

# KEMAMPUAN OOSIT IKAN LELE (*Clarias grapienus*) DALAM MENOLERANSI KLOORIN SEBAGAI BAHAN OKSIDATIF STRES

## *The Ability of Catfish (*Clarias grapienus*) Oocyte to Tolerate Chlorine as A Compound Inducing Oxidative Stress*

Hadid Armansyah<sup>1</sup>, Yulianus Linggi<sup>2</sup>, Maheno<sup>3</sup>, dan Marsoedi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dinas Perikanan Kabupaten Aceh Tenggara, Kutacane

<sup>2</sup>Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang

<sup>3</sup>Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan Fakultas Pertanian Universitas Nusa Cendana, Kupang.

E-mail: ariyama\_cawal@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini menggunakan klorin dalam bentuk natrium hipoklorit yang dipaparkan secara *in vitro* untuk menguji kemampuan oosit ikan lele dalam menoleransi kehadiran klorin sebagai bahan oksidatif stres dalam medium kultur. Konsentrasi klorin yang digunakan adalah 0, 10, 20, 40, 80, 160, dan 320  $\mu\text{M}$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi paparan semakin rendah jumlah oosit yang mampu bertahan hidup hingga 4 jam pengamatan. Konsentrasi klorin 320  $\mu\text{M}$  menghasilkan jumlah oosit yang mampu bertahan hidup paling optimum. Disimpulkan bahwa oosit ikan lele mampu menoleransi kehadiran bahan oksidatif stres dalam medium kultur dengan konsentrasi paparan klorin sebanyak 320  $\mu\text{M}$ .

Kata kunci: klorin, toleransi, oksidatif stres, oosit

### ABSTRACT

This research used chlorine in the form of sodium hypochlorite that was induced *in vitro* to test the ability of catfish oocyte in tolerating the presence of chlorine as an oxidative stress compound in a culture medium. Chlorin concentrations used were 0, 10, 20, 40, 80, 160, and 320  $\mu\text{M}$ . The result showed that the higher the exposure concentration the lower the oocyte number survived in 4 hours observation, but at the concentration of 320  $\mu\text{M}$  the oocyte survive was the most optimum. This phenomenon explains the theory about the role of oxidative stress material in an oocyte that able to activate molecules 5'-adenosine monophosphate kinase (AMPK) at certain concentration. The results of this research confirmed that the AMPK molecules in catfish oocyte will activate by chlorine exposure concentration at 320  $\mu\text{M}$ , thus, the ATP production increases and oocyte able to tolerate the presence of oxidative stress material in a culture medium. In conclusion, catfish oocyte able to tolerate the presence of oxidative stress compound in culture medium with the chlorine exposure concentration of 320  $\mu\text{M}$ .

Key words: chlorine, oxidative stress, tolerance, oocyte

### PENDAHULUAN

Dalam bidang perikanan seperti usaha pemeliharaan ikan ataupun usaha pembibitan ikan, klorin biasanya digunakan untuk membersihkan kolam dengan tujuan membasmi bakteri sekaligus melepaskan kotoran yang menempel di sekitar wadah pemeliharaan. Klorin adalah oksidan kuat dan dianggap sebagai antibakteri yang sangat efektif karena dapat menghentikan aktivitas enzim dalam sel bakteri secara *irreversible*. Prinsip kerja klorin adalah oksidasi gugus *sulphydryl group* (SH) terutama pada enzim-enzim esensial sehingga mematikan sel (Estrela *et al.*, 2002).

Pada saat sel terpapar oleh klorin maka akan terjadi reaksi saponikasi, reaksi netralisir asam amino, dan reaksi kloramin. Ketiga reaksi tersebut dapat menyebabkan kondisi stres pada oosit dan jika intensitas paparan cukup tinggi akan menyebabkan kematian oosit (Powell, 2002). Menurut Donaldson (1981), jika ikan mengalami stres akan mengakibatkan peningkatan hormon kortikosteron pada tingkat seluler. LaRosa dan Downs (2005) menyatakan bahwa sel oosit yang mengalami stres akan menginduksi molekul 5'-adenosin monophosphate kinase (AMPK) dalam sitoplasma menjadi aktif sehingga memungkinkan

terjadinya penurunan level *cyclic adenosin monophosphate* (cAMP). Perkembangan sel oosit pada vertebrata mengalami penghentian proses meiosis pada saat oosit mencapai profase dari meiosis I. Pada saat itu, oosit dalam keadaan belum matang. Supaya oosit matang maka proses meiosis harus diaktifkan kembali (*meiosis resumption*) (Yamashita dan Nagahama, 1995).

Masciarelli *et al.* (2004), menjelaskan bahwa penyebab utama terjadinya penghentian proses meiosis dalam sel oosit adalah tingginya kandungan cAMP. Produksi cAMP dalam sitoplasma oosit diregulasi oleh enzim *adenylate cyclase* (AC) yang mengkatalisis perubahan *adenosin triphosphate* (ATP) menjadi cAMP (Conti *et al.*, 2002). Jika level cAMP dalam sitoplasma tetap tinggi maka oosit tidak bisa matang karena aktivitas protein kinase A (PKA) dipengaruhi oleh cAMP (Corton *et al.*, 1994). Semakin tinggi level cAMP akan semakin tinggi aktivitas PKA. Tingginya aktivitas PKA akan mengakibatkan *maturation promoting factor* (MPF) tidak dapat aktif sehingga oosit tidak dapat memasuki tahap maturasi. Jadi walaupun molekul MPF disebut sebagai faktor pembatas untuk pematangan oosit tetapi pintu gerbang proses pematangan adalah level cAMP.

Level cAMP dalam sitoplasma dapat diturunkan dengan bahan-bahan lain selain hormon reproduksi yakni bahan-bahan yang bersifat oksidatif stres (Vivarelli *et al.*, 1983; Mehlmann, 2005; LaRosa dan Downs, 2006). Hardie dan Pan (2002) menjelaskan bahwa oosit yang mengalami stres akibat terpapar dengan racun arsenik masih dapat matang karena pada konsentrasi tertentu racun tersebut akan mengaktifkan molekul AMPK. Molekul AMPK dalam oosit berperan untuk menghentikan penggunaan energi (ATP) oleh enzim-enzim lain sehingga merubah rasio AMP/ATP. Perubahan rasio tersebut menghambat aktivitas PKA. Semakin tinggi rasio AMP/ATP maka aktivitas PKA semakin turun. Dengan demikian bahan-bahan racun yang bersifat oksidatif stres dapat memiliki regulasi positif terhadap maturasi oosit ikan.

Hasil studi Estrela *et al.* (2002) menunjukkan bahwa dengan basa kuat yang dimiliki oleh natrium hipoklorit akan memengaruhi fungsi enzim-enzim yang ada di bawah membran sel seperti metabolisme, pembelahan/pertumbuhan sel, pembentukan dinding sel, biosintesis lipida, transpor elektron, dan fosforilasi oksidatif. Oksidatif yang dimiliki klorin juga dapat mengakibatkan aktivasi molekul AMPK, selanjutnya akan menurunkan level cAMP. Untuk itu dalam penelitian ini dilakukan percobaan menggunakan klorin yang bersifat oksidatif stres untuk dipaparkan pada oosit ikan lele dengan tujuan untuk menurunkan level cAMP. Jika klorin dapat menurunkan level cAMP dalam oosit ikan lele, maka kemungkinan bahan ini dapat dipertimbangkan untuk diteliti lebih lanjut sebagai bahan yang dapat mematangkan oosit ikan.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Breeding dan Laboratorium Bioteknologi/IIP Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Hewan uji yang digunakan adalah ikan lele (*Clarias grapienus*) yang diperoleh dari Balai Benih Ikan Air Tawar Jawa Timur di Kepanjen Kabupaten Malang dan hasil pemeliharaan petani lokal di Dau dan Tumpang, Malang. Induk yang dipilih adalah induk yang umur sekitar 1 tahun dengan berat 500-700 g. Selama pemeliharaan ikan diberi pakan alami maupun pakan komersil secara *ad libitum*.

Oosit diperoleh dengan cara dibedah dari induk yang sebelumnya dianestesi dengan minyak cengkeh (100 ppm). Oosit yang terkumpul dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) yang mengandung 0,4 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) kemudian diamati di bawah mikroskop untuk memastikan tingkat kematangan oosit. Oosit yang digunakan adalah oosit pada tahap vitelogenesis akhir sampai awal maturasi. Beberapa sampel oosit direndam dalam *clearing solution* untuk mengamati letak inti. Inti oosit pada tahap vitelogenesis masih berada di tengah.

### Prosedur

Oosit terpilih kemudian dipisahkan menurut perlakuan kemudian direndam dalam medium yang

mengandung klorin dengan konsentrasi sesuai perlakuan selama 10-15 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan larutan PBS sebanyak 5 kali, kemudian dipindahkan ke dalam wadah yang berisi medium. Setelah itu diinkubasi dalam inkubator dengan suhu konstan 30° C selama 4 jam. Jumlah oosit yang bertahan hidup (*survival rate*/SR) diamati dengan cara pewarnaan menggunakan *trypan blue dye* 1%.

Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini meliputi persentase oosit yang tetap hidup, diperoleh dengan menghitung jumlah oosit yang tetap bertahan hidup setelah dipapari dengan klorin kemudian dikultur selama 1 jam. Data ini akan digunakan untuk menentukan dosis yang paling optimal sebagai dosis yang masih dapat ditoleransi oleh oosit ikan lele. Eksistensi molekul AMPK, diperoleh dari hasil *running elektroforesis* berupa gumpalan protein dalam pita elektroforesis yang terletak pada baris gel dengan berat molekul 63 kDa.

### Pemaparan Klorin

Klorin yang digunakan adalah klorin dalam bentuk larutan natrium hipoklorit dengan konsentrasi 5,25%. Untuk mendapatkan dosis klorin sebesar 10 µl akan dilarutkan sebanyak 10 µl ke dalam 1 l medium berarti dalam medium sebanyak 10 ml mengandung 0,0000053 µl natrium hipoklorit dan dihomogenkan dalam *magnet stirrer* selama 20 menit. Oosit direndam dalam larutan yang mengandung natrium hipoklorit selama 10-15 menit kemudian larutan medium dibuang dan oosit dicuci dengan larutan PBS.

### Kultur Oosit

Oosit yang terpilih dimasukkan ke dalam medium yang mengandung 3,74 g NaCl; 0,32 g KCl; 0,16 g CaCl<sub>2</sub>; 0,10 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,16 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,40 g glukosa, dan 0,008 g *phenol red*. Semua bahan tersebut yang dilarutkan dalam 1 l air suling (*triple distilled*), ditambahkan natrium bikarbonat (1 mol/l) hingga mencapai pH 7,5. Untuk mencegah kontaminasi medium ditambahkan penisilin 200.000 IU dan streptomisin sulfat 200 mg (Matsuyama *et al.*, 2001; Nayak *et al.*, 2004; Mishra dan Joy, 2006). Oosit dimasukkan ke dalam inkubator yang telah diatur pada suhu 30° C selama 4 jam.

### Running Elektroforesis

Untuk memperoleh pita elektroforesis dilakukan *running* pada gel *running* 12,5%; 0,25 M Tris-HCl pH 8,8; *stacking* gel 4,5% dalam 0,125 M Tris-HCl pH 6,8; arus listrik 80 mA selama 1 jam. Pewarnaan menggunakan 0,2% *commassie brilliant blue* yang dibuat dalam *staining solution* dengan 45:45:10 % (metanol:air:asam asetat). Pencucian pita menggunakan larutan yang mengandung metanol, akuades, asam asetat (25%:65%:10% ).

### Analisis Data

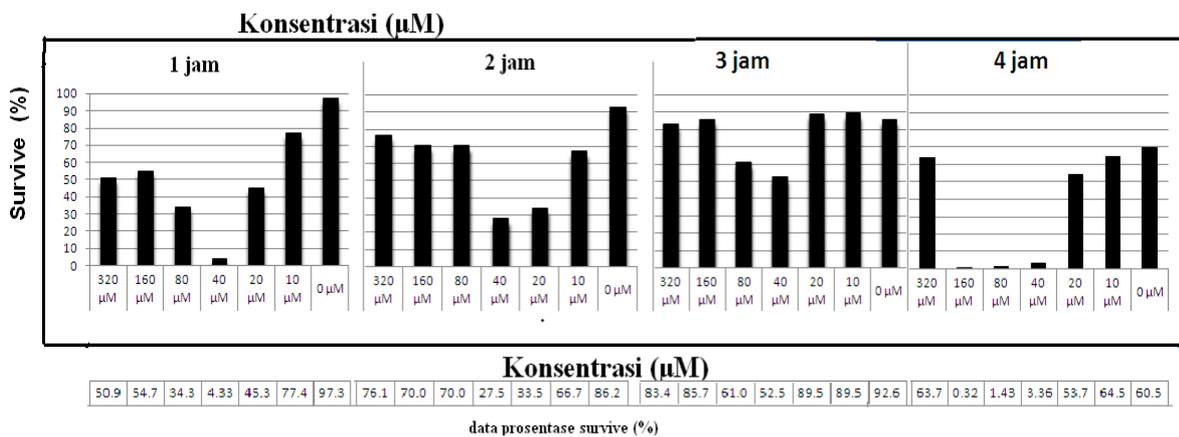
Pengaruh klorin terhadap *survival rate* oosit ikan lele dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) dan

dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT). Hasil elektroforesis *crude protein* menampilkan pita-pita *running* yang menunjukkan berat molekul yang diukur dengan persamaan linier  $Y = a + bX$  sebagai fungsi (Y) dari perbandingan jarak protein *marker*.

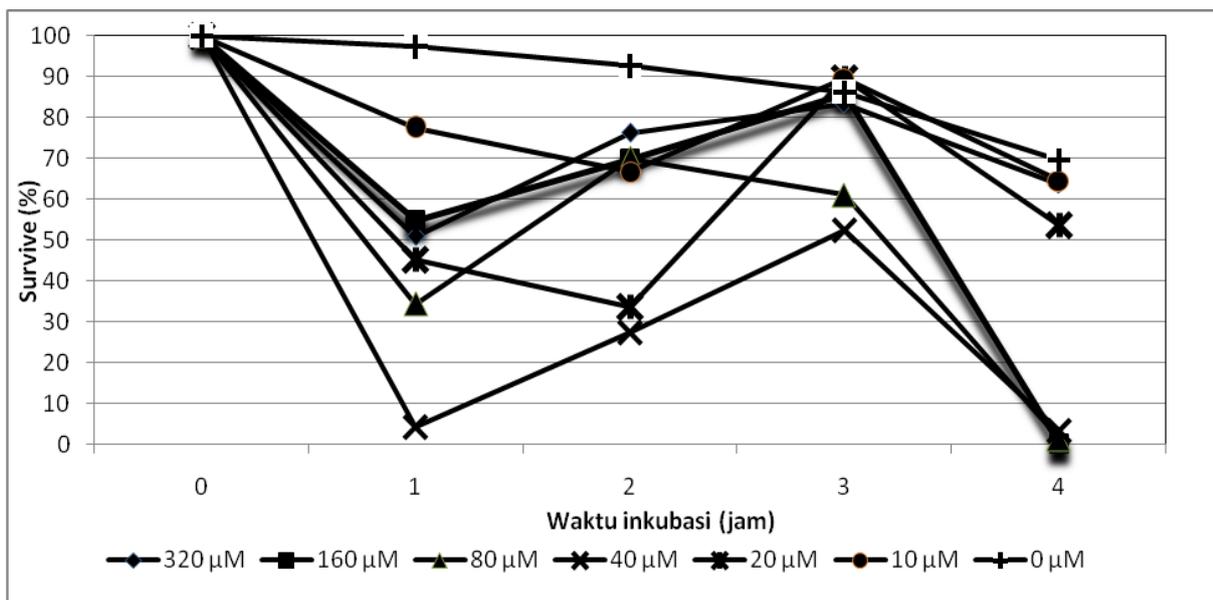
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil pemaparan klorin terhadap oosit ikan lele selama 4 jam menunjukkan adanya perubahan yang signifikan setiap jam pada masing-masing perlakuan. Perlakuan dengan persentase jumlah oosit yang mampu bertahan hidup selama 4 jam tanpa induksi hormon alami maupun hormon buatan adalah perlakuan dengan konsentrasi 10 µM (64,5±3,66%) diikuti oleh perlakuan 320 µM kemudian perlakuan 20 µM. Pemaparan dengan konsentrasi 160, 80, dan 40 µM adalah perlakuan yang sangat beracun bagi oosit selama 4 jam sehingga persentase oosit yang mampu bertahan hidup rata-rata kurang 5% seperti yang disajikan pada Gambar 1.

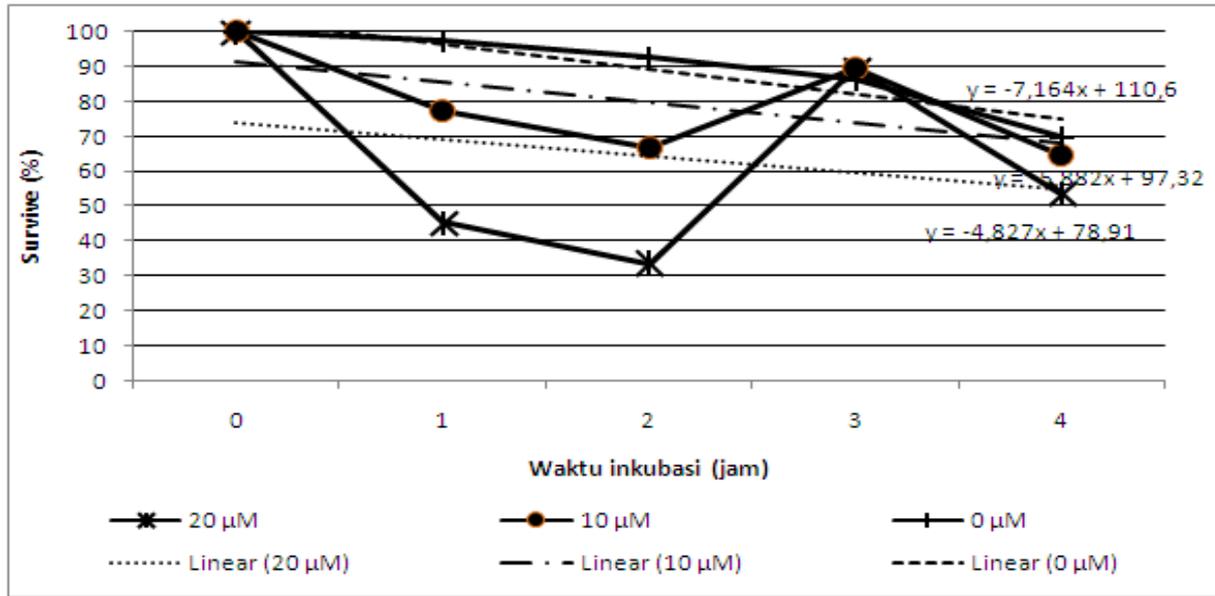
Secara umum semua perlakuan mengalami pengurangan jumlah oosit yang bertahan hidup namun beberapa kejadian yang menarik yakni bahwa perlakuan 40-320 µM pada jam pertama mengalami penurunan persentase oosit bertahan hidup yang drastis tetapi pada jam kedua naik kembali hingga jam ke-3 dan pada jam ke-4 turun kembali. Hanya oosit yang tidak dipapari klorin (0 µM) yang mengalami penurunan persentase hidup mulai dari jam pertama hingga jam ke-4. Jika titik jumlah yang bertahan hidup naik kembali disebut sebagai titik penyesuaian atau titik *recovery* maka titik *recovery* pada perlakuan 20 dan 10 µM lebih lambat dari perlakuan lainnya yakni pada jam ke-3. Hal lain yang menarik dari hasil penelitian ini yakni pada perlakuan yang dipaparkan klorin dengan konsentrasi 320 µM (konsentrasi paling tinggi dalam penelitian ini), walaupun jumlah oosit yang bertahan hidup juga mengalami penurunan pada jam pertama namun rata-rata prosentase jumlah yang bertahan hidup hingga 4 jam justru lebih tinggi dari perlakuan 20-160 µM seperti yang disajikan pada Gambar 2.



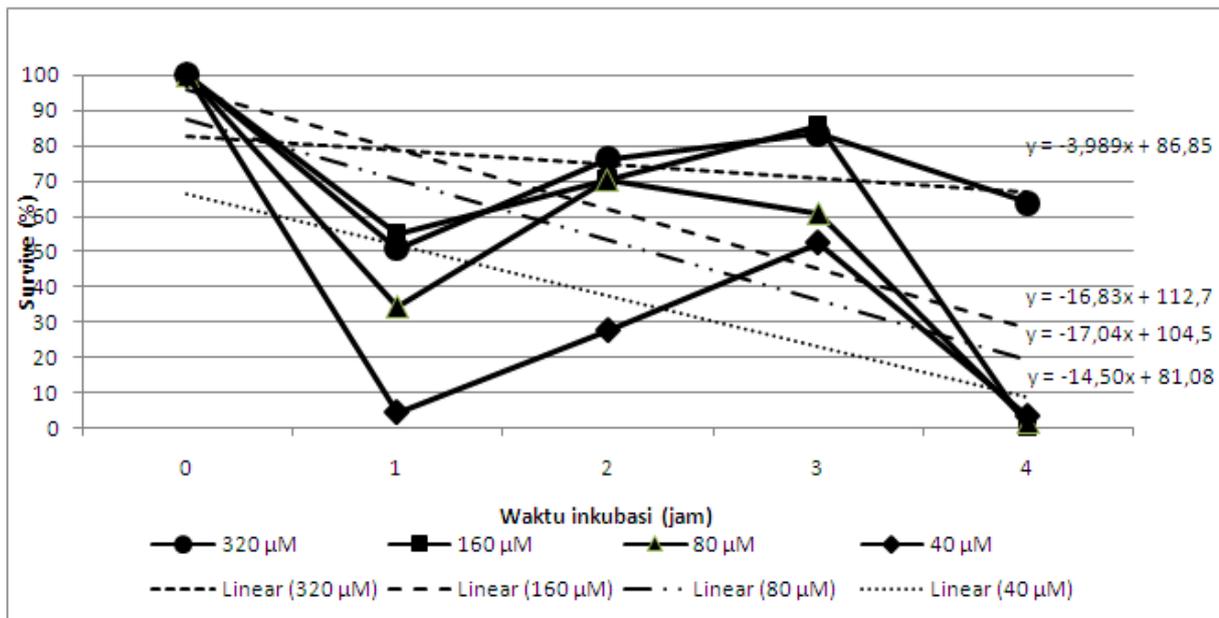
Gambar 1. Histogram tingkat kelulushidupan oosit ikan lele yang dikultur selama 4 jam



Gambar 2. Grafik hubungan antara perlakuan dengan persentase jumlah oosit ikan lele yang mampu bertahan hidup selama 4 jam



**Gambar 3.** Unit percobaan yang tidak dipapari dengan klorin secara stabil mengalami penurunan hingga jam ke-4 (Perlakuan 10 dan 20 mengalami kenaikan persentase bertahan hidup pada jam ke-2. Garis linier masing-masing perlakuan memiliki kemiringan relatif sama)



**Gambar 4.** Perlakuan 40-320 μM memiliki titik *recovery* satu jam setelah diinkubasi (sudut kemiringan garis linear pada perlakuan 320 μM lebih kecil dibanding perlakuan 40-160 μM yang menunjukkan jumlah rata-rata oosit yang bertahan hidup hingga jam ke-4 justru lebih tinggi)

Prinsip kerja klorin adalah mengoksidasi gugus SH yang ada pada asam amino terutama pada residu metionin dan triptopan. Jika oosit terpapar klorin maka protein-protein yang ada di membran (terutama yang memiliki metionin dan triptopan) akan terdegradasi. Kejadian ini akan menyebabkan pengambilan asam amino akan terhambat karena protein-protein, pengambilan glukosa terhambat, jumlah ATP menjadi berkurang, menghambat ATPase yang terdapat pada channel ion Na/K sehingga ion K akan keluar dari dalam sel, dan permeabilitas sel akan terganggu karena keluarnya ion K. Semua kejadian tersebut menjadikan sel oosit berada dalam kondisi stres. Namun karena

semua sel memiliki bentuk pertahanan hidup maka berkurangnya ATP menyebabkan molekul AMPK menjadi aktif. Jika molekul AMPK aktif maka mengaktifkan molekul-molekul yang terlibat dalam siklus Krebs's sehingga terbentuk ATP dalam jumlah banyak dalam waktu singkat (Palmer *et al.*, 1998). Meningkatnya ATP secara tiba-tiba menyebabkan perbandingan antara cAMP/ATP menjadi tidak sama dengan pada saat sel belum terpapar dengan klorin. Kondisi ini mengakibatkan *phosphodiesterase* (PDE) menjadi aktif (LaRosa dan Downs, 2007), sementara PDE berperan menghambat aktivitas AC (Hardie dan Pan, 2002) sedangkan AC fungsinya untuk

memproduksi cAMP dengan cara merubah ATP menjadi cAMP (Billodeau, 2011). Dengan demikian jumlah cAMP berkurang terus begitu juga dengan rasio cAMP/ATP semakin tidak stabil. Kondisi ini mengakibatkan aktivitas PKA terganggu karena PKA adalah molekul yang sangat tergantung pada cAMP (Vivarelli *et al.*, 1983). Terhambatnya aktivitas PKA maka molekul kaskade berikutnya terhambat (Vaur *et al.*, 2004). Dengan terhambatnya kaskade PKA maka molekul molekul yang sebelumnya berfungsi untuk mengunci MPF. Tidak terkuncinya MPF menyebabkan molekul-molekul regulator MPF akan menjadi aktif. Dengan kata lain tidak aktifnya PKA memberi peluang bagi kaskade berikutnya untuk mengaktifkan MPF. Jika MPF telah aktif maka oosit memasuki fase *final maturation* yang ditandai dengan adanya *germinal vesicle maturation* (GVM) dan *germinal vesicle breakdown* (GVBD) (Nagahama *et al.*, 1995). Dengan demikian secara teori paparan klorin dengan dosis tertentu memberi peluang untuk menjadikan oosit ikan menjadi matang. Namun yang menjadi perhatian adalah dosis yang diperlukan agar oosit tidak sampai mengalami stres yang berlebihan sehingga oosit menjadi mati tetapi stres yang dialami malah mengaktifkan molekul AMPK.

Dengan penjelasan seperti di atas maka diduga bahwa perlakuan 320  $\mu\text{M}$  merupakan konsentrasi klorin dalam bentuk hipoklorit yang mampu ditoleransi secara optimum oleh oosit ikan lele dengan bantuan molekul AMPK. Gambar 3 dan 4 menunjukkan adanya waktu *recovery*, pada jam pertama semua perlakuan mengalami penurunan persentase bertahan hidup, tetapi kemudian oosit tersebut diduga memproduksi ATP kembali melalui aktivasi molekul AMPK sehingga oosit yang tadinya sudah mengalami stres, menjadi pulih kembali dan perlahan-lahan menunjukkan adanya tanda kehidupan. Tanda kehidupan oosit tersebut dalam penelitian ini ditunjukkan dengan warna hijau kekuningan atau tidak terjadi perubahan warna selama diinkubasi, sedangkan oosit yang mati ditandai dengan warna biru yang berasal dari *trypan blue dye*. Warna biru tersebut tembus melalui membran oosit.

### KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa oosit ikan lele mampu menoleransi kehadiran klorin dalam bentuk hipoklorit di dalam medium kultur *in vitro* paling optimum pada konsentrasi 320  $\mu\text{M}$  dan umumnya semua perlakuan mengalami *recovery* yang diduga karena adanya aktivasi molekul AMPK yang menginduksi terbentuknya ATP sehingga oosit mampu menoleransi kehadiran klorin.

### DAFTAR PUSTAKA

- Billodeau, G. 2003. Effects of phosphodiesterase inhibitors on spontaneous nuclear maturation and cAMP concentrations in bovine oocytes. **Theriogenology**. 60:1679-1690.
- Conti, M., C.B. Danersen, F. Richard, C. Mehats, S.Y. Chun, K. Horner, C. Jin, and A. Tsafiriri. 2002. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Mol. Cell. Endocrinol.** 187:153-159.
- Corton, J., J. Gillespie, and D. Hardie. 1994. Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. **Curr. Biol.** 4:315-324.
- Donaldson, E.M. 1981. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. **J. Fish Physiol.** 8:455-497.
- Estrela, C., C.R.A. Estrela, E.L. Barbin, J.C.E. Spano, M.A. Marchesam, and J.D. Pecora. 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz. Dent. J.** 13(2):113-117.
- Hardie, D. and D. Pan. 2002. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. **Biochem. Soc. Trans.** 30:1064-1070.
- LaRosa, C. and S.M. Downs. 2007. Stress stimulates AMP-activated protein kinase and meiotic resumption in mouse oocytes. **Hum. Reprod.** 25(10):2465-2474.
- Masciarelli S., K. Horner, C. Liu, S. Park, M. Hinckley, S. Hockman, T. Nedachi, C. Jin, M. Conti, and V. Manganiello. 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. **J. Clin. Invest.** 114:196-205.
- Matsuyama, M., A. Sasaki, K. Nakagawa, T. Kobayashi, Y. Nagahama, and H. Chuda. 2001. Maturation-inducing hormone of the tiger puffer, *takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Teleostei): Biosynthesis of steroids by the ovaries and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown in vitro. **Zoological Sci.** 18:225-234.
- Mehlmann, L.M. 2005. Stops dan starts in mammalian oocytes: Recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest dan oocyte maturation. **Reproduct.** 130:791-799.
- Mishra, A. and K.P. Joy. 2006. 2-hydroxyestradiol-17 $\alpha$ -induced oocyte maturation: involvement of cAMP-protein kinase A and okadaic acid-sensitive protein phosphatases, and their interplay in oocyte maturation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. **J. Experiment. Biol.** 209: 2567-2575.
- Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumoto, and Y. Katsu. 1995. Regulation of oocyte growth dan maturation in fish. **Curr. Topics Dev. Biol.** 30:103-145.
- Nayak, P.K., J. Mishra, and S. Ayyaapan. 2004. **In Vitro Effects of Actinomycin D and Cycloheximide on Gonadotropin or 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -Dihydroxy-4-Pregnen-3-One-Induced Maturation of *Catla catla***. Central Institute of Freshwater Aquaculture. Kausalyaganga, Bhubaneswar - 751002, Orissa, India.
- Palmer, A., A. Gavin, and A.R. Nebreda. 1998. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. **EMBO J.** 17(17):5037-5047.
- Powel, S. 2002. Sodium Hypochlorite. General Information Hand Book. Fabrication and Manufacturing Hand Book. **www.Powellfab.com**.
- Vaur, S., R. Poulhe, G. Maton, Y. Daneol, and C. Jessus. 2004. Activation of cdc2 kinase during meiotic maturation of axolotl oocyte. **J. Development. Biol.** 267(2):265-278.
- Vivarelli, E., M. Conti, M. De Felici, and G. Siracusa. 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. **Cell Differentiation.** 12(5):271-276.
- Yamashita, M., H. Kajiura, T. Tanaka, S. Onoe, and Y. Nagahama. 1995. Molecular mechanism activation of maturation promoting factors during gold fish oocyte maturation. **Dev. Biol.** 168:67-75.