

Pengaruh Paparan Chlorine terhadap Stress Fisiologis dan Ekspresi Gen Hsp70 dan Hsp90 pada Abalon (*Haliotis squamata*)

Ngurah Sedana Yasa^{1*}, Lutfi Anshory¹, Niken S.N. Handayani², Alim Isnansetyo³, Murwantoko³

¹Balai Produksi Induk Udang Unggul dan Kekerangan, Kementerian Kelautan dan Perikanan
Jl. Tambak Udang, Desa Bugbug, Karangasem, Bali, 80812 Indonesia

²Fakultas Biologi, Laboratorium Genetik, Universitas Gadjah Mada
Jl. Flora, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281 Indonesia

³Departemen Perikanan Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jl. Sekip Utara, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281 Indonesia

Email : ngurahsyasa@gmail.com

Abstrak

Abalon merupakan salah satu moluska bercangkang tunggal yang memiliki nilai ekonomis tinggi dan merupakan komoditas potensial dalam peningkatan devisa Negara. Namun permasalahannya adalah mudahnya abalone mengalami stress akibat perubahan berbagai faktor lingkungan seperti suhu, salinitas, bakteri *Vibrio* dan bahan desinfektan seperti chlorine. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat stress benih abalone terhadap paparan chlorine pada gen heat shock protein (HSP) dan mengetahui perubahan enzim-enzim antioksidan seperti SOD, CAT, PO dan perubahan struktur histologi otot kaki abalone akibat paparan chlorine. Koleksi benih abalone dengan ukuran cangkang 3-4 cm dari unit hatchery abalone, BPIU2K Karangasem Bali. Uji paparan abalone pada akuarium kaca volume 100 L dengan konsentrasi chlorine 10 ppm. Pengambilan sample (hemolim, otot kaki, gonad) dilakukan pada waktu pengamatan (0,12,24,48 jam). Pengamatan meliputi uji ekspresi gen heat shock protein (Hsp70 dan Hsp90), aktifitas enzim-enzim antioksidan dan histology pada otot kaki. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Hsp70 terekspresi paling tinggi pada hemolim abalone yaitu sebesar 350 kali lipat pada paparan jam ke 12 dibandingkan kontrol ($P < 0.05$). Sedangkan, Hsp90 pada waktu yang sama menunjukkan tingkat stress abalone paling tinggi pada otot kaki dengan tingkat ekspresi sebesar 7 kali lipat jika dibandingkan kontrol ($P < 0.05$). Gen heat shock protein diekspresikan cukup tinggi pada uji paparan chlorine, namun demikian Hsp70 menunjukkan tingkat ekspresi yang lebih tinggi jika dibanding dengan Hsp90. Hsp70 lebih sensitif sebagai marka stress abalone akibat paparan chlorine. Perubahan struktur histologi menunjukkan cemaran chlorine dapat meningkatkan ukuran diameter hemolim sinus dan kerusakan pada lapisan epitel otot kaki abalone.

Kata kunci : *Haliotis squamata*, chlorine, Hsp70, Hsp90, stress

Abstract

Adaptation Capability of Abalone (Haliotis squamata) Under Chlorine as a Stressor

Abalone is one of the single-shelled mollusks which has high economic value and is a commodity in increasing the country's foreign exchange. However, the problem is that it is easy for abalone to experience stress due to the influence of various environmental factors such as temperature, salinity, Vibrio bacteria and disinfectants such as chlorine. The study was conducted to determine the stress level of abalone seeds produced by hatcheries against residual chlorine. The aim of the study were to see the stress level based on the heat shock protein (HSP) gene and to see changes in antioxidant enzymes such as SOD, CAT, PO and histological structure of abalone foot muscles due to chlorine contamination. Collection of abalone seeds with a 3-4 cm shell size from the abalone hatchery unit, BPIU2K Karangasem Bali. Abalone exposure test using a glass volume of 100 L with a chlorine concentration of 10 ppm. Furthermore, sampling was carried out (hemolime, leg muscles, gonads) at the time of

observation (0.12,24,48 hours). Observations included heat shock protein gene expression (Hsp70 and Hsp90) and histology in foot muscles. The results showed that Hsp70 was the highest expressed in hemolime abalone 350 times at 12 hours exposure compared to controls ($P < 0.05$). Meanwhile, Hsp90 at the same time showed the highest level of stress on leg muscles with an expression level of 7 times when compared to controls ($P < 0.05$). It was concluded that the heat shock protein gene was expressed high enough in the chlorine exposure test, however, Hsp70 was more sensitive as a sign of abalone stress as indicated by a higher expression level when compared to Hsp90. Changes in the histological structure show that chlorine contamination can increase the diameter of the sinus hemolime and damage to the epithelial layer of the abalone foot muscles.

Keywords : *Haliotis squamata*, chlorine, Hsp70, Hsp90, stress

PENDAHULUAN

Abalone merupakan gastropoda yang tersebar di perairan seluruh dunia, dan terdapat sekitar 100 species yang bernilai ekonomis penting. Abalone yang berukuran besar umumnya terdapat di daerah sub tropis dan yang berukuran lebih kecil terdapat di perairan tropis. Species abalone ini memiliki karakteristik bercangkang tunggal, pada bagian dalam cangkang terdapat lapisan nakreas sedangkan pada bagian luar cangkang memiliki motif dan warna yang berbeda. Warna cangkang dapat dipengaruhi oleh lingkungan hidup dan pakannya (NCBI, 2017 & Arctos, 2018). Cangkang merupakan mekanisme perlindungan pertama pada abalone dengan cara memasukkan seluruh bagian tubuh lunaknya ke dalam cangkang sehingga semaksimal mungkin dapat terhindar dari polutan yang menimbulkan kematian.

Perubahan mutu lingkungan yang disebabkan oleh suhu, salinitas, oksigen terlarut, padat tebar berlebih, polusi bahan berbahaya seperti chlorine, logam-logam berat, dan bahan organik dapat menimbulkan stress yang mengakibatkan kematian. Respons stress pada abalone juga ditandai dengan diproduksinya mucus secara berlebih jika dibandingkan kondisi normal.

Stress adalah perubahan yang terukur baik parameter biokimia maupun fisiologi yang diinduksi oleh perubahan lingkungan yang mengakibatkan berkurangnya kemampuan individu dalam beradaptasi terhadap perubahan lingkungan (Bayne, 2001), sedangkan respons stress adalah istilah yang digunakan untuk menyatakan respons terhadap stressor (Hooper *et al.*, 2007). Kondisi stress yang diakibatkan oleh stressor spesifik digeneralisir sebagai respons terhadap stress (Perez dan Fontanetti, 2011).

Stressor yang masuk ke dalam tubuh dapat meningkatkan produksi radikal bebas / reactive oxygen species (ROS) akibat terinduksinya sistem cytochrome P450. Meningkatnya produksi ROS akibat paparan polutan dapat terjadi melalui beberapa mekanisme, yaitu uptake redox cycling metal dan organic xenobiotic, melalui metabolisme xenobiotic menjadi redox cycling derivatives seperti quinone dan rangsangan terhadap enzim yang menyebabkan timbulnya ROS (Livingstone *et al.*, 1989). Stress pada abalone menimbulkan kerentanan dengan mudahnya terinfeksi oleh penyakit bakterial (Wu *et al.*, 2008; Yasa *et al.*, 2020).

Chlorine merupakan bahan kimia industri yang banyak dipergunakan dalam dunia manufaktur, sebagai bahan desinfektan di industri akuakultur, bahan desinfektan cadangan air minum perkotaan, dan sebagai pendingin air (*cooling water*) (Fava, 1997). Disamping manfaat yang dimilikinya, chlorine juga memiliki dampak buruk dalam interaksinya dengan senyawa organik membentuk organochlorine yang bersifat toxic (Environment Canada, 1993). Dalam sistem akuatik yang tercemar oleh residu chlorine dan limpasan akan berdampak terhadap biota peliharaan baik secara tingkah laku, fisiologi, dan biokimia. Hal ini acapkali terjadi pada gastropoda yang bersifat ectothermic yang dipelihara berdekatan dengan daerah industri yang memiliki lingkungan yang variatif (Park *et al.*, 2016).

Limpasan air yang mengandung residu chlorine secara mendadak akan menimbulkan stress baik secara akut maupun kronis bagi organisme aquatic seperti ikan, udang dan moluska yang dibudidayakan (Storelli *et al.*, 2006; Squadrito *et al.*, 2010). Stress yang timbul dapat mengakibatkan infeksi patogen hingga kematian (Hsieh *et al.*, 2008; Hooper *et al.*, 2014; Yasa *et al.*, 2019).

Enzim Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) merupakan kelas enzim antioxidant yang mengkatalisis dismutase menjadi oksigen (O_2) dan hidrogen peroksida (H_2O_2). SOD pada invertebrata secara umum diekspresikan secara konstitutif dan memainkan peranan penting dalam memproteksi sel dari perubahan berbagai faktor lingkungan (Li *et al.*, 2010). Enzim Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) merupakan salah satu enzim sentral yang terlibat dalam pemangsaan ROS. Enzim ini mengkatalisis dekomposisi hidrogen peroksida menjadi oksigen dalam bentuk gas dan molekul air. Enzim Phenoloxydase (PO) (EC 1.14.18.1) terdapat dalam hemolymph sebagai inactive proenzyme yang disebut proPO. Transformasi proPO menjadi PO melibatkan beberapa reaksi dikenal sebagai proPO activating system (sistem aktivasi proPO). Enzim ini mengkatalisis hidrosilasi monophenol dan oksidasi phenol menjadi quinones yang diperlukan untuk proses melanisasi sebagai respons terhadap serangan faktor-faktor lingkungan dan selama proses penyembuhan (Sritunyalucksana & Soderhall, 2000).

Heat shock protein (HSP) merupakan gen yang bertanggungjawab terhadap stress yang jumlahnya mendominasi di dalam sel. Gen ini akan mengalami peningkatan sintesis akibat responsnya terhadap keberadaan stressor (Lawrence and Hemingway, 2004). Gen ini akan mampu menjadi buffer bagi berbagai macam stressor lingkungan dan memainkan peranan penting dalam menjaga homeostasis dari tubuh moluska (Perez dan Fontanetti, 2011). Dalam sistem pertahanan sel, gen ini mencegah denaturasi protein dan memandu reintroduksi dan eliminasi protein yang terdenaturasi yang diakibatkan oleh faktor biotik dan abiotik (Wang *et al.*, 2004).

Kajian fisiologi dan ekspresi gen-gen HSP telah banyak dilakukan pada berbagai organisme, namun demikian belum banyak dilakukan kajian dampak residu chlorine pada Abalone *H. squamata*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan adaptasi abalone paska paparan chlorine terhadap ekspresi gen Hsp70 dan Hsp90, berdasarkan enzim-enzim SOD, CAT, PO, dan perubahan struktur histologi otot kaki.

MATERI DAN METODE

Produksi ROS secara berlebih akan mengakibatkan *oxidative stress*, hilangnya fungsi

sel, apoptosis dan necrosis (Lushchak, 2011). Invertebrata memiliki sejumlah besar enzim antioxidant yang mampu menunjukkan responsnya terhadap stress yang diakibatkan oleh perubahan mutu lingkungan dan enzim-enzim tersebut diekspresikan secara konstitutif dan memainkan peranan penting dalam memproteksi sel dari perubahan lingkungan (Li *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2015; Park *et al.* 2016).

Aktifitas enzim Superoxide dismutase (SOD)

Uji aktifitas SOD dilakukan menggunakan SOD Kit-WST (*water soluble tetrazolium salt*) melalui akses (www.dojindo.com). Laju pengurangan WST-1 dengan O_2 berhubungan secara linier terhadap aktivitas xanthine oxidase (XO), dan laju pengurangan ini dihambat oleh SOD. Satu unit aktivitas SOD didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang dibutuhkan untuk menginduksi sebanyak 50% hambatan pada laju pengurangan NBT dalam kondisi tertentu. Hasilnya dinyatakan sebagai unit aktivitas (U) $U \cdot mg^{-1}$ protein extract. Pembacaan enzim ini dilakukan pada panjang gelombang OD 490nm.

Aktifitas enzim Catalase (CAT)

Aktivitas Catalase diukur secara kolorimetri menggunakan Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit GeneWay, Biotech, Inc (techine@genwaybio.com) sesuai instruksi pabrikan. Reaksi catalase dilakukan melalui penambahan 12 μl 1mM H_2O_2 ke dalam masing-masing sumuran sampel dan sampel high control (HC) untuk memulai reaksi. Sedangkan stop solution ditambahkan untuk menghentikan reaksi. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang OD 490 nm. Satu unit catalase adalah sejumlah catalase yang mendekomposisi 1,0 μmol H_2O_2 per menit pada pH 4,5 dan suhu 25°C.

Aktivitas enzim Phenoloxidase (PO)

Aktivitas Phenoloxidase mengacu pada prosedur penelitian sebelumnya (Hooper *et al.*, 2014). dengan cara mengukur produksi dopachrome yang diproduksi dari *L-dihydroxyphenylalanine* (L-DOPA). Hemolimf sebanyak 100 μl dimasukkan ke dalam sumuran 96-well micro-plates demikian pula of L-DOPA (30 mM *L-3,4-dihydroxyphenylalanine*, Sigma D9628, in HCl 0.2 M, pH 8) ditambahkan sebanyak 100 μl ke dalam masing-masing

sumuran tersebut. Campuran tersebut diaduk dengan cepat selama 10 detik sebelum dilakukan pembacaan. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang OD492. Aktifitas enzim diukur sebagai perubahan yang terjadi dalam absorbansi $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein. Pembacaan enzim-enzim SOD, CAT dan PO dilakukan menggunakan ELISA reader Heales® MB-580, Shenzhen Huisong Technology Development Co.,Ltd. China.

Ekstraksi RNA

Hemolim abalone diekstraksi menggunakan RNA extraction kit (Zymo Resesarch®). Dengan metode spin kolom (zymospin) sesuai instruksi pabrikan.

Tahapan spesifik yang dilakukan dengan kit tersebut adalah penambahan gDNA remover untuk meningkatkan kemurnian RNA yang dihasilkan. Volume akhir produk RNA ini sebanyak 50 μl setelah penambahan DNase/RNase free water. RNA dimasukkan ke dalam tabung mikro 200 μl yang steril dan siap digunakan untuk cDNA sintesis.

Sintesis cDNA

Sintesis cDNA menggunakan ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (www.toyobo.co.jp/e/bio). RNA hasil ekstraksi (RNA template) diinkubasi pada *thermoblock* suhu 65°C selama 5 menit. Selanjutnya dilakukan pembuatan master mix yang terdiri dari (4x DN master mix 88 μl dan gDNA remover 1,8 μl). Master mix diambil sebanyak 2 μl , ditambahkan RNA template sebanyak 1 μl dan *nuclease free water* (NFW) sebanyak 5 μl . Campuran tersebut diinkubasi pada *thermoblock* dengan suhu 37°C selama 5 menit. Hasil inkubasi diambil sebanyak 8 μl dan ditambahkan 5x RT master mix II sebanyak 2 μl . Campuran tersebut diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 15 menit, suhu 50°C selama 5 menit dan suhu 98°C selama 5 menit. Selanjutnya campuran tersebut didiamkan pada suhu ruangan sebelum dilakukan amplifikasi.

Ekspresi gen Hsp70 dan Hsp90

Ekspresi gen HSP dilakukan dengan real-time PCR Applied Biosystem 7.500 Fast (Applied Biosystem). (ABI, USA). Reagen ekspresi Thunderbird™ Sybr qPCR mix (Larutan I) yang terdiri dari (Thunderbird SYBR qPCR mix 250 μl

dan 50x Rox Reference dye 1 μl). Reaksi PCR real-time dilakukan dalam volume 20 μL dengan campuran 2 μL Thunderbird SYBR® qPCR, 2 μL forward primer (10 μM), reverse primer 2 μL (10 μM), 2 μL Template cDNA setara dengan RNA total 50 ng, dan 4 μL nuclease free water. Kondisi siklus termal adalah 95 ° C selama 30 detik, diikuti oleh 40 siklus yang terdiri dari denaturasi dengan suhu 95 ° C selama 5 detik, annealing pada suhu 58 ° C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72 ° C selama 30 detik.

Sequence Hsp70 dan Hsp90 diadopsi berdasarkan Farcy *et al.*, (2007) yang disajikan pada Tabel 1. Analisa ekspresi gen ditentukan berdasarkan metode komparatif (Livak & Schmittgen, 2001) yang dinormalisir menggunakan β -actin sebagai internal kontrol.

Uji Histologi

Untuk mengamati efek perlakuan terhadap otot kaki abalones, maka setelah 96 jam percobaan karkas abalone diambil, direndam dan difiksasi dalam larutan Bouin's, dan sampel disiapkan melalui parafinasi. Jaringan yang terfiksasi kemudian dipotong dengan ketebalan 5 μm . Potongan-potongan tersebut diberi pewarnaan H&E. Jaringan yang telah diwarnai kemudian dianalisis dengan mikroskop cahaya (ZEISS Primovert P35-C 2/3 "0,65x).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian ini tampak bahwa aktifitas enzim SOD secara umum menunjukkan penurunan jika dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.05$). Penurunan aktifitas enzim ini terjadi mulai jam ke 12 hingga jam ke 48. (Gambar 1a) Menurunnya aktifitas enzim SOD disebabkan oleh terakumulasinya ion-ion O_2^- yang menimbulkan gangguan keseimbangan antara formasi oksigen dan pemangsaan oksiradikal (Breusegem *et al.*, 1998). Aktifitas enzim Catalase juga mengalami penurunan pada jam ke 12 paska paparan chlorine jika dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.05$) selanjutnya aktifitas CAT meningkat dan mendekati kondisi normal. Sedangkan aktifitas enzim PO menunjukkan nilai aktifitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan control ($P < 0.05$) mulai jam ke 12 hingga jam ke 48. Hal ini menunjukkan bahwa ezim tersebut cukup sensitif dalam merespons stressor chlorine.

Aktifitas enzim SOD dan CAT paska paparan chlorine mengalami penurunan mulai jam

ke 12, hal ini menunjukkan bahwa terjadi ketidakseimbangan osmosis pada jam ke 12 baik pada SOD dan CAT. Meningkatnya ion-ion superoksida akan didismutase oleh enzim SOD. Aktifitas CAT merupakan reaksi lanjutan setelah H_2O_2 diproduksi dari hasil dismutase SO_2 oleh SOD, namun demikian produksi H_2O_2 seiring dengan pemangsaan O_2^- sehingga pada waktu yang sama (12 jam) terjadi penurunan aktifitas kedua enzim tersebut. Namun demikian penurunan aktifitas SOD masih berlangsung hingga jam ke 48, sementara aktifitas CAT sudah pulih menuju kondisi normal yang menunjukkan kemampuan proteksi CAT dalam melindungi sel-sel dari oksidatif stress akibat peroksida lebih cepat. Meningkatnya aktifitas enzim phenoloxidase akibat teraktifasinya sistem ProPO oleh adanya kelarutan partikel-partikel chlorine yang dikenali sebagai antigen oleh sistem *clotting* dan encapsulasi dari melanin (Amparyup *et al.*, 2013; Sritunyalucksana & Söderhäll 2000; Li & Xiang, 2013).

Hasil ekspresi gen Hsp70 dan Hsp90 selama uji chlorine stress pada konsentrasi 10ppm telah diukur pada berbagai jaringan tubuh abalone yang meliputi (hemolim, gonad dan foot muscle). Hasil pengukuran tersebut menunjukkan trend yang hampir sama pada uji chlorine stress. Pada pengukuran jam ke 12 hasil pengukuran tingkat ekspresi gen Hsp70 dan Hsp90 menunjukkan puncaknya, pada pengukuran hemolim sebesar 350 kali lipat jika dibandingkan dengan kontrol ($P < 0.05$) (Gambar 1a). Selanjutnya tingkat ekspresi menurun mendekati kontrol seiring waktu hingga jam ke 48.

Demikian halnya dengan Hsp90 yang di *up regulasi* pada uji chlorine stress hingga mencapai nilai puncak sebanyak 7 kali lipat pada otot kaki dan sebesar 4 kali lipat pada hemolim jika dibandingkan dengan kontrol pada jam ke 12 ($P < 0.05$). Tingkat ekspresi menurun pada jam ke 24 hingga mendekati kontrol pada jam ke 48 (Gambar 1b). Jika dibandingkan dengan HSP90, HSP70 pada ketiga jaringan dengan nilai berkisar antara 50-350 kali lipat dibandingkan kontrol sehingga Hsp70 tampak lebih sensitif pada uji stress chlorine jika dibandingkan Hsp90.

Gen Hsp70 dan Hsp90 pada kondisi normal tersebar pada berbagai level ekspresi. Namun demikian dalam kasus ini Hsp70 dan Hsp90 terdeteksi pada hemolim, otot kaki dan gonad.

Ekspresi maximum kedua gen tersebut terdeteksi pada jam ke 12 pasca paparan chlorine sebesar 350 kali dan 7 kali dibandingkan kontrol. Peningkatan yang signifikan level Hsp70 dan Hsp90 merupakan indikator yang sensitif terjadinya respons stress seluler akibat kontaminasi. Ekspresi yang terjadi pada berbagai jaringan tersebut mengindikasikan terjadinya polusi lingkungan. Setelah jam ke 24 tingkat ekspresi Hsp70 dan Hsp90 menurun dengan pesat hingga mencapai level kontrol.

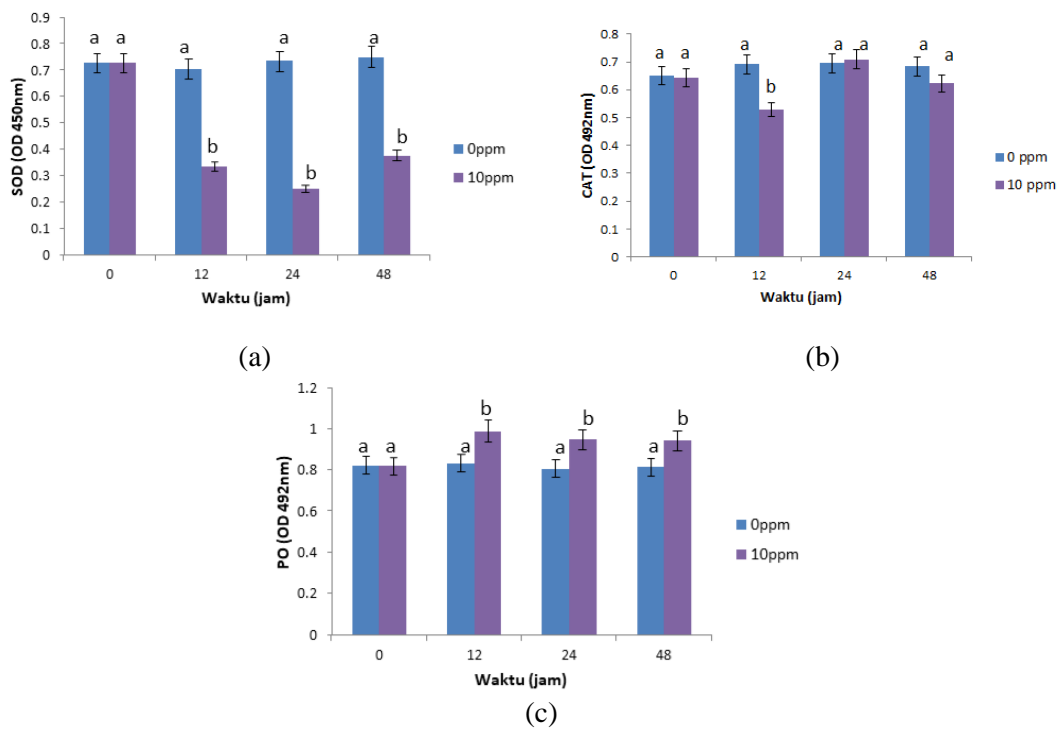
Saat abalone terekspose oleh chlorine maka ROS akan terbentuk dan akan sangat mengganggu fungsi normal sel-sel yang secara tidak langsung bertindak sebagai molekul-molekul signal (*signaling molecules*) menunjukkan terjadinya kerusakan DNA (Zhou *et al.*, 2009).

Perubahan struktur histology otot kaki abalone akibat paparan chlorine tampak pada Gambar 3. Kerusakan struktur histology otot kaki abalone tampak meningkat seiring meningkatnya konsentrasi chlorine yang diberikan. Pasca paparan chlorine 10 ppm dapat dilihat bahwa sel-sel epithelia (*epithelial cells*) dari otot kaki tampak terlepas dari lapisan terluar otot kaki yang tampak segaris dengan epithelial layer yang masih melekat (Gambar 3d). Respons biologis organisme akuatik akibat paparan Cl_2 tergantung pada konsentrasi yang diberikan dan lama waktu paparan yang secara umum telah digeneralisir dalam hukum Haber's (*Haber's law*) (Miller *et al.*, 2000). Selanjutnya faktor lain yang harus dipertimbangkan adalah kerentanan, jika tidak akan berdampak semakin buruk dan meluas ke bagian-bagian tubuh yang rentan seiring meningkatnya konsentrasi Cl_2 (Barrow *et al.*, 1979; Nodelman and Ultman, 1999).

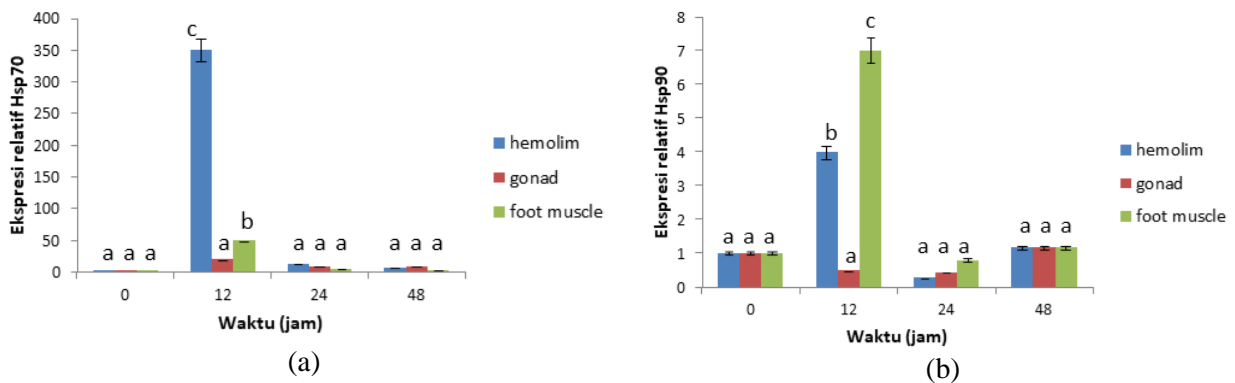
Chlorine akan semakin merusak lebih cepat pada jaringan mucosal basah yang berhubungan erat dengan kelarutan Cl_2 dalam air (Squadrito *et al.*, 2010). Efek biosida chlorine akan tampak dari adanya gangguan terhadap fungsi sel. Chlorine dapat mendisrupsi kerja sistem enzim, seperti enzim *triose phosphate dehydrogenase*, yang essential untuk pemanfaatan glucose (Green and Stumpf, 1946). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Grothe dan Eaton (1975) menunjukkan bahwa toksisitas chlorine terhadap ikan disebabkan oleh adanya oksidasi hemoglobin menjadi methemoglobin, yang mampu mereduksi kelarutan oxygen dalam darah yang berdampak pada gangguan metabolisme.

Table 1. Primer yang digunakan pada penelitian ini (Farcy *et al.*,2007)

| Primer | Sequence (5'-3') | Gene bank Accession number |
|-----------|----------------------|----------------------------|
| Hsp90 F | CCAGGAAGAATATGCCGAGT | AM283515 |
| Hsp90 R | CACGGAACTCCAAGTACC | |
| Hsp70 F | CCGCTCTAGAACTAGTGGAT | AM283516 |
| Hsp70 R | CCGCCAAGTGGGTGTCT | |
| β-actin F | GGGTGTGATGGTCGGTAT | AM236595 |
| β-actin R | AGCGAGGGCAGTGATTTC | |



Gambar 1. Aktifitas enzim SOD, CAT dan PO (a, b, c) paska paparan chlorine 10 ppm. Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0.05$).



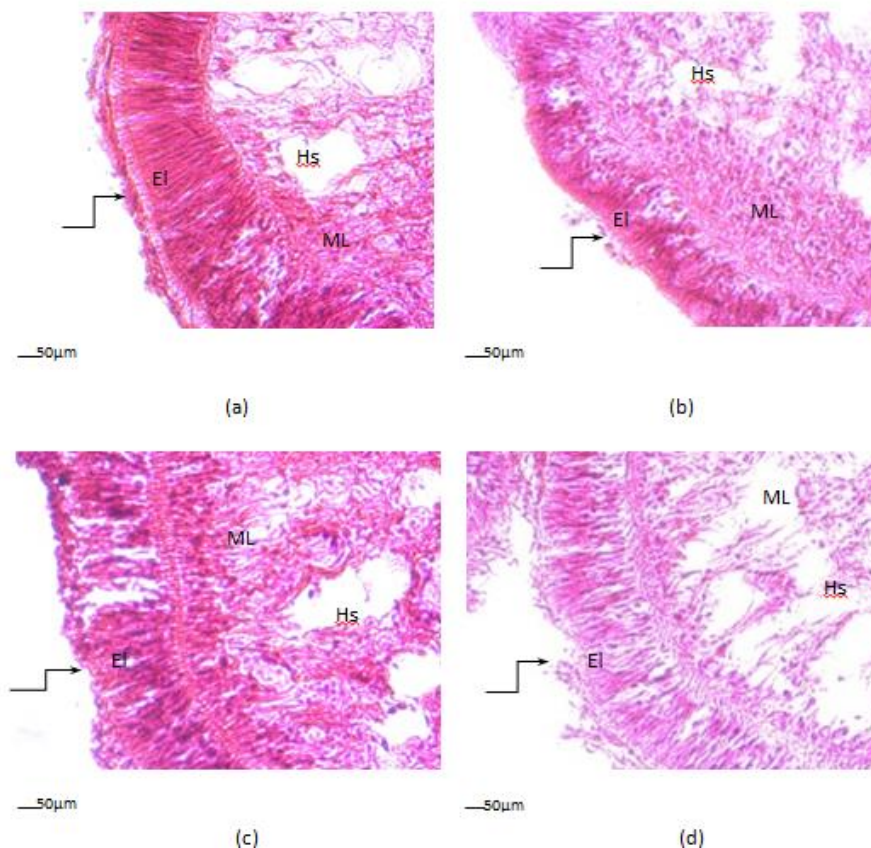
Gambar 2. Ekspresi gen HSP70 (a) dan HSP90 (b) pada hemolimf, otot kaki dan gonad paska paparan chlorine. Huruf yang berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0.05$).

Paparan residu chlorine pada media pemeliharaan abalone dapat terjadi karena berbagai faktor seperti pencemaran pada lokasi budidaya, dan kurang tuntasnya proses pembersihan/ netralisasi media pemeliharaan paska dilakukannya klorinasi tandon air. Hal ini tentu saja mengakibatkan stress pada abalone bahkan terjadinya kematian. Chlorine mampu merusak jaringan mukosa yang basah, akibat kelarutan ion Cl_2 yang memiliki tingkat kelarutan 5 kali lebih tinggi dibandingkan ozon (O_3) maupun nitrit (Squadrito *et al.*, 2010). Chlorine juga mampu mengganggu kerja enzim *triose phosphate dehydrogenase* yang essential dalam pemanfaatan glukosa (Green and Stumph, 1946). Demikian pula ikan yang terpapar chlorine akan kehilangan warnanya dan timbul tanda-tanda yang tidak spesifik seperti kesulitan bernafas karena kerusakan epithelium pada insang.

Peningkatan ekspresi gen HSP dapat dipandang sebagai pendekatan proteksi terhadap kerusakan terhadap sel-sel (Li *et al.*, 2010). Hasil-hasil laju transkripsi kedua gen di atas baik pada

Hsp70 and Hsp90 tampak memiliki pola yang sama. Meningkatnya stress yang diakibatkan oleh chlorine secara dramatis meningkatkan ekspresi Hsp70 dan Hsp90. Berdasarkan data-data di atas kami menduga bahwa diantara kedua gen tersebut, Hsp70 memainkan peranan yang lebih dominan dalam memproteksi sel-sel dari kerusakan yang diakibatkan oleh chlorine karena level ekspresinya lebih tinggi jika dibandingkan dengan Hsp90 pada konsentrasi yang sama, hal ini menunjukkan Hsp70 sebagai kandidat terbaik untuk biomarker dalam mengkaji stress abalone hasil pembenihan akibat paparan chlorine.

Hsp70 pada abalone *H.discus hannai* dalam kondisi normal diekspresikan pada berbagai jaringan, yang menunjukkan bahwa Hsp70 dapat disintesis pada kondisi tidak stress, tingkat ekspresi yang tertinggi terletak pada mantel (Cheng *et al.*, 2007). Selanjutnya dampak chlorine pada organisme lain dapat diketahui pada moluska yang berbeda seperti pada Japanese carpet shell, *Ruditapes Pilippinarum*. HSP pada biota ini diekspresikan pada empat jaringan



Gambar 3. Perubahan struktur histology otot kaki abalone paska paparan chlorine. a: 0 ppm b:1 ppm, c:5 ppm and d:10 ppm, ML: muscle layer, Hs: hemolymph sinus, El: epithelial layer

berbeda, namun demikian tingkat ekspresi yang tertinggi dijumpai pada saluran pencernaan (Liu *et al.*, 2015). Namun demikian hasil yang berbeda dijumpai pada *Catabacter hongkongensis*, dimana ekspresi gen Hsp70 tertinggi dijumpai pada jaringan otot (Zhang and Zhang, 2012).

Perubahan struktur otot kaki termasuk erosi yang terjadi pada permukaan luar lapisan epitel akibat perlakuan chlorine 10 ppm mengakibatkan meningkatnya ukuran hemolim sinus pada jaringan otot (*muscle layer*) (Gambar 3d). Sehingga peningkatan konsentrasi chlorine dengan jelas mampu menginduksi perubahan struktur histology otot kaki abalone dan mengakibatkan struktur otot kaki menjadi tidak normal. Otot kaki / kaki perut yang tidak normal akan dapat mengganggu pergerakan (*locomotion*), tingkah laku komunitas abalone (*community behavior*), terganggunya kemampuan proteksi dari faktor-faktor eksternal (*protection from external threats*), terganggunya status kesehatan (*health status*) dan mengakibatkan kematian massal pada abalone.

Menurut Palmer *et al.*, (2006) perubahan struktur komunitas bentic macroinvertebrata pada wilayah yang terpapar maupun tidak terpapar oleh limbah buangan chlorine pada dua sungai tampak berbeda. Jumlah invertebrata pada kedua sungai nampak berlimpah, namun jumlah taxa nampak mengalami penurunan begitu terjadi limpasan limbah chlorine di salah satu perairan sungai yang terpapar tersebut. Sebagai contoh di atas adalah perubahan struktur komunitas Mayfly, *Baetis harrisoni*. secara total menghilang dari struktur komunitas perairan sungai yang terklorinasi sedangkan limbah yang tidak terklorinasi perubahan struktur komunitas relatif kecil. Hal ini menunjukkan chlorin dengan limbah buangan bertanggungjawab terhadap hilangnya komunitas organisme tersebut. Toksisitas chlorine pada ikan salmon (*S. gairdneri*) dapat mengganggu keseimbangan mineral dalam darah.

Efek yang paling signifikan adalah pada organ reproduksi, yang terbukti bahwa paparan chlorine menimbulkan menurunnya jumlah benih yang dihasilkan. Pada kajian yang berlangsung lebih lama (15 minggu) konsentrasi paparan chloramines yang tidak berdampak pada organisme ini adalah < 0.0034 ppm. Namun demikian, Basch dan Truchan (1974) merekomendasikan bahwa total residu chlorine yang aman sebaiknya tidak melebihi 0.04 mg/L saat suhu air (< 21,1°C (70°F) dan 0,2 mg/L saat

suhu air (> 21,1 °C) yang merupakan batas aman bagi semua spesies perikanan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktifitas enzim-enzim antioksidan SOD dan CAT menurun pada jam ke 12 akibat paparan chlorine, sebaliknya PO mengalami peningkatan aktifitas pada jam yang sama. Jika kita bandingkan profil ekspresi HSP70 dan HSP90 pada kondisi stress chlorine kedua gen menunjukkan pola ekspresi yang mirip, yaitu terjadi peningkatan ekspresi pada jam ke 12 pada hemolim dan foot muscle, namun demikian HSP70 lebih sensitif dibandingkan HSP90 dengan nilai sebesar 350 dan 50 kali lipat dibanding kontrol. Perubahan struktur histology menunjukkan paparan chlorine dapat meningkatkan ukuran diameter hemolim sinus dan kerusakan pada lapisan epitel otot kaki abalone. Selain itu, dibutuhkan kajian lebih lanjut untuk mengetahui bagaimana respon abalone bila terpapar secara bersama-sama oleh beberapa faktor stres dalam konteks lingkungan, di mana banyak faktor stres bersifat regulatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Amparyup, P., Charoensapsri, W. & Tassanakajon, A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*. 34(4):990-1001. doi: 10.1016/j.fsi.2012.08. 019.
- Arctos, 2018. Collaborative Collection Management Solution. https://arctos.database.museum/name/Haliotis_squamata.
- Barrow, N.J. 1979. The Description of Desorption of Phosphate From Soil. *European Journal of Soil Science*. 30(2):259-270. doi: 10.1111/j. 1365-2389.1979.tb00983.x.
- Basch. R.E. & Truchan, J.G. 1974. Calculated residual chlorine concentrations safe for fish. Michigan Department National Recourses Technical Bulletin.74-82:29p.
- Bayne, C.J., Hahn, U.K. & Bender, R.C. 2001. Mechanism of molluscan host resistance and of parasite strategies for survival. *Parasitology* 123:159-167. doi: 10.1017/s031182001008137.
- Cheng, P., Liu, X., Zhang, G. & He, J. 2007. Cloning and expression analysis of a HSP70 gene from Pacific abalone (*Haliotis discus*

- hannai*). *Fish & Shellfish Immunology* 22: 77-87. doi: 10.1016/j.fsi.2006.03.014.
- Environment Canada. 1993. Chlorinated wastewater effluents Canadian Environmental Protection Act-priority substances list supporting document. Government of Canada. Health and Welfare Canada; Environment Canada, Ottawa, Ontario.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B. & Lebel, J.M., 2007. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 146:540–550. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.12.006.
- Fava, S.G. 1997. Effects of chlorine and ammonia compounds on the bioenergetic physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Master Thesis. The Faculty of Graduate Studies. University of Guelph.
- Green, D.E. & Stupmf, P.K., 1946. A note on an enzymatic method on estimating chlorine. *Journal American Water Works Association*, 38:1306-1308.
- Grothe, D.R. & Eaton, J.W. 1975. Chlorine-Induced Mortality in Fish. *Transaction of American Fisheries Society*. 104(4):800-802. doi: 10.1577/1548-8659.
- Guo, X., Yan, H., Zhang, L., Lelong, C. & Jouaux, A. 2015. Immune and stress responses in oysters with insights on adaptation. *Fish & Shellfish Immunology*, 30: 1-13. doi: 10.1016/j.fsi.2015.05.018.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handler, J. & Benkendorff, K. 2007. Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish & Shellfish Immunology*. 22:363-379. doi: 10.1016/j.fsi.2006.06.009.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Benkendorff, K., Handler, J. & Goulias, J. 2014. Effects of severe heat stress on immune function, biochemistry and histopathology in farmed Australian abalone (hybrid *Haliotis laevigata* × *Haliotis rubra*). *Aquaculture*, 432:26–37. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.03.032.
- Hsieh, S.L., Ruan, Y.H. Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H. & Kuo, C.M.. 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture*, 275:335–341. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.019.
- Lawrence, A. & Hemingway, K. 2004. Effect of Pollution on Fish. Molecular Effect and Population Responses. Blackwell Science. 362 p.
- Li, F. & Xiang, J., 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in 907 China. *Developmental and Comparative Immunology*. 39:11–26. doi: 10.1016/j.dci.2012.03.016.
- Li, H., Sun, X., Cai, Z., Cai, G. & Xing, K. 2010. Identification and analysis of a Cu/Zn superoxide dismutase from *Haliotis diversicolor supertexta* with abalone juvenile detached syndrome. *Journal of Invertebrate Pathology*. 103:116–123. doi: 10.1016/j.jip.2009.11.009.
- Liu, T., Pan, L., Cai, Y. & Miao, J. 2015. Molecular cloning and sequence analysis of heat shock proteins 70 (HSP70) and 90 (HSP90) and their expression analysis when exposed to benzo (a) pyrene in the clam *Ruditapes philippinarum*. *Gene*. 555(2): 108-118. doi: 10.1016/j.gene.2014.10.051.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method. *Methods*, 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101 : 13-30. doi: 10.1016/j.aqua.tox.2010.10.006.
- Miller, F.J., Schlosser, P.M. & Janzen, D. 2000. Haber's rule: A special case in a family of curves relating concentration and duration of exposure to a fixed level of response for a given endpoint. *Toxicology*, 149(1):21-34. doi: 10.1016/S0300-483X(00)00229-8.
- NCBI, 2017. National Centre for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=2017615>
- Nodelman V, Ultman J.S. 1999. Longitudinal distribution of chlorine absorption in human airways: comparison of nasal and oral quiet breathing. *Journal Applied Physiology*, 86:1984–1993. doi: 10.1152/jappl.1999.86.6.1984.
- Palmer, C.G., Palmer, A.R. & Palmer, R.W. 2006. Macroinvertebrate community structure and altitudinal changes in the upper reaches of a warm temperate southern African river.

- Freshwater Biology*. 32(2):337-347. doi: 10.1111/j.1365-2427.1994.tb01130.x.
- Park, K., Lee, J.S., Kang, J.C., Kim, J.W. & Kwak, I.S., 2016. Cascading effects from survival to physiological activities, and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. *Fish & Shellfish Immunology*, 42:233–240. doi: 10.1016/j.fsi.2014.10.036.
- Perez, D.G. & Fontanetti, C.S. 2011. Hemocitological responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environment Monitoring Assessment*. 177:437-447. doi: 10.1007/s10661-010-1645-7.
- Squadrito, G.L., Postlethwait, E.M. & Matalon, S. 2010. Elucidating mechanisms of chlorine toxicity: reaction kinetics, thermodynamics, and physiological implications. *American Journal of Physiology- Lung Cellular Molecular Physiology* 299:L289–L300. doi: 10.1152/ajplung.00077.2010.
- Sritunyaluksana, K. & Söderhäll, K. 2000. The proPo and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191:53-69. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00411-7.
- Storelli, M.M., Barone, G., D'Addabbo, R. & Marcotrigiano, G.O. 2006. Concentrations and composition of organochlorine contaminants in different species of cephalopod molluscs from the Italian waters (Adriatic Sea). *Chemosphere*, 64:129–134. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.10.037.
- Wang, S., Wang, Y., Zhang, Z., Ralph, J., Weng, Z., Zou, Z. & Ziping, Z., 2004. Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or non-pathogenic infection. *Journal of Shellfish Research*, 23:1173–1177.
- Wu, J.P., Chen, H.C. & Huang, D.J., 2008. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 73: 1019–1026. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.08.019.
- Yasa, N.S., Murwantoko, Isnansetyo A, Handayani N.S.N., Triastutik G. & Anshory L. 2020. Physiological, biochemical and HSP70 and HSP90 gene expression profiles of tropical abalone *Haliotis squamata* in response to *Vibrio alginolyticus* infection. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 25(1): 12-20. doi: 10.22146/ijbiotech.51322.
- Yasa, N.S., Murwantoko, Isnansetyo, A. & Handayani N.S.N. 2019. Physiological stress response and gene expression of the Hsp70 and Hsp90 in abalone *Haliotis squamata* under thermal shock. *AAFL Bioflux*, 12(5): 1672-1687.
- Zhang, Z. & Zhang. 2012. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 70 gene from the oyster *Crassostrea hongkongensis* responding to thermal stress and exposure of Cu²⁺ and malachite green. *Gene*. 497:172-190. doi: 10.1016/j.gene.2012.01.058.
- Zhou, J., Wang, W.N., Wang, A.L., He, W.Y., Zhou, Q.T., Liu, Y., Xu, J., 2009. Glutathione S transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: characterization and regulation under pH stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 150, 224–230. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.04.012.