiga buah tentakel digunakan sebagai sampel, sehingga terdapat 5 pengulangan untuk setiap sampel ; sisa tiga tentakel lainnya digunakan untuk analisis protein (dijelaskan dalam bagian berikut). Setelah 30 menit dari perlakuan awal, satu anemon yang terkena tembaga diambil untuk analisis klorofil dan diperlakukan dengan cara yang sama seperti pada kontrol. Sampel lainnya diambil tiap 3 jam selama 24 jam percobaan, kemudian tiap 6 jam selama 72 jam percobaan. Sebelum analisis, semua sampel diletakkan pada saringan fiberglass (Whatman GF/F), dibungkus dengan aluminium foil, dan dijaga pada suhu -20°C.

### IV.2.2. Analisis klorofil

Prosedur untuk analisis klorofil dari zooxantellae pada *Anemonia* dijelaskan sebagai berikut :

- a) Persiapan sampel untuk determinasi spektrofotometri
  - (1) Sampel dicairkan dalam suhu ruangan
  - (2) Sampel dihomogenisasi dalam homogenisator gelas yang mengandung 0,05% (b/v) SDS (Sodium dodecyl-sulfate). Deterjen ini telah banyak digunakan untuk mengisolasi *Chlorella* dari *Hydra* (McAuley 1986) untuk menghilangkan protein inang tanpa mempengaruhi hidup dari alga simbiotik. Konsentrasi SDS yang digunakan tidak boleh lebih besar dari 0,05% (McAuley, *pers.comm.*).
  - (3) Suspensi dari hasil homogenisasi disaring menggunakan saringan teh ketimbang menggunakan **kain penyaring keju** (Muscatine1967, Jeffrey & Haxo 1968) untuk menghilangkan jalinan lendir, jaringan inang, dan kotoran lainnya, kemudian sampel ditempatkan pada tabung gelas untuk sentrifugasi.
  - (4) Sampel homogen disentrifugasi pada 3000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang.
  - (5) Pelet zooxantellae diekstrak dalam 4 ml aseton 100% (Jeffrey & Humphrey 1975) dalam ruang gelap pada suhu 4°C selama 24 jam.
  - (6) Larutan hijau kecoklatan yang telah diekstraksi kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 3 menit untuk menghilangkan residu sedimen. Residu ini dapat mengganggu pembacaan absorpsi selama pengukuran spektrofotometri (Givan *pers.comm.*). Kemudian, supernatan yang jernih dari ekstrak alga disimpan untuk analisis klorofil.
- b) Pengukuran spektrofotometrik dari klorofil-a dan c2 pada zooxantellae
  - (1) Absorpsi ekstrak pada aseton 100% diukur pada panjang gelombang 663, 630, dan 750 nm. Nilai absorpsi pada 750 nm diperoleh dari nilai absorpsi lainnya untuk memperoleh nilai **extinction** sebagai koreksi atas adanya turbiditas (Wetzel & Likens 1979). Semua pembacaan absorpsi pada tiap panjang gelombang dikoreksi menggunakan blanko. Blanko dibuat dari aseton 100% (tanpa ekstrak pigmen).
  - (2) Pengasaman dilakukan dengan menambahkan 0,02 ml HCl 0,1 M pada ekstrak di dalam kuvet spektrofotometer. Kuvet kemudian ditutup, isinya dicampur, dan dibiarkan mengendap dalam wadah kuvet selama 3 menit. Menurut praktek teoritis di metode standar APHA (American Public Health Association, 1989), penentuan klorofil-a pada

fitoplankton mungkin akan terhitung lebih karena adanya phaeopigmen yang menyerap di panjang gelombang yang berdekatan dengan klorofil a. Penambahan asam pada ekstrak, menyebabkan hilangnya atom magnesium pada klorofil-a ; klorofil a kemudian berubah menjadi phaeophytin-a.

- (3) Pengukuran ulang dari nilai absorpsi pada 750, 663, dan 630 nm dan nilai *extinction*nya dilakukan.
- (4) Kuvet dibilas ulang dengan aseton, dan dikeringkan untuk sampel berikutnya.
- (5) Semua pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer Shimadzu UV-240, yang dihubungkan dengan printer gambar yang dapat diprogram.

c) Perhitungan

Perhitungan dilakukan menggunakan formula dari Jeffrey dan Humphrey (1975), berdasarkan koefisien extinction dan panjang gelombang absorpsi dari klorofil a dan c2 pada dinoflagellata dalam aseton 100%. Teknik untuk menentukan nilai *extinction* dari klorofil dengan spektrofotometri diadaptasi dari teknik yang digunakan Wetzel & Likens (1979), dan pada metode standar untuk analisis klorofil oleh APHA (1989). Formula yang digunakan adalah sbb :

$$\text{Chl-a} = [\{11,43(E_{663b} - E_{663a})\} - \{0,64 (E_{630b} - E_{630a})\} \times (V/P*Z)].$$

$$\text{Chl-c2} = [\{27,09(E_{663b} - E_{663a})\} - \{3,63 (E_{630b} - E_{630a})\} \times (V/P*Z)].$$

Dimana :

$E_{663b}$  =  $A_{663b}$  -  $A_{750b}$ , nilai extinction atau absorpsi terkoreksi pada 663 nm sebelum pengasaman, A adalah pembacaan absorpsi dari spektrofotometri UV

$E_{663a}$  =  $A_{663a}$  -  $A_{750a}$ , nilai extinction atau absorpsi terkoreksi pada 663 nm setelah pengasaman

$E_{630b}$  =  $A_{630b}$  -  $A_{750b}$ , nilai extinction atau absorpsi terkoreksi pada 630 nm sebelum pengasaman

$E_{630a}$  =  $A_{630a}$  -  $A_{750a}$ , nilai extinction atau absorpsi terkoreksi pada 630 nm setelah pengasaman

V = volume ekstrak (4 ml)

P = kandungan protein (dalam mg) dari sampel, diukur menggunakan metode Bradford (1976)

Z = lebar kuvet atau sel (1 cm), isi 2 ml

#### IV.2.3. Kuantifikasi protein menggunakan metode Bradford (1976)

a) Reagen Bradford

- (1) 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (produk BDH) dilarutkan dalam 50 ml etanol 95%
- (2) 50 ml asam fosfat 85% (b/v) ditambahkan pada larutan di tahap 1
- (3) Larutan tersebut diencerkan dengan air suling hingga 500 ml

b) Essay protein

- (1) Larutan stok BSA (Bovine Serum Albumin, murni 99%, produk Sigma) diencerkan hingga konsentrasi 5 mg/ml
- (2) Larutan stok diencerkan untuk memperoleh beberapa konsentrasi protein : 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,065 mg/ml
- (3) Beberapa kuvet (isi 3 ml) disiapkan untuk essay protein
- (4) Volume yang telah diketahui (dalam mikroliter) dari larutan BSA [300, 240, 120, dan 60  $\mu$ l dari 1 mg/ml BSA dari tahap 2 dan 60  $\mu$ l dari konsentrasi BSA lainnya ditempatkan pada kuvet secara berurutan, kemudian reagen Bradford (BR) ditambahkan hingga 3 ml,

- sehingga dihasilkan konsentrasi akhir 100, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25  $\mu\text{g}$  protein dan 0  $\mu\text{g}$  protein sebagai blanko (hanya BR).
- (5) Kuvet ditutup dan larutan di dalamnya dicampur ; larutan dibiarkan selama 30 menit
  - (6) Pengukuran absorbansi spektrofotometer dilakukan pada 595 nm
  - (7) Untuk menghasilkan kurva standar, nilai absorbansi diplotkan terhadap konsentrasi protein standar
  - (8) Protein diekstrak dari sampel *Anemonia* melalui homogenisasi tentakel dalam 0,15 M NaCl yang digunakan sebagai penyangga. Ekstrak protein kemudian dianalisis dalam BR dan absorbansinya diukur.
  - (9) Untuk menentukan kandungan protein dalam sampel, nilai absorbansi sampel dikalibrasi dari kurva standar.
  - (10) Kandungan protein dari semua sampel digunakan untuk menormalisasi konsentrasi klorofil dari zooxantellae *in vivo*.

### IV.3. HASIL

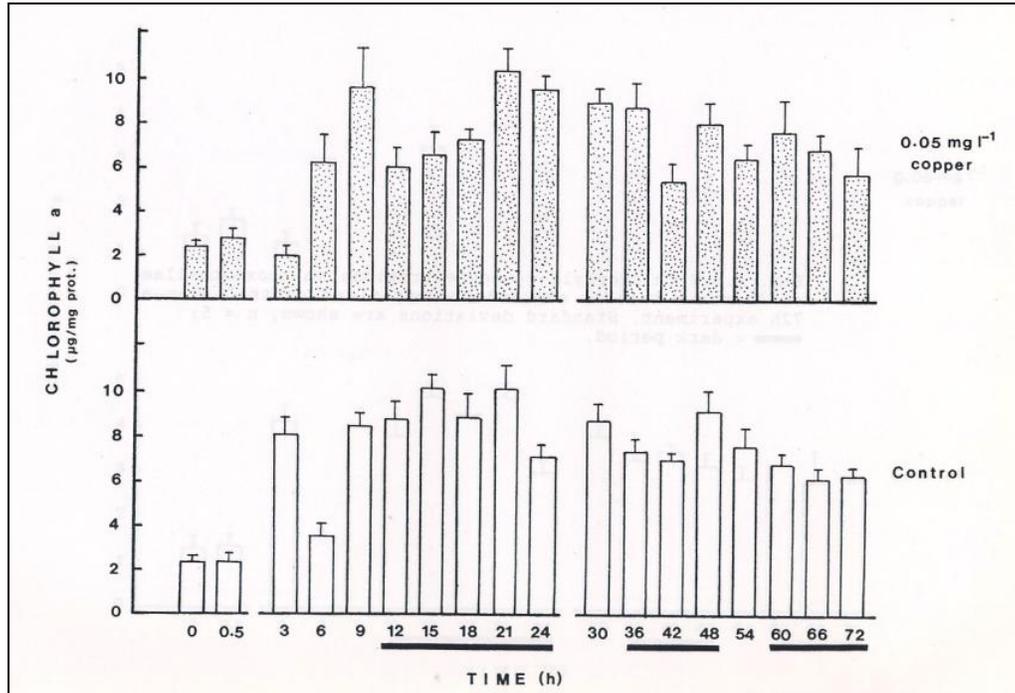
Nilai rata-rata dan standar deviasi dari konsentrasi klorofil a dan c2 yang diperoleh dari zooxantellae pada *Anemonia viridis* dengan perlakuan 0,05 mg/l tembaga, serta kondisi kontrol selama 72 jam percobaan ditampilkan dalam bentuk histogram pada Gambar 4.3.1 (untuk chl-a) dan Gambar 4.3.2 (untuk chl-c2).

Nilai rata-rata dari rasio chl-a : c2 pada zooxantellae dari anemon (hasil dari perlakuan tembaga dan kontrol) juga ditampilkan pada Gambar 4.3.3. Pengukuran rasio pigmen pada tumbuhan umumnya digunakan oleh ahli botani untuk menghitung fotoadaptasi. Pada karang, Kinzie III dkk (1984) telah mengukur rasio klorofil a : c pada zooxantellae dari karang *Pocillopora damicornis* ketika diberi perlakuan berbagai spektrum cahaya. Hasilnya menunjukkan bahwa perlakuan cahaya merah memberikan penurunan yang nyata atas rasio chl-a : c pada zooxantellae karang, sementara cahaya biru, putih, dan hijau tidak menghasilkan perbedaan nyata pada nilai rasio chl-a : c.

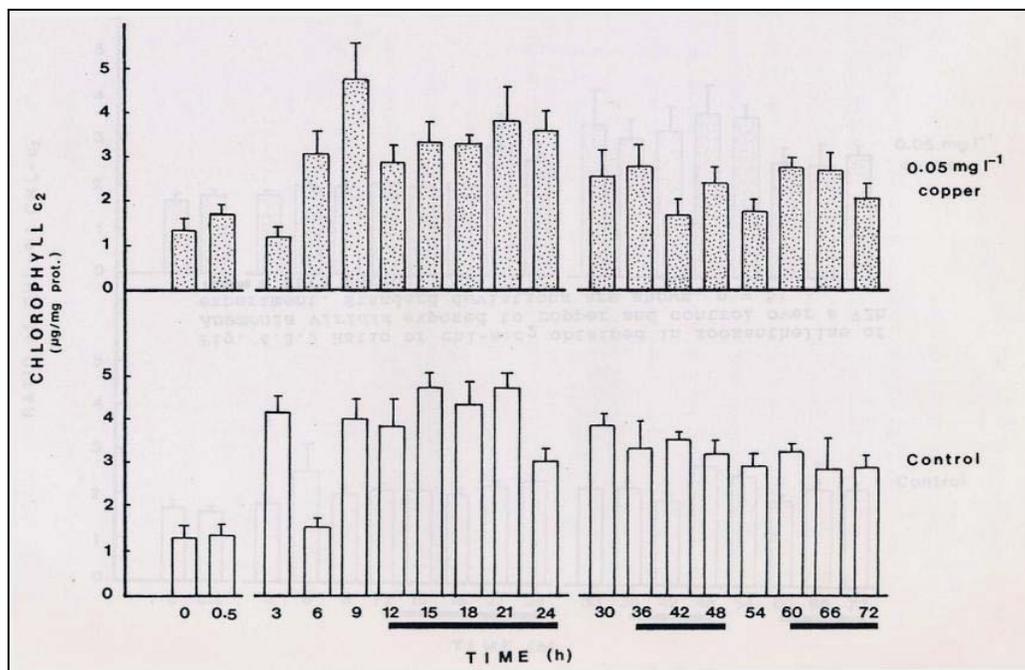
Perbedaan signifikan (ANOVA multifaktorial  $p < 0,05$ ) terlihat jelas pada konsentrasi chl-a zooxantellae dari *Anemonia* sepanjang waktu dan antara tiap perlakuan (tembaga vs kontrol). Perbedaan yang sangat tinggi (ANOVA  $p < 0,001$ ) terlihat jelas pada konsentrasi chl-c2 dan rasio chl-a : c2 pada zooxantellae dari anemon sepanjang waktu dan antara perlakuan (tembaga vs kontrol).

Untuk mengidentifikasi perbedaan dalam perlakuan, uji multiple range dilakukan. Uji ini menunjukkan bahwa pada anemon yang diberi perlakuan tembaga, nilai konsentrasi chl-a pada zooxantellae secara nyata berkurang jika dibandingkan dengan anemon kontrol (uji Tukey  $p < 0,05$ ) ; konsentrasi chl-c2 juga berkurang tinggi dibandingkan kontrol (uji Tukey  $p < 0,01$ ). Nilai rasio chl-a : c2 zooxantellae pada anemon yang terkena tembaga cukup meningkat jika dibandingkan dengan kontrol (uji Tukey  $p < 0,01$ ).

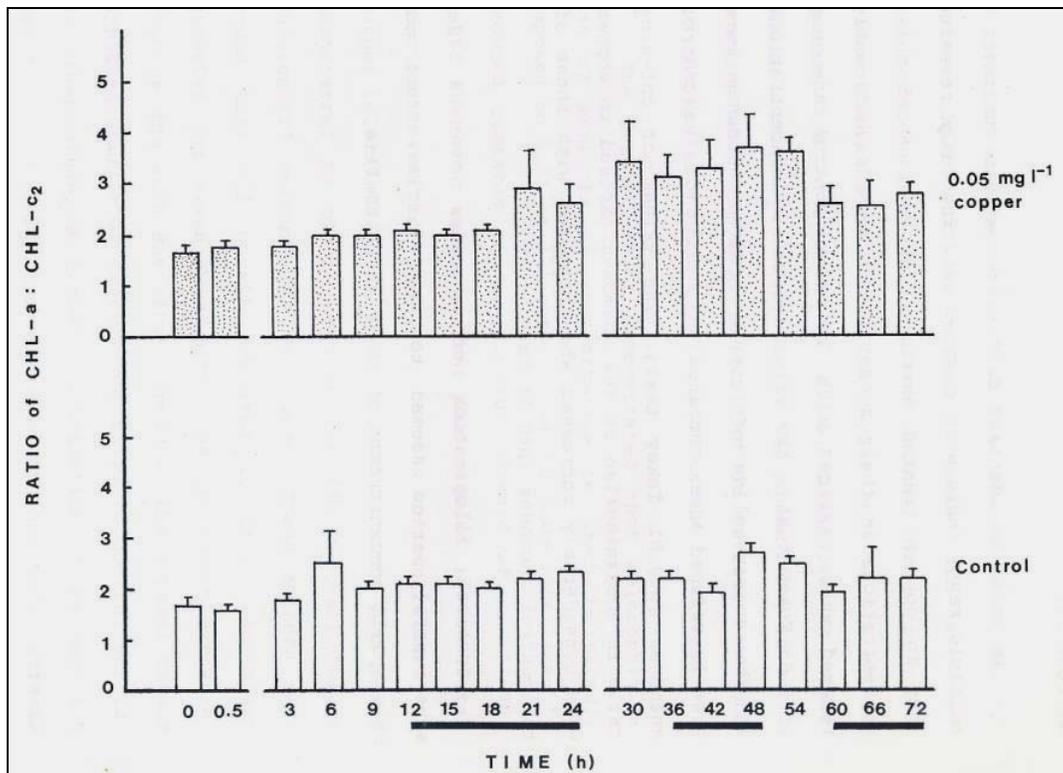
Pencahayaan siklis dari anemon selama 72 jam periode percobaan sepertinya memiliki efek yang sedikit pada konsentrasi klorofil dari zooxantellae.



Gambar 4.3.1. Konsentrasi Klorofil a dari zooxantellae pada *Anemonia viridis* yang terkena tembaga dan kontrol sepanjang 72 jam percobaan. Standar deviasi ditunjukkan, n = 5 ; --- = periode gelap.



Gambar 4.3.2. Konsentrasi Klorofil c<sub>2</sub> dari zooxantellae pada *Anemonia viridis* yang terkena tembaga dan kontrol sepanjang 72 jam percobaan. Standar deviasi ditunjukkan, n = 5 ; --- = periode gelap.



Gambar 4.3.3. Rasio Klorofil a : c2 dari zooxantellae pada *Anemonia viridis* yang terkena tembaga dan kontrol sepanjang 72 jam percobaan. Standar deviasi ditunjukkan, n = 5 ; --- = periode gelap.

#### IV.4. DISKUSI

Senyawa tembaga telah lama digunakan sebagai algisida untuk merusak pertumbuhan alga pada kolam renang, dan telah digunakan pula untuk cat pencegah kekotoran pada lambung kapal (Evans 1988 ; Boney 1989). Tembaga berperan sebagai pelindung terhadap pelekatan alga, kerang, dan organisme laut lain yang biasa melekat di lambung kapal. Kemungkinan lepasnya logam tersebut ke perairan saat kapal berlabuh dalam waktu lama akan memiliki efek yang berbahaya bagi organisme laut.

Penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan klorofil a dan c2 pada zooxantellae di dalam *Anemonia viridis* yang terkena 0,05 mg/l tembaga selama periode 72 jam berkurang secara nyata dibandingkan dengan kontrol. Howard dkk. (1986) menemukan bahwa kandungan chl-a berkurang pada karang *Montipora verrucosa* yang terkena tembaga konsentrasi rendah (0,01 – 0,05 mg/l) selama 1 jam, dengan karang kemudian dipindahkan ke air laut bersih untuk periode pemulihan 24 jam sebelum diukur klorofilnya. Peneliti-peneliti ini juga menemukan bahwa semua karang nampak memutih (bleaching) pada air laut bersih tersebut dalam periode tujuh hari setelah terkena tembaga selama 1 jam. Kemudian, pada hari ke-40 setelah perlakuan, karang mulai tampak serupa dalam hal warna (tidak pucat) dibandingkan dengan karang kontrol. Pada alga lain, konsentrasi tembaga antara 1,0 µg/l – 0,75 mg/l telah memberikan efek racun yang bermacam-macam (Rai dkk., 1981). Efek tersebut meliputi penghambatan pertumbuhan, respirasi, dan fotosintesis. Steeman – Nelson dan Wium – Anderson (1970) melaporkan bahwa 1 – 2 µg/l tembaga dapat mengurangi pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa* dan *Nitzschia palea*.

Pada penelitian ini, parameter chl-c2 yang diukur di zooxantellae dalam *Anemonia viridis* tampak lebih sensitif terhadap tembaga dibandingkan chl-a. Respons chl-c2 tersebut tidak banyak diketahui,

karena sedikit publikasi yang menjelaskan tentang pigmen lain selain chl-a pada coelenterata simbiotik. Pada penelitian terbaru yang dilakukan Lesser dkk (1990), konsentrasi chl-c2 secara nyata berkurang pada zooxantellae di dalam zoanthid *Palythoa caribaeorum* ketika diberi perlakuan kenaikan suhu (26 – 31°C) selama 10 hari ; respon Chl-a pada zooxantellae juga berkurang sejalan dengan kenaikan suhu. Pada studi tersebut, Lesser dkk juga mengukur rasio chl-a : c2 untuk menganalisis respons fotoadaptif dari zoanthid simbiotik. Mereka menemukan bahwa nilai rasio tersebut menurun ketika suhu dan irradiasi meningkat, tetapi sebaliknya ketika irradiasi menurun, rasio meningkat. Mereka mengusulkan bahwa perubahan dalam jumlah chl-a dan chl-c2 pada zooxantellae dalam zoanthid mungkin menunjukkan perubahan dalam fotoadaptasi.

Pada studi yang sama, Lesser dkk (1990) juga melaporkan bahwa kenaikan suhu dan irradiasi menyebabkan kenaikan aktivitas enzim pada zooxantellae di dalam zoanthid *Palythoa caribaeorum*. Enzim tersebut meliputi superoksida dismutase, katalase, dan askorbat peroksidase. Menurut peneliti-peneliti tersebut, enzim ini berperan dalam mendetoksifikasi oksigen aktif, yang dihasilkan saat fotosintesis zooxantellae. Mereka juga mengusulkan bahwa radikal superoksida tersebut berpotensi sebagai racun bagi inang dan zooxantellae, bahkan dapat menyebabkan pemutihan, ketika zoanthid simbiotik ini terkena kenaikan suhu dan irradiasi.

Pada penelitian ini, rasio chl-a : c2 pada zooxantellae dari *Anemonia* yang diberi perlakuan tembaga selama 72 jam meningkat secara nyata dibandingkan dengan kontrol. Hal ini disebabkan terjadinya pengurangan yang lebih besar dari chl-c2 dibandingkan chl-a pada zooxantellae. Sebagai akibatnya, reaksi fotosintesis pada zooxantellae akan terganggu. Hellawell (1986) menunjukkan bahwa beberapa jenis kontaminan industri (logam berat dan senyawa kimia halogen lain) mengurangi atau bahkan menghambat reaksi fotosintesis pada banyak alga perairan ; logam berat (seperti tembaga, Cadmium, raksa, timbal, dan logam bivalen lain) dapat menyebabkan kerusakan struktural pada kloroplas ; halogen (seperti klorin, bromin klorida) juga mengakibatkan pengurangan pigmen fotosintesis.

O'Kelley (1974) menjelaskan bahwa sel *Chlorella* yang kehilangan magnesium menjadi **chlorotic**, membesar, dan memiliki vakuola yang besar. Retovsky dan Klasterka (1961) menyatakan bahwa kekurangan magnesium pada alga dapat menyebabkan gangguan metabolisme. Mekanisme peracunan logam berat pada alga kemungkinan adalah dengan digantikannya posisi atom magnesium dalam struktur kimia klorofil, dalam hal ini dengan tembaga. Sebagai akibatnya, kandungan klorofil dalam kloroplas menjadi terpengaruh ; fungsinya terganggu dan pada akhirnya reaksi fotosintesis menjadi terhambat.

Pengurangan konsentrasi nutrisi juga tampaknya berperan dalam penurunan pigmen fotosintesis pada fitoplankton. Berkurangnya ketersediaan nitrogen anorganik mengurangi kandungan klorofil pada alga laut (Falkowski 1980, Dawes dkk.1984, Graneli dan Sunback 1985). Cook dkk (1988) juga menunjukkan bahwa kandungan klorofil (chl-a) dari zooxantellae pada anemon laut *Aiptasia pallida* menurun saat inang kelaparan, kemungkinan karena berkurangnya konsentrasi nutrisi anorganik di dalam sel.

Banyak peneliti telah melaporkan bahwa kandungan chl-a pada zooxantellae meningkat dengan berkurangnya pencahayaan (Falkowski dan Dubinsky 1981, Chang dkk 1983, Porter dkk 1984). Meskipun demikian, pada penelitian ini, tidak terdapat indikasi dari efek pencahayaan siklis terhadap konsentrasi chl-a dari zooxantellae di dalam *Anemonia viridis*.

Faktor lingkungan lain mungkin berpengaruh terhadap kandungan chl-a dari zooxantellae. Hoegh-Guldberg dan Smith (1989a,b) melaporkan baru-baru ini bahwa ekspose singkat cahaya matahari penuh pada karang *Stylophora pistillata* dan *Seriatopora hystrix* mengakibatkan pemutihan pada

karang, yang ditunjukkan dengan rendahnya kandungan chl-a pada alga simbiotiknya. Kenaikan suhu terhadap karang ini juga menyebabkan pengurangan kandungan chl-a pada zooxantellae. Meskipun begitu, pengurangan kadar garam secara singkat (di bawah 30 ‰) pada kedua spesies karang tersebut tidak memberikan efek nyata terhadap kandungan chl-a dari zooxantellae.

Fenomena pemutihan pada karang dapat terjadi sebagai akibat dari hilangnya zooxantellae dan/atau pengurangan pigmen fotosintesisnya (lihat Brown 1990 ; Jokiel & Coles 1990). Meski pengukuran konsentrasi total dari klorofil a pada coelenterata simbiotik di bawah stress telah memberikan indikasi yang baik atas respon pemutihan, merupakan hal yang menarik jika pengukuran chl-c2 juga dilakukan mengingat respon chl-c2 ini tampak sebagai assay sensitif atas keadaan zooxantellae dalam *Anemonia* yang terkena tembaga. Rasio chl-a : c2 juga dapat memberikan indeks sensitif untuk menilai stress pada coelenterata yang memiliki alga simbiotik.

## Bab V

### Penanda Tekanan Molekuler pada Anemon *Anemonia viridis*

#### V.1 Pendahuluan

Berbagai rangkaian sel hidup, mulai prokariot sampai eukariot, merespon kejutan panas (*heat shock*) atau tekanan lingkungan lainnya dengan menunjukkan tekanan sitologis yang menginduksi atau meningkatkan sintesis beberapa set protein terbatas (lihat Atkinson dan Walden 1985; Schlesinger 1986). Beberapa jenis protein yang telah dipelajari dengan baik pada system biologi adalah protein kejutan panas (*heat shock protein/hsp<sub>s</sub>*) yang dihasilkan sebagai respon terhadap suhu yang ekstrim. Terdapat beberapa kategori hsp<sub>s</sub> berdasarkan berat molekulnya; kelompok hsp90 dan hsp70 secara umum diproduksi oleh *Escherichia coli*, *Drosophila melanogaster*, dan sel-sel manusia jika terdedah tekanan panas (lihat Pelham 1986; Lindquist dan Craig 1988). Produksi protein hsp<sub>s</sub> banyak terinduksi oleh tekanan lain, maka sering disebut dengan protein tekanan/*stress protein* (lihat Morimoto *et al.* 1990; Young 1990). Young mendefinisikan protein tekanan sebagai “protein-protein yang tingkatannya bertambah saat ada stimuli tekanan”.

Stress protein utama adalah termasuk protein tekanan panas yang berat molekulernya (MW/*molecular weight*) berkisar antara 22 sampai 110 kDa (kilodalton)(Schlesinger *et al.* 1982, Atkinson dan Walden 1985, Welch 1985, Lanks 1986). Protein yang mendekati MW 85-90 kDa (masuk dalam kelompok hsp90), MW 68-72 (hsp70) dan hsp60 merupakan predominan pada hampir semua organisme, sementara kelompok dengan berat molekul rendah (hsp 20-30) juga umum dijumpai. *Ubiquitin*, suatu protein dengan MW 8 kDa, juga termasuk pada protein tekanan panas (lihat McLennan dan Miller 1990; Morimoto *et al.* 1990; Young 1990). Para peneliti mengatakan bahwa kelompok hsp90 dan hsp70 berhubungan dekat pada spesies yang berbeda, sementara protein lainnya tidak.

Induksi protein tekanan adalah fenomena yang banyak ditemukan di alam. Fungsi dari protein ini masih merupakan spekulasi (Pelham 1986), tetapi diasumsikan bahwa protein ini melindungi sel dari tekanan-tekanan, tetapi mekanismenya masih belum diketahui. Beberapa peneliti menyatakan bahwa protein tekanan mempunyai peranan penting dalam fungsi homeostasis (Caltabiano *et al.* 1988). Fungsi lainnya adalah mungkin sebagai protein pengikat untuk melindungi protein lainnya (Schlesinger *et al.* 1982; Munro dan Pelham 1986; Miller 1989), contohnya formasi protein pengikat kolagen (Nandan *et al.* 1990). Selain itu protein tekanan juga mungkin berfungsi sebagai respon imun atau pada kehadiran antigen (Young 1990).

Pada semua sel eukariot *ubiquitin* hadir sebagai system yang universal, non-lisosomal, tergantung ATP untuk mendegradasikan polipeptida (Stryer 1988). Berat molekulernya secara tepat mungkin menunjukkan variasi yang tipis antar organisme (Schlesinger 1986). Caltabiano *et al.* (1988) menemukan bahwa sel yang terdedah logam berat ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , dan  $Cd^{2+}$ ) atau agen yang reaktif terhadap sulphydryl (disulfiran, auranofin, arsenite dan iodoacetamide) menghasilkan protein tekanan yang memiliki berat molekul yang serupa (28-34 kDa) dengan protein yang terlibat dalam proses detoksifikasi. Sel tersebut juga memiliki proses penyesuaian diri yang menjaga sistem selnya saat mengalami tekanan. Proses tersebut dikenal sebagai proses homeostasis.

Schuh *et al.* (1985) menjelaskan bagaimana protein tekanan panas, contohnya hsp90, dapat mengatur aksi hormon steroid dalam sel. hsp90 membungkus lokasi pengikatan DNA pada reseptor hormon, sampai ada hormon yang terposisi pada lokasi pengikat hormonnya. Jika ini terjadi, hsp90 dilepaskan, sehingga memungkinkan hormone/kompleks reseptor untuk berikatan dengan DNA. hsp90 juga memiliki peranan dalam kontrol sintesis protein kompleks. Contohnya, hsp90 muncul

sebagai modulator dalam fosforilasi protein yang melibatkan kinase, suatu kelompok enzim fosforilolitik; proses ini muncul saat metabolisme glikogen, kontraksi otot, dan proses-proses biokimia lainnya (Stryer 1988).

Miller (1989) berkomentar bahwa “hsp90 dan hsp70 berhubungan dengan elemen-elemen dari jaringan intraseluler pada filament yang dikenal sebagai sitoskeleton”. Hale dan Margham (1988) menjelaskan sitoskeleton sebagai jaringan mikrotubul dan mikrofilamen pada sitoplasma sel yang memberikan bentuk sel yang khas. Jaringan ini memungkinkan organel-organel untuk bergerak di dalam sitoplasma dan untuk memproduksi aliran sitoplasma atau siklosis. Siklosis adalah gerakan sitoplasma dari satu daerah ke daerah lainnya; pergerakannya dikontrol oleh mikrofilamen yang terdiri atas protein yang serupa dengan aktin. Maka, keseimbangan dinamis pada sitoskeleton dapat berubah karena adanya tekanan panas. Stabilisasinya adalah faktor yang penting dan merupakan hasil toleransi terhadap suhu (*thermotolerance*) (Miller 1989).

Produksi protein stress sebagai respons adanya tekanan pada lingkungan, untuk keperluan pemantauan lingkungan, merupakan fenomena baru yang saat ini dipelajari. Menurut Anderson (1989) dan McLennan dan Miller (1990) protein tekanan dapat terinisiasi oleh berbagai agen kimia (jumlahnya  $\approx 30$ ) seperti arsenat, arsenit, ion-ion logam berat dan agen-agen oksidasi (Schlesinger 1985, Welch 1985, Caltabiano *et al.* 1986, Lanks 1986, Taketani *et al.* 1989, 1990), yang kehadirannya bertambah banyak pada perairan yang terpolusi.

Kemampuan induksi dan mudahnya deteksi protein-protein ini menyebabkan para peneliti mempertimbangkan kegunaan protein tekanan sebagai indikator yang sensitive terhadap polusi lingkungan. Sebagai tambahan, setidaknya ada satu perusahaan bioteknologi yang telah menawarkan pemasaran peralatan polusi berdasar deteksi protein yang spesifik atau precursor mRNAnya (Anderson 1989).

Anderson menyebutkan bahwa peralatan diagnosa tersebut menggunakan antibodi untuk mendeteksi berbagai tingkat protein stress, yaitu menggunakan teknik immunosorbent seperti ELISA (*enzym-linked immunosorbent assay*). Metode tersebut menggunakan deteksi kompleks antigen-antibodi dengan mengikat suatu enzim pada suatu antibodi sekunder dan mendeteksi enzim dengan substrat yang sesuai (Bradley dan Ward 1989, Plant *et al.* 1989). Cara lainnya adalah dengan menggunakan probe gen yang dapat mendeteksi protein tekanan secara tidak langsung, dengan cara menargetkan tingkatan mRNA yang telah diketahui sebagai mediator kimia antara gen dan protein.

Berdasarkan informasi yang telah diketahui, penelitian ini bertujuan untuk meneliti kemungkinan penggunaan protein tekanan sebagai indikator polusi pada coelenterata laut. Secara khusus, penelitian ini meneliti respons anemon temperata, *Anemonia viridis*, terhadap tembaga dan suhu yang meningkat. Penelitian ini merupakan studi awal yang jika berhasil dapat diperluas dengan penggunaan coelenterata yang terkena polusi di lapangan, baik perairan temperata maupun tropis.

## V.2 Bahan dan Metode

### V.2.1 Pencuplikan dan Pemeliharaan Anemon

*Anemonia viridis* (Forsk.) dikumpulkan dari Pantai Kames, Kepulauan Cumbrae, Skotlandia. Anemon tersebut dikumpulkan dan disimpan dalam tangki yang berisi air laut artifisial yang teraerasi (salinitas 35‰) pada dua regim suhu, yaitu  $15 \pm 1^\circ\text{C}$  dan  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . Suhu dalam tangki dijaga dengan menggunakan waterbath yang dikontrol secara termostatik. Anemon diberi makan *Mytilus* segar ( $\approx 1$  gram/anemon) satu kali seminggu. Pengaturan waktu penerangan harian dilakukan dengan menggunakan pengontrol waktu yang saling berhubungan sehingga menghasilkan siklus 12 jam

terang dan 12 jam gelap. Lampu fluoresens terang (Durolite truelite) 20 watt digunakan untuk menerangi anemon.

Anemon dipelihara pada suhu tertentu selama lima minggu sebelum digunakan untuk penelitian. Anemon lain dipelihara dalam suhu  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  selama lima bulan. Semua anemon dipindahkan selama 2 jam ke Rumah Sakit Universitas St James, Leeds, dalam termos untuk eksperimen panas kejut. Di Leeds, anemon dipelihara pada suhu yang sesuai selama 10 hari sebelum perlakuan panas kejut.

### **V.2.2 Eksperimen dengan Anemon**

Sejumlah limabelas hewan digunakan dalam eksperimen panas kejut dan pemaparan tembaga. Semua anemon berukuran 30-35 mm pada discus basalnya.

#### **a) Paparan panas kejut**

Tiga eksperimen panas kejut dilakukan dalam penelitian ini. Pertama, anemon yang dipelihara dalam suhu  $15^\circ\text{C}$  sebelum eksperimen diberi perlakuan 2 jam panas kejut pada  $28^\circ\text{C}$  kemudian dipulihkan kembali selama 4 jam pada suhu  $15^\circ\text{C}$ . Satu anemon digunakan untuk analisis protein setelah 4 jam pemulihan kembali bersamaan dengan anemon kontrol yang tetap pada  $15^\circ\text{C}$  selama eksperimen.

Pada eksperimen kedua, anemon yang telah dipelihara pada suhu  $20^\circ\text{C}$  selama lima bulan diberi perlakuan 2 jam panas kejut pada suhu  $32^\circ\text{C}$  dan kemudian dipulihkan kembali selama 4 jam pada suhu  $20^\circ\text{C}$ . Tiga anemon digunakan untuk analisis protein, seperti disebutkan di atas, dengan 3 anemon kontrol yang tetap pada suhu  $20^\circ\text{C}$  selama eksperimen.

Pada eksperimen ketiga, lima anemon yang dipelihara dalam suhu  $15^\circ\text{C}$  untuk lima minggu diberi perlakuan panas kejut  $28^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Setelah itu, satu anemon digunakan untuk analisis protein segera setelah eksperimen panas kejut, diikuti satu anemon yang telah dipulihkan kembali pada suhu  $15^\circ\text{C}$  selama 1 jam, 2 jam, dan 4 jam, serta satu anemon kontrol yang tetap berada pada suhu  $15^\circ\text{C}$  selama eksperimen.

#### **b) Pendedahan tembaga (dalam bentuk $\text{CuCl}_2$ )**

Anemon yang telah dipelihara pada suhu  $15^\circ\text{C}$  didedahkan terhadap tembaga dalam bentuk  $\text{CuCl}_2$  dalam air laut. Satu anemone didedahkan pada  $0.1 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  selama 6 jam kemudian diberi waktu untuk pulih kembali selama 4 jam; kemudian digunakan untuk analisis protein. Satu anemone yang dibiarkan dalam air laut selama eksperimen sebagai control juga digunakan untuk analisis protein.

#### **c) Pelabelan radioaktif**

Empat anemone diberi label sebelum perlakuan kejut panas dengan menggunakan ( $^{35}\text{S}$ )-metionin (ICN Biomedical Inc). Masing-masing anemone disuntik dengan isotop sebesar  $200 \mu\text{Ci}$ . Isotop disuntikkan langsung ke rongga tubuh yang kemudian disimpan dalam air laut bersuhu  $15^\circ\text{C}$  selama 3 jam agar terbiasa dengan isotopnya.

### **V.2.3 Persiapan Sampel**

Satu anemone utuh dipotong kecil menggunakan gunting yang bersih dan tajam. Pemotongan dilakukan di dalam wadah polythene steril yang kemudian ditutup. Di dalam wadah tersebut terdapat 4 ml buffer sampel terhomogenisasi per gram berat basah anemone segar. Sampel dihomogenisasi pada suhu  $4^\circ\text{C}$  (dibekukan dengan es) selama 15 menit. Pekerjaan ini dilakukan dalam lemari asam. Homogenat yang mengandung label radioaktif disimpan dalam suhu  $-70^\circ\text{C}$ , sementara homogenat non-radioaktif disimpan dalam suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

Pada metode Miller berikut (1988), digunakan larutan buffer terhomogenasi dari beberapa komposisi kimia (0.5M KCl, 100mM Tris-HCl pH7.5, 5mM 2-mercaptoethanol, 10mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA)). Beberapa inhibitor protease ditambahkan secara langsung untuk mendapatkan konsentrasi akhir larutan buffer, yaitu 2.5mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> inhibitor tripsin kacang kedelai, 2 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> pepstatin-A, 2  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> antipain, dan 1  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> leupeptin. Sampel beku yang telah dicairkan disentrifugasi pada kecepatan rendah, yaitu 5000 rpm selama 45 menit pada suhu 4°C. Supernatannya kemudian disentrifugasi pada kecepatan tinggi 13000 rpm selama satu jam pada suhu 4°C. Kemudian supernatant didialisis dengan 1 liter 62.5mM buffer Tris-HCl pH6.8, selama 18 jam pada ruangan bersuhu 10°C.

Suatu assay protein kemudian dilakukan dengan menggunakan metode Bradford (1976). Teknik ini sudah dijelaskan pada Bab IV. Sisa sampel dikonsentrasikan sepuluh kali lipat dari rata-rata dengan menggunakan mini-concentrator (Amicon's product, USA). Sampel dibagi ke dalam beberapa tabung eppendorf yang mengandung buffer sampel dan disimpan dalam suhu -20°C. Sampel buffer terbuat dari 62.5mM Tris-HCl pH6.8, 10% (w/v) 2-mercaptoethanol dan 0.1% (w/v) bromophenol biru.

#### V.2.4 Assay Elektrofosis

SDS-PAGE (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) satu dimensi disiapkan untuk BIO-RAD mini gel menggunakan metode Laemmli (1970). Pada tahap pertama, beberapa larutan stok disediakan untuk menggerakkan gel. Larutan stoknya terdiri atas (a) 30% total konsentrasi monomer polyacrylamide yang terdiri atas 29.2 g acrylamide dan 0.8 g N'N'-bis-methylene acrylamide dalam 100 ml air destilasi deionisasi (ddH<sub>2</sub>O). Larutan ini difilter dan disimpan pada suhu 4°C pada botol berwarna gelap (jangka waktu penyimpanan pada kondisi ini adalah 30 hari); (b) 1.5M Tris-HCl pH8.8, biasanya disebut dengan gel buffer pemisah dan disimpan pada suhu 4°C; (c) 0.5M Tris-HCl pH6.8, biasanya disebut dengan gel buffer stok dan disimpan pada suhu 4°C; (d) 10% (w/v) SDS; (e) buffer penggerak terdiri dari 25mM Tris-base, 192mM glycine dan 1% (w/v) SDS; (f) larutan pengikat (*fixative*) dalam bentuk pewarna Comassie Brilliant Blue (CBB) yang terdiri atas 0.1% (w/v) CBB-R250, 10% (v/v) asam asetat glacial dan 30% (v/v) methanol; (g) zat pembilas, yang terdiri atas campuran larutan pengikat (*fixative*) tanpa CBB-R250.

Pada tahap kedua aliquot dari supernatant ditambahkan buffer sampel, sesuai dengan metode Laemmli (1970) dan direbus selama 5 menit. Electrophoresis dilakukan pada lempengan gel 15% polyacrylamide dengan mengikuti protokol BIO-RAD. Ringkasan konsentrasi bahan-bahan yang digunakan pada preparasi gel dapat dilihat pada Tabel 5.2.1. Sampel yang diambil atas dasar yang sama menambah jumlah protein atau hitungan CPM (hitungan per menit/*count per minute*) menggunakan penghitung cairan scintillator 1217 RACKBETA-LKB. Jumlah optimum protein berkisar antara 50 sampai 80  $\mu$ g; hal tersebut menyebabkan resolusi gel yang baik (Miller, pers. comm.). Gel bergerak dalam buffer penggerak selama sekitar 90 menit pada 20mA, 800 V menggunakan tenaga BIO-RAD, model 500/1000. Penanda pelangi protein (Amersham, code RPM. 756) yang digunakan adalah phosphorilase-b (MW 97.4 kDa), serum albumin bovine (MW 69 kDa), ovalbumin (MW 46 kDa), anhidrase karbonik (MW 30 kDa), inhibitor tripsin (MW 21.5 kDa), dan lisosom (MW 14.3 kDa). Protein diwarnai dengan larutan pengikat CBB-R250. Setelah dibilas dengan larutan yang sama tanpa pewarna, gel dipenuhi dengan reagen fluorografik yang bersifat memperbesar atau 20% (w/v) PPO dalam asam asetat glacial, dikeringkan dalam pengering gel (BIO-RAD model 543), dan dipaparkan pada Kodak XAR-5 dalam suhu -70°C selama periode yang beragam antara 7 hari dan 2 minggu.

### V.2.5 Immunoblotting

Protein dari gel satu dimensional dipindahkan secara elektroforesis selama satu malam ke membran nitroselulosa pada 150mA, 30V dalam buffer penggerak (25mM Tris, 192 mM glisin pH8.3, 20% methanol, dan 1% SDS). Noda kemudian diblok selama 6 jam dalam 5% marvel dalam TBS (20mM Tris-HCl pH7.5, 0.5 M NaCl), kemudian diinkubasi semalaman dengan antibodi monoklonal anti manusia hsp90 atau hsp70 dari tikus dalam TBS yang ditambahkan 1% (w/v) susu bubuk marvel (buffer antibodi). Setelah diinkubasi, noda dicuci dengan buffer yang sama, tetapi tanpa marvel, dengan tambahan Tween-20 (0.05% v/v). Lapisan kedua label blotting IgG<sub>1</sub> anti tikus dari domba diaplikasikan selama 2 jam dalam buffer antibodi kemudian dicuci seperti sebelumnya. Akhirnya noda diinkubasikan dalam fosfatase anti alkalin dan noda dikembangkan dalam nitro-blue tetrazolium (NBT) ditambah BCIP (5 bromo-4 chloro-3 indolyphosphate).

Tabel 5.2.1 Ringkasan konsentrasi bahan-bahan yang digunakan dalam preparasi SDS-PAGE

	Separating gel	Stacking gel
Monomer concentration	15%	4%
- ddH <sub>2</sub> O	2.35 ml	3.00 ml
- 1.5M Tris-HCl pH8.8	2.50 ml	-
- 0.5M Tris-HCl pH6.8	-	1.25 ml
- 10% (w/v) SDS	100 µl	50 µl
- Acrylamide/bis	5.00 ml	0.70 ml
- 10% amonium persulfate	50 µl	15 µl
- TEMED	5 µl	7.5 µl
Volume ~:	± 10 ml	± 5 ml
~ This volume is enough for 2 slabs of Bio-Rad mini gel with a spacer thickness 0.50-0.75 mm.		

### V.3 Hasil

Analisis sintesis protein pada *Anemonia viridis* menggunakan pelabelan dengan gel SDS-PAGE <sup>35</sup>S-metionin tidak berhasil dilakukan karena isotopnya tidak menempel dengan baik dengan protein. Kesulitan yang dihadapi dalam kasus ini kemungkinan disebabkan oleh kemampuan anemon untuk melepaskan isotop dari rongga tubuh melalui mulut. Pemeriksaan radioaktif yang disuntikkan pada anemon menunjukkan tingkatan yang jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan radioaktif yang terdapat dalam air laut setelah inkubasi selama 6 jam.

Tetapi, pemeriksaan gel dengan pewarna CBB (coomassie brilliant blue) (Gambar 5.3.1) menggunakan densitometer ultrascanning laser menunjukkan adanya perubahan komposisi protein pada semua anemone eksperimen. Berat molekuler relatif protein baru atau protein tekanan yang terbentuk ditandai menggunakan marker/penanda protein pada gel berwarna yang sama. Hasil-hasil penandaan ini akan digunakan dalam penghitungan yang akan dilakukan selanjutnya.

Protein yang telah diekstraksi dari anemon yang dipindahkan ke gel diasumsikan berasal hanya dari inang (bukan dari alga atau zooxanthella simbiotiknya). Alga dipindahkan dari homogenat dengan

sentrifugasi diferensial. Hasil akhirnya, supernatan, yang berasal dari preparasi sampel untuk SDS-PAGE diperiksa menggunakan mikroskop cahaya, dan tidak ada kehadiran alga.

Anemon yang terdedah pada regim-regim panas kejut atau perlakuan tembaga yang berbeda menunjukkan setidaknya terdapat enam protein yang baru terinduksi, yaitu pada 30 kDa, 31 kDa, 35 kDa, 39 kDa, 69 kDa, dan 127 kDa. Jenis-jenis protein tersebut belum diketahui dengan jelas. Penggunaan Ab<sub>s</sub> anti-manusia monoklonal western immunoblotting terhadap sampel gel tidak berhasil. Tetapi, Ab<sub>s</sub> yang sama dapat mengenali hsp90 dan hsp70 pada sel manusia (Miller, pers. comm.). Ekspresi protein yang diinduksi karena panas kejut dan pemaparan tembaga secara umum ditunjukkan pada Tabel 5.3.1. Hasil analisis protein terekstraksi pada *Anemonia* secara rinci ditunjukkan dalam bentuk hasil ultrascan gel SDS-PAGE pada Gambar 5.3.2-10.

Tabel 5.3.1 Ekspresi protein yang diinduksi karena panas kejut dan pemaparan tembaga secara umum pada *Anemonia*

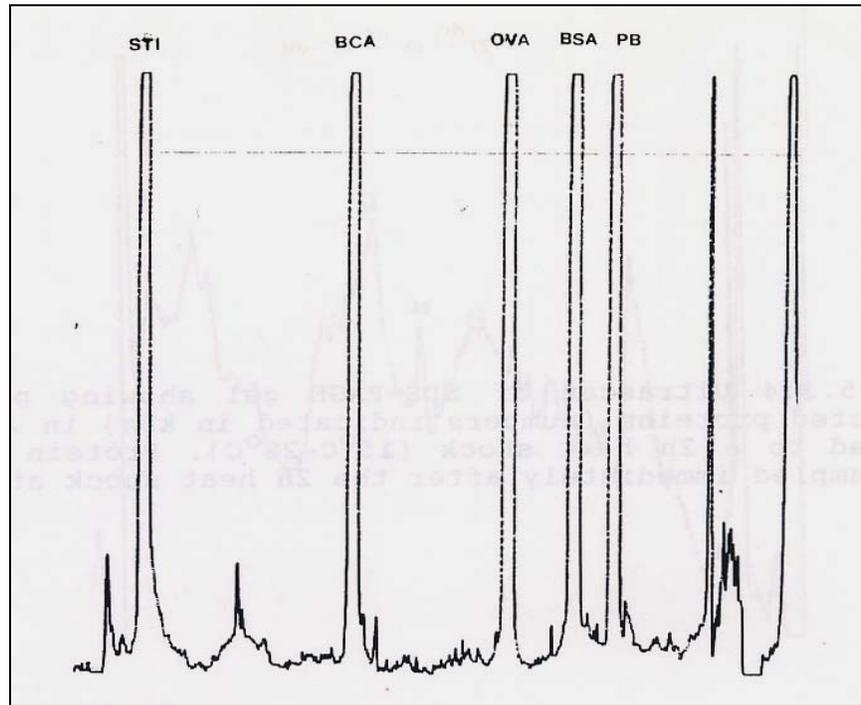
	Induced/enhanced proteins (kDa)					
	30	31	35	39	69	127
<b>Heat-shock exposure:</b>						
C- 15°C	---	---	---	---	---	---
HS-28°C, 2h	---	---	---	---	---	---
R- 15°C, 1h	---	---	---	---	---	---
R- 15°C, 2h	---	---	---	---	---	---
R- 15°C, 4h	---	---	---	---	---	---
C- 20°C	---	---	---	---	---	---
HS-32°C, 2h	---	---	---	---	---	---
& R- 20°C, 4h	---	---	---	---	---	---
<b>Copper exposure:</b>						
Cu <sup>2+</sup> , 6h at 15°C	---	---	---	---	---	---
R- 15°C, 4h	---	---	---	---	---	---

**Gambar 5.3.1 Gel SDS-PAGE yang menjelaskan sampel-sampel *Anemonia***

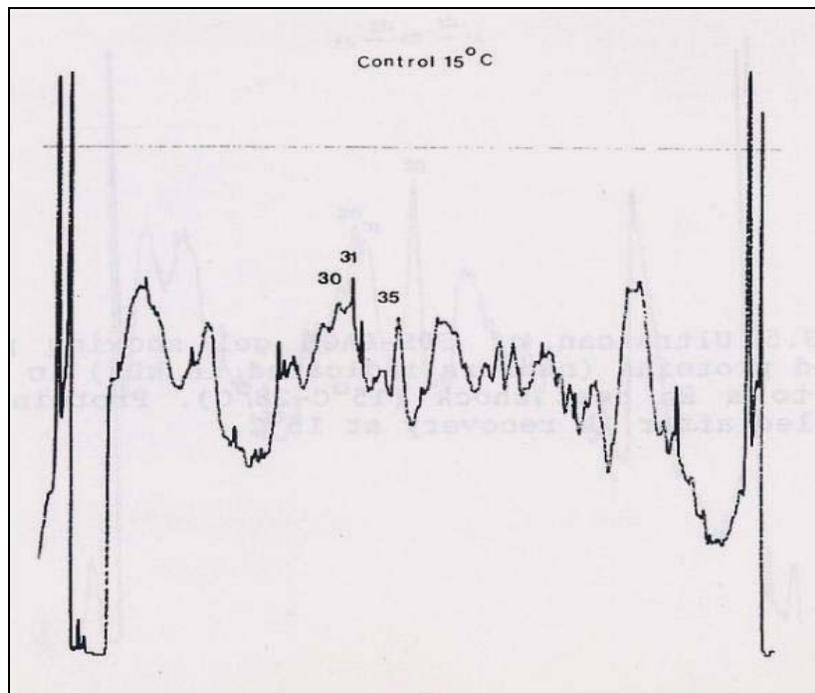
A. Diberi perlakuan suhu 15-28°C panas kejut selama 2 jam (garis 2-6) atau suhu 20-32°C panas kejut selama 2 jam (garis 8). Garis 1, protein standar; garis 2, 15°C kontrol; garis 7, 20°C kontrol. Catatan: kehadiran dan/atau penambahan gradual protein pada 127 kDa, 69 kDa, 39 kDa, 35 kDa, 31 kDa, dan 30 kDa pada sampel yang didapat dari anemon yang terhomogenasi pada 0 jam (garis 3), 1 jam (garis 4), 2 jam (garis 5), 4 jam (garis 6) pada pemulihan kembali di suhu 15°C.

B. Diberi perlakuan 6 jam pemaparan terhadap tembaga klorida (0.1 mg/l). Garis 1, protein standar; garis 2,6, 15°C kontrol (tanpa paparan tembaga); garis 7, terpapar tembaga dengan waktu pemulihan kembali 4 jam pada suhu 15°C. Terdapat posisi protein baru pada 69 kDa, 39 kDa, dan 35 kDa. Sampel dari shock (garis 3) atau panas kejut selama 2 jam pada 20-32°C (garis 5) dijadikan perbandingan. Anak panah yang menunjuk ke atas pada garis 5 dan 7 menandai protein 35 kDa yang terbentuk setelah anemon mendapat perlakuan panas kejut (sebelumnya 5 bulan dalam suhu 20°C) atau terdedah tembaga. Beberapa protein hilang dari anemon yang diberi perlakuan panas kejut dan pemaparan tembaga; dua yang paling menyolok pada anemone kontrol adalah pada 90 kDa dan 43

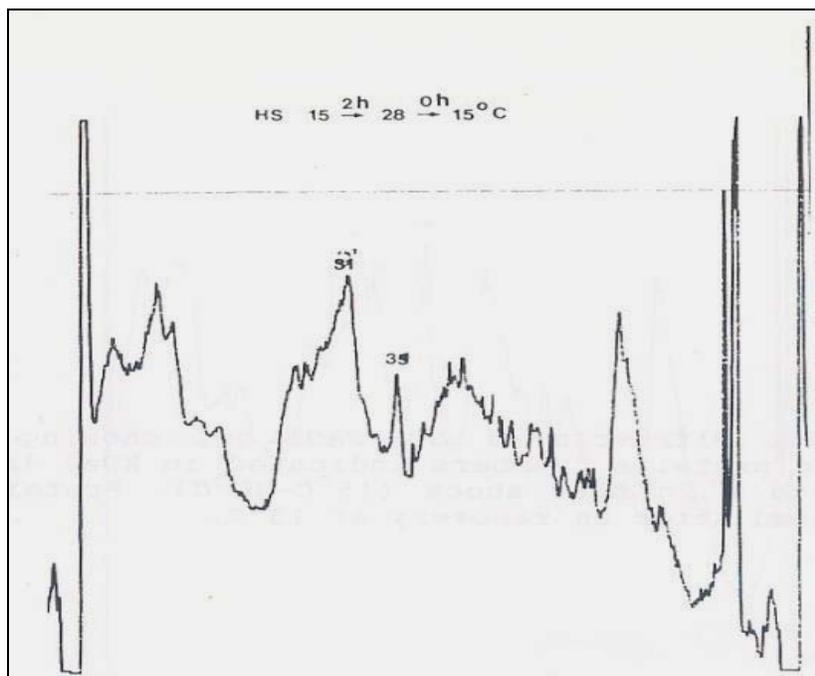
kDa (ditunjukkan dengan adanya segitiga terbuka pada garis 2). Identitas protein-protein tersebut belum jelas.



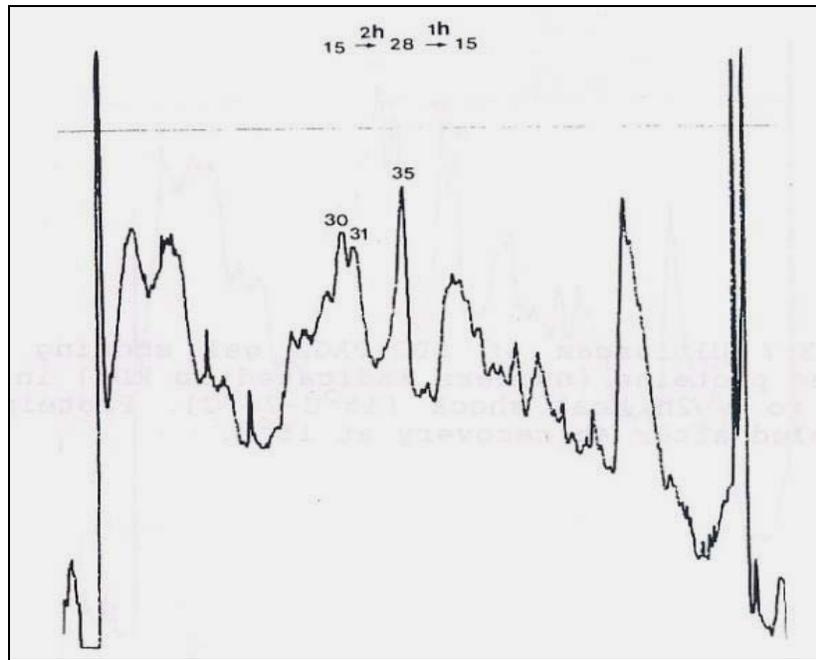
Gambar 5.3.2 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein standar yaitu STI = soybean trypsin inhibitor/inhibitor tripsin kedelai (21,500 kDa), BCA = bovine carbonic anhydrase/anhidrase karbonik bovin (31,000 kDa), OVA = ovalbumin (45,000 kDa), BSA = bovine serum albumin (66,200 kDa) dan PB = phosphorylase-b (97,400 kDa).



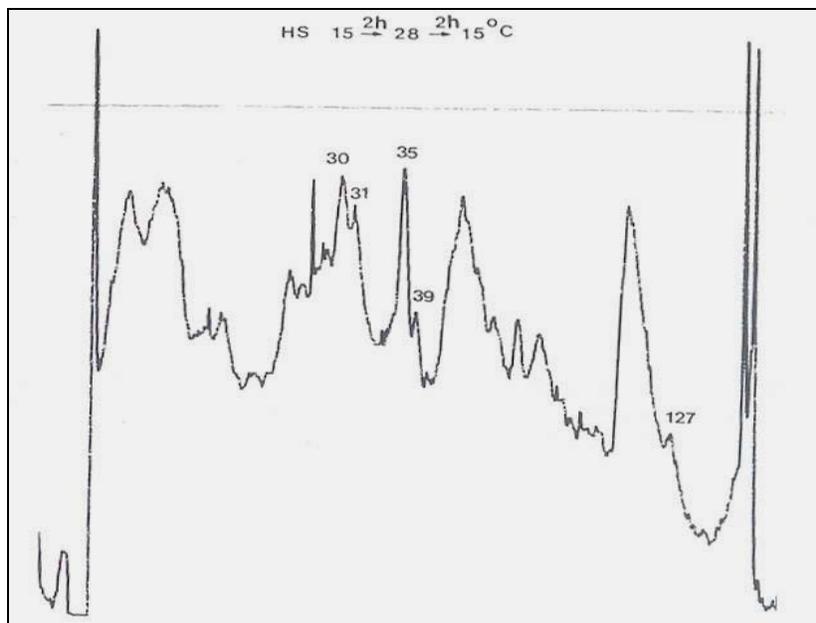
Gambar 5.3.3 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang dipelihara dalam suhu 15°C (sebagai kontrol).



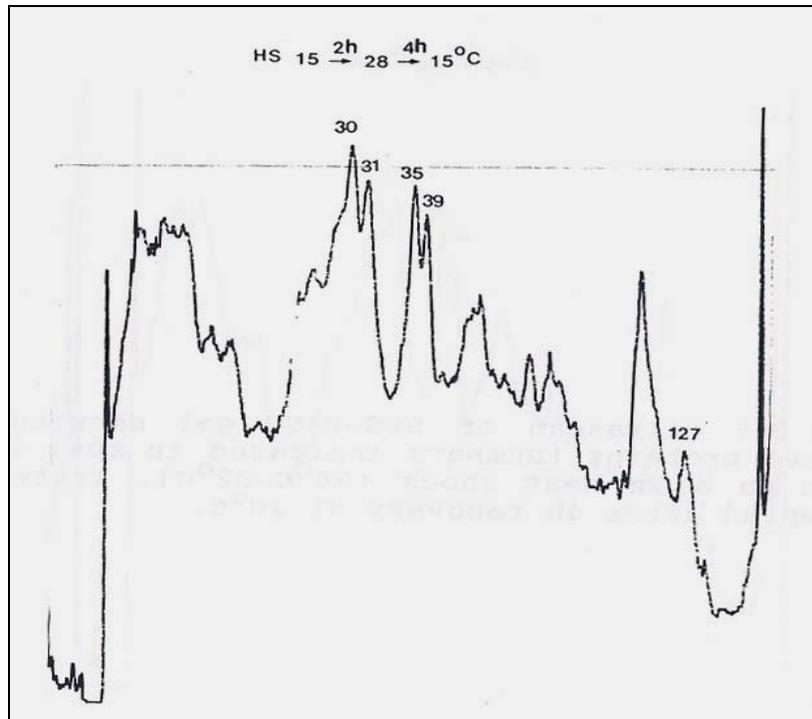
Gambar 5.3.4 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar panas kejut selama 2 jam (15°C-28°C). Ekstrak protein diambil segera setelah panas kejut selama 2 jam pada suhu 28°C.



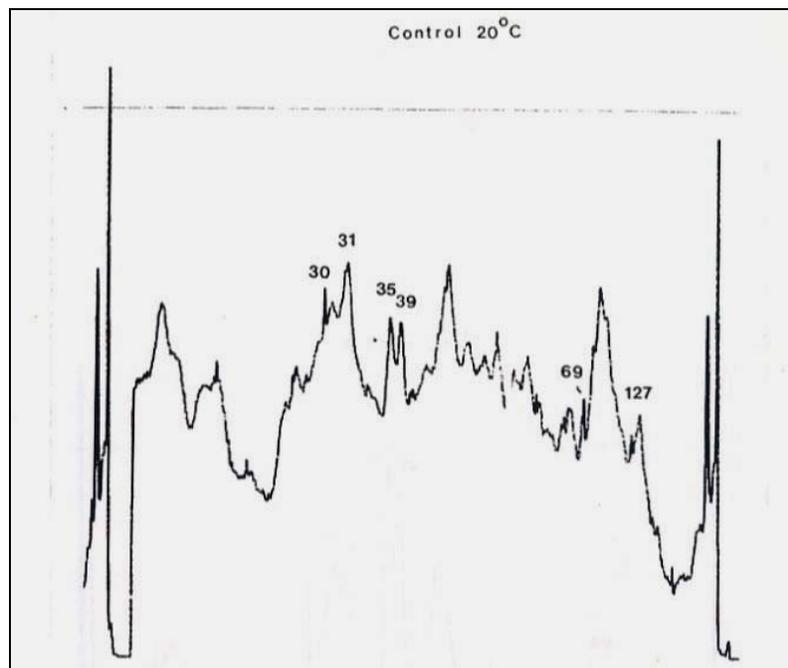
Gambar 5.3.5 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar panas kejut selama 2 jam (15°C-28°C). Ekstrak protein diambil setelah pemulihan selama 1 jam pada suhu 15°C.



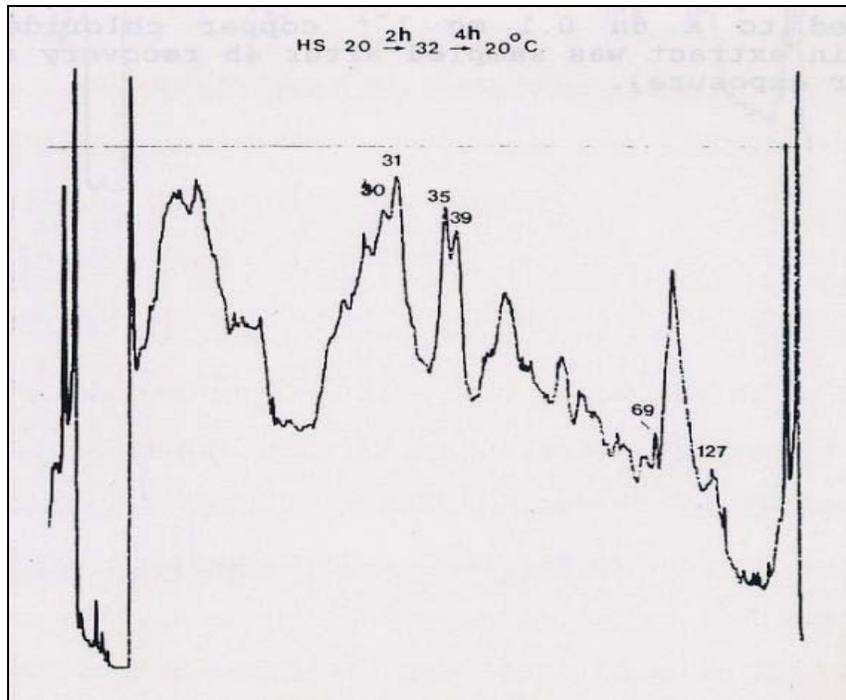
Gambar 5.3.6 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar panas kejut selama 2 jam (15°C-28°C). Ekstrak protein diambil setelah pemulihan selama 2 jam pada suhu 15°C.



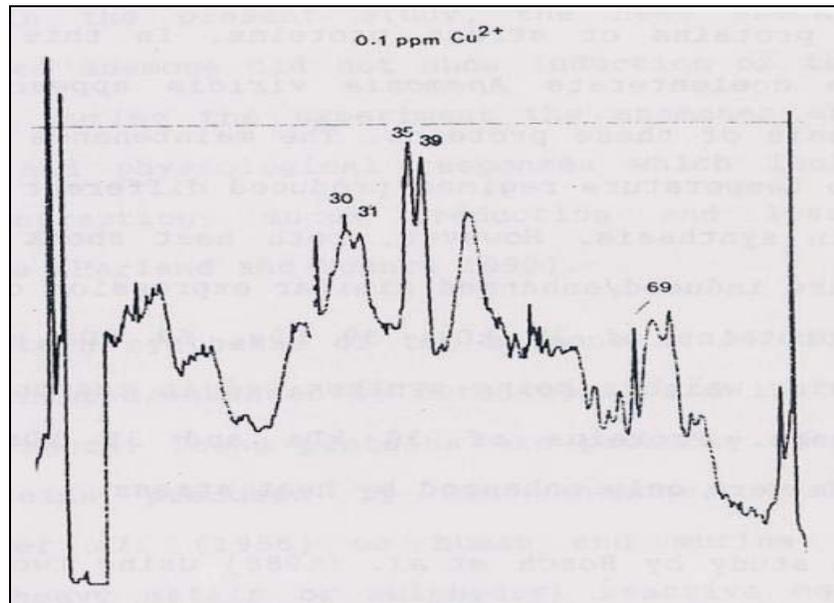
Gambar 5.3.7 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar panas kejut selama 2 jam (15°C-28°C). Ekstrak protein diambil setelah pemulihan selama 4 jam pada suhu 15°C.



Gambar 5.3.8 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang dipelihara dalam suhu 20°C selama lima bulan.



Gambar 5.3.9 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar panas kejut selama 2 jam ( $20^{\circ}\text{C}$ - $32^{\circ}\text{C}$ ). Ekstrak protein diambil setelah pemulihan selama 4 jam pada suhu  $20^{\circ}\text{C}$ .



Gambar 5.3.10 Hasil ultrascan gel SDS-PAGE menunjukkan puncak-puncak protein terekstraksi (jumlah ditunjukkan dengan kDa) pada *Anemonia* yang terpapar  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$  tembaga klorida selama 6 jam pada suhu  $15^{\circ}\text{C}$ . Ekstrak protein diambil setelah pemulihan selama 4 jam pada suhu  $15^{\circ}\text{C}$  (tanpa pemaparan tembaga).

#### V.4 Diskusi

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, organisma yang beragam seperti bakteri, tumbuhan, invertebrata dan vertebrata merespon tekanan yang terjadi di lingkungan dengan mensintesis sejumlah kecil protein panas kejut atau protein tekanan yang disimpan dalam jumlah tinggi. Pada penelitian ini, coelenterata laut *Anemonia viridis* menunjukkan reaksi sintesis protein-protein tersebut. Pemeliharaan anemon dalam dua regim suhu menghasilkan pola sintesis protein yang berbeda. Tetapi, baik panas kejut maupun pendedahan tembaga telah menginduksi ekspresi protein yang serupa, yaitu protein dengan berat molekul 35 kDa, 39 kDa, 69 kDa, dan 127 kDa yang disintesis karena adanya tekanan. Protein dengan berat molekul 30 kDa dan 31 kDa hanya terbentuk karena adanya tekanan panas.

Studi oleh Bosh *et al.* (1988) yang menggunakan dua spesies coelenterata air tawar *Hydra* menunjukkan bahwa spesies *Hydra oligactis* sensitif terhadap tekanan thermal. Spesies ini tidak menunjukkan adanya thermotoleransi pada inkubasi suhu yang meningkat selama satu jam (18°C-34°C), sementara spesies lainnya *Hydra attenuata* menunjukkan adanya thermotoleransi dan sintesis protein dengan berat molekul 60 kDa. *H. oligactis* tidak mensintesis protein ini pada tingkatan yang dapat dideteksi. Hasil seperti ini bisa terjadi karena radioaktif (protein berlabel <sup>35</sup>S) tidak cukup menyatu dengan *Hydra* karena label radioaktif disuntikkan ke hewan dan diinkubasikan hanya dalam 1 jam, sementara *Hydra* didedahkan terhadap suhu yang makin meningkat. Para peneliti ini (*op cit.*) menyatakan bahwa protein panas kejut pada *Hydra* diperlukan untuk toleransi tekanan meskipun tidak memiliki efek terhadap pertumbuhan atau fisiologis normalnya. Protein tekanan lainnya pada *Hydra* tidak dijelaskan. Pada penelitian ini, peendedahan tembaga dan panas kejut pada anemon tidak menunjukkan induksi protein 60 kDa. Pada saat eksperimen, anemon menunjukkan respon perilaku dan fisiologi seperti kontraksi tentakel, produksi mukus, dan hilangnya zooxanthella (Harland dan Nganro 1990).

Sintesis protein 35 kDa dan 39 kDa pada anemon diinduksi baik oleh kejutan panas yang semakin meningkat dan juga tembaga. Protein-protein ini mungkin merupakan protein tekanan yang spesifik yang diproduksi oleh anemon. Penelitian Caltabiano *et al.* (1986) pada sel manusia dan murin yang terdedah logam berat atau agen reaktif sulphydryl, termasuk sodium arsenit, menunjukkan sintesis protein tekanan 32 kDa dan 34 kDa. Tetapi, pada kedua mamalia itu kedua protein tersebut tidak diinduksi oleh panas.

Penelitian lain oleh Caltabiano *et al.* (1988) melaporkan bahwa antibodi yang disiapkan untuk melawan protein 32/34 kDa dari sel melanoma A375 manusia diserap (immunoprecipitated) oleh antigen dengan berat molekul yang serupa yang diisolasi dari kultur sel manusia, tikus dan murin yang terdedah sodium arsenit (20-50 µg l<sup>-1</sup>) selama 6-8 jam. Berat molekul yang tepat dari antigen yang diinduksi oleh arsenit ini adalah spesifik spesies: 32 kDa untuk sel manusia dan tikus; dan 34 kDa untuk sel murin.

Peneliti-peneliti lain menemukan bahwa pemaparan sel leukemia manusia HL60 terhadap cadmium klorida (1.8 µg l<sup>-1</sup>) atau sodium arsenit (50 µg l<sup>-1</sup>) selama 8 jam menyebabkan peningkatan enzim heme oksigenase. Analisis SDS-PAGE pada protein berlabel <sup>35</sup>S metionin menunjukkan bahwa pada sel yang diberi perlakuan tersebut terdapat induksi protein 32 kDa. Sel yang sama diberi perlakuan cobaltic klorida (50 µg l<sup>-1</sup>) selama 8 jam dan panas kejut 37°C-43°C selama 2 jam juga menunjukkan adanya induksi protein 32 kDa. Para peneliti tersebut menyimpulkan bahwa protein tekanan 32 kDa diinduksi oleh ion-ion arsenit dan cadmium pada sel-sel manusia ini adalah heme oksigenase.

Enzim tersebut juga ditemukan meningkat pada sel makrofag tikus yang terpapar diethylmaleate (100 µg l<sup>-1</sup>) selama 11 jam dan sodium arsenite (2.5 µg l<sup>-1</sup>) selama 11 jam (Taketani *et al.* 1990). Mereka

juga melaporkan bahwa protein 34 kDa adalah protein yang paling aktif disintesis pada sel-sel tikus yang terpapar agen-agen sulphhydryl cadmium klorida ( $1.84 \mu\text{g l}^{-1}$ ) selama 7 jam. Protein tekanan ini bereaksi silang dengan antibodi. Kirchherr *et al.* (1990) menemukan bahwa pendedahan sel ovarium hamster cina terhadap  $10.4 \mu\text{g l}^{-1}$   $\text{CdSo}_4$  selama 3 jam menginduksi protein 32 kDa. Sel embrio ayam yang terdedah tembaga menginduksi protein 35 kDa (Hightower *et al.* 1985). Semua protein-protein tersebut teridentifikasi dengan spesifik.

Protein-protein 30-35 kDa sepertinya diinduksi oleh panas kejut, logam berat, dan agen-agen sulphhydryl lain pada berbagai tipe sel, maka protein-protein tersebut diduga memiliki peranan dalam detoksifikasi (Caltabiano *et al.* 1986, 1988). Beberapa enzim detoksifikasi dengan berat molekul dan distribusi sitoplasmik yang serupa telah teridentifikasi; termasuk methyltransferase (28 kDa), acetyltransferase (33 kDa), sulphurtransferase (33 kDa) (Jakoby 1980). Produksi heme oksigenase pada sel tikus yang terpapar logam berat (Taketani *et al.* 1990) juga diduga memiliki peran detoksifikasi; dengan fungsi yang serupa dengan metallothionene.

Pada penelitian ini, protein 39 kDa yang diinduksi pada *Anemonia* yang terdedah  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  selama 6 jam, belum teridentifikasi. Untuk mengidentifikasi protein tersebut dibutuhkan penelitian lebih lanjut. Respon fisiologi pada anemon yang terdedah  $0.1 \text{ mg l}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  selama 12 jam tidak terjadi dalam hal jumlah zooxanthella yang terlepas bila dibandingkan anemon kontrol (lihat Bab II). Namun anemon yang terdedah panas kejut ( $15^\circ\text{C}$ - $28^\circ\text{C}$ ) selama 2 jam menunjukkan induksi protein yang berat molekulnya serupa dengan protein 39 kDa tapi tidak disebutkan seperti yang teramati pada pendedahan tembaga. Anemon dengan perlakuan panas kejut menunjukkan pelepasan zooxanthella yang signifikan (Sharp 1990 tidak dipublikasikan), tidak seperti anemon yang terdedah tembaga.

Protein tekanan lain yang dihasilkan oleh anemon yang terdedah baik suhu yang meningkat dan tembaga adalah protein 69 kDa. Protein ini diduga berhubungan dengan kelompok protein tekanan yang khas yang diproduksi oleh berbagai macam sel yaitu hsp70. Protein dengan ukuran serupa (68-72 kDa) telah bereaksi silang dengan antibodi poliklonal pada ragi, diptera, amfibi, tumbuhan, rodensia, dan manusia (Schlesinger 1985). Pada sel-sel aves, protein 70 kDa terinduksi dengan kuat setelah pendedahan sel terhadap sodium arsenit ( $25 \mu\text{g l}^{-1}$ ) selama 4 jam (Wang *et al.* 1981). Pada sel manusia dan murin yang terkena logam berat  $0.13 \text{ mg l}^{-1}$   $\text{CuCl}_2$ ,  $1.84 \mu\text{g l}^{-1}$   $\text{CdCl}_2$ ,  $13.61 \mu\text{g l}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$ ) selama 8 jam, dihasilkan protein 72 kDa, 100 kDa, dan 90 kDa (Caltabiano *et al.* 1986).

Kelompok hsp 68-70 kDa dilaporkan terdapat pada inti dan fraksi sitoplasmik sel-sel yang terkena panas kejut, contohnya pada *Drosophila* (Tanguay 1985). Tetapi protein-protein ini tidak berhubungan dengan fraksi inti sel, dapat berpindah antar kompartemen sel tergantung pada tipe dan/atau konsentrasi penginduksinya (Atkinson dan Walden 1985).

Lokalisasi kelompok hsp70 pada sel-sel yang tertekan mungkin berhubungan dengan fungsi protein-protein tersebut yang masih belum diketahui. Rothman dan Schmid (1986) menyatakan bahwa hsp70 bisa beraksi sebagai enzim atau katalis pemindah protein tertentu seperti clathrin. *Chlatrin* adalah protein yang berfungsi sebagai penangkap molecular untuk menempelkan dan memerangkap molekul pada permukaan sel. Aktivitas enzim membutuhkan energy dalam bentuk ATP. Hsp70 capat berikatan pada ribosom yang terbentuk sebagian untuk mencegah denaturasi struktur protein (Pelham 1986). Deshaies *et al.* (1988) juga menyatakan bahwa hsp70 dapat berperan dalam proses post translasi sekretori protein ke dalam lumen retikulum endoplasma atau dalam translokasi protein lainnya ke dalam mitokondria.

Pada sel mamalia, kelompok hsp70 telah diklasifikasi ke dalam tiga membran berdasarkan lokasi dan pola ekspresinya (Pelham 1986) yaitu hsp70, hsc70 (untuk panas kejut yang serupa), grp78 (untuk protein yang diatur oleh glukosa). Hsp70 hanya diinduksi oleh panas dan dalam keadaan normal

terdapat pada inti dan sitoplasma. Hsc70 terdapat pada sel yang sedang tumbuh, sedikit diinduksi oleh panas dan kebanyakan ditemukan di sitoplasma yang berhubungan dengan filamen. Grp78 terdapat pada sel-sel sekretori dan terletak di dalam lumen retikulum endoplasma (Lee *et al.* 1984, Munro dan Pelham 1986, Nandan *et al.* 1990). Grp78 pada sel-sel limfoid berhubungan dengan immunoglobulin dan pada sel-sel non-limfoid berhubungan dengan protein-protein abnormal (Kassenbrock *et al.* 1988).

Hsp70 pada hewan laut seperti *Artemia* (Miller dan McLennan 1988), *Gammarus* (Bradley dan Ward 1989) dengan kuat bereaksi silang dengan hsp70 anti-ayam. Miller dan McLennan (1988) menunjukkan bahwa setidaknya terdapat 8 tipe protein hsp70 yang diinduksi oleh panas (68-74 kDa) yang terdapat pada cyst atau larva *Artemia*. Telah diketahui bahwa hsp70 bersamaan dengan hsp90 dan hsp31 yang memiliki berat molekul rendah bertanggungjawab atas pembentukan thermotoleransi pada *Artemia* (Miller 1989, McLennan dan Miller 1990). Sebagai tambahan, hasil yang menarik didapat dari penelitian Bradley dan Ward (1989) dimana hsp70 pada *Gammarus* semakin banyak diproduksi seiring dengan menurunnya suhu (16°C-3°C). Protein hsp70 dan hsp30 akibat tekanan kelaparan pada amfipod ini juga bereaksi silang dengan antiserum hsp70 poliklonal. Protein dengan berat molekul yang rendah tersebut mungkin serupa dengan protein tekanan yang terbentuk pada penelitian ini. Protein tekanan yang diinduksi oleh panas juga umum ditemukan pada bulu babi (Guidice 1985, Heikkila *et al.* 1985).

Pertanyaan yang sekarang timbul adalah mengapa *Anemonia* yang diberi perlakuan panas kejut dan pendedahan tembaga menghasilkan protein tekanan yang serupa (yaitu 35, 39, 69, dan 127 kDa), tetapi hilangnya zooxanthella dari anemon yang terkena panas kejut lebih besar daripada pendedahan tembaga? Pendedahan *Anemonia* terhadap panas kejut menghasilkan lebih banyak protein tekanan (yaitu 30 dan 31 kDa) daripada tembaga. Sudah jelas pada penelitian ini bahwa dengan mengukur protein tekanan pada *Anemonia*, simbiosis alga dalam tekanan dapat diketahui dan diteliti. Tetapi, apakah hubungannya, kalau ada, antara produksi protein tekanan pada inang dengan hilangnya zooxanthella? Tentu saja dibutuhkan lebih banyak penelitian dan eksperimen untuk mengklarifikasi fenomena ini. Identifikasi protein tekanan merupakan subyek yang sangat menarik karena terdapat beberapa protein yang berbeda yang terinduksi pada *Anemonia* akibat tekanan yang berbeda-beda. Protein yang diinduksi oleh *Anemonia* pada penelitian ini memiliki berat molekul yang serupa dengan protein pengikat aktin (Craig dan Pollard 1982) yang mungkin berperan dalam penginduksian kontraksi selular *Anemonia* yang menyebabkan hilangnya zooxanthella. Hanya penelitian biokimia dan selular yang lebih jauh yang dapat menjelaskan mekanisme hilangnya zooxanthella, namun teknik dalam penelitian ini dapat digunakan pada penelitian di masa yang akan datang pada pengembangan bioassay dan mekanisme *bleaching* secara molekuler.

## Bab VI

### Tingkat Logam Berat Lingkungan di Perairan Teluk Jakarta

#### VI.1 Pendahuluan

Republik Indonesia adalah negara dengan jumlah penduduk terbanyak ke-lima di dunia, yaitu lebih dari 180 juta jiwa. Terdapat lebih dari 13,000 pulau di Indonesia yang tersebar di ekuator antara 95°E dan 143°E. Lebih dari 9 juta jiwa hidup di ibukota Jakarta di pulau Jawa. Limbah industry dan rumahtangga kota Jakarta adalah permasalahan yang besar. Saat ini, terdapat lebih dari 4,000 industri yang beroperasi di Jakarta, yang berpotensi mencemari lingkungan (Anon. 1991). Sungai-sungai di Indonesia secara tradisional telah dijadikan tempat pembuangan berbagai macam limbah dan sampah (Soegiarto 1980), dan sebagian besar mencapai laut, terutama di kota-kota pesisir seperti Jakarta.

Di Jakarta, terdapat setidaknya 19 sungai atau kanal yang membelah kota sampai Teluk Jakarta. Kondisi sungai dan kanal tersebut telah terpolusi. Sebagai contoh, penghitungan bakteri pada air yang diambil dari semua sungai oleh PPPPL (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkotaan dan Lingkungan) Jakarta, pada tahun 1985 – 1986 menunjukkan sekitar  $9 \times 10^4 - 46 \times 10^8$  MPN (*Most Probable Number*) bakteri coliform per 100 cc air sampel. Ini berarti tingkatan air sungai-sungai di Jakarta sangat buruk jika dibandingkan dengan batas yang ditetapkan standar EEC pada tahun 1975, yaitu sejumlah 50-5000 MPN total coliform per 100 cc air (Tebbut 1982).

Dari air perairan pantai sekitar kota, didapat bakteri coliform sebanyak  $10^2 - 10^6$  MPN per 100 cc air laut; sebuah studi kasus menyebutkan bahwa sekitar 50% dari 300 bivalvia (*Anadara* dan *Crassostrea*) yang diteliti terkontaminasi oleh *Salmonella* (Anon. 1991). Hal tersebut mungkin menyebabkan pemerintah kota Jakarta secara diam-diam menutup pembudidayaan kerang hijau di Ancol, yang berlawanan dengan upacara pembukaan yang dilakukan besar-besaran (Ongkosongo 1991).

Perairan dangkal Teluk Jakarta terbentang 490 km<sup>2</sup> dengan kedalaman antara 15-30 meter di Laut Jawa. Terdapat sekitar 15 pulau karang pada perairan dangkal tersebut di dalam area teluk (Stoddart 1986), dan lebih dari seratus pulau karang yang berlokasi di luar teluk; semua membentuk gugus kepulauan lepas pantai sampai 80 km ke arah barat daya dari Jakarta (Ongkosongo dan Sukarno 1986). Pulau-pulau tersebut dikenal dengan nama Kepulauan Seribu; pulau-pulau ini memiliki potensi pariwisata yang menarik karena keanekaragaman terumbu karangnya.

Tetapi, konfigurasi beberapa pulau di daerah teluk yang disurvei kembali pada saat seminar mengenai kerusakan terumbu karang yang disebabkan manusia (diadakan oleh UNESCO di Jakarta tahun 1986) telah berubah, beberapa pulau sudah menghilang atau dalam proses menghilang sebagai akibat dari erosi yang disebabkan oleh penggalian di sekitar terumbu karang (Brown 1986).

Karena banyak sungai di Jakarta masih digunakan sebagai tempat pembuangan informal dan formal, limbah padat dan berbagai jenis sampah lainnya terbawa hanyut di sungai dan menumpuk di teluk (Ongkosongo 1991). Willoughby (1986a, b) melaporkan adanya sampah laut dalam jumlah besar di garis pantai Kepulauan Seribu; seperti sampah plastik polythene, sepatu/sandal, kotak polystyrene, botol, kaleng, bola lampu, tali dan jaring. Menurut Willoughby, kebanyakan (tidak semua) sampah-sampah tersebut berasal dari daratan Jawa dan atau paling banyak berasal dari Jakarta.

Polusi lingkungan lainnya pada perairan Pesisir laut Jakarta adalah logam berat, minyak, pestisida, *red tides* dan limbah thermal (untuk peninjauan lihat Ongkosongo 1991). Polusi logam seperti Hg dalam air laut dan kenaikan konsentrasi Cd, Pb, Cu, Cr, Zn pada jaringan beberapa biota laut telah

dilaporkan oleh Hutagalung (1987, 1989), dan Hutagalung dan Syamsu (1987). Beberapa konsentrasi logam pada biota laut melebihi standar yang ditetapkan WHO.

Polusi minyak ditemukan di sekitar pelabuhan minyak di Tanjung Priok dan di sekitar lepas pantai daerah PLTU Muara Karang (Ongkosongo 1991); polusi pestisida terjadi akibat adanya pestisida dari air larian yang berasal dari tanah pertanian, sementara pertumbuhan alga menyebabkan perairan di sekitar Teluk Jakarta berwarna kekuningan.

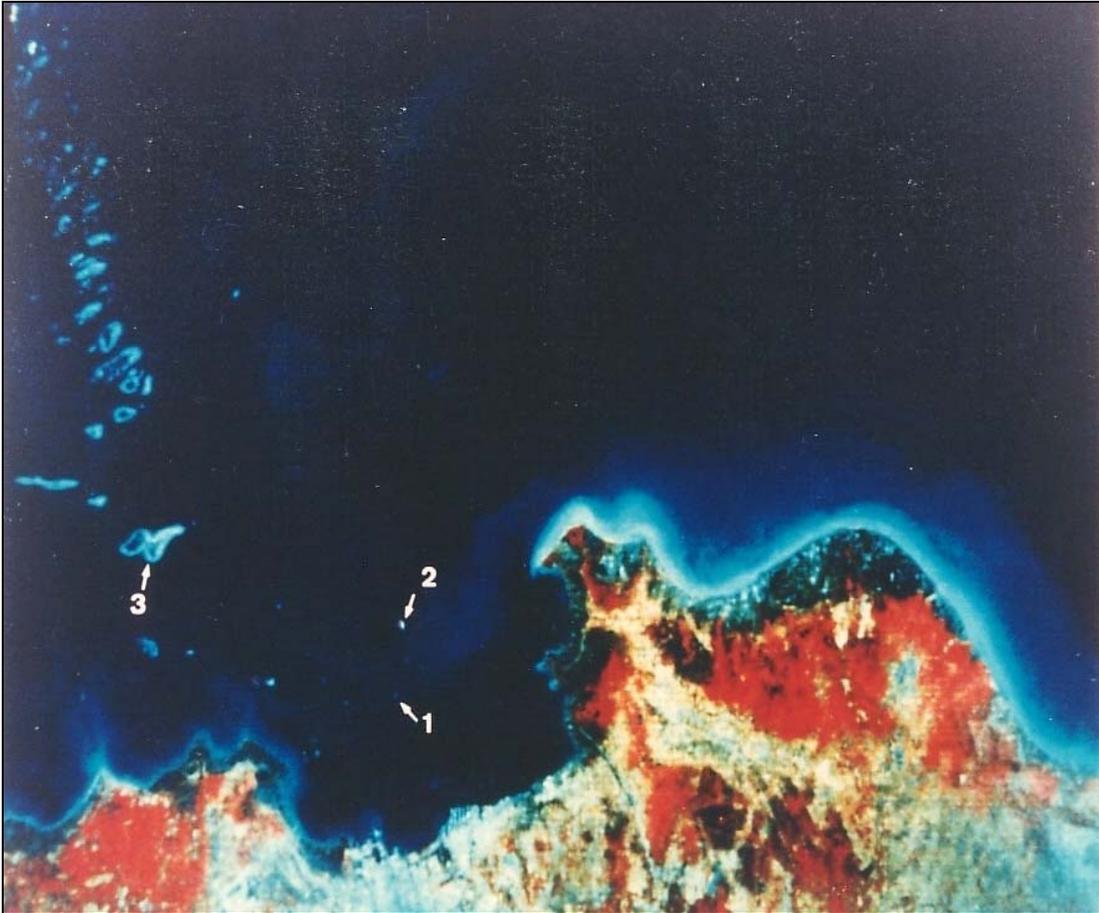
Polusi thermal dihasilkan oleh dua PLTU yang beroperasi di Pantai Jakarta, yaitu Muara Karang dan Priok. Buangan air panas dari kedua PLTU menyebabkan kenaikan suhu air laut sekitarnya menjadi 39°C, sementara ambang batasnya adalah 29°C. Akibatnya komposisi biota laut di sekitar lokasi kedua PLTU tersebut berubah, yang paling signifikan adalah menurunnya anekaragam jenis-jenis ikan (Ongkosongo 1991).

Seperti polusi-polusi yang disebut di atas, sedimentasi juga menjadi permasalahan di perairan Teluk Jakarta. Menurut Ongkosongo (1991), banyak garis pantai di barat daya pulau Jawa telah terdegradasi atau tererosi karena aktivitas manusia. Faktor utama yang menyebabkannya adalah eksploitasi pasir dan batuan untuk keperluan konstruksi, penebangan mangrove untuk perluasan budidaya air payau, perubahan aliran sungai dan perubahan bentuk tepian pantai karena reklamasi pantai, dan eksploitasi terumbu karang.

Dengan menggunakan citra satelit dan *ground-thruting* perairan keruh dengan keeping Secchi, Scoffin (1986) menemukan perbedaan zona perairan yang terbebani sedimen, yang terbentang dari Pulau Bidadari di Teluk Jakarta sampai batas utara gugus Pulau Seribu yaitu Pulau Jukung. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa perairan di sekitar Pulau Bidadari lebih keruh (nilai keeping Secchi 2.5m di sekitar karang) dibandingkan dengan perairan dekat Pulau Pari yang terletak lebih ke utara (nilai keeping Secchi mencapai 28m). Pada citra satelit hal tersebut ditunjukkan dengan daerah perairan terjernih di sekitar Pulau Pari (Gambar 6.1.1).

Penelitian ini terbatas hanya pada penelitian awal yang berhubungan dengan perkembangan teknik bioassay yang dapat diaplikasikan terhadap coelenterata laut tropis. Penelitian ini bertujuan untuk menguji hipotesis bahwa terdapat gradient lingkungan yang signifikan, yaitu konsentrasi logam, antara bagian dalam Teluk Jakarta dalam dan luar.

Penelitian-penelitian sebelumnya di daerah tropis yang terkena polusi logam berat telah menggunakan berbagai macam indikator biologi untuk merefleksikan derajat polusi logam (Brown dan Holley 1982, Brown dan Kumar 1990). Indikator-indikator tersebut termasuk alga (yang mengindikasikan konsentrasi logam “dapat larut” dalam air laut) (Bryan dan Hummerstone 1973) dan moluska bivalvia (Phillips 1980) yang mengindikasikan akumulasi ‘partikulat’ logam di sedimen.

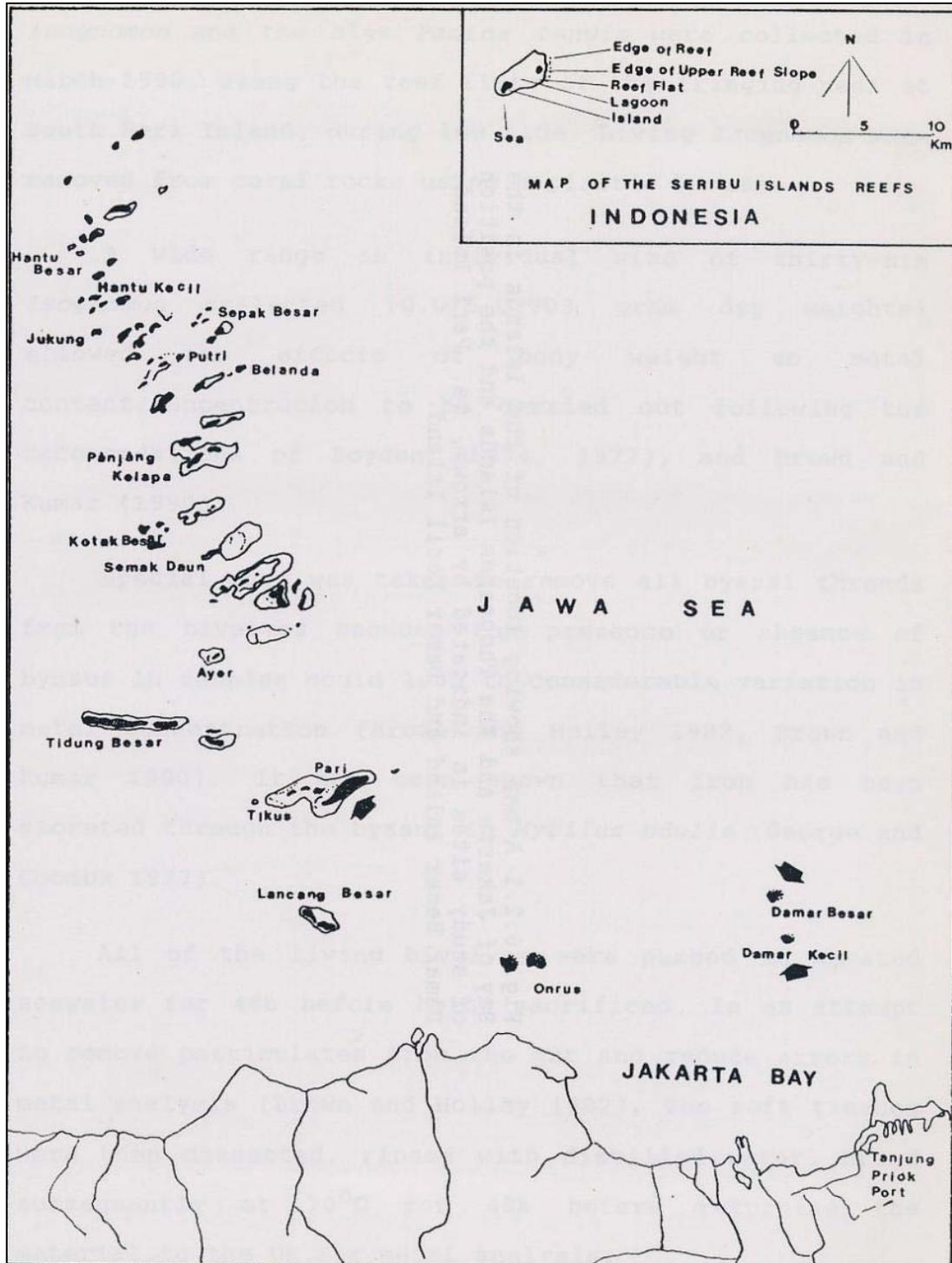


Gambar 6.1.1 Citra Landsat Multi-Spectral Scanner (MSS)(1986) menunjukkan jejak sedimen di Teluk Jakarta. Posisi lokasi penelitian ditunjukkan dengan anak panah (1) Pulau Damar Kecil, (2) Pulau Damar Besar, dan (3) Pulau Pari.

## VI.2 Bahan dan Metode

### VI.2.1 Lokasi Studi

Lokasi studi terletak di Teluk Jakarta; terdiri dari pulau karang yang mudah diakses dengan menggunakan perahu dari Jakarta. Tiga pulau yang dipilih adalah Pulau Pari selatan sebagai lokasi kontrol ('bersih'), karena lokasinya diluar teluk sekitar 35 km ke arah barat daya dari pelabuhan Jakarta, Tanjung Priok; Pulau Damar Besar (terletak di antara Pulau Pari dan Jakarta); dan Pulau Damar Kecil sebagai lokasi yang terkontaminasi, dua lokasi yang disebut terakhir berlokasi dalam area teluk, 11 km ke arah utara dari Tanjung Priok. Peta yang menunjukkan lokasi pulau-pulau tersebut di Teluk Jakarta dan Kepulauan Seribu dan posisi lokasi studi ditunjukkan pada Gambar 6.2.1.



Gambar 6.2.1 Peta yang menunjukkan lokasi pulau-pulau di Teluk Jakarta dan Kepulauan Seribu dan posisi lokasi penelitian ditunjukkan dengan anak panah, yaitu Pulau Pari, Pulau Damar Besar, dan Pulau Damar Kecil.

### VI.2.2 Organisme indikator yang digunakan untuk memantau tingkat logam di perairan

Brown dan Holley (1982) menggunakan berbagai moluska dan alga tropis sebagai indikator pencemaran konsentrasi logam di perairan pesisir yang bersumber dari limbah industri timah, *smelting* di Ko Phuket, Thailand. Moluska tertentu merefleksikan akumulasi logam partikulat dan organisme lainnya, sementara alga sebagai indikator yang merefleksikan logam terlarut di air laut.

Pada penelitian ini, moluska tiram bivalvia *Isognomon* dan alga *Padina tenuis* dikumpulkan pada bulan Maret 1990, sepanjang rataan karang di Pulau Pari selatan pada saat surut. *Isognomon* hidup dipindahkan dari karang dengan menggunakan palu plastik.

Tigapuluh enam individu *Isognomon* dengan ukuran yang bervariasi (0.075-0.093 gram berat kering jaringan daging) dikumpulkan sehingga dapat diketahui pengaruh berat badan terhadap kandungan/konsentrasi logam dengan mengikuti rekomendasi Boyden (1974, 1977) dan Brown dan Kumar (1990).

Penanganan khusus dilakukan untuk memisahkan benang byssal dari bivalvia karena ada atau tidaknya byssus dalam sampel dapat menyebabkan variasi pada konsentrasi logam (Brown dan Holley 1982, Brown dan Kumar 1990). Telah diketahui bahwa besi dieksresikan melalui byssus *Mytilus edulis* (George dan Coomns 1977).

Semua bivalvia hidup dibersihkan dalam air laut teraerasi selama 48 jam sebelum dijadikan bahan penelitian, untuk memisahkan partikulat dalam perut dan mengurangi kesalahan analisis logam (Brown dan Holley 1982). Jaringan lunaknya kemudian disayat, dibasuh air destilasi, kemudian dikeringkan pada suhu 70°C selama 48 jam sebelum dibawa ke Inggris untuk analisis logam.

Saat tingkatan logam lingkungan antara Pulau Pari dengan Damar Besar/Kecil dibandingkan, tidak ditemukan ada tiram yang dapat dicuplik di Damar Kecil dan Damar Besar. Alga *Padina* dicuplik di Pulau Damar Besar dan Damar Kecil.

Semua sampel alga dikumpulkan menggunakan tangan dan diletakkan dalam wadah polythene yang dicuci dengan asam. Sampel-sampel tersebut kemudian dibawa ke laboratorium di Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi di Pulau Pari. Sampel alga dicuci dengan seksama menggunakan air destilasi untuk membuang sedimen yang menempel dan untuk menghindari kesalahan analisis logam. Alga yang telah dicuci kemudian dikeringkan pada suhu 70°C selama 48 jam untuk kemudian dibawa ke Inggris untuk analisis logam.

### VI.2.3 Analisis Logam

Sampel alga dan moluska dilarutkan dalam 20 ml campuran nitrat/asam perklorik 30:1 (Analar grade acid, BDH Chemicals Ltd.) dalam lemari asam. Setelah volumenya dikurangi sebanyak 50% dengan cara dipanaskan dengan pasir pada suhu 80°C, residu ditambahkan 20 ml air destilasi deionisasi. Analisis logam dilakukan dengan spektrofotometri *flame atomic-absorption* menggunakan PYF Unicam SP9 spektrofotometer penyerap atom yang terhubung dengan komputer SP9. Standar analisis (Spectrosol, BDH Chemical Ltd.) digunakan untuk kalibrasi dan koreksi dilakukan dengan *blank*. Standar dimasukkan pada akhir setiap kelompok sampel sebagai kontrol kualitas. Alga dengan berat kering antara 0.22-0.36 gram. Logam yang dianalisis adalah Cd, Pb, Cu, Mn, Zn, dan Fe. Konsentrasi dinyatakan dalam satuan  $\mu\text{g g}^{-1}$  berat kering jaringan.

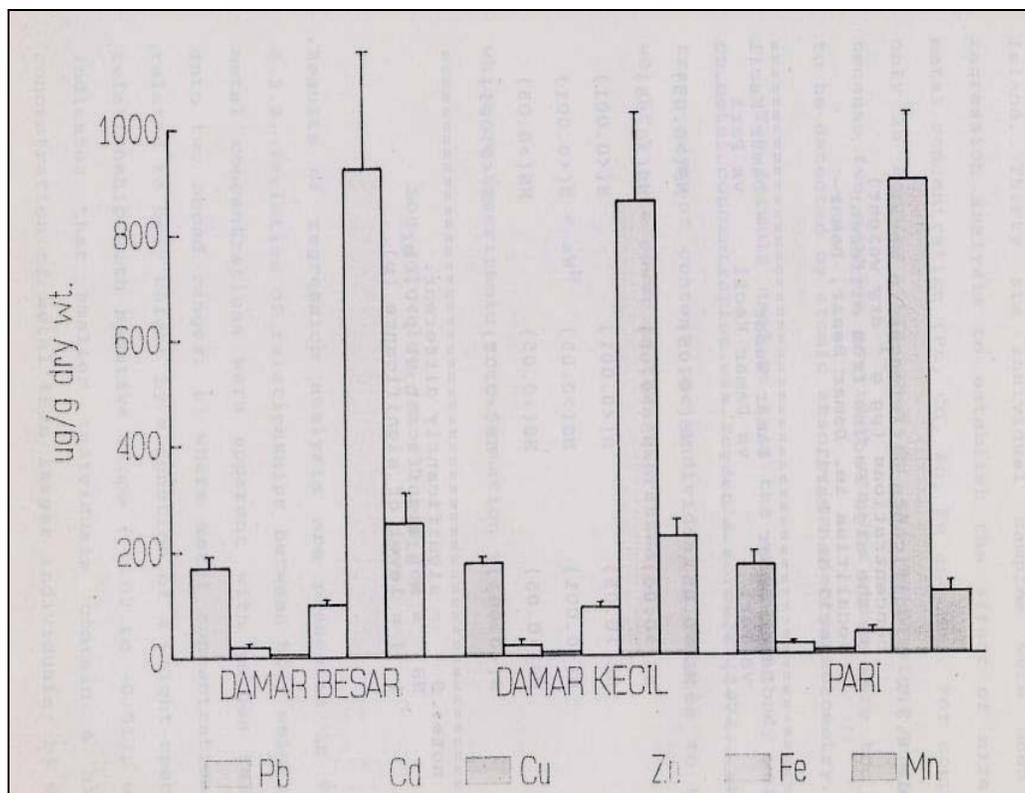
## VI.3 Hasil

### VI.3.1 Analisis Logam alga *Padina*

Enam jenis logam yang dianalisis dalam alga *Padina* yang dikumpulkan dari ketiga lokasi penelitian, yaitu Pulau Pari, Pulau Damar Besar, dan Pulau Damar Kecil. Konsentrasi logam yang didapat dari alga dari lokasi-lokasi berbeda dapat dilihat pada Gambar 6.3.1.

Kisaran rata-rata konsentrasi logam ( $\mu\text{g g}^{-1}$  berat kering) yang ditemukan pada alga-alga dari ketiga lokasi adalah 149.6-190.5 (Pb), 18.3-23.3 (Cd), 0.4-5.3 (Cu), 35.1-113.1 (Zn), 692-1151 (Fe) dan 101-302 (Mn).

Terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0.001$  oneway ANOVA) pada konsentrasi Seng (Zn) dan Mangan (Mn) antara alga dari Pulau Pari dan alga dari Pulau Damar Besar dan Damar Kecil. Perbedaan signifikan ( $p < 0.001$ ) juga terdapat pada konsentrasi Tembaga (Cu) pada alga dari Pulau Pari dengan Pulau Damar Kecil. Konsentrasi tembaga pada alga dari Pulau Damar Kecil juga berbeda secara signifikan ( $p < 0.001$ ) jika dibandingkan dengan alga dari Pulau Damar Besar. Untuk logam-logam lainnya tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada alga dari ketiga lokasi. Hasil analisis statistik berdasarkan konsentrasi logam yang terkandung dalam alga dari lokasi-lokasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 6.3.1.



Gambar 6.3.1 Mean konsentrasi timah (Pb), cadmium (Cd), tembaga (Cu), seng (Zn), besi (Fe), dan mangan (Mn) ( $\mu\text{g g}^{-1}$  berat kering) pada *Padina tenuis* yang dikumpulkan dari Pulau Damar Besar, Pulau Damar Kecil dan Pulau Pari. Garis vertikal menunjukkan standar deviasi ( $n = 10$ ).

Tabel 6.3.1 Signifikansi perbedaan pada konsentrasi logam ( $\mu\text{g g}^{-1}$  berat kering) pada alga *Padina* dari tiga lokasi berbeda, yaitu Pulau Damar Besar, Damar Kecil dan Pulau Pari.

	Damar Besar vs Pari	Damar Besar vs Damar Kecil	Damar Kecil vs Pari
Pb	NS(>0.05)	NS(>0.05)	NS(>0.05)
Cd	NS(>0.05)	NS(>0.05)	NS(>0.05)
Cu	NS(>0.05)	S(<0.001)	S(<0.001)
Zn	S(<0.001)	NS(>0.05)	S(<0.001)
Fe	NS(>0.05)	NS(>0.05)	NS(>0.05)
Mn	S(<0.001)	NS(>0.05)	S(<0.001)

note: S = significantly different.  
 NS = not significant at  $p > 0.05$ .  
 ( ) = level of significance (p).

### VI.3.2 Analisis Logam pada bivalvia *Isognomon*

Sampel *Isognomon* hanya tersedia dari Pulau Pari saja. Tigapuluh enam individu *Isognomon* digunakan dalam analisis regresi untuk mengetahui pengaruh ukuran terhadap konsentrasi logam (Pb, Cd, Zn, Fe, dan Mn). Untuk tembaga, hanya 26 sampel yang digunakan dalam analisis regresi karena 10 sampel lainnya menghasilkan nilai yang terlalu rendah untuk dapat dideteksi dengan spektrofotometer *atomic absorption*.

Rumus yang digunakan untuk menguji pengaruh berat badan terhadap konsentrasi logam adalah rumus Boyden (1974), dimana kandungan element per individu Y berbanding lurus dengan berat badan W sebagai fungsi yang diekspresikan sebagai berikut:

$$Y = aW^b$$

yang dalam transformasi logaritmiknya menghasilkan persamaan:

$$\text{Log}_{10} Y = \text{log}_{10} a + b \text{log}_{10} W$$

Hasil analisis regresi dapat dilihat pada Tabel 6.3.2. Variasi hubungan antara berat badan dengan konsentrasi logam muncul dalam nilai yang dikelompokkan menjadi dua: a) konsentrasi logam berhubungan dengan berat badan dengan fungsi hubungan yang spesifik berat dengan gradien negatif (-0.02 sampai -0.91), yang mengindikasikan bahwa individu yang lebih kecil mengandung konsentrasi logam yang lebih tinggi dibandingkan individu yang berukuran lebih besar; b) konsentrasi logam berhubungan dengan berat badan dengan fungsi hubungan yang spesifik berat dengan gradien positif (+0.12 sampai +0.66), yang mengindikasikan bahwa konsentrasi elemen jaringan secara langsung berhubungan dengan berat badan.

Perbandingan konsentrasi logam pada tiram antar lokasi dalam Teluk Jakarta tidak dapat dilakukan karena terbatasnya ketersediaan moluska tersebut. Maka perbandingan yang dilakukan adalah dengan nilai yang didapat dari lokasi terpolusi lainnya di Asia Tenggara dan Amerika Selatan (lihat Pembahasan).

Table 6.3.2 Regression information relating metal content ( $\mu\text{g}$ ) and body weight (g) in *Isognomon* sacrificed in March 1990 at Pari Island, Indonesia. Weight range of animals was 0.075 - 0.903 g dry weight.

Element	N	Intercept [ $\log_{10}$ a] value	Real intercept value a [ $\mu\text{g}$ ]	Regression slope b	(b-1)	r
Pb	36	1.09	12.42	0.09	-0.91	0.104
Cd	36	0.73	5.38	0.98	-0.02	0.714
Cu	26	0.93	8.55	1.66	+0.66	0.736
Zn	36	3.328	2024.77	1.58	+0.58	0.743
Fe	36	2.14	139.32	1.12	+0.12	0.891
Mn	36	0.98	9.59	0.48	-0.52	0.621

Note:

- N = number of samples used in regression analysis.
- a = real element content ( $\mu\text{g}$ ) intercept in relating to body weight.
- b = regression coefficient relating element content to body weight.
- (b-1) = weight-specific relationship, deduced regression coefficient relating element concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) to body weight (g).
- r = correlation coefficient.

#### VI. 4 Pembahasan

Hanya sedikit literatur-literatur ilmiah yang memuat diskusi mengenai gradien polusi di sepanjang daerah Teluk Jakarta sampai Kepulauan Seribu bagian utara. Scoffin (1986) menunjukkan perbedaan yang signifikan pada pertumbuhan karang menggunakan *skeletal banding* pada beberapa spesies terumbu karang terpilih, *Porites lutea* pada beberapa lokasi sekitar Jakarta sampai pulau di bagian utara Kepulauan Seribu. Penelitian tersebut menunjukkan rata-rata laju pertumbuhan tahunan (pertumbuhan linear) yaitu 7.5 mm untuk karang di dalam Teluk Jakarta dan 9.8-11 mm untuk karang di pulau-pulau bagian utara. Scoffin juga menemukan bahwa sebagian besar karang yang dikumpulkan dari Pulau Bidadari (dekat Jakarta) menunjukkan kinerja menyeluruh oleh pengaruh organisma-organisma pengebor.

Penelitian lain menggunakan parameter-parameter ekologis untuk mengukur perbedaan antara Teluk Jakarta bagian dalam dengan pulau-pulau di utara. Parameter-parameter tersebut adalah persentase penutupan terumbu karang hidup, jumlah spesies karang dan jumlah koloni karang. Semua parameter

tersebut menunjukkan nilai yang lebih rendah pada lokasi-lokasi di Teluk Jakarta bagian dalam daripada pulau-pulau di utara (Moll dan Suharsono 1986, Scoffin 1986). Begitu pula dengan keanekaragaman ikan-ikan karang yang lebih rendah di Teluk Jakarta jika dibandingkan dengan di pulau-pulau di utara (Hutomo dan Adrim 1986). Tanpa pengecualian, semua penelitian tersebut menunjukkan suatu gradien lingkungan dari Teluk Jakarta sampai Kepulauan Seribu bagian utara.

Pada penelitian ini kontaminasi logam berat dipelajari dari alga *Padina* yang didapat dari Teluk Jakarta bagian dalam dan luar. Seng (Zn) dan mangan (Mn) ditemukan lebih tinggi pada alga yang berasal dari daerah dalam teluk daripada luar teluk. Konsentrasi logam lainnya (Pb, Cd, Cu dan Fe) tidak berbeda secara signifikan pada sampel alga yang dikumpulkan dari ketiga lokasi.

Pada perairan pesisir laut tropis, Brown (1988) menyatakan ada alga laut tertentu yang dapat digunakan sebagai indikator biologi untuk memantau tingkatan logam (Tabel 6.4.1). Konsentrasi logam pada alga dapat merefleksikan sebaran polusi logam 'terlarut' dalam air laut sekelilingnya. Alga laut tropis seperti *Dictyota* dan *Enteromorpha* telah digunakan sebagai indikator polusi logam yang potensial di daerah Penang, Malaysia dimana alga-alga tersebut mengakumulasi cadmium, chromium, tembaga, besi, timah, dan seng dengan tingkat yang tinggi (Sivalingam 1978).

Pada Tabel 6.4.1, lokasi penelitian di Teluk Jakarta nampak lebih terpolusi dibandingkan dengan pesisir di Teluk Thailand dalam tingkat muatan polusi logamnya. Contohnya, konsentrasi timah, cadmium, dan seng yang tinggi ditemukan pada *Padina* dari Teluk Jakarta jika dibandingkan dengan logam yang ditemukan dari genus yang sama dari Teluk Thailand. Kontaminasi besi pada sampel alga Teluk Jakarta serupa dengan yang terdapat pada *Padina* yang berasal dari lokasi yang berdekatan dengan peleburan timah di Ko Phuket, Thailand (Brown dan Holley 1982).

Pada perairan pesisir tropis, pengukuran konsentrasi logam pada jaringan beberapa jenis kerang tertentu telah digunakan untuk memantau tingkat polusi logam (Tabel 6.4.2). Terdapat beberapa keuntungan yang didapat dengan menggunakan kerang sebagai indikator biologi (untuk mengetahui perubahan tingkatan logam pada lingkungan) dibandingkan dengan cara tradisional yang menggunakan metode analisis air dan sedimen (Phillips 1977) karena organisme hidup berintegrasi kuat dengan konsentrasi dan terpengaruh jejak logam sepanjang waktu.

Kerang merupakan indikator yang berguna karena tidak bergerak, berlimpah, berusia panjang, dan mudah dikumpulkan. Tetapi, dalam penggunaan kerang sebagai indikator ada hal-hal yang harus diperhatikan, yaitu kerang tidak boleh mengandung logam yang akan diperiksa (Brown 1988b); dan faktor lainnya seperti ukuran dan jenis kelamin harus dipertimbangkan. Ukuran kerang dapat menyebabkan variasi yang signifikan pada konsentrasi logam dalam jaringan (Boyden 1974). Pada penelitian ini, konsentrasi timah, cadmium, dan mangan pada bivalvia *Isognomon* yang dikumpulkan dari Pulau Pari menunjukkan nilai yang lebih tinggi pada individu yang berukuran kecil dibandingkan pada individu yang berukuran besar, sementara konsentrasi tembaga, seng dan besi pada bivalvia proporsional dengan ukuran tubuhnya.

Brown (1988b) menyatakan bahwa tidak semua spesies kerang tropis dapat digunakan sebagai indikator. Keberadaan logam (Bryan 1967) dan toleransi terhadap logam (Bryan dan Hummerstone 1973) dapat menghasilkan tingkatan elemen/unsur logam yang tidak merefleksikan keadaan lingkungan. Phillips dan Yim (1981) juga telah menekankan bahayanya menggunakan spesies kerang sebagai indikator untuk polusi logam, terutama di area tropis, dimana data biologi dan fisiologi spesies kerang masih sangat sedikit. Contohnya, Phillips dan Yim (1981) pada studi perbandingan tingkatan logam pada perairan Hong Kong menunjukkan bahwa kerang *Septifer bilocularis* tidak sesuai sebagai organisme indikator karena pada spesies tersebut terdapat logam secara alami.

Tabel 6.4.1 Konsentrasi logam ( $\mu\text{g g}^{-1}$  berat kering) pada beberapa alga laut tropis (Brown 1988) dan saat penelitian ini dilakukan.

Species	Pb	Cd	Cu	Zn	Fe	Mn
<b>Rhodophyceae:</b>						
<i>Acanthophora orientalis</i> <sup>a</sup>	5.72	7.15	-	34.32	486	-
<i>Gracilaria sp.</i> <sup>a</sup>	44.61	7.43	39.65	19.83	1214	-
<i>Laurencia sp.</i> <sup>a</sup>	1.68	8.40	13.43	60.45	1612	-
<b>Chlorophyceae:</b>						
<i>Caulerpa racemosa</i> <sup>a</sup>	41.12	10.28	10.28	71.97	5106	-
<i>Cladophora fascicularis</i> <sup>a</sup>	12.95	9.25	7.40	38.85	4735	-
<i>Enteromorpha flexuosa</i> <sup>a</sup>	58.77	16.32	26.12	104.47	7117	-
<b>Phaeophyceae:</b>						
<i>Dictyota bartayresii</i> <sup>a</sup>	9.01	5.63	4.50	27.02	8445	-
<i>Sargassum grevillei</i> <sup>a</sup>	5.15	6.44	5.15	15.46	347	-
<i>Padina tenuis</i> <sup>a</sup>	17.06	7.11	5.69	45.51	3327	-
<i>Padina tenuis</i> <sup>b</sup>	-	-	10.24	120-210	900-1200	-
<i>Padina tenuis</i> <sup>c</sup>	-	-	6.00	37-57	-	-
<i>Padina tenuis</i> <sup>d</sup>	149-171	19-23	2.4-5.2	88-113	692-1151	200-302
<i>Padina tenuis</i> <sup>e</sup>	160-188	18-23	0.4-3.1	80-103	692-1023	184-261
<i>Padina tenuis</i> <sup>f</sup>	149-190	19-23	2.9-5.3	35-48	774-1015	101-131
<b>Locality/year:</b>						
<sup>a</sup> Gulf of Thailand (1978).						
<sup>b</sup> Ko Phuket, Thailand (1982).						
<sup>c</sup> Pari Island, Indonesia (1982).						
<sup>d</sup> Damar Besar Island, in Jakarta Bay (present study).						
<sup>e</sup> Damar Kecil Island, in Jakarta Bay (present study).						
<sup>f</sup> Pari Island, north of Jakarta Bay (present study).						

Untuk pemantauan pencemaran logam, Brown (1988b) menyarankan bahwa organisme karang harus dipilih dari tingkatan trofik yang berbeda untuk analisis logam (seperti alga, herbivora, pemakan suspensi, karnivora) dari satu lokasi yang sama. Analisis seperti itu mungkin dapat merefleksikan bentuk polusi logam dengan adanya alga yang menunjukkan adanya logam terlarut dalam air laut sementara pemakan suspensi dapat menunjukkan adanya logam yang terikat dalam bentuk partikulat.

Pada Tabel 6.4.2 kisaran konsentrasi logam (Pb, Cd dan Cu) yang didapat pada *Isognomon* dari Pulau Pari lebih tinggi daripada yang dilaporkan oleh Campos (1988) dari perairan pesisir Kolumbia – Karibia dimana lokasi penelitiannya mendapatkan kontaminan logam dari industri dan perkotaan yang sampai ke pesisir laut melalui sungai-sungai. Konsentrasi seng dan tembaga pada *Isognomon* yang diambil di dekat peleburan timah di Ko Phuket Thailand (Brown dan Holley 1982) menunjukkan kisaran konsentrasi logam yang hampir serupa dengan *Isognomon* dari Pulau Pari.

Kesimpulannya, konsentrasi logam yang didapat dari analisis alga *Padina* dari tiga lokasi dan bivalvia *Isognomon* dari Pulau Pari, merefleksikan polusi logam yang kemungkinan besar berasal dari Teluk

Jakarta, meskipun tidak ada perbandingan tingkat logam pada bivalvia dari daerah dalam Teluk Jakarta yang dapat dilakukan. Di masa yang akan datang, akan sangat menarik untuk melakukan penelitian tentang analisis logam berat dengan organisme yang lebih banyak yang dikumpulkan dari area yang lebih luas dari daerah dalam Teluk Jakarta sampai Kepulauan Seribu. Serangkaian bioassay dan pemantauan kesehatan komunitas laut juga dapat dilakukan, tidak hanya untuk mengukur gradien polusi tetapi juga sebagai evaluasi terhadap sensitivitas berbagai metode berbeda yang dapat digunakan dalam pemantauan polusi di perairan tropis.

**Table 6.4.2 Metal concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) in selected tropical marine bivalves.**

Species	Pb	Cd	Cu	Zn	Fe	Mn
<i>Mytilus viridis</i> <sup>a</sup>	83-330	2.8-8.2	3.7-16.9	47.6-91.7	-	-
<i>Mytilus viridis</i> <sup>b</sup>	-	0.03-8.6	-	-	-	-
<i>Saccostrea cucullata</i> <sup>c</sup>	-	-	80-679	1166-6359	180-800	-
<i>Pecten sp.</i> <sup>d</sup>	nd	0.02-0.22	0.6-1.7	8.9-18	-	-
<i>Isognomon alatus</i> <sup>e</sup>	0.4-4.2	0.8-15.6	0.4-4.8	-	-	-
<i>Isognomon bicolor</i> <sup>e</sup>	0.5-82.6	0.9-6.9	0.9-3.9	-	-	-
<i>Isognomon isognomon</i> <sup>c</sup>	-	-	4.8-21	1042-2489	-	-
<i>Isognomon isognomon</i> <sup>f</sup>	-	-	-	-	200-880	-
<i>Isognomon isognomon</i> <sup>g</sup>	3-153	1.9-30.9	nd-23.1	76-3918	46-251	5.7-63

nd = non detectable.  
 Locality/references:  
<sup>a</sup> River Mouths in Thailand (Menasveta and Cheevaparanapiwat 1981).  
<sup>b</sup> Onrust Island, in Jakarta Bay, Indonesia (Hutagalung 1989).  
<sup>c</sup> Tin Smelter, Ko Phuket, Thailand (Brown and Holley 1982).  
<sup>d</sup> Muara Angke (Angke Estuary), Jakarta, Indonesia (Hutagalung and Syamsu 1987).  
<sup>e</sup> Colombian Bays, Caribbean Sea (Campos 1988).  
<sup>f</sup> Tin Smelter, Ko Phuket, Thailand (Brown and Kumar 1990).  
<sup>g</sup> Pari Island, north of Jakarta Bay, Indonesia (present study).

## Bab VII

### Indeks Mitosis Zooxanthella pada Anemon Tropis *Heteractis* sp. sebagai Respons Terhadap Pendedahan Tembaga

#### VII.1 Pendahuluan

Pengukuran Indeks Mitosis (MI) pada alga simbiotik coelenterata telah digunakan oleh banyak peneliti untuk mengetahui akibat kondisi penuh tekanan terhadap hubungan simbiosis. Kondisi tersebut termasuk suhu tinggi dan rendah, kurangnya makanan, peningkatan iluminasi, minyak mentah dan *dispersant* minyak.

Pendedahan anemon temperata *Anemonia viridis* terhadap peningkatan suhu menunjukkan adanya kenaikan MI pada zooxanthella simbiotiknya (Gates dan Brown 1985, Suharsono 1990); dampak kurangnya makanan dan kegelapan pada *Hydra viridissima* temperata adalah menurunnya MI pada chlorella simbiotiknya (McAulley 1982, 1985a, b); Cook *et al.* (1988) juga menemukan bahwa pembelahan sel pada zooxanthella pada anemon tropis *Aiptasia pallida* berkurang pada anemon yang kekurangan makanan tetapi jika anemon diberi nitrogen dan fosfat yang meningkat, mitosis pada zooxanthellanya juga meningkat.

Muller-Parker (1987) melaporkan bahwa anemon tropis *Aiptasia pulchella* yang terdedah pada sinar matahari menunjukkan MI zooxanthella yang tinggi tetapi jika sedikit terpapar pada sinar matahari zooxanthellanya menunjukkan MI yang rendah. Pendedahan fraksi minyak mentah yang larut air terhadap karang hidroid *Myrionema hargitti* menghasilkan penurunan MI yang signifikan pada alga simbiotiknya jika dibandingkan dengan kontrol (Michel dan Fitt 1984). Bagaimanapun, pendedahan *Anemonia viridis* terhadap konsentrasi *dispersant* minyak yang meningkat (Corexit 9527) menyebabkan peningkatan MI pada zooxanthella simbiotiknya (Goh 1988).

Meskipun para peneliti yang disebut diatas melakukan penelitian dengan metode yang berbeda dengan penelitian ini, indeks-indeks pada zooxanthella simbiotik dapat dijadikan teknik *bioassay* yang potensial untuk pengukuran kualitas air.

Tujuan dari studi ini adalah pertama, untuk melakukan teknik *Feulgen-stain* untuk menganalisis indeks-indeks mitosis zooxanthella pada coelenterata-coelenterata tertentu. Hewan ini biasanya digunakan dalam penelitian *bioassay* yang melibatkan garam tembaga sebagai agen penekan. Teknik ini sudah berhasil diterapkan pada coelenterata temperata dalam uji laboraorium (Bab III).

Tujuan kedua adalah untuk menguji sensitivitas indeks mitosis pada zooxanthella simbiotik sebagai tolok ukur tingkat polusi logam di lingkungan dimana anemon yang bersimbiosis dapat digunakan untuk eksperimen *bioassay*, yaitu anemon yang didapatkan dari terumbu karang di Teluk Jakarta dan daerah utara teluk.

## VII.2 Metode dan Bahan Penelitian

### VII.2.1 Lokasi Pencuplikan

Anemon tropis *Heteractis (Radianthus)* sp. (Gambar 7.2.1) dikumpulkan dari rataan terumbu karang di dua lokasi, yaitu sebelah selatan Pulau Pari yang terletak di bagian utara Teluk Jakarta, dan Pulau Damar Besar yang terletak di dalam area teluk (lihat peta Pantai Jakarta, Gambar 6.2.1, Bab VI). Anemon yang dikumpulkan tidak berlimpah pada kedua lokasi, sehingga hanya limabelas anemon yang diambil untuk keperluan penelitian.

Anemon *Heteractis* biasanya dimakan oleh penduduk lokal; nama lokalnya 'Kalamuik'. Berdasarkan Haywood dan Wells (1989) dan Thomason (pers.comm.), nama ilmiah generik dari *Heteractis* adalah *Radianthus*. Genus ini ditemukan di daerah Laut Hindia dan Indo-pasifik. Banyak penggemar akuarium air laut yang mengimpor anemon dari Singapura, Indonesia, Sri Lanka, dan Filipina karena anemon ini atraktif dan mudah dipelihara dalam akuarium. Ukuran anemon berkisar antara 10-40 cm, dan dapat lebih besar ketika kondisi pertumbuhannya optimal. Anemon ini biasanya merupakan sarang bagi ikan badut *Amphiprion* spp.

Anemon yang dikumpulkan didapat dari sisa-sisa karang yang mati pada rataan terumbu karang bagian dalam di mana habitatnya didominasi oleh alga *Turbinaria turbinata*. Anemon dipindahkan secara hati-hati dari substrat untuk meminimalkan kerusakan pada lembaran pedal.



Gambar 7.2.1 Spesimen anemon tropis *Heteractis*



Gambar 7.2.2 Tangki penyimpanan anemon *Heteractis* yang digunakan dalam eksperimen *bioassay*

### VII.2.2 Pemeliharaan Anemon *Heteractis*

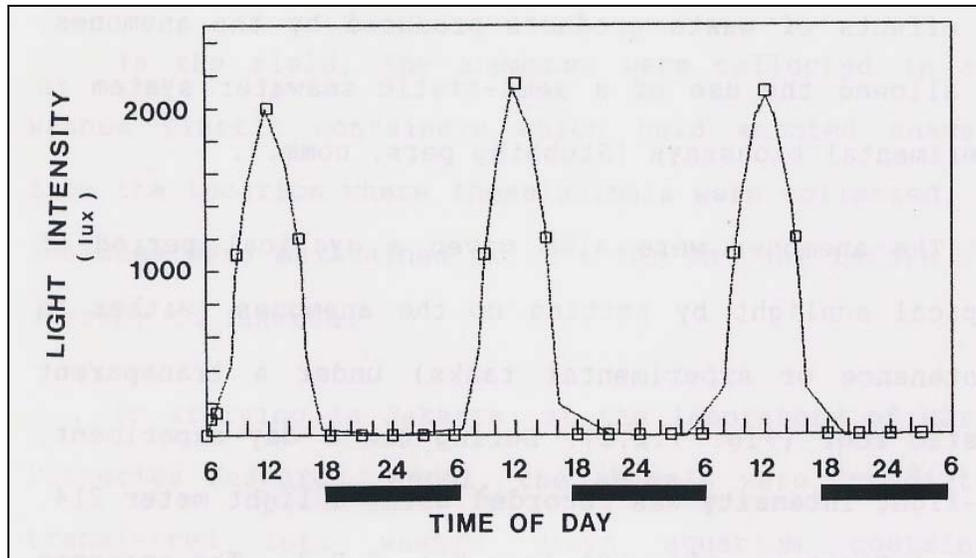
Di lapangan, anemon dikumpulkan dalam wadah plastik yang dicuci dengan asam yang berisi air laut yang diaerasi berasal dari lokasi pencuplikan. Anemon dijaga agar tetap berada pada suhu 29°C selama sehari sebelum perjalanan selama 4 jam ke Jakarta.

Sampai di Jakarta, di Laboratorium Penelitian Perikanan Laut, Ancol, hewan-hewan tersebut segera dipindahkan ke akuarium gelas yang telah dicuci yang berisi air laut yang difilter (volume 50 liter). Air laut yang digunakan didapat dari Gelanggang Samudera Ancol dimana berbagai biota air laut dipelihara di akuarium untuk kepentingan rekreasi dan ilmiah.

Menurut staff di Gelanggang Samudera Ancol, air laut yang digunakan berasal dari Teluk Jakarta. Air laut tersebut dipompa melalui pipa sepanjang 500 meter dari garis pantai Ancol; titik inletnya 5 meter dibawah level saat surut. Air laut kemudian diberi perlakuan melalui system filter (menggunakan filter karbon teraktivasi), yang membuat air laut memiliki kualitas yang baik sehingga dapat langsung digunakan dan aman untuk biota akuarium. Air laut ini juga dijual untuk umum.

Anemon dipelihara selama 15 hari sebelum digunakan untuk bahan eksperimen. Setiap 12 jam, air laut yang sudah difilter diganti secara hati-hati dalam tangki gelas dengan cara *siphon*. Penggantian air dengan cara tersebut meminimalisasi dampak produk buangan yang dihasilkan anemon, dan memungkinkan penggunaan system air laut semi-statis dalam *bioassay* eksperimen (Stebbing, pers.comm).

Anemon ini juga diberi sinar matahari tropis dengan periode siklis dengan cara mengaturnya (baik selama pemeliharaan maupun dalam tangki eksperimen) di bawah atap plastik transparan (Gambar 7.2.2). Selama 3 hari eksperimen, intensitas cahaya matahari diukur menggunakan 'light meter 214, General Electric, OHIO USA' (lihat Gambar 7.2.3). Anemon diberi pakan larva *Artemia* dua kali dalam seminggu.



Gambar 7.2.3 Intensitas cahaya matahari (lux) yang tercatat selama lebih dari 69 jam eksperimen ( $\approx 3$  hari). kotak hitam = periode gelap.

### VII.2.3 Penggunaan indeks-indeks mitosis zooxanthella pada *Heteractis* untuk mengukur toksisitas tembaga pada air laut

Sejumlah 12 anemon digunakan untuk analisis indeks-indeks mitosis. Pada enam anemone yang diperoleh dari Pulau Pari, tiga individu dipaparkan terhadap ion tembaga  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  (British Drug House standard, BDH Chemical, Ltd), dan tiga lainnya digunakan sebagai kontrol (tidak ada penambahan tembaga). Sementara enam anemon lainnya yang berasal dari Pulau Damar Besar, tiga anemon juga dipaparkan terhadap tembaga dengan konsentrasi yang sama, dan tiga lainnya juga sebagai kontrol.

Indeks-indeks mitosis zooxanthella yang dihitung berasal dari tentakel anemon yang digunakan selama 69 jam eksperimen. Pada pukul 06.00, pada hari pertama sebelum pendedahan tembaga, lima tentakel dari masing-masing anemon diambil untuk mendapatkan 15 sub-sampel. **Setiap subsequent sampel meliputi lima tentakel yang memberikan 15 sub-sampel untuk analisis.** Pengambilan tentakel dari anemon dilakukan secara teliti dengan menggunakan gunting yang bersih dan tajam.

Pada interval tigapuluh menit dan kemudian satu jam setelah pendedahan tembaga, kelima tentakel diambil dari masing-masing anemon kontrol dan anemon yang terdedah tembaga. Sampel **subsequent** diambil pada interval 3 jam selama eksperimen 69 jam. Selama eksperimen, tidak ada pakan tambahan yang diberikan pada anemon. Semua sampel tentakel segera disimpan dalam asam asetat/alkohol selama 1 jam diikuti dengan fiksasi dalam alkohol 70%. Prosedur analisis indeks mitosis untuk zooxanthella pada coelenterata secara detail telah dijelaskan dalam Bab III.

### VII.3 Hasil

Semua anemon uji yang diteliti, baik kontrol maupun dengan perlakuan  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  tembaga, hidup pada akhir eksperimen bioassay, setelah 69 jam. Tentakel-tentakel memanjang dan bergerak, serta perilakunya serupa dengan anemon di habitat aslinya. Perbedaan yang jelas yang terdapat antara anemon control dengan anemon perlakuan adalah kekeruhan air pada wadah anemon yang diberi

perlakuan jika dibandingkan dengan wadah kontrol. Ini mungkin disebabkan oleh lebih banyaknya mukus yang disekresikan oleh anemon yang terdedah tembaga daripada anemon kontrol. Tentakel anemon perlakuan juga terlihat ditutupi lembaran-lembaran mukus.

### **Pengukuran indeks mitosis zooxanthella *Heteractis* dari Pulau Pari yang terdedah tembaga**

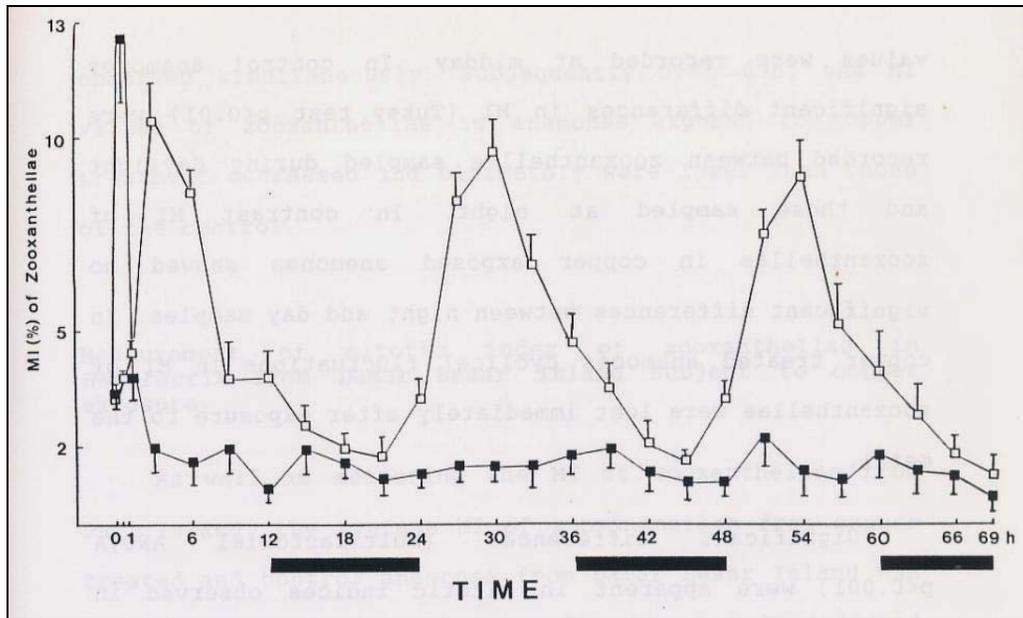
Rata-rata indeks mitosis (MI) zooxanthella dari anemon yang terdedah tembaga maupun kontrol dihitung dan ditabulasikan (Lampiran D). Data transformasi log digunakan dalam semua analisis statistik.

Untuk menggambarkan fluktuasi indeks-indeks mitosis selama waktu eksperimen, maka dibuat grafik antara rata-rata indeks mitosis zooxanthella dengan waktu (Gambar 7.3.1). Fluktuasi siklik pada nilai MI diamati pada anemon kontrol, dengan puncak nilai MI sesuai dengan periode intensitas cahaya yang tinggi. MI tertinggi didapat pada saat tengah hari. Pada anemon kontrol terdapat perbedaan yang signifikan pada MI (Tuket test  $p < 0.01$ ), tercatat antara pencuplikan zooxanthella saat periode terang dan periode gelap. Sebaliknya, MI zooxanthella pada anemon yang terpapar tembaga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara pencuplikan periode terang dan gelap. Pada anemon terdedah tembaga fluktuasi siklik MI zooxanthella hilang segera setelah terpapar pada logam.

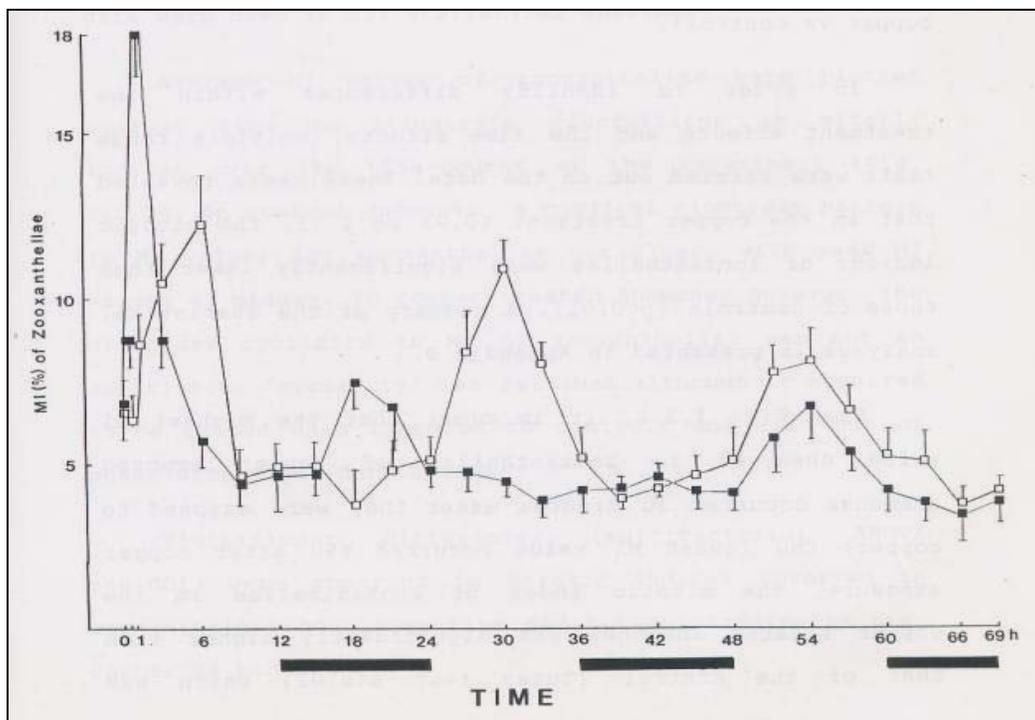
Perbedaan signifikan (ANOVA multifaktorial  $p < 0.001$ ) jelas terlihat pada indeks-indeks mitosis yang teramati pada zooxanthella baik sepanjang waktu dan antar perlakuan (tembaga vs kontrol).

Untuk mengidentifikasi perbedaan dalam dampak perlakuan dan waktu, berbagai rangkaian uji dilakukan terhadap data. Dari uji-uji tersebut diketahui bahwa pada perlakuan tembaga ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ), indeks-indeks mitosis zooxanthella lebih rendah secara nyata daripada kontrol ( $p < 0.01$ ). Ringkasan analisis statistik dapat dilihat pada Lampiran D.

Dari Gambar 7.3.1, jelas diketahui bahwa nilai MI tertinggi yang terdapat pada zooxanthella yang terdedah tembaga muncul setelah 30 menit terdedah tembaga; nilai MI terendah terjadi setelah 69 jam pendedahan tembaga. Indeks mitosis zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga lebih tinggi secara nyata daripada kontrol (Tukey Test  $p > 0.01$ ) yang teramati secara simultan. Kemudian setelah 69 jam, nilai MI zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga berkurang dan akhirnya menjadi lebih rendah daripada kontrol.



Gambar 7.3.1 Indeks-indeks mitosis (MI) zooxanthella pada anemon *Heteractis* yang berasal dari Pulau Pari. MI pada kontrol (□) dan tembaga 0.05 mg l<sup>-1</sup> (■), vs waktu (jam). Garis vertical menunjukkan standar deviasi (n = 15); ■■■■ = periode gelap.



Gambar 7.3.2 Indeks-indeks mitosis (MI) zooxanthella pada anemon *Heteractis* yang berasal dari Pulau Damar Besar. MI pada kontrol (□) dan tembaga 0.05 mg l<sup>-1</sup> (■), vs waktu (jam). Garis vertical menunjukkan standar deviasi (n = 15); ■■■■ = periode gelap.

### **Pengukuran indeks mitosis zooxanthella *Heteractis* dari Pulau Damar Besar terdedah tembaga**

Seperti pengukuran MI zooxanthella pada anemon dari Pulau Pari, rata-rata indeks mitosis (MI) zooxanthella dari anemon yang terdedah tembaga maupun kontrol yang berasal dari Pulau Damar Besar dihitung dan ditabulasikan (Lampiran D). Data transformasi log digunakan dalam semua analisis statistik.

Untuk menggambarkan fluktuasi indeks-indeks mitosis selama waktu eksperimen, maka dibuat grafik antara rata-rata indeks mitosis zooxanthella dengan waktu (Gambar 7.3.2). Pada anemon kontrol, pola siklus siang/malam pada MI zooxanthella sangat jelas, dengan puncak nilai MI pada tengah hari. Tetapi, pada anemon yang terdedah tembaga, siklus siang/malam nilai MI zooxanthella tidak begitu jelas; beberapa “siklus” tertunda meskipun tampaknya ada bila dibandingkan dengan kontrol dan juga tidak sesuai fase dengan siklus terang/gelap.

Perbedaan signifikan (ANOVA multifaktorial  $p < 0.001$ ) jelas terlihat pada indeks-indeks mitosis yang teramati pada zooxanthella baik sepanjang waktu dan antar perlakuan (tembaga vs kontrol).

Untuk mengidentifikasi perbedaan dalam dampak perlakuan dan waktu, berbagai rangkaian uji dilakukan terhadap data. Dari uji-uji tersebut diketahui bahwa pada perlakuan tembaga ( $0.05 \text{ mg l}^{-1}$ ), indeks-indeks mitosis zooxanthella lebih rendah secara nyata daripada kontrol ( $p < 0.01$ ).

Dari Gambar 7.3.2, jelas diketahui bahwa nilai MI tertinggi yang terdapat pada zooxanthella yang terdedah tembaga muncul setelah 1 jam terdedah tembaga; nilai MI ini lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan kontrol (Tukey test  $p < 0.01$ ) yang diukur pada waktu yang sama.

### **Perbandingan antara nilai MI zooxanthella pada *Heteractis* dari Pulau Pari dan Pulau Damar Besar**

Perbedaan signifikan secara keseluruhan (ANOVA multifaktorial  $p < 0.001$ ) terlihat pada indeks-indeks mitosis zooxanthella baik dalam waktu maupun antar lokasi (anemon kontrol dari Pulau Pari vs Damar Besar; anemon perlakuan tembaga dari Pulau Pari vs Damar Besar).

Pada anemon kontrol di kedua lokasi, MI zooxanthella pada malam hari lebih tinggi secara nyata pada anemon dari Pulau Damar Besar daripada yang berasal dari Pulau Pari (Tukey test  $p < 0.01$ ). Indeks mitosis zooxanthella pada siang hari tidak memiliki perbedaan yang nyata pada anemon kontrol dari kedua lokasi.

Respons MI zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga dari kedua lokasi (Pulau Pari dan Damar Besar) menunjukkan hasil yang berbeda. Fluktuasi siklik pada MI zooxanthella anemon dari Pulau Pari hilang sama sekali sebagai hasil dari pendedahan tembaga selama eksperimen. Sebaliknya, fluktuasi siklik MI zooxanthella anemon dari Pulau Damar Besar tercatat meskipun skalanya kecil jika dibandingkan dengan anemon kontrol dari lokasi yang sama.

Begitu pula dengan pola siang/malam dari puncak MI pada tengah hari dan MI terendah pada periode gelap yang terganggu akibat pendedahan tembaga pada anemon dari Pulau Damar Besar, puncak MI terlihat muncul pada 18 jam setelah pendedahan tembaga pada saat tengah malam, 30 jam setelah pendedahan tembaga tidak ada puncak MI yang tercatat pada tengah hari sementara pada 54 jam setelah pendedahan tembaga (pada tengah hari) puncak MI kembali tercatat meskipun terdapat penurunan yang signifikan (Tukey test  $p < 0.01$ ) jika dibandingkan dengan anemon kontrol.

Satu jam setelah pendedahan tembaga, MI zooxanthella pada anemon yang berasal dari Pulau Damar Besar menunjukkan kenaikan yang signifikan di atas nilai kontrol (Tukey test  $p < 0.01$ ). Kenaikan seperti itu juga muncul pada anemon dari Pulau Pari, meskipun baru terjadi setelah 30 menit

pendedahan. Indeks-indeks mitosis zooxanthella kemudian menurun secara drastis pada kedua populasi anemon yang terpapar tembaga. Skala kenaikan awal pada anemon dari kedua lokasi serupa meskipun nilai aktual MI yang tercatat berbeda secara signifikan (Tukey test  $p < 0.01$ ), anemon dari Damar Besar memiliki MI yang lebih tinggi pada awal eksperimen. Yang menarik adalah laju basal MI zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga dari Damar Besar lebih tinggi selama eksperimen jika dibandingkan dengan laju basal MI zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga dari Pulau Pari ( $p < 0.05$  F test).

#### VII.4 Diskusi

Penelitian ini adalah penelitian pengukuran indeks-indeks mitosis zooxanthella pada anemon tropis yang pertama yang menggunakan teknik *Feulgen stain*. Teknik ini pada awalnya ditemukan oleh ahli tumbuhan (Badr *et al.* 1985) untuk meneliti sel-sel akar tumbuhan pada berbagai kondisi tertekan, dan dimodifikasi untuk digunakan pada zooxanthella yang bersimbiosis dengan coelenterata di daerah temperata (Bab III).

Pada penelitian ini, nilai indeks mitosis zooxanthella pada anemon tropis *Heteractis* yang berasal dari Pulau Damar Besar, suatu area yang terkena polusi logam berat (Bab III), lebih tinggi secara nyata bila dibandingkan dengan yang berasal dari Pulau Pari, dimana polusi logam lebih sedikit. Respons MI zooxanthella yang berbeda ditunjukkan oleh anemon mungkin merefleksikan perbedaan nutrisi pada kedua lokasi. Perairan sekitar Pulau Damar Besar yang terletak lebih dekat pada Kota Jakarta mengandung lebih banyak polutan organik daripada perairan di sekitar Pulau Pari (Willoughby, 1986a, b). Cook dan D'Elia (1987) dan Cook *et al.* (1988) menyatakan bahwa laju pertumbuhan in-situ dan biomassa zooxanthella tinggi pada inang yang berasal dari lingkungan terumbu karang dimana partikulat pakan yang kaya akan zat-zat organik berlimpah bila dibandingkan dengan inang yang berasal dari lingkungan yang miskin.

Penelitian ini menunjukkan bahwa nilai MI zooxanthella *Heteractis* yang terdedah ion tembaga  $0.05 \text{ mg l}^{-1}$  selama tiga hari berkurang secara signifikan jika dibandingkan dengan anemon tanpa pendedahan tembaga. Michel dan Fitt (1984) menemukan penurunan signifikan dalam laju pembelahan pada alga yang bersimbiosis dengan karang hydroid *Myrionema hargitti* yang terdedah oleh fraksi minyak mentah yang larut air selama dua hari jika dibandingkan dengan kontrol. Disebutkan bahwa penurunan tersebut mungkin terjadi akibat adanya gangguan pada apparatus mitotik mikrotubular pada alga simbiotik sebagai akibat pendedahan minyak mentah; atau dengan kata lain kurangnya makanan mempengaruhi pembelahan. Pada studi yang sama, Michel dan Fitt menyatakan bahwa hilangnya polips dan stolon pada *Myrionema* sebagai akibat pendedahan minyak mentah dan kekurangan makanan.

Dalam penelitian ini, respons MI zooxanthella pada anemon yang terdedah tembaga dari kedua lokasi (yaitu Pulau Pari dan Damar Besar) menunjukkan perbedaan yang signifikan. Fluktuasi siklik MI zooxanthella pada anemon kontrol yang berasal dari Pulau Pari hilang sama sekali akibat pendedahan tembaga pada saat eksperimen. Sebaliknya, beberapa siklus MI zooxanthella dari Pulau Damar Besar teramati meskipun skala fluktuasinya sedikit dibandingkan dengan anemon kontrol dari lokasi yang sama. Fenomena peningkatan MI yang terjadi pada zooxanthella anemon yang terdedah tembaga dari kedua lokasi, mungkin menunjukkan adanya hormesis – atau kompensasi berlebih oleh mekanisme pengaturan biologis (Stebbing 1981).

Fenomena serupa ditunjukkan pada respons pertumbuhan hidroid (*Campanularia flexuosa*) yang terdedah tembaga (Stebbing 1976, 1980). Stebbing menemukan bahwa laju pertumbuhan yang spesifik pada hidroid terstimulasi ketika terdedah tembaga dalam konsentrasi yang relative rendah (1-

15  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Dengan pendedahan tembaga diatas konsentrasi tersebut, *C. flexuosa* menunjukkan respons terhambatnya laju pertumbuhan. Mekanisme pengaturan serupa juga ditunjukkan oleh *Hydra* yang terdedah timah dimana parameter terukur adalah peningkatan formasi tunas (Browne dan Davis 1977); Michel dan Fitt (1984) melaporkan bahwa setelah pendedahan hidroid *Myrionema hargitti* terhadap minyak mentah selama satu sampai tiga jam, zooxanthella simbiotiknya menunjukkan respons hormesis, yang diindikasikan oleh sedikit kenaikan pada respirasi dan fotosintesis alga.

Dari penelitian ini jelas terlihat bahwa penggunaan indeks-indeks mitosis (dan juga respons hormesis) pada alga simbiotik coelenterata sebagai teknik bioassay untuk mengkaji pengaruh tekanan terhadap lingkungan memiliki potensi yang besar. Akan sangat menarik untuk membandingkan penggunaan teknik ini di lapangan secara paralel dengan teknik bioassay lainnya baik pada coelenterata tropis maupun temperata. Contoh teknik bioassay lainnya adalah teknik 'bouyant weight' (Davies 1989); 'energy budgets' (Davies 1984, Edmunds dan Davies 1986); 'tissue leison' dan laju pertumbuhan karang (Jackson *et al.* 1989); tahap-tahap perkembangan tunas anemon (Walter, tidak dipublikasikan); dan laju pembentukan planula karang (Goh 1991). Teknik-teknik tersebut beserta parameter-parameter komunitas dan gradient polusi dapat menjadi langkah awal metode evaluasi bioassay di perairan laut tropis.

## Bab VIII

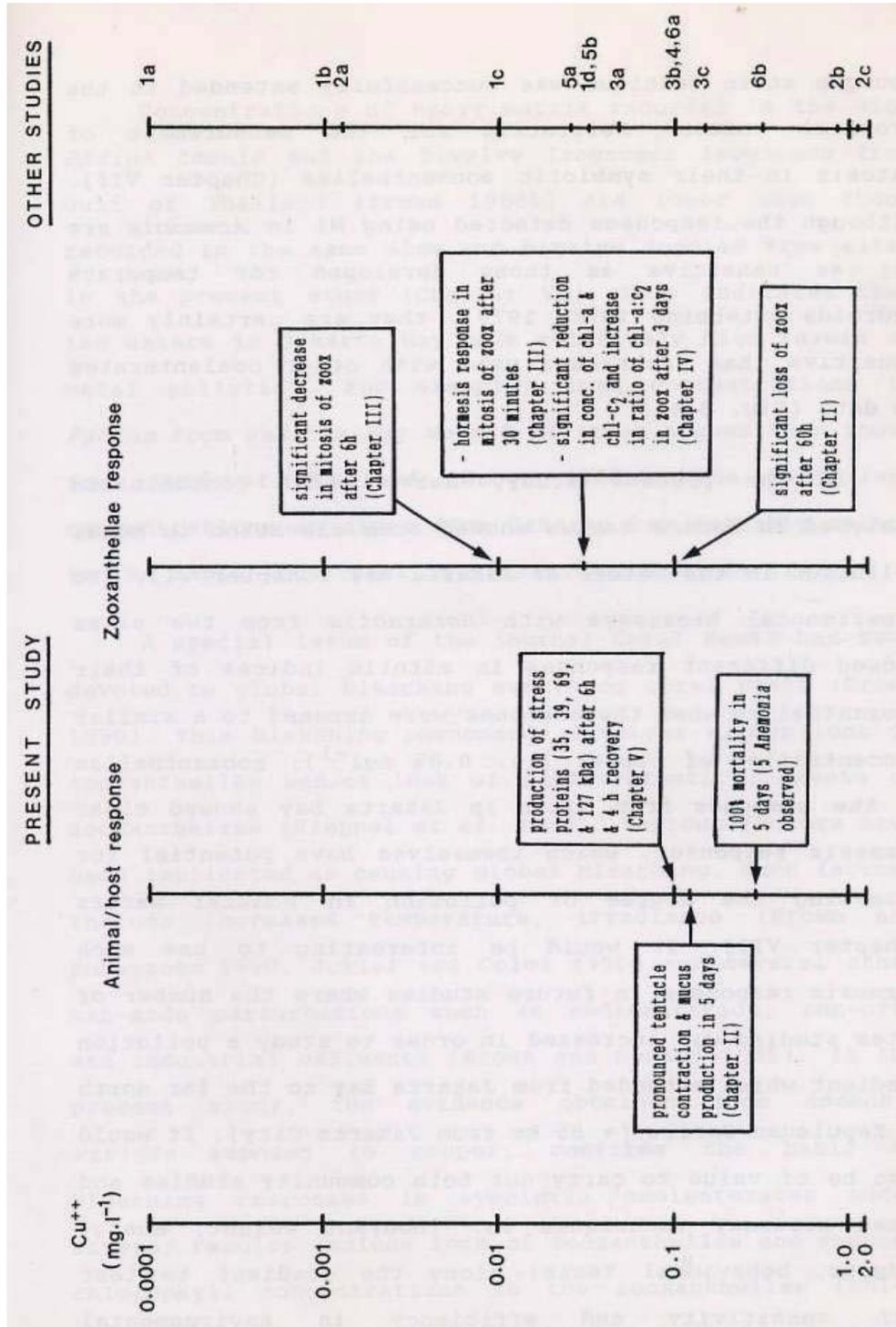
### Kesimpulan

Ekotoksikologi adalah ilmu baru yang berkembang pada akhir abad 21 (Abel dan Axiak 1991); tujuan utama dari ekotoksikologi adalah untuk menilai pengaruh tekanan pada lingkungan termasuk polusi terhadap ekosistem. Axiak (1991) menyatakan bahwa penilaian pengaruh tersebut memerlukan setidaknya dua jenis informasi: informasi mengenai tingkatan dan pengaruh polutan terhadap lingkungan, dan informasi mengenai karakter toksikologis alami polutan pada berbagai tingkatan organisasi biologi. Meskipun data tentang factor-faktor lingkungan (faktor kimia dan fisika) merupakan komponen penting dalam analisis dampak, namun data tentang respon biologis terhadap tekanan atau polutan yang akan membantu menentukan derajat dampak kerusakan biologis yang mungkin terjadi.

Indeks-indeks respon biologis telah dikembangkan oleh sekelompok ahli di Laboratorium Laut Plymouth (*Plymouth Marine Laboratory/PML*), Inggris, untuk mengukur kualitas air (Bayne *et al.* 1985). Indeks-indeks terukur tersebut memiliki rentangan organisasi biologi yang luas seperti molekular, selular, individu, populasi dan komunitas. Beberapa pendekatan biologis ini telah berhasil diaplikasikan pada perairan pantai daerah temperate, contohnya *bioassay* Hidroid hasil klon *Campanularia* yang dikembangkan oleh Stebbing (1976, 1979), 'ruang tumbuh' *Mytilus* oleh Widdows *et al.* (1978, 1982) dan pengaruh komunitas yang dipelajari oleh Warwick, *et al.* (1986, 1990).

Saat ini, indeks-indeks terukur biologis pada coelenterata di daerah temperate *Anemonia viridis* setelah terdedah tembaga, termasuk *assays* pada tingkat molekular, selular dan organisme (dan perbandingannya dengan indeks-indeks terukur lainnya pada coelenterata jenis berbeda yang terdedah tembaga oleh peneliti lain) seperti diringkas pada gambar 8.1. Meskipun beberapa indeks yang didapat pada studi ini kurang tepat dibandingkan dengan penelitian Stebbing di PML (Inggris), namun pengerjaannya menunjukkan bahwa di masa depan penggunaan coelenterata tropis sebagai organisme *bioassay* kualitas air diperlukan. Pengukuran terhadap respon fisiologis terhadap polutan, seperti 'ruang tumbuh', rasio konsumsi oksigen terhadap ekskresi ammonia (Axiak 1991) terbukti berguna untuk interpretasi dampak polutan di ekosistem laut tropis.

Pengukuran mitosis terhadap zooxanthella pada *Anemonia* (menggunakan teknik *squash* dan reaksi *Feulgen staining*) memberikan hasil yang jelas dan pasti jika dibandingkan dengan teknik *cell plate* yang digunakan sebelumnya; hasil yang didapat dengan teknik ini lebih rendah 2 – 3 kali daripada teknik *Feulgen stain* (Bab III). Penggunaan teknik *Feulgen stain* dengan sukses diterapkan pada anemon tropis *Heteractis* untuk pengukuran mitosis pada zooxanthella simbiosisnya (Bab VII). Meskipun respon yang terdeteksi pada penggunaan MI pada *Anemonia* tidak sepeka yang terbentuk pada hydroid temperata (Stebbing 1976, 1979), namun lebih peka daripada teknik yang digunakan dengan coelenterata lainnya sampai saat ini (Gambar 8.1)



Gambar 8.1 Indeks-indeks terukur pada *Anemonia viridis* yang terdedah terhadap tembaga dalam berbagai konsentrasi dan perbandingannya dengan indeks-indeks terukur oleh peneliti lain, terhadap coelenterata tertentu yang terdedah tembaga:

1. Stebbing dan Brown (1984); Respon hydroid *Campanularia flexuosa*: a) peningkatan produksi gonozoid; b) peningkatan aktivitas enzim autolysis; c) adanya inhibisi laju pertumbuhan koloni; d) kematian koloni dalam 2 hari.
2. Walter (tidak dipublikasikan); a) adanya inhibisi pembentukan tunas pada anemon *Aiptasia pallida*; b) 7 hari LC<sub>50</sub> pada *A. pallida*; c) 7 hari LC<sub>50</sub> pada planula bunga karang *Agaricia fragilis*.
3. Esquivel (1986); a) 96 jam LC<sub>50</sub> pada planula bunga karang *Pocillopora damicornis*; b) 48 jam LC<sub>50</sub> pada planula bunga karang *P. damicornis*; c) 24 jam LC<sub>50</sub> pada planula bunga karang *P. damicornis*.
4. Evans III (1971); Kematian bunga karang (*Pocillopora damicornis* dan *Montipora verrucosa*) dalam waktu 24 jam.
5. Howard *et al.* (1986); a) 96 jam LC<sub>50</sub> pada *Montipora verrucosa*; b) penurunan konsentrasi klorofil-a pada zooxanthella (zoox) pada *M. verrucosa* setelah 1 jam terdedah dan 40 hari pemulihan.
6. Heyward (1988); a) setelah 4.5 jam pendedahan tembaga terhadap gamet bunga karang *Favites chinensis*, sekitar 50% gamet terfertilisasi; b) setelah 4.5 jam pendedahan tembaga terhadap gamet bunga karang *F. chinensis*, tidak ada fertilisasi gamet.

Kontaminan berupa logam berat yang teranalisis pada *Padina tenuis* menunjukkan adanya peningkatan polusi logam di perairan Teluk Jakarta (Bab VI). Eksperimen *bioassays* dengan *Heteractis* dari dua lokasi menunjukkan respons yang berbeda pada indeks-indeks mitosis zooxanthella ketika anemon terdedah pada konsentrasi tembaga yang serupa (contoh 0.05 mg l<sup>-1</sup>); zooxanthella pada anemon dari pantai Jakarta menunjukkan respons hormesis yang jelas, dimana zooxanthella tersebut memiliki potensi untuk menaksir derajat polusi pada perairan pesisir (Bab VII). Respons hormesis tersebut sangat menarik untuk digunakan pada penelitian yang akan datang, dimana jumlah lokasi penelitian akan bertambah untuk meneliti gradien polusi yang ada dari Teluk Jakarta sampai Kepulauan Seribu bagian utara (≈ 85 km dari kota Jakarta). Juga akan sangat penting untuk melakukan studi komunitas pada kedua lokasi serta penerapan teknik-teknik *bioassay* lainnya, seperti berat luapan, anggaran energi, dan uji perilaku sepanjang gradient untuk menguji sensitivitas dan efisiensi dalam analisis lingkungan.

Konsentrasi logam berat yang tercatat pada alga *Padina tenuis* dan bivalvia *Isognomon isognomon* dari Teluk Thailand (Brown 1988b) lebih rendah daripada logam berat pada spesies alga dan bivalvia yang sama pada lokasi penelitian ini (Bab VI). Ini menunjukkan bahwa perairan Teluk Jakarta memiliki tingkatan polusi logam yang lebih tinggi. Contohnya, konsentrasi timah pada *Padina* yang berasal dari Teluk Jakarta 8-11 kali lebih tinggi daripada dari Teluk Thailand (Brown 1988b). Tingginya konsentrasi timah pada alga dari Teluk Jakarta mungkin berhubungan dengan cepatnya pertumbuhan industri di Kota Jakarta.

Isu khusus mengenai pemutihan terumbu karang secara global diberitakan dalam jurnal *Coral Reefs* (Brown 1990). Fenomena pemutihan ini disebabkan baik oleh hilangnya zooxanthella dan/atau hilangnya pigmen fotosintesis pada zooxanthella (Kleppel *et al.* 1989). Berbagai faktor telah diimplikasikan sebagai penyebab pemutihan global termasuk kenaikan suhu, pencemaran, perubahan iklim (Brown dan Suharsono 1990, Jokiel dan Coles 1990), dan beberapa gangguan akibat manusia seperti sedimentasi, air larian, dan buangan industri (Brown dan Howard 1985). Pada penelitian ini, hasil penelitian yang didapat dari *Anemonia viridis* yang terdedah tembaga mengkonfirmasi basis respons pemutihan (bleaching) pada coelenterata yang bersimbiosis dibawah tekanan; hasil termasuk hilangnya zooxanthella dan penurunan konsentrasi klorofil pada zooxanthella (chl-a dan chl-c<sub>2</sub>). Disarankan bahwa pengukuran untuk chl-c<sub>2</sub> atau rasio chl-a:chl-c<sub>2</sub> pada zooxanthella merupakan indikator yang potensial untuk menilai respons pemutihan dari coelenterata dalam tekanan yang memiliki alga simbiotik. Indeks-indeks terukur tersebut dalam zooxanthella pada *Anemonia Anemonia* yang terdedah tembaga menjadi lebih sensitive daripada total pengukuran chl-a dan hilangnya zooxanthella.

Sebagai tambahan, dalam studi ini sangat jelas bahwa dengan mengukur protein stres pada *Anemonia* dapat menghasilkan perkiraan analisis polusi lingkungan dan kesehatan coelenterata pada umumnya, karena anemon terdedah kejutan panas (*heat shock*) dan pendedahan terhadap tembaga menghasilkan protein stres yang serupa (35, 39, 69, dan 127 kDa). Hubungan antara produksi stres protein pada inang dan hilangnya zooxanthella masih harus diteliti lebih jauh. Penelitian mendalam diperlukan untuk mengevaluasi fenomena ini. Identifikasi stres protein menjadi area penelitian yang menarik karena protein terinduksi yang berbeda yang dihasilkan *Anemonia* pada studi ini memiliki berat molekuler yang serupa dengan protein pengikat aktin (Craig dan Pollard 1982) yang mungkin terkait dalam induksi kontraksi selular pada *Anemonia* yang menyebabkan hilangnya zooxanthella. Namun hanya penelitian biokimia dan selular yang lebih jauh yang akan menjelaskan sifat dan mekanisme hilangnya zooxanthella, tetapi terdapat kemungkinan untuk penggunaan teknik seperti itu pada penelitian selanjutnya. Sebagai contoh, isolasi protein yang spesifik atau prekursor mRNA dapat digunakan sebagai indikator polusi lingkungan (Anderson 1989).

## Referensi:

- 1) Abel P.D. and Axiak V. (eds)(1991) *Ecotoxicology and the Marine Environment*. Ellis Horwood Ltd., 269 p.
- 2) Achituv Y. and Dubinsky Z. (1990) Evolution and zoogeography of coral reefs. In: *Coral reefs* (edited by Dubinsky Z.), *Ecosystems of the World* 25, pp.1-9. Elsevier.
- 3) Anderson R. (1989) Early warnings of stress. *New Scientist* 122:50-52.
- 4) Anonim (1986) *Laporan Lingkungan Jakarta 1985-1986 Air Sungai*. PPPPL (Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkotaan dan Lingkungan) DKI Jakarta, 94 p.
- 5) Anonim (1991) *Kualitas Lingkungan Indonesia 1991*. KKLH (Kantor Kependudukan dan Lingkungan Hidup), Jakarta, 227 p.
- 6) Atkinson B.G. and Walden D.B. (eds)(1985) *Changes in Eukaryotic Gene Expression in response to Environmental Stress*. Academic Press, New York, 379 p.
- 7) Axiak V. (1991) Sublethal toxicity tests: physiological responses. In: *Ecotoxicology and the Marine Environment* (edited by Abel P.D. and Axiak V.), pp. 132-146. Ellis Horwood Ltd.
- 8) Badr A. and Ibrahim A.G. (1987) Effect of herbicide gleen on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytologia* 52:293-302.
- 9) Badr A., Hamoud M.A. and Haroun S.A. (1985) Effect of the herbicide gespax on mitosis, mitotic chromosomes and nucleic acids in *Vicia faba* L. root meristems. *Proc.Saudi boil.Soc.* 8:359-370.
- 10) Barnard L.A., MacIntyre I.G. and Pierce J.W. (1974) Possible environmental index in tropical reef corals. *Nature* 252:219-220.
- 11) Barnes R.D. (1980) *Invertebrate Zoology*, 4<sup>th</sup> ed. Saunder Colledge, Philadelphia, 1089 p.
- 12) Baszczynty C.L., Walden D.B. and Atkinson B.G. (1985) Maize genome response to thermal shifts. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp.349-371. Academic Press, New York.
- 13) Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingston D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., and Widdows J. (1985) *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, 384 p.
- 14) Becker W.M. (1986) *The World of the Cell*. Benjamin/Cummings, 882 p.
- 15) Blank R.J. and Trench R.K. (1985) Speciation and symbiotic dinoflagellate. *Science* 229:656-658.
- 16) Boney A.D. (1989) *Phytoplankton*. Edward Arnold, 118 p.
- 17) Boon M.E. and Drijver J.S. (1986) *Routine Cytological Staining Techniques, Theoretical Background and Practice*. MacMillan, 238 p.
- 18) Bosch T.C.G., Krylow S.M., Bode H.R. and Steele R.E. (1988) Thermotolerance and synthesis of heat shock proteins: these responses are present in *Hydra attenuate* but absent in *Hydra oligactis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:7927-7931.
- 19) Boyden C.R. (1974) trace element content and body size in mollusks. *Nature* 251:311-314.
- 20) Boyden C.R. (1977) Effect of size upon metal content of shellfish. *J.mar.biol.Ass.UK.* 57:675-714.
- 21) Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254.

- 22) Bradley B.P. and ward J.B. (1989) Detection of a major stress protein using a peptide antibody. *Marine Environ.Res.*28:471-475.
- 23) Brown B.E. (1982) The form and function of metal containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biol Rev.* 57:621-627.
- 24) Brown B.E. (1985) Marine pollution research in South East Asia. *Mar.Pollut.Bull.* 16:95-97.
- 25) Brown B.E. (1986)(ed) Human Induced Damage to Coral Reefs. *Unesco Reports 40, UNESCO,* 179 p.
- 26) Brown B.E. (1987a) Heavy metals pollution on coral reefs. In: *Human Impacts on Coral reefs: Facts and Recommendations* (edited by Salvat S.), pp.119-134. Antene Museum EPHE. French Polynesia.
- 27) Brown B.E. (1987b) Worlwide death of corals – natural cyclical events or man-made pollution. *Mar.Pollut.Bull.* 18:9-13.
- 28) Brown B.E. (1988a) Assessing environmental impacts on coral reefs. *Proc.6<sup>th</sup> Int.Coral reef Symp.* 1:71-79.
- 29) Brown B.E. (1988b) Fate of metals in biota and biological interactions in the tropical coastal zone. In: *Metals in Coastal Environments of latin America* (edited by Seeliger U., deLacerda L.D. and Patchineelam S.R.), pp. 109-121. Springer-Verlag.
- 30) Brown B.E. (1990) (ed) Special issue Coral Bleaching. *Coral Reefs* 8(4). Springer-Verlag, pp.153-232.
- 31) Brown B.E. and Holley M.C. (1982) Metal levels associated with tin dredging and smelting and their effect upon intertidal reef flats at ko Phuket, thailand. *Coral reefs* 1:131-137.
- 32) Brown B.E. and Howard L.S. (1985a) Assessing the effects of 'stress on reef corals. *Adv.mar.Biol.* 22:1-63.
- 33) Brown B.E. and Howard L.S. (1985b) Responses of coelenterates to trace metals: a field and laboratory evaluation. *Proc.5<sup>th</sup> Int. Coral reef Congr.* 6:465-470.
- 34) Brown B.E. and Kumar A.J. (1990) Temporal and spatial variations of tropical bivalves during a dredging event. *Mar.Pollut.Bull.* 21:118-123.
- 35) Brown B.E. and Suharsono (1990) Damage and recovery of coral reefs affected by El-Nino related seawater warming in Thousand Islands, Indonesia. *Coral Reefs* 8:163-170.
- 36) Browne C.L. and Davis L.E. (1977) Cellular mechanisms of stimulation of bud production in Hydra by low levels of inorganic lead compounds. *Cell.Tissue res.* 177:555-570.
- 37) Bryan G.W. (1967) Zinc regulation in the freshwater crayfish (including some comparative copper analyses).*J.exp.Biol.*, 46:282-296.
- 38) Bryan G.W. and Hummerstone L.G. (1971) Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of heavy metals. 1. general observations and adaptation to copper. *J.mar.biol.Ass.UK.*, 51:845-863.
- 39) Bryan G.W. and Hummerstone L.G. (1973) Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *J.mar.biol.Ass.UK.* 53:839-857.
- 40) Caltabiano M.M., Koestler T.P., Poste G. and Greig R.G. (1986) Induction 32- and 34-kDa stress proteins by sodium arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents.*J.Biol.Chem.* 261(28):13381-13386.

- 41) Caltabiano M.M., Poste G. and Greig R.G. (1988) Isolation and Immunological characterization of the mammalian 32/34 kDa stress protein. *Exp.Cell Res.* 178:41-50.
- 42) Campos N.H. (1988) Selected bivalves for monitoring of heavy metal contamination in the Colombian Caribbean. In: *Metals Coastal Environments of Latin America* (edited by Seeliger U, deLacerda L.D. and Patchineelam), pp. 270-275. Springer-Verlag.
- 43) Change S.S., Prezelin B.B. and Trench R.K. (1983) Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Mar.Biol.* 76:219-229.
- 44) Clesceri L.S., Greeberg A.E. and R.R. (eds) (1988) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17<sup>th</sup> ed, APHA (American Public Health Association, AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation), 1379 p.
- 45) Cook C.B. and D'Elia C.F. (1987) Are natural populations of zooxanthellae ever nutrient-limited? *Symbiosis* 4:199-212.
- 46) Cook C.B., D'Elia C.F. and Muller-Parker G. (1988) Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. *Mar.Biol* 98:253-262.
- 47) Cossins A.R. and Bowler K. (1987) *Temperature Biology of Animals*. Chapman and Hall, 339 p.
- 48) Craig S.W. and Pollard T.W. (1982) Actin-binding proteins. *Trends Biochem.Sci. (TIBS)* 7:88-92.
- 49) Craik W., Kenchington R. and Kelleher G. (1990) Coral-reef management. In: *Coral Reefs* (edited by Dubinsky) *Ecosystems of the World* 25, pp.453-467. Elsevier.
- 50) Davies P.S. (1984) The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reefs* 2:181-186.
- 51) Davies P.S. (in press) *Endosymbiosis in marine cnidarians*, 33 p.
- 52) Dawes C.J., Chen C.P., Jewtt-Smith J., Marsh J. and Watts S.A. (1984) Effects of phosphate and ammonium levels on photosynthetic and respiratory responses of the red alga *Gracilaria verrucosa*. *Mar.Biol.* 78:325-328.
- 53) De Robertis E.D.P. and De Robertis Jr.E.M.F. (1987) *Cell and Molecular Biology*, 8th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 734 p.
- 54) Denton G.R.W. and Burdon-Jones C. (1986) Trace metals in corals from the Great Barrier. *Mar.Pollut.Bull.* 17:209-213.
- 55) Deshaies R.J. Koch B.D. and Schekman R. (1988) The role of stress proteins in membrane biogenesis. *Trends Biochem.Sci. (TIBS)* 13:384-388.
- 56) Dodge J.D. (1982) *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. HMSO, London, 303 p.
- 57) Dodge R.E. (1982) Effects of drilling mud on the reef building coral *Montastre annularis*. *Mar.Biol.* 71:14-17.
- 58) Dodge R.E. and Gilbert T.R. (1984) Chronology of lead pollution contained in banded coral skeletons. *Mar.Biol.* 82:9-13.
- 59) Dodge R.E. and Vaisnys J.R. (1975) Hermatypic coral growth as environmental recoder. *Nature* 258:706-709.
- 60) Dodge R.E. and Szmant-Froelich A. (1984) Effects of drilling fluids on reef corals: a review. In: *Wastes in the Ocean* (edited by Duedall I.W., Kester D.R., Parl P.W. and Ketchum B.H.). John Wiley and Sons, New York.

- 61) Dustan P. (1982) Depth-dependent photoadaptation by zooxanthellae of the reef coral *Montastrea annularis*. *Mar. Biol.* 68:253-264.
- 62) Edmunds P.J. and Davies P.S. (1986) An energy budget for *Porites porites* (Scleractinia). *Mar. Biol.* 92:339-347.
- 63) Esquivel I. (1986) Short term copper bioassay on the planula of the reef coral *Pocillopora damicornis*. Hawaii Institute of Marine Biology. Technical Reports 37:465-472.
- 64) Evans L.V. (1988) Marine biofouling. In: *Algae and Human Affairs* (edited by Lembi C.A. and Waaland J.R.) pp. 433-453. Cambridge Univ. Press.
- 65) Evans III E.C. (1977) Microcosm responses to environmental perturbants. An extension of baseline field survey. *Helgolander wiss.Meersunter.*30:178-191.
- 66) Falkowski P.G. (1980) Light-shade adaptation in Marine Phytoplankton. In: *Primary Productivity in the Sea* (edited by Falkowski P.G.), pp. 99-119. Plenum Press, New York.
- 67) Falkowski P.G. and Dubinsky Z. (1981) Light-shade adaptation of *Stylophora pistilla*, a hermatypic coral from the Gulf of Eilat. *Nature* 289:172-174.
- 68) Fankboner P.V. and Reid R.G.B. (1981) Mass expulsion of zooxanthellae by heat-stressed reef corals: a source of food for giant clam?. *Experientia* 37:251-252.
- 69) Ganning B. (1966) Short-term fluctuations of the microfauna in rock pool in the northern Baltic proper. *Veroff.Inst.Meeresforsch.Bremeh. (Sonderbad)* 2:149-154.
- 70) Gates R. (1990) Seawater Temperature and Algal-Cnidarian Symbiosis. PhD Thesis, The Univ. of Newcastle upon Tyne, UK., 196 p.
- 71) Gates R. and Brown B.E. (1985) The 'loss' of zooxanthellae in the sea anemone *Anemonia viridis* (Forsskal) under stress. *Proc.5<sup>th</sup> Int.Coral Reef Congr.* 2:143.
- 72) Gates R.D. (1990) Seawater temperature and sublethal coral bleaching in Jamaica. *Coral reefs* 8:193-197.
- 73) George S.G. and Coombs T.L. (1977) Effects of high stability iron-complexes on the kinetics of iron accumulation and excretion in *Mytilus edulis* (L). *J.exp.mar.Biol.Ecol.* 28:133-140.
- 74) Giudice G. (1985) heat shock proteins in sea urchin development. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp 115-133. Academic Press, New York.
- 75) Glynn P.W. (1983) Extensive bleaching and death of reef corals on the Pacific Coast of Panama. *Environ.Conserv.* 10:149-154.
- 76) Glynn P.W. (1984) Widespread mortality and the 1982-83 El Nino warming event. *Environ.Conserv.* 11:133-146.
- 77) Goh B.P.L. (1991) Mortality and settlement success of *Pocillopora damicornis* planula larvae during recovery from low level of nickel. *Pac.Sci.* 45:272-286.
- 78) Goh B.P.L. (1988) The development of a Marine Bioassay for the Oil Dispersant Corexit 9527 Using the algal/Coelenterate Symbiosis. M.Sc Thesis in Tropical Coastal Management. The Univ. of Newcastle upon Tyne, UK., 65 p.
- 79) Goreau T.F. (1964) Mass expulsion of zooxanthellae from Jamaican reef communities after Hurricane Flora. *Science* 145:383-386.

- 80) Govindjee G. and Braun B.Z. (1974) Light absorption, emission and photosynthesis. In: Algal Physiology and Biochemistry (edited by Stewart W.D.P.) Botanical Monographs Volume 10, pp. 346-390. Blackwell Sci. Publ.
- 81) Graneli E., and Sundback K (1984) The response of planktonic and microbenthic algal assemblages to nutrient enrichment in shallow coastal waters, southwest Sweden. *J.exp.mar.Biol.Ecol.* 85:253-268.
- 82) Grigg R.W. and Dollar S.J. (1990) Natural and anthropogenic disturbance on coral reefs. In: Coral Reefs (edited by Dubinsky Z.), *Ecosystems of the World* 25, pp.439-452. Elsevier.
- 83) Hale W.J. and Margham J.P. (1988) *Dictionary of Biology*. Collins Reference, Glasgow, 567 p.
- 84) Hall D.O. and Rao R. (1989) *Photosynthesis*. 4<sup>th</sup> ed. Edward Arnold, 122 p.
- 85) Harland A.D. (1990) Metal Regulation by Coelenterates. M.Phil.Thesis in Marine Biology. The Univ.of Newcastle upon Tyne, UK., 69 p.
- 86) Harland A.D. and Brown B.E. (1989) Metal tolerance in the scleractinian coral *Porites lutea*. *Mar.Pollut.Bull.* 20:353-357.
- 87) Harland A.D. and Nganro N.R. (1990) Copper uptake by the sea anemone *Anemonia viridis* and the role of zooxanthellae in metal regulation. *Mar.Biol.* 104:297-301.
- 88) Haywood M. and Wells S. (1989) *The Manual of Marine Invertebrates*. Salamander Book, 208 p.
- 89) Heikkila J.J., Miller J.G.O, Schultz G.A., Klock M. and Browder L.W. (1985) heat shock gene expression during early animal development. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in response to Environmental stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.) pp.135-181. Academic Press, New York.
- 90) Hellawell J.M. (1986) *Biological Indicators of Freshwater Pollution and Environmental Management*. Elsevier, 546 p.
- 91) Heyward A.J. (1988) Inhibitory effects of copper and zinc sulphates on fertilization in corals. *Proc.6<sup>th</sup> Int.Coral Reef Symp.* 2:299-303.
- 92) Hightower L.E., Guidon Jr.P.T., Whelan S.A. and White C.N. (1985) Stress responses in avian and mammalian cells. In: *Change in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental stress* (edited by Atkinson B.G. and Wakled D.B.), pp. 197-210. Academic Press, New York.
- 93) HMSO (1983) *The Determination of Chlorophyll a in Aquatic Environments*. London Her Majesty's Stationary Office, 23 p.
- 94) Hoegh-Guldberg O. and Smith G.J. (1989a) Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. *Mar Ecol.Prog.Ser.* 57:173-186.
- 95) Hoegh-Guldberg O., McCloskey L.R. and Muscatine (1987) Expulsion of zooxanthellae by symbiotic cnidarians from the Red Sea. *Coral reefs* 5:201-204.
- 96) Howard L.S. and Brown B.E. (1984) Heavy metals and reef corals. *Oceanogr.Mar.Biol.Ann.Rev.* 22:195-210.
- 97) Howard L.S. and Brown B.E. (1986) Metals in the tissues and skeleton of *Fungia* fungites from Phuket, Thailand. *Mar.Pollut.Bull.* 17:569-570.
- 98) Howard L.S. and Brown B.E. (1987) Metals in *Pocillopora damicornis* exposed to tin smelter effluent. *Mar.Pollut.Bull.* 18:451-454.

- 99) Howard L.S., Crosby D.G. and Alino P. (1986) Evaluation of some methods for quantitatively assessing the toxicity of heavy metals to corals. Hawaii Institute of Marine Biology. Technical Report 37:452-464.
- 100) Hudson J.W. and Robbin D.M. (1980) Effects of drilling mud on the growth rate of the reef-building coral *Montastrea annularis*. Proc.Symp.Res Environ. Fate and Effects of Drilling Fluids and Cutting Lake Buena Vista Florida 2:1101-1122.
- 101) Hutagalung H.P. (1987) Mercury content in the water and marine organisms in angke Estuary, Jakarta Bay, Bull Environ.Contam.Toxicol. 39:406-411.
- 102) Hutagalung H.P. (1989) Mercury and cadmium content in green mussel, *Mytillus viridis* L. from Onrust waters, Jakarta Bay. Bull.Enviroin.Contam.Toxicol.42:814-820.
- 103) Hutagalung H.P. and Syamsu S. (1987) Heavy metal content in some seafoods collected from Muara Angke Auction Place, Jakarta. Mar.Res.Indonesia 26:51-58.
- 104) Hutomo M. and Adrim M. (1986) Distribution of fish along transects in Bay of Jakarta and Kepulauan Seribu. In: Human Induced damage to Coral Reefs (edited by Brown B.E.), pp.135-156. Unesco reports 40.
- 105) Jaap W.C. (1979) Observations on zooxanthellae expulsion at Middle sambo Reef, Florida Keys. Bull.Mar.Sci. 29:414-422.
- 106) Jackson J.B.C., Cubit J.D., Keller B.D., Batista V., Burns K., Caffey H.M., Caldwell R.L., Garrity S.D., Getter C.D., Gonzalez C., Guzman H.M., Kaufmann K.W., Knap A.H., Levings S.C., Marshall M.J., Stegar R., Thomson R.C. and Weil E. (1989) Ecological effects of a major oil spill on Panamanian coastal marine communities. Science 243:37-44.
- 107) Jakoby W.B. (ed) (1980) Enzymatic Basis of Detoxication. Academic Press, New York, 2 vols, 784 p.
- 108) Jeffrey S.W. (1969) Properties of two spectrally different components in chloropyll c preparations. Biochem.Biophys.Acta 177:459-467.
- 109) Jeffrey S.W. (1972) Preparation and some properties of crystalline chlorophyll c1 and c2 from marine algae. Biochem.Biophys. acta 279:15-33.
- 110) Jeffrey S.W. (1989) Chlorophyll c pigments and their distribution in the chrophyte algae. In: The Chlorophyte algae: Probelems and Perspectives (edited by Green J.C., Leadbeater B.S.C. and Diver W.L.), Sistematics Association Special Volume 38, pp.13-36. Claredon Press, Oxford.
- 111) Jeffrey S.W. and Haxo F.T. (1968) Photosynthetic pigments of symbiotic dinofalgellates (zooxanthelae) from corals and clams. Biol.Bull. 135:149-165.
- 112) Jeffrey S.W. and Humphrey G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem.Physiol. Pflanzen (BPP), Bd. 167:191-194.
- 113) Johannes R.E. (1975) Pollution and degradation of coral reef communities. In: Tropical Marine Pollution (edited by Wood E.J.F. and Johannes R.E.), pp. 593-595.
- 114) Johannes R.E. (1983) Coral reefs. In: Coastal Ecosystem Management (edited by Clark J.R.), pp 593-595. Robert E. Krieger Co., Florida.
- 115) Jokiel P.L. and Coles S.L. (1974) Effects of heated effluent on hermatypic corals at Kahe Point Oahu. Pac.Sci. 22:1-18.

- 116) Kassenbrock C.K., Garcia P.D., Walter P. And Kelly R.B. (1988) Heavy-chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translocated in vitro. *Nature* 333:90-93.
- 117) Key J.J., Kimpel j., Vierling E., Lin C., Nagao R.T., Czarnecka E. and Schoffl F. (1985) Physiological and molecular analyses of the heat shock response in plants. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp.327-348. Academic Press, New York.
- 118) Kinzie III R.A., Jokiel P.L. and York R. (1984) Effects of light of altered spectral composition on coral zooxanthellae association and on zooxanthellae in vitro. *Mar.Biol.*78:239-248.
- 119) Kircherr H., Beyersmann D. and Rensing L. (1990) Cadmium (II) induces a 32 kDa stress protein in Chinese hamster ovary cells which is associated with a high molecular weight protein. *Eur.J.Cells Biol.Supp* 30(51), (abstract).
- 120) Kirk J.T.O (1986) *Light and Photosynthesis in aquatic Ecosystem.* Cambridge Univ.Press, 401 p.
- 121) Kleppel G.S., Dodge R.E. and Reese C.J. (1989) Changes in pigmentation associated with the bleaching of stony corals. *Limnol.Oceanogr.*34(7):1331-1335.
- 122) Koyasu S., Nishida E., Kadowaki T., Matsuzaki F., Iida K., Harada F., Kasuga M., Sakai H. And Yahara I. (1986) Two mammalian heat shock proteins, hsp90 and hsp100, are actin-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83:8054-8058.
- 123) Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 124) Landolt M.L. and Kocan R.M. (1983) Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutions. In: *Aquatic Toxicology* (edited by Nriagu J.O.), pp. 335-353. John Wiley & Sons.
- 125) Lanks K.W. (1986) Modulators of the eukaryotic heat shock response. *Exp.Cell Res.* 165:1-10.
- 126) Lee A.S. , Bell J. and Ting J. (1984) Biochemical characterization of the 94- and 78-kilodalton glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts. *J.Biol.Chem.*259 (7):4616-4621.
- 127) Lesser M.P., Stochaj W.R., Tapley D.W. and Shick J.M. (1990) Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* 8:225-232.
- 128) Lewin R.A. (1974) *Biochemical Taxonomy.* In: *Algal Physiology and Biochemistry* (edited by Stewart W.D.P.). Botanical Monographs Volume 10, pp. 1-39. Blackwell Sci.Publ.
- 129) Lindquist S. and Craig E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu.Rev.Genet.* 22:631-677.
- 130) Lindquist S. and DiDomenico B. (1985) Coordinate and noncoordinate gene expression during heat shock: a model for regulation. In *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp.71-90. Academic Press, New York.
- 131) Mann K.H. (1982) *Ecology of Coastal Waters.* Univ.of California Press, Berkeley & Los Angeles, 322 p.
- 132) McAuley P.J. (1982) Temporal relationships of host cell and algal mitosis in the green hydra symbiosis. *J.Cell Sci.* 58:423-431.

- 133) McAuley P.J. (1985a) The cell cycle of symbiotic *Chlorella* I. The relationship between host finding and algal cell growth and division. *J. Cell Sci.* 77:225-239.
- 134) McAuley P.J. (1985b) The cell cycle of symbiotic *Chlorella* II. The effect of continuous darkness. *J. Cell Sci.* 77:241-253.
- 135) McAuley P.J. (1986) Isolation of viable uncontaminated *Chlorella* from green hydra. *Limnol Oceanogr.* 31:222-224.
- 136) McLennan A.G. and Miller D. (1990) A biological role for the heat shock response in crustaceans. *J. therm. Biol.* 15(1):61-66.
- 137) Meeks J.C. (1974) Chlorophylls. In: *Algal Physiology and Biochemistry* (edited by Stewart W.D.P.). Botanical Monographs Volume 10, pp. 161-175. Blackwell Sci. Publ.
- 138) Menasteva P. and Chevapanapivat P. (1981) Heavy metals, organochlorine pesticides and PCB in green mussels, mullets and sediments of river mouths in Thailand. *Mar. Pollut. Bull.* 12:19-25.
- 139) Michel W.C. and Fitt W.K. (1984) Effects of a water-soluble fraction of a crude oil on the coral reef hydroid *Myrionema hargitii*: feeding, growth and algal symbionts. *Mar. Biol.* 84:143-154.
- 140) Miller D. (1989) Heat shock proteins to the rescue. *New Scientist* 122:47-50.
- 141) Miller D. and McLennan A.G. (1988a) The heat shock response of the cryptobiotic brine shrimp *Artemia*-I. A comparison of the thermotolerance of cysts and larvae. *J. therm. Biol.* 13(3):119-123.
- 142) Miller D. and McLennan A.G. (1988b) The heat shock response of the cryptobiotic brine shrimp *Artemia*-II. Heat shock proteins. *J. therm. Biol.* 13(3):125-134.
- 143) Mitchison T.J. (1989) Mitosis –from molecular to machine. *Amer. Zool.* 29:523-539.
- 144) Moll H. and Suharsono (1986) Distribution, diversity and abundance of reef corals in Jakarta Bay and Kepulauan seribu. In: *Human Induced Damage to Coral Reefs* (edited by Brown B.E.), pp. 112-125. Unesco reports 40.
- 145) Morimoto R., Tissres A. and Georgopoulos C. (1990) (eds) *Stress Proteins in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Lab. Press, 450 p.
- 146) Muller-Parker (1987) seasonal variation in light-shade adaptation of natural populations of symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella* (Calgren, 1943) in Hawaii. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 112:165-183.
- 147) Munro S. and Pelham H.R.B. (1986) An hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46:291-300.
- 148) Muscatine L. (1967) Glycerol excretion of symbiotic algae from corals and *Tridacna* and its control by the host. *Science* 156:516-519.
- 149) Muscatine L. (1980) Productivity of zooxanthellae. In: *Primary Productivity in the Sea* (edited by Falkowski P.G.), pp.381-402, Plenum Press, New York.
- 150) Muscatine L. (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In: *Coral Reefs* (edited by Dubinsky Z.). *Ecosystem of the World* 25, pp.75-87. Elsevier.
- 151) Muscatine L., McCloskey L.R. and Loya Y. (1985) A comparison of the growth rate of zooxanthellae animal tissue in the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. *Proc. 5<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp.* 6:119-123.

- 152) Muscatine L., McClosekey L.R. and Marian R.E. (1981) Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral annual respiration. *Limnol.Oceanogr.* 26(4):601-611.
- 153) Nandan D., Ball E.H. and Sanwal B.D. (1989) Two stress proteins of the endoplasmic reticulum bind denaturated collagen. *Biochem.Cell Biol.* 68:1057-1061.
- 154) Nganro N.R. (1988) The Development of a Marine Bioassay to Assess the Effects of Stress in Coelenterates. M.Sc. Thesis in Tropical Coastal Management, the Univ.ofNewcastle upon Tyne, UK., 48 p.
- 155) Nieboer E. and Shaw S.L. (1988) Mutagenic and other genotoxic effects of chromium compounds. In: *Chromium in the Natural and Human Environments* (edited by Nriagu J.O. and Nieboer E.), pp. 399-441.
- 156) Nienhuis P.H. (1986) Background levels of heavy metals in nine tropical seagrass species in Indonesia. *Mar.Pollut.Bull.* 17:508-511.
- 157) O'Kelley J.C. (1974) Inorganic nutrients. In: *Algal Physiology and Biochemistry* (edited by Stewart W.D.P.). Botanical Monographs volume 10, pp. 610-635. Blackwell Sci. Publ.
- 158) Ongkosongo O.S.R. (1991) Human activities, environmental problems and management of the north coast of West Java, Indonesia, with the emphasis in the Jakarta Bay. The Interregional Scientific COMAR Conference on Coastal System Studies and Sustainable Development, Unesco-SCOR-IABO, Paris, May 1991, 23 p.
- 159) Ongkosongo O.S.R. and Sukarno (1986) Background to the study sites in the Bay of Jakarta and Kepulauan Seribu. In: *Human Induced Damage to Coral Reefs* (edited by Brown B.E.), pp.56-79. Unesco reports 40.
- 160) Ono B.I. (1988) Genetic approaches in the study of chromium toxicity and resistance in yeast and bacteria. In: *Chromium in the Natural and Human Environments* (edited by Nriagu J.O and Nieboer E.), pp. 351-368.
- 161) Palmer C.M. (1964) Algae in water supplies of the United States. In: *Algae and Man* (edited by Jackson D.F.), pp. 351-368.
- 162) Pantin C.F.A (1962) *Notes on Microscopical Technique for Zoologists*, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge Press, 76 p.
- 163) Parry E.M., Hague A. and Parry J.M. (1990) A study of mitotic division fidelity and numerical chromosome changes in ageing Syrian hamster dermal cells. *Mutation Res.* 237:83-93.
- 164) Pearse V.B. (1974) Modification of sea anemone behavior by symbiotic zooxanthellae: phototaxis. *Biol.Bull.* 147:630-640.
- 165) Pearse V.B. and Muscatine L. (1971) Role of symbiotic algae (zooxanthellae in coral calcification). *Biol.Bull.* 141:350-363.
- 166) Pelham H.R.B. (1986) Speculation on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46:956-961.
- 167) Pfister L.A and Anderson D.M. (1987) Dinoflagellate reproduction. In: *The Biology of Dinoflagellates* (edited by Tylor F.J.R.) pp. 611-648. Blackwell Sci. Publ.
- 168) Phillips D.J.H (1977) The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments: a review. *Environ. Pollut.* 12:281-317.
- 169) Phillips D.J.H. (1980) *Quantitative Aquatic Biological Indicators*. Applied Science Publishers, London, 488 p.

- 170) Phillips D.J.H. and Yim W.W.S. (1981) A comparative evaluation of oysters, mussels and sediments as indicators of trace metals in Hongkong waters. *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 6:285-293.
- 171) Plant A.L., Brzgys M.V., Locasio-Brown L. and Durst R.A. (1989) Generic liposome reagent for immunoassays. *Anal Biochem.* 176:420-426.
- 172) Pollard T.D. and Cooper J.A. (1986) actin and Actin-binding proteins, a critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann.Rev.Biochem.* 55:987-1035.
- 173) Porter J.W., Muscatine L., Dubinsky Z. And Falkowski P.G. (1984) Primary production and photoadaptation in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral, *Stylophora pistillata*. *Proc.R.Soc.Lond.Ser.B.* 222:161-180.
- 174) Rai L.C., Gaur J.P. and Kumar H.D. (1981) Phycology and heavy-metal pollution. *Biol.rev.*56:99-151.
- 175) Retovsky R. and Klasterka I. (1961) Study of the growth and development of *Chlorella* populations in the culture as a whole. The influence of MgSO<sub>4</sub> on autospore formation. *Folia Micriol.* 6:142-149.
- 176) Rinkevich B. and Loya Y. (1983) Oriented translocation of energy in grafted reef corals. *Coral Reefs* 1:243-247.
- 177) Robertson J.M., Yeung E.C., Reid D.M. and Hubick K.T. (1990) Developmental responses to drought and abscisic acid in sunflower roots. *J.exp.Bot.* 41(224):339-350.
- 178) Rothman J.E. and Schmid S.L. (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46:5-9.
- 179) Rowan R. and Powers D.A. (1991a) A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251:1348-1351.
- 180) Rowan R. and Powers D.A. (1991b) A molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Mar.Ecol.Prog.Ser.* 71:65-73.
- 181) Roy A.K., Sharma A. and Talukder G. (1986) A time-course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*. *Mutation Res.* 227:221-226.
- 182) Schlesinger M.J. (1985) Stress responses in avian cells, In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp. 183-195. Academic Press, New York.
- 183) Schlesinger M.J. (1986) Heat shock proteins: the search for functions. *J.Cell Biol.* 103:321-325.
- 184) Schuh S., Yonemoto W., Brugge J., Bauer V.J., Riehl R.M., Sullivan W.P. and Taft D.O. (1985) A 90,000 – Dalton binding protein common to both steroid receptors and the rous sarcoma virus transforming protein, pp60v-src. *J.Biol.Chem.* 260:14292-14296.
- 185) Scoffin T.P. (1986) Banding in coral skeletons from Pulau sribu as revealed by x-rays and u/v light analysis. In: *Human Induced Damage to Coral Reefs* (edited by Brown B.E.), pp.126-134. *Unesco reports* 40.
- 186) Sharp V.A. (1991) The molecular and Cellular Heat Shock Responses of *Amonia viridis* and its endosymbiotic zooxanthellae. B.Sc. Final Honours Project in Marine Biology. The Univ. of Newcastle upon Tyne, UK., 83 p.
- 187) Shen G.T. and Boyle E.A. (1987) Lead in corals: reconstruction of historical industrial fluxes to the surface ocean. *Earth Palnet Sci.Lett.* 82:289-304.

- 188) Shen G.T. and Boyle E.A. (1988) Determination of lead, cadmium and other trace metals in annually-banded corals. *Chem.Geol.* 67:47-62.
- 189) Shen G.T., Boyle E.A. and Lea D.W. (1987) Cadmium in corals as a tracer of historical upwelling and industrial fallout. *Nature* 328:794-796.
- 190) Sivaramakrishnan S., Patell V.Z. and Soman P. Heat shock proteins of sorghum (*sorghum bicolor* L.Moench) and pearl millet (*Pennisetum galaukum* L. R.Br.) cultivars with differing heat tolerance at seedling establishment stage. *J.exp.Bot.* 41 (223), 249-254.
- 191) Sivalingam P.M. (1978) Biodeposited trace metals and mineral content studies of some tropical marine algae. *Botanica mar.* 21:327-330.
- 192) Smith D.C. and Douglas A.E. (1987) *The Biology of Symbiosis*. Edward Arnold., 302 p.
- 193) Smith S.V. (1977) Kaneohe Bay: A preliminary report on the responses of a coral reef/estuary ecosystem to relaxation of sewage stress. *Proc.3<sup>rd</sup> Int.Coral Reef symp.* 2:578-583.
- 194) Smith S.V., Kimmerer W.J. Laws E.A., Brock R.E. and Walsh T.W. (1981) Kaneohe Bay sewage diversion experiment: perspectives on ecosystem responses to nutritional perturbation. *Pac.Sci.* 35:279-396.
- 195) Southgate R., Mirault M.E., Ayme A. and Tissieres A. (1985) Organization, sequences and induction of heat shock genes, In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress* (edited by Atkinson B.G. and Walden D.B.), pp.3-30. Academic Press, New York.
- 196) Soegiarto A. (1980) The present state of mangrove ecosystem in S.E.Asia, and the impact of pollution – Indonesia. *SCSFD & CP.SCS/80/WP(\$a, FAO, UNEP, Rome, 25 p.*
- 197) Spangenberg D.B., Ives K. and Patten M. (1980) Strobilation aberrations in *Aurelia* induced by aniline and phenol. In: *Developmental and Cellular Biology of Coelenterates* (edited by Tardent P. and Tardent R.), pp.263-269. Elsevier.
- 198) St.John B.E. (1973) Trace elements in corals of the Coral Sea and their relationship to oceanographic factors. In: *Proc.Int.Symp. Oceanography of the South Pacific*, Wellington, UNESCO, pp.149-158.
- 199) Stebbing A.R.D. (1976) The effects of low metal levels on a clonal hydroid. *J.mar.biol.Ass.UK.* 56:977-994.
- 200) Stebbing A.R.D. and Brinsley M.D. (1985) The effects of load and stress induced by cadmium on the growth of a yeast. In: *Marine Biology of the Polar regions and Effects of Stress on Marine Organisms* (edited by Gray J.S. and Christiansen M.E.), pp. 577-583. John Wiley and Sons.
- 201) Stebbing A.R.D. (1979) An experimental approach to determinants of biological water quality. *Phil. Trans. R.Soc.Lond.* 286:465-481.
- 202) Stebbing A.R.D. (1980) Increase in gonozooid frequency as adaptive response to stress in *campanularia flexuosa*. In: *Developmental and Cellular Biology of Coelenterates* (edited by Tardent P. and Tardent R.), pp. 27-32. Elsevier.
- 203) Stebbing A.R.D. (1981a) Hormesis-Stimulation of colony growth in *Cmpanularia felxuosa* (Hydrozoa) by copper, cadmium and other toxicants. *Aquatic Toxicology* 1:227-238.
- 204) Stebbing A.R.D. (1981b) Stress, Health and Homeostasis. *Mar.Pollut.Biol.* 12:326-329.

- 205) Stebbing A.R.D and Brown B.E. (1984) Marine ecotoxicological tests with coelenterates. In: Ecotoxicological Testing for the Marine Environment (edited by Persoone G., Jaspers F. and Claus C.) State Univ. Ghent & Inst.Mar.Scient.Res.Bredene, Belgium. 1:307-339.
- 206) Stebbing A.R.D., Akesson B., Calabrese A., Gentile J.H., Jensen A. and Lloud R. (1980) The role of bioassays in marine pollution monitoring (Bioassay panel report).Rapp.P.-v.Reun. Cons.int.Exlor.Mer. 179:322-332.
- 207) Steele R.D. (1975) Stages in the life history of a symbiotic zooxanthellae in pellets extruded by its host *Aiptasia tagetes* (Duch. And Mich.) (Colenterata, Anthozoa).Biol Bull. 149:590-600.
- 208) Steele R.D. (1976) Light intensity as a factor in regulation of the density of symbiotic zooxanthellae in *Aiptasia tagetes*. J.Zool.Lond. 179:387-405.
- 209) Steele R.D. (1977) The significance of zooxanthellae containing pellets extruded by sea anemones. Bull.Mar.Sci. 27:591-594.
- 210) Steeman-Nielson and Wium-Anderson (1970) Copper ions as poisons in the sea and freshwater. Mar.Biol.6:93-97.
- 211) Steen R.G. (1987) Evidence for facultative heterotrophy in cultured zooxanthellae. Mar. Biol. 95:15-23.
- 212) Steen R.G. and Muscatine L. (1987) Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. Biol.Bull. 172:246-263.
- 213) Stoddart D.R. (1986) Umbgrove's islands revisited. In: Human Induced Damage to Coral Reefs (edited by Brown B.E.), pp. 80-98. Unesco reports 40.
- 214) Stryer L. (1988) Biochemistry, 3<sup>rd</sup> ed. W.H.Freeman. New York, 949 p.
- 215) Suharsono (1984) Kematian alami karang di Laut Jawa. Oceana IX(1):31-40.
- 216) Suharsono (1990) Ecological and Physiological Implication of Coral Bleaching at Pari Island, Thousand Islands, Indonesia. Ph.D. Thesis, the Univ. of Newcastle upon Tyne, UK., 279 p.
- 217) Szmant-Froelich A. and Pilson M.E.Q. (1984) Effects of feeding frequency and symbiosis with zooxanthellae on nitrogen metabolism and respiration of the coral *Astrangia danae*. Mar.Biol.81:153-162.
- 218) Taketani S., Kohno H., Yoshinaga T. And Tokunaga R. (1989) The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters 245(12):173-176.
- 219) Taylor D.L. (1967) The pigments of the zooxanthellae symbiotic with the intertidal anemone, *Anemonia sulcata*. J.Phycol.3:238-240.
- 220) Taylor D.L. (1968) In-situ studies on the cytochemistry and ultrastructure of a symbiotic marine dinoflagellate. J.mar.biol.Ass.UK. 48:349-366.
- 221) Tebbutt T.H.Y. (1991) Principles of Water Quality Control. 3<sup>rd</sup> ed. Pergamon Press, 235 p.
- 222) Thompson J.H. and Bright T.J. (1977) Effects of drill mud on sediment clearing rate of certain hermatypic corals. Proc.1977 Oil Spill Conf., pp. 295-298.
- 223) Thompson J.H. Shinn E.A. and Bright T.J. (1980) Effects of drilling mud on seven species of reef-building corals as measured in the field and laboratory. Elsevier Oceanogr.Ser. 27A:413-432.

- 224) Trench R.K. (1971) The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. *Proc.R.Soc.Lond.Ser.B* 177:225-264.
- 225) Trench R.K. (1979) The cell biology of plan-animal symbiosis. *Ann.rev.Plant Physiol.*30:485-531.
- 226) Warwick R.M. (1986) A new method for detecting pollution effects on marine macrobenthic communities. *Mar.Biol.* 92:557-562.
- 227) Warwick R.M., Clarke K.R. and Suharsono (1990) A statistical analysis of coral community responses to the 1982-83 El Nino in the Thousand Islands, Indonesia. *Coral-Reefs* 8:171-179.
- 228) Welch W.J. and Feamisco J.R. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000-Dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol.Cell.Biol.* 5(6):1229-1237.
- 229) Wetzel R.G. and Likens G.E. (1979) *Limnological Analyses*. W.B. Saunders, 357 p.
- 230) Wittaker S.G., Zimmermann F.K., Dicus B., Piegorsch W.W., Resnick M.A and Fogel S. (1990) Detection of induced mitotic chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* – an interlaboratory assessment of 12 chemicals. *Mutation res.* 241:225-242.
- 231) Widdows J. (1978) Physiological indices of stress in *Mytilus edulis*. *J.mar.biol.Ass.UK.* 58:125-142.
- 232) Widdows J., Bakke T., Bayne B.L., Donkin P., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Evans S.V. and Moore S.L. (1982) Responses of *Mytilus edulis* on exposure to water-accomodated fractions of North Sea Oil. *Mar. Biol.* 67:15-31.
- 233) Wilkerson E.P., Muller-Parker G. and Muscatine L. (1983) Temporal patterns of cell division in natural populations of endosymbiotic algae. *Limnol.Ocenogr.* 28(5):1009-1014.
- 234) Wilkerson E.P., Kobayashi D. and Muscatine L. (1988) Mitotic index and size of symbiotic algae in Caribbean reef corals. *Coral Reefs* 7(1):29-36.
- 235) Willoughby N.G. (1986a) Man-made litter on the shores of Thousand Island Archipelago, Java. *Mar.Pollut.Bull.* 17:224-228.
- 236) Willoughby N.G. (1986b) Man-made flotsam on the strand-lines of the Thousand Islands (Kepulauan Seribu) Jakarta, Java. In: *Human Induced Damage to Coral Reefs* (edited by Brown B.E.), pp.157-171. Unesco reports 40.
- 237) Young C.M. (1930) Studies on the physiology of coral I. Feeding mechanisms and food. *Sci.Rep. Great Barrier Reef Exped. 1920-1929*, Br.Mus. (Nat.Hist.) 1:13-57.
- 238) Young C.M. and Nicholls (1931) Studies on the physiology of corals V. The effect of starvation in light and in darkness on relationship between corals and zooxanthellae. *Sci.Rep. Great Barrier Reef Exped. 1920-1929*, Br.Mus. (Nat.Hist.) 1 (6):13-57.
- 239) Young R.A. (1990) Stress proteins and immunology, *Ann.Rev.Immunol.* 8:401-420.
- 240) Zamani N.P. (1991) The use and measurement of Mitotic Index of Zooxanthellae as a Bioassay Tool. M.Sc. Thesis in Tropical Coastal Management. The Univ.of Newcastle upon Tyne, UK., 49 p.
- 241) Zwiazek J.J. and Shay J.M. (1988) Effect of sodium fluoride treatments on the mitotic cycle of root-tip cells in jack pine seedlings. *Can.J.Bot.* 67:1606-1608.