

EKOGENOTOKSISITAS LIMBAH CAIR BATIK DAN EFEK ANTIMUTAGENIK *Lemna minor* TERHADAP ERITROSIT IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*)

Ecogenotoxicity of batik liquid waste and antimutagenicity of Lemna minor on Nile tilapia erythrocytes

Erma Musbita Tyastuti¹⁾, Okid Parama A.²⁾, Sunarto³⁾

Universitas Sebelas Maret, Jalan Ir. Sutami No. 36A Ketingan Surakarta, 57126

E-mail korespondensi: ermatyastuti@gmail.com

Abstract – Batik liquid waste in Solo are mostly sent directly to water stream without any treatment. This activity may lead to water contamination. The liquid waste contains some heavy metals that induce genotoxicity such as micronucleus formation. *Lemna minor* has antimutagenic properties due to its active biological compounds (i.e. caroten and amino acids) and able to inhibit the formation of micronucleus. The objectives of this present study are to understand the ecogenotoxicity of batik liquid waste and antimutagenicity of *Lemna minor* on Nile tilapia erythrocytes. This study were conducted in Biology Laboratory of UMS. Two groups of Nile tilapia were fed with different diet, 1 group of *Lemna minor* and 1 group of commercial pelet then exposed to batik liquid waste on 0 ppm/L, 2500 ppm/L, 5000 ppm/L and 7500 ppm/L. The result showed that the exposure of batik liquid waste induced the formation of micronucleus in fish erythrocytes, the highest frequency of micronucleus formation was the exposure of 7500 ppm/L. *Lemna minor* is proven to have the antimutagenicity and suppressed the formation of micronucleus lower than fish with pelet diet.

Keywords: batik liquid waste, ecogenotoxicity, micronucleus, *Lemna minor*, antimutagen.

Abstrak – Limbah cair batik di Solo sebagian besar dibuang langsung ke perairan tanpa diolah terlebih dahulu dan menyebabkan pencemaran air. Kandungan logam berat di dalam limbah cair batik dapat memicu efek genotoksik seperti pembentukan mikronukleus. *Lemna minor* berpotensi sebagai antimutagen dan mencegah pembentukan mikronukleus karena mengandung senyawa aktif seperti karoten dan asam amino. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekogenotoksisitas limbah cair batik dan efek antimutagenik *Lemna minor* terhadap eritrosit ikan nila. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi UMS dengan pemaparan limbah cair batik 0 ppm/L, 2500 ppm/L, 5000 ppm/L dan 7500 ppm/L terhadap 2 kelompok ikan nila dengan diet pelet dan *Lemna minor*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan limbah cair batik memicu pembentukan mikronukleus dengan frekwensi tertinggi pada konsentrasi paparan 7500 ppm/L. *Lemna minor* juga terbukti memiliki potensi antimutagenik karena mampu menekan frekwensi mikronukleus lebih rendah dibandingkan diet pelet.

Kata kunci: limbah cair batik, ekogenotoksisitas, mikronukleus, *Lemna minor*, antimutagen.

PENDAHULUAN

Ekogenotoksikologi adalah suatu bentuk pendekatan yang mengaplikasikan prinsip dan teknik genetika toksikologi untuk menilai efek potensial dari polusi lingkungan dalam bentuk agen genotoksik terhadap kesehatan ekosistem (Akpoilih, 2012; Shugart and Theodoralis, 1998).

Limbah cair batik mengandung logam berbahaya yang dapat mengganggu kesehatan, diantaranya adalah Cr, Cu, Cd, Fe, Mn dan NH₃N (Aryani dkk., 2004; Hartanti dkk., 2011; Putra dkk., 2014; Sasongko dan Tresna, 2010; Subki dkk., 2014). Beberapa studi ekogenotoksikologi terhadap organisme perairan telah membuktikan bahwa paparan logam

berat mampu memicu kerusakan DNA, pembentukan mikronukleus, kelainan kromosom, mutasi sel, perkembangan sel kanker dan kerusakan janin serta beberapa gangguan kesehatan lainnya (Cadalwa *et al.*, 2008; Martin and Griswold, 2009; Mohod and Dhote, 2013).

Mikronukleus didefinisikan sebagai badan ekstra-nuklear yang mengandung fragmen kromosom dan atau keseluruhan kromosom yang tidak bergabung dengan nukleus setelah proses pembelahan sel (Luzhna *et al.*, 2013). Mikronukleus dapat dengan mudah dibedakan dari nukleus utama sel karena memiliki karakteristik sebagai berikut : (i) badan ekstra nuklear di dalam sitoplasma, berbentuk bulat atau lonjong, (ii) diameter $1/3 - 1/20$ dari nukleus utama di dalam sel, (iii) tekstur, warna dan penampakan menggambarkan nukleus utama, (iv) posisi benar-benar terpisah dari nukleus utama. (Ayoola and Akaeze, 2012).

Antimutagen dideskripsikan sebagai agen yang dapat mengurangi akibat yang muncul karena mutasi spontan maupun sengaja dipicu. Mekanisme anti mutagenesis diklasifikasikan menjadi 2 proses utama, yaitu :

- a. Desmutagenesis : faktor yang berperan langsung pada mutagen atau menginaktivasi mutagen. Zat yang berperan disebut desmutagen
- b. Bio anti mutagenesis : faktor yang berperan pada proses mutagenesis atau memperbaiki kerusakan DNA sehingga menurunkan frekwensi mutasi yang terjadi (Nagarathna *et al.*, 2013).

Beberapa kelompok utama senyawa antimutagenik diantaranya adalah vitamin, flavonoid, senyawa fenol, antrakuinon, karotenoid, diterpenoid, kumarin, tanin, hormon steroid, saponin dan produk-produk dari laut

(Bhattacharya, 2011; Sloczynska *et al.*, 2014), serta beberapa kelompok asam amino (Mauro *et al.*, 2009; Srividya *et al.*, 2012).

Lemna minor adalah tumbuhan kecil yang hidup mengambang di perairan, tersebar luas di seluruh penjuru dunia dan sering ditemui tumbuh sebagai populasi yang membentuk selimut tebal di permukaan air yang kaya akan nutrisi. *Lemna minor* adalah tumbuhan monokotil yang termasuk ke dalam famili *Lemnaceae* dan diklasifikasikan sebagai makrofit. Berdasarkan beberapa penelitian, diketahui bahwa *Lemna minor* memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai agen biomonitoring dan bioremediator pencemaran air (Azeez and Sabbar, 2012; Khellaf and Zerdaoun, 2010; Paczkowski *et al.*, 2007; Radic *et al.*, 2009), bahan pakan alami bagi ikan (Olaniyi and Oladunjoye, 2012; Yilmaz *et al.*, 2004); bebek (Ali dkk., 2014); ayam (Hanstein *et al.*, 1992), antioksidan, antibakteri dan antifungal (Gulcin *et al.*, 2010)

Ikan nila dianggap sebagai bioindikator yang sangat bagus untuk studi genotoksikologi perairan dan untuk monitoring lingkungan karena mudah didapat, mudah beradaptasi di segala kondisi lingkungan dan memiliki nilai komersial yang tinggi (Bucker and Conceicao, 2012). Secara umum ikan adalah organisme yang paling sensitif terhadap efek genotoksik yang disebabkan oleh polutan karena beberapa alasan berikut ini : bioindikator yang sensitif terhadap kualitas air dan menunjukkan bahaya dari bahan-bahan kimia yang masuk ke dalam perairan; merespon toksikan seperti respon vertebrata yang lebih tinggi tingkat taksonnya; memiliki kemampuan yang lebih besar untuk memetabolisme xenobiotik dan mengakumulasi polutan; mampu hidup di segala zona perairan dan memiliki nilai

komersial serta rekreasional yang tinggi; memiliki peran penting dalam jaring tropik seperti mengalami bioakumulasi polutan dan biotransformasi xenobiotik seperti mamalia; merespon mutagen dalam konsentrasi rendah; sel tubuh ikan memiliki mekanisme perbaikan yang rendah; jika dibandingkan dengan sel mamalia, sel ikan lebih sensitif terhadap induksi kerusakan DNA; perbaikan DNA yang rusak lebih lambat dibandingkan mamalia sehingga cocok untuk studi bio-monitoring (Mir *et al.*, 2014).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan pada bulan April-Mei 2016, bertempat di Laboratorium Biologi FKIP UMS Surakarta. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan 8 perlakuan dengan 5 kali ulangan. Limbah cair batik didapatkan dari bak tampungan IPAL industri batik di wilayah Kampung Batik Laweyan, Solo. Lemna minor didapatkan dari penggiat Lemna minor di desa Banyudono, Boyolali kemudian dikembangkan di bak pembiakan. Sedangkan ikan nila sehat dengan berat 30-50 gram dan panjang 8-10 cm didapatkan dari Balai Benih Ikan Dinas Peternakan Surakarta.

1. Pemberian pakan

Hewan uji dibagi menjadi 2 kelompok pakan yaitu kelompok pelet (P) dan kelompok Lemna (L). Pemberian pakan dilakukan 2 x setiap hari pada pagi hari dan sore hari. Sisa pakan dibersihkan setiap 24 jam sekali untuk menjaga kondisi air di aquarium. Air yang digunakan harus dalam kondisi : pH 6.9 ± 0.3 ; DO 4.8 ± 0.2 mg/L; suhu 23.59 ± 0.24 °C. Pemeliharaan ikan dengan fotoperiode 12-14 jam selama

7 hari. Pemberian pakan dihentikan satu hari sebelum pemaparan limbah cair batik.

2. Paparan limbah cair batik

Sebelumnya dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan LC50-96 dan didapatkan LC50-96 sebesar 13.601 ppm/L. Berdasarkan hasil di atas maka ditetapkan konsentrasi untuk uji sebenarnya sebagai berikut :

- Kelompok perlakuan A dengan penambahan limbah 0 ppm/L air sebagai kontrol.
- Kelompok perlakuan B dengan penambahan limbah 2500 ppm/L air.
- Kelompok perlakuan C dengan penambahan limbah 5000 ppm/L air.
- Kelompok perlakuan D dengan penambahan limbah 7500 ppm/L air.

3. Penghitungan jumlah mikronukleus

Setelah 96 jam paparan limbah cair batik, ikan nila dibius untuk proses pengambilan darah. Darah diambil dari vena cauda dengan menggunakan *syringe* yang telah dilengkapi EDTA agar darah tidak cepat membeku. Darah yang telah diambil segera dibuat preparat apus darah di atas gelas obyek kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang semalaman. Apusan darah difiksasi dengan methanol absolut selama 10 menit dan dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan Giemsa 10% selama 1 jam. Untuk tiap sampel darah dari satu individu ikan dibuat 2 preparat apus darah untuk pengamatan 1000 eritrosit, penghitungan 500 eritrosit untuk tiap preparat dan diamati ada tidaknya

mikronuleus dan nukleus abnormal lainnya. Pengamatan eritrosit menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x (Kousar and Javed, 2015; Srivastava and Singh, 2015 dengan beberapa modifikasi). Untuk mempermudah proses penghitungan eritrosit, mikroskop dilengkapi dengan optilab yang berfungsi mengambil gambar eritrosit yang teramati. Mikronukleus yang telah teramati kemudian dihitung frekuensinya dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$FMN (\%) = \frac{\text{Jumlah mikronukleus yang teramati}}{\text{Jumlah total sel yang diamati}} \times 100$$

(Kousar and Javed, 2015)

4. Analisis dan Interpretasi Data

Data frekwensi mikronukleus dianalisis secara non parametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis untuk membandingkan antara kelompok paparan limbah dan jenis pakan ($p < 0.05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Ekogenotoksisitas limbah cair batik terhadap pembentukan mikronukleus eritrosit ikan nila.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa paparan limbah cair batik telah memicu pembentukan mikronukleus pada beberapa konsentrasi uji. Hasil dapat dilihat pada table 1. Data pada tabel menunjukkan bahwa paparan limbah cair batik telah memicu pembentukan mikronukleus pada beberapa konsentrasi paparan dan frekwensi mikronukleus cenderung meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi paparan.

Tabel 1. Frekwensi mikronukleus pada eritrosit ikan nila dengan beberapa konsentrasi paparan limbah cair batik

Konsentrasi paparan limbah cair batik	% Frekwensi mikronukleus eritrosit (Mean ± SD)
0 ppm/L (kontrol)	0
2500 ppm/L	1.40±1.647
5000 ppm/L	1.00±1.155
7500 ppm/L	2.10±1.792

Frekwensi tertinggi terdapat pada konsentrasi paparan 7500 ppm/L dan memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Sedangkan pada kontrol tidak terdeteksi adanya mikronukleus pada eritrosit ikan nila. Semakin tinggi konsentrasi limbah cair batik maka semakin tinggi juga kadar pencemar yang terkandung di dalamnya, sehingga memicu semakin tingginya frekwensi pembentukan mikronukleus. Mikronukleus yang terbentuk pada eritrosit ikan nila dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Mikronukleus yang terbentuk di eritrosit ikan nila (a) dan (b). Mikronukleus yang diamati berukuran 1/3-1/40 dari nukleus utama.

Pembentukan mikronukleus pada uji ini diperkirakan karena paparan logam berat yang terkandung pada limbah cair batik. Beberapa studi telah mengindikasikan bahwa logam berat dapat menimbulkan efek genotoksik salah satunya adalah pembentukan mikronukleus. Logam berat dapat berperan baik secara tunggal maupun

bersama-sama (polimetal). Pada limbah cair batik yang digunakan dalam studi ini terkandung logam Cr, Cd, Mn, Fe dan Cu. Masing-masing jenis logam tersebut memiliki potensi genotoksik yang spesifik terhadap sel-sel tubuh organisme.

Cr terdapat di lingkungan dalam tiga tahapan oksidasi yang stabil yaitu Cr (0), Cr (III) dan Cr (VI) dimana masing-masing memiliki karakteristik toksisitas dan transport yang berbeda. Cr (VI) atau hexavalen adalah bentuk yang paling beracun bagi manusia maupun hewan karena potensi oksidasinya tinggi dan mampu menembus membran sel. Selain terindikasi toksik, Cr (VI) juga merupakan agen karsinogenik dan dapat menghancurkan struktur DNA. (Govind and Madhuri, 2014; Lin et al., 2009; Shadreck and Mugazda, 2013).

Penelitian oleh Kumar et al. (2012) terhadap ikan *Channa punctatus* menunjukkan bahwa paparan konsentrasi subletal potasium kromat selama 21 hari menginduksi pembentukan MN secara maksimal pada eritrosit, sedangkan paparan selama 7 hari memicu pembentukan ekor komet pada limfosit dan sel insang secara maksimal dengan uji *commet assay*. Pada penelitian lain dilakukan pemaparan Cr selama 21 hari pada ikan *Catla catla* dan hasil yang didapatkan menunjukkan adanya peningkatan frekwensi MN dan nukleus binuklear secara signifikan pada eritrosit ikan yang dipicu oleh peningkatan kerusakan DNA dan seiring dengan penurunan aktifitas enzim SOD serta peningkatan aktifitas enzim katalase (Arunachalan et al., 2013). Penelitian Rasa et al. (2011) juga memperkuat bukti tentang efek genotoksik Cr. Penelitian dilakukan

terhadap ikan *Labeo rohita* dengan paparan potasium dikromat, bentuk terlarut dari heksavalen Cr (VI). Hasil menunjukkan bahwa terjadi pembentukan MN pada eritrosit ikan setelah paparan potasium dikromat baik pada konsentrasi subletal maupun nonletal.

Cd adalah logam non esensial yang banyak dilepas di lingkungan sebagai limbah industri dan merupakan logam yang dapat mengendap di dalam jaringan tubuh dalam waktu yang lama (10-30 tahun) dan lambat proses ekskresinya (Ercal et al., 2001). Dubey dan Tripathi (2014) melakukan pengamatan efek genotoksitas paparan Cd terhadap 3 jenis jaringan pada ikan *Channa punctatus* yaitu eritrosit, sel-sel ginjal dan sel-sel insang selama 96 jam dengan uji MN. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa frekwensi MN tertinggi terdapat pada sel insang, kemudian eritrosit dan terakhir pada sel ginjal. Semakin lama paparan dan semakin tinggi konsentrasi paparan Cd maka semakin tinggi juga frekwensi MN. Hasil yang sama juga didapatkan oleh Ozkan et al. (2011) yang melakukan studi efek genotoksik Cd pada ikan *Oreochromis niloticus*, bahwa semakin tinggi dosis Cd dan semakin panjang durasi paparan meningkatkan frekwensi pembentukan MN.

Mn, Fe dan Cu adalah logam esensial yang dalam batasan tertentu berguna dalam metabolisme namun jika dalam jumlah yang berlebih dapat menjadi racun bagi tubuh (Flora et al., 2008). Ketiga logam tersebut dapat memicu kerusakan DNA secara oksidatif dengan membentuk radikal bebas. Radikal bebas berupa Fe bebas, Mn bebas, Cu bebas, OH*

atau O^{2*} . Pembentukan radikal hidroksil melalui jalur reaksi Fenton dan Haber-Weiss. Radikal bebas yang mengoksidasi DNA menyebabkan terjadinya substitusi basa pada DNA dan memicu mutasi. Selain berperan langsung terhadap DNA, radikal bebas juga memicu kerusakan enzim-enzim antioksidan dan enzim-enzim perbaikan DNA sehingga kerusakan pada DNA lambat diperbaiki atau bahkan tidak dapat diperbaiki. Kondisi inilah yang bisa memicu pembentukan MN (Anderson et al., 2007; Dziaman et al., 2011; Jaishankar et al., 2014; Okocha and Adedeji, 2012; Papanikolaou and Pantopoulos, 2005; Stephenson et al., 2013; Toyokuni, 2009). Penelitian oleh Horta et al. (2016) membuktikan bahwa logam Fe dapat memicu pembentukan MN secara in vivo pada limfosit mencit. Logam Cu juga telah terindikasi dapat menginduksi pembentukan mikronukleus pada larva katak *Lithobates catabieanus* (Da Rocha, 2011) dan pada beberapa spesies ikan yaitu *Labio rohita*, *Cirrhina mrigala*, *Ctanopharygodon idella* dan *Catla catla* setelah 30 hari paparan (Kousar and Javeed, 2015).

2. Efek antimutagenik *Lemna minor* terhadap pembentukan mikronukleus eritrosit ikan nila setelah pemaparan limbah cair batik.

Pemaparan limbah cair batik dilakukan setelah sebelumnya 2 kelompok ikan nila diberi 2 jenis pakan yang berbeda. Kelompok 1 diberi pakan pelet sebagai kontrol sedangkan kelompok 2 diberi pakan *Lemna minor* sebagai kelompok perlakuan. Hasil pengamatan pembentukan mikronukleus setelah paparan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Frekwensi mikronukleus di tiap konsentrasi paparan limbah cair batik pada 2 jenis pakan yang berbeda (pelet dan *Lemna minor*)

Konsentrasi paparan limbah cair batik	Frekwensi mikronukleus (Mean \pm SD)	
	Pelet	<i>Lemna minor</i>
0 ppm/L (kontrol)	0	0
2500 ppm/L	2.20 \pm 2.049	0.60 \pm 0.548
5000 ppm/L	1.40 \pm 1.517	0.60 \pm 0.548
7500 ppm/L	3.60 \pm 1.140	0.60 \pm 0.548

Dalam studi ini belum dapat ditentukan peran spesifik *Lemna minor*, apakah sebagai desmutagen atau bioantimutagen. Diperlukan studi lanjutan untuk mengetahui mekanisme kerja *Lemna minor* dalam menghambat pembentukan mikronukleus sehingga peran spesifik antimutagenya dapat diketahui.

Untuk memperkirakan mekanisme kerja antimutagen *Lemna minor*, bisa dilihat dari kandungan kimiawi yang dimiliki. *Lemna minor* kaya akan protein dan asam amino yang memiliki efek antimutagenik. Roy et al. (2002) telah menguji aktifitas antimutagenik dari 19 asam amino (kecuali histidin) terhadap daya mutagenik N-metil-N'-nitro-Nnitroguanidin (MNNG) dengan uji AMES dan didapatkan hasil bahwa sistein adalah antimutagen teraktif dan glisin, triptofan, lisin dan arginin sebagai antimutagen kuat, sedangkan sisanya menunjukkan aktifitas antimutagenik menengah hingga lemah. Asam amino juga berperan sebagai *chelator*, yaitu senyawa yang mampu mengikat logam berat dan mencegah toksisitas logam berat (Marara, 2012). Pengikatan logam berat oleh *chelator* mencegah pembentukan ROS dan mutasi pada

sel. *Lemna minor* juga mengandung karoten yang merupakan prekursor vitamin A, memiliki daya antioksidan yang berperan sebagai antimutagen dan menginaktivasi mutagen sehingga *Lemna minor* bisa berperan sebagai antimutagen dengan potensi antioksidan (Flora *et al.*, 2008). Antioksidan mampu menghilangkan ROS sebelum molekul mutagen bereaksi dengan DNA dan menyebabkan mutasi (Sloczynska *et al.*, 2014). Lemnan, senyawa pektin kompleks juga ditemukan terkandung di dalam *Lemna minor* (Gulcin, 2010). Pektin adalah kelompok polisakarida yang ditemukan di dinding sel tumbuhan tingkat tinggi dengan fungsi sebagai agen penghidrasi dan bahan pematang untuk jaringan selulosa (Thakur *et al.*, 1997). Pektin juga berperan sebagai *chelator* bagi logam berat sehingga mencegah mutasi sel karena pembentukan ROS. Zhao *et al.* (2008) menguji peran pektin pada jeruk sebagai *chelator* pada detoksifikasi timbal terhadap anak-anak yang dirawat di rumah sakit karena keracunan timbal. Hasil uji menunjukkan penurunan kadar timbal pada serum darah dan peningkatan kadar timbal pada urin anak-anak tersebut.

Semakin beragamnya bahan-bahan mutagenik yang terlepas di lingkungan maka semakin tinggi juga ancaman genotoksik yang dapat menurunkan kualitas hidup makhluk hidup. Efek genotoksik adalah pemicu awal berkembangnya gangguan-gangguan sistem fisiologis pada makhluk hidup. Potensi antimutagenik yang dimiliki oleh *Lemna minor* menjadikan tumbuhan ini sebagai salah satu alternatif solusi dalam mencegah atau meminimalisir

efek genotoksik bahan-bahan mutagenik.

SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Limbah cair batik memiliki efek ekogenotoksik terhadap eritrosit ikan nila karena mampu memicu pembentukan mikronukleus. Kandungan logam berat di dalam limbah cair batik sebagai salah satu pemicu munculnya efek genotoksik pada eritrosit ikan nila. Logam berat yang terkandung di dalam limbah cair batik adalah Cd, Cr, Fe, Mn dan Cu. *Lemna minor* berpotensi sebagai antimutagenik karena mampu meminimalisir pembentukan mikronukleus pada eritrosit ikan nila. Belum dapat ditentukan aktifitas antimutagenik yang utama pada *Lemna minor*, apakah sebagai desmutagen atau bioantimutagen.

DAFTAR PUSTAKA

- Akpoilih, B. U. 2012. "Fish Ecogenotoxicology: An Emerging Science, An Emerging Tool for Environmental Monitoring and Risk Assessment". *G.J.B.B.* 1 (2) : 141-151. ISSN : 2278-9103
- Ali, M., Sukirno, Tamzil, M. H. and Ichsan, M. 2014. "Meat Traits of Muscovy Ducks Fed on Phytonutrition Meal". *Int. J. Poult. Sci.* 13 (4) : 204-207. ISSN : 1682-8356
- Anderson, G. 2007. "Mechanism of Iron Loading and Toxicity". *Am. J. Hematol.* 82 : 1128-1131. DOI : 10.1002/ajh.21075
- Arunachalan, K.D., Annamalai, S.K. and Kuruva, J. K. 2013. "In Vivo Evaluation of Hexavalent Chromium Induced DNA Damage by Alkaline Comet Assay and Oxidative Stress in *Catla catla*". *AJES* 9 (6) : 470-482. DOI : 10.3844/ajessp.2013.470.482

- Aryani, Y., Sunarto dan Widiyani, T. 2004. "Toksistas Akut Limbah Cair Batik CV. Giyant Santoso Surakarta dan Efek Sublethalnya Terhadap Struktur Mikroanatomi Branchia dan Hepar Ikan nila (*Oreochromis niloticus*)". *BioSMART*. 6 (2) : 147-153. ISSN : 1412-033x
- Ayoola, S. O. and Akaeze, c. O. 2012. "Genotoxic Evaluation and Toxicity of Spent Engine Oil on *Clarias gariepinus*". *Res. J. Environ. Toxicol.* 6 (4) : 133-141. ISSN : 1819-3420. DOI : 10.3923/rjet.2012.133.141.
- Azeez, N. M. and Sabbar, A. A. 2012. "Efficiency of Duckweed (*Lemna minor* L.) in Phytotreatment of Wastewater Pollutants from Basrah Oil Refinery". *J. Appl. Phytotech. Environ. Sanit.* 1 (4) : 163-172. ISSN : 2088-6586
- Bhattacharya, Sanjib. 2011. "Natural Antimutagens : A Review". *Res. J. Med. Plant.* 5 (2) : 116-126. ISSN : 1819-3455. DOI : 10.3923/rjmp.2011.116.126
- Bucker, A. and da Conceicao, M. B. 2012. "Genotoxicity evaluation of tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to waters from two sites of Itajai-Acu River (SC, Brazil)". *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 7 (2) : 51-56. DOI : 10.5132/jbse.2012.02.008
- Cadahia, B. P., Laffon, B., Porta, M., Lafuente, A., Cabaleiro, T., Lopez, T., Caride, A., Pumarega, J., Romero, A., Pasaro, E. and Mendez, J. 2008. "Relationship Between Blood Concentration and Endocrine Parameters Among Subjects Involved in Cleaning Coastal Areas Affected by The 'Prestige' Tanker Oil Spill". *Chemosphere.* 71 : 447-455. DOI :10.1016/j.chemosphere.2007.10.053
- Da Rocha, C. A. M. 2011. "The micronucleus Test in Erythrocytes of Amphibian Larvae as Tool for Xenobiotic Exposure Risk Assessment : A Brief Review and An Example Using *Lithobates catesbeianus* Exposed to Copper Sulphate". *Middle-East. J. Sci. Res.* 8 (1) : 23-29. ISSN : 1990-9233
- Dubey, A. and Tripathi, N.K. 2014. "Evaluation of Time, Dose, and Tissue Dependent Genotoxic Effect of Cadmium Chloride in a Freshwater Fish, *Channa punctatus* (Pisces : Family : Channidae)". *IJRSR* 5 (5) : 934-939. ISSN : 0976-3031
- Dziaman, T., Jurgowiak, M. and Olinski, R. 2011. "Association between body iron stores and level of oxidatively modified DNA bases". *JBCBB* 92 (2) : 159-165
- Flora, S. J. S., Mittal, M. and Mehta, A. 2008. "Heavy metal induced oxidative stress and its possible reversal by chelation therapy". *Indian. J. Med. Res.* 128 : 501-523
- Gulcin, I., Kurecci, E., Akkenik, E., Topal, F. and Hisar, O. 2010. "Antioxidant, Antibacterial and Anticandidal Activities of Aquatic Plant : Duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). *Turk. J. Biol.* 34 : 175-188
- Hartati, I., Riwayati, I. dan Kurniasari, L. 2011. "Potensi Xanthate Pulpa Kopi Sebagai Adsorben Pada Pemisahan Ion Timbal dari Limbah Industri Batik". *Momentum.* 7 (2) : 25-30
- Horta, R.N., Kahl, V. F. S., Sarmiento, M. S., Nunes, M. F. S., Porto, C. R. M., de Andrade, V. M., Ferraz, A. B. F. and Da Silva, J. 2016. "Protective effects of acerola juice

- on genotoxicity induced by iron in vivo". *GMB* 39 (1) : 122-128. DOI : 10.1590/1678-4685-GMB-2015-0517
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B. and Beeregowda, K. 2014. "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals". *Interdiscip. Toxicol.* 7 (2) : 60-72. DOI : 10.2478/intox-2014-0009
- Khellaf, N. and Zerdaoui, M. 2010. "Growth, Photosynthesis and respiratory Response to Copper in *Lemna minor* : A Potential Use of Duckweed in Biomonitoring". *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 7 (2) : 299-306
- Kousar, S and Javed, M. 2015. "Studies on Induction of Nuclear Abnormalities in Peripheral Blood Erythrocytes of Fish Exposed to Copper". *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 15 : 879-886. ISSN : 1303-2712. DOI : 10.4194/1303-2712-V15_4_11
- Kumar, R., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S. K. and Lakra, W. S. 2010. "Investigation of the genotoxicity of malathion to freshwater teleost fish *Channa punctatus* (Bloch) using the micronucleus test and *comet assay*". *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 58 : 123-130. DOI : 10.1007/s00244-009-9354-3
- Lin, C. C., Wu, M. L., Yang, C. C., Ger, J., Tsai, W. J. and Deng, J. F. 2009. "Acute Severe Chromium Poisoning After Dermal Exposure to Hexavalent Chromium". *J. Chin. Med. Assoc.* 72 (4) : 219-221. DOI : 10.1016/s1726-4901 (09) 70059-0
- Luzhna, L., Kathiria, B. and Kovalchuk, O. 2012. "Micronuclei in Genotoxicity Assessment : From Genetics to Epigenetics and Beyond". *Frontiers in Genetics.* 4 Article 131. DOI : 10.3389/fgene.2013.00131
- Marara, A. 2012. "Plant Response to Heavy Metal Toxicity" in A. Furim (ed). *Plants and Heavy Metals. Springerbriefs in BioMetals.* DOI : 10.1007/978-94-007-4441-7_2
- Martin, S. and Griswold, W. 2009. "Human Health Effects of Heavy Metals". *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens.* 15th Ed. CHSR. KSU. Manhattan. New York
- Mauro, M. O., Pesarini, J. R., Ishii, P. L., daSilva, A. F. and Oliveira, R. J. 2010. "Chemopreventive Activity of Phenylalanine Againsts Damage Mutagenic Prompted by the Acute Administration of Cyclophosphamide in Pregnant and Non-Pregnant Mice Using the Micronucleus Test". *Braz. J. Pharmacogn.* 20 (3) : 334-339
- Mir, M. I., Khan, S., Bhat, S. A., Reshi, A. A., Shah, F. A., Balki, M. H. and Manzoor, R. 2014. "Scenario of Genotoxicity in Fishes and Its Impact on Fish Industry". *IOSR-JESTFT.* 8 (6) : 2319-2402. E-ISSN : 2319-2402
- Mohod, C. V. and Dhote, J. 2013. "Review of Heavy Metals in Drinking Water and Their Effect on Human Health". *IJIRSET.* 2 (7) : 2992-2996
- Nagarathna, P. K. M., Wesley, M. J., Reddy, P. S. and Renna, K. 2013. "Review on Genotoxicity, Its Molecular Mechanism and Prevention". *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 22 (1) : 236-243. ISSN : 0976-044x
- Okocha, R. O. and Adedeji, O. B. 2012. "Overview of Copper Toxicity to Aquatic Life". *Rep. Opinion.* 4 (8) : 57-67. ISSN : 1553-9873

- Olaniyi, C. O. and Oladunjaye, I. O. 2012. "Replacement Value of duckweed (*Lemna minor*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diet". *Transnat.J. Sci. Tech.* 2 (9) : 54-61
- Ozkan, F., Gunduz, S. G., Berkoz, M. and Ozlner Hunt, A. 2011. "Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, following exposure to sublethal cadmium dose". *Turk. J. Zool.* 35 (4) : 585-592. DOI : 10.3906/zoo-0907-77
- Paczkowska, M., Kozłowska, M. and Golinski, P. 2007. "Oxidative Stress Enzyme Activity in *Lemna minor* L. Exposed to Cadmium and Lead". *ACTA BIOLOGICA CRACOVENSIS Series Botanica.* 49 (2) : 33-37. PL ISSN : 0001-5296
- Papanikolaou, G. and Pantopoulos, K. 2005. "Iron metabolism and toxicity". *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 : 199-211. DOI : 10.1016/j.taap.2004.06.021
- Putra, D. E., Astuti, F. P. dan Suharyadi, E. 2014. "Studi Penurunan Kadar Logam Besi (Fe) pada Limbah Batik dengan Sistem Purifikasi Menggunakan Absorben Nanopartikel Magnetic (Fe₃O₄)". *Prosiding Pertemuan Ilmiah XXVIII HFI Jateng dan DIY* : 250-252. ISSN : 0853-0823
- Radic, S., Stipanicev, D., Cvjetko, P., Mikelic, I. L., Rajcic, M. M., Sirac, S., Kozlina, B. P. and Pavlica, M. 2009. "Ecotoxicological Assessment of Industrial Effluent Using Duckweed (*Lemna minor* L.) as A Test Organism". *Ecotoxicology.* DOI 10.1007/s10646-009-0408-0
- Rasal, K., Rasal, A. and Makwana, N. 2011. "Micronucleus test as a cytogenetic marker for evaluation of genotoxicity in fish, *Labeo rohita*". *Asian J. Animal. Sci.* 6 (1) : 32-34
- Roy, M. K., Kuwabara, Y., Hara, K., Watanabe, Y. and Tamai, Y. 2002. "Antimutagenic Effects of Amino Acids on the Mutagenicity of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)". *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 66 (6) : 1400-1402. DOI : 10.1271/666.66.1400
- Sasongko, Dwi P. 2010. "Identifikasi Unsur dan Kadar Logam Berat pada Limbah Pewarna Batik dengan Metode Analisis Pengaktifan Neutron". *TELAAH.* 27 : 22-27
- Shadreck, M. and Mugadza, T. 2013. "Chromium, an essential nutrient and pollutant : A Review". *AJPAC* 7 (9) : 310-317. DOI : 10.5897/AJPAC 2013.0517
- Shugart, L. and Theodorakis, C. 1998. "New Trends in Biological Monitoring : Application of Biomarkers to Genetic Ecotoxicology". *Biotherapy.* 11 : 119-127
- Sloczynska, K., Powraznik, B., Pekala, E. and Waszkielewicz. 2014. "Antimutagenic Compounds and Their Possible Mechanism of Action". *J. Appl. Genetics.* 55 : 273-285. DOI : 10.1007/513355-014-0198-9
- Srivastava, P. and Singh, A. 2015. "Evidence of Micronuclei in Fish Blood as A Biomarker of Genotoxicity due to Surface Run of Agricultural Fungicide (Propiconazole)". *J Toxicol. Environ. Health. Sci.* 7 (1) : 4-8.

- Article Number : 845D77C50247.
ISSN : 2006-9820. DOI : 10.5897/
JTEHS2015.0325
- Srividya, A. R., Dhanabal, S. P. and Vishnuvarthan, V. J. 2012. "Mutagenicity/Antimutagenicity of Plant Extracts Used in Traditional Medicine : A Review". *WJPR*. 2 (1) : 236-259. ISSN : 2277-7105
- Stephenson, A. P., Mazu, T.K., Miles, J. S., Freeman, M. D., Reams, R. R. and Flores-Rozas, H. 2013. "Defects in Base Excision Repair Sensitize Cells to Manganese in *S. cerevisiae*". *BioMed. Res. Int.* Article ID 295635. DOI : 10.1155/2013/295635
- Subki, N. S., Hashim, R. and Muslim, N. Z. M. 2014. "Heavy Metals Analysis of Batik Industry Wastewater, Plant and Soil Samples : A Comparison Study of FAAS and HACH Colorimeter Analytical Capabilities" in A. Z. Aris *et al.*, (Eds) From Sources to Solution pages 285-289. Springer Science and Business Media. Singapore
- Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K. and Rao, M. A. 1997. "Chemistry and uses of pectin – A Review". *Critical Rev. In Food Sci. and Nutri.* 37 (1) : 47-73. DOI : 10.1080/10408399709527767
- Toyokuni, S. 2009. "Role of Iron in Carcinogenesis : Cancer as a ferrotoxic disease". *Cancer Sci.* 100 (1) : 9-16. DOI : 10.1111/j.1349-7006.2008.01001.x
- Yilmaz, E., Akyurt, I. and Gunal, G. 2004. "Use of Duckweed. *Lemna minor*, as A Protein Feedstuff in Practical Diets for Common Carp, *Cyprinus carpio*, Fry". *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 4 : 105-109
- Zhao, Z. Y., Liang, L., Fan, X. Q., Yu, Z. H., Hotchkiss, A. T., Wilk, B. J. and Eliaz, I. 2008. "The Role of Modified Citrus Pectin As An Effective Chelator of Lead in Children Hospitalized with Toxic Lead Levels". *Altern. Ther. Health. Med.* 14 (4) : 34-38