

HASIL PENELITIAN**PENGARUH KONSENTRASI SUBLETHAL DIAZINON 60 EC TERHADAP PERKEMBANGAN AWAL EMBRIO BULU BABI *ECHINOMETRA MATHAEI***Markus T. Lasut¹⁾⁴⁾, Deiske A. Sumilat²⁾⁴⁾ & Deddy T. Arbie³⁾¹⁾ Laboratorium Toksikologi & Farmasitika Kelautan,²⁾ Laboratorium Bioteknologi Kelautan,³⁾ Dinas Bahari, Pemerintah Kota Manado, Sulawesi Utara⁴⁾ Program Studi Ilmu Kelautan, Fak. Perikanan & Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi

Abstract. Diazinon is one of insecticides used to control pests and other organisms. However, diazinon may have negative impact to aquatic ecosystem since its application in agriculture is uncontrolled. The present experiment aims to determine the effect of diazinon (insecticide) in sublethal concentration on embryonic development of sea urchin *Echinometra mathaei*. The experiment was designed by using toxicity test technique in which a number of eggs and sperms of the sea urchin were exposed into seawater with 0.3, 0.6, and 3 ppm of diazinon concentrations and a control (0 ppm). Percentage of developing larvae were accounted and time of each embryonic development stage was recorded. The result shows the range of sublethal concentration of diazinon is 0.06 to 0.6 ppm. Mean percentage of developed larvae for concentration of 0.3, 0.6, 3 and the control are 29.23, 40.07, 62.11, and 82.28, respectively. Mean time for the first, second, third, fourth, morula, hatching and larvae development stages are 87.41, 158.08, 188.75, 227.83, 269.83, 523.75, and 2122.41 minutes, respectively. Even though diazinon in sublethal concentration was not affect the development time, it is for mortality of larvae.

Keywords: toxicity test, sea urchin, *Echinometra mathaei*, diazinon, insecticide.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah serius yang selalu dibicarakan oleh masyarakat dan pemerintah adalah pencemaran lingkungan. Bahan pencemar (polutan) yang masuk ke lingkungan, baik darat maupun laut, dapat mengancam kehidupan manusia.

Di Indonesia, sebagian besar petani memiliki pendidikan yang rendah, usaha penanggulangan hama dan penyakit pada tanaman selalu dilakukan dengan cara pengendalian kimia, yaitu dengan menggunakan pestisida. Namun dalam penggunaannya di lapangan, para petani sering menggunakan pestisida secara berlebihan tanpa menghiraukan dampak

negatifnya terhadap lingkungan umum (Sembel *dkk.* 1991).

Ekosistem perairan merupakan wadah penampungan dari berbagai limbah. Demikian juga dengan ekosistem daerah pesisir sangat dipengaruhi oleh tekanan-tekanan pencemaran/polusi. Organisme yang hidup di daerah ini dapat terganggu oleh karena adanya buangan limbah, baik dari suatu sumber tertentu (misalnya limbah sampah dan industri) maupun dari daerah yang bukan merupakan sumber buangan (misalnya aktifitas pelabuhan dan saluran limbah pertanian). Daerah-daerah yang terkena pengaruh pencemaran ini sering merupakan daerah yang penting bagi

perikanan dan pariwisata. Oleh karena itu, merupakan suatu hal yang sangat penting untuk membuat suatu teknik pemantauan pencemaran yang dapat digunakan untuk memantau pencemaran yang dapat membahayakan kehidupan manusia dan organisme perairan.

Dalam hubungan dengan teknik pemantauan lingkungan, khususnya yang menggunakan organisme laut, tahap perkembangan awal dari suatu organisme perairan telah ditemukan lebih peka terhadap pencemaran/polusi yang terjadi di lingkungan daripada tahap dewasa organisme tersebut (Ringwood 1992).

Berhubung dengan hal itu, embrio bulu babi adalah bahan yang telah sering digunakan dalam uji biologis untuk mengukur toksisitas suatu bahan/substansi di perairan laut karena mempunyai prosedur yang cepat, sensitif dan biaya yang relatif murah (Dinnel *dkk.* 1987).

Didasari atas beberapa alasan tersebut di atas, maka timbul keinginan untuk melaksanakan penelitian mengenai pengaruh pestisida terhadap embrio bulu babi hasil fertilisasi buatan. Diharapkan penelitian ini dapat berguna bagi penelitian selanjutnya dan mempunyai manfaat dalam pengelolaan sumberdaya pantai pada umumnya, juga dapat menambah informasi mengenai fertilisasi buatan bulu babi yang dipengaruhi oleh bahan pencemar pada khususnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh diazinon (pestisida) terhadap tingkat keberhasilan larva yang terbentuk dan waktu dari setiap tahap perkembangan embrio bulu babi jenis *Echinometra mathaei*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 1997 sampai April 1999 di Laboratorium Toksikologi dan Farmasitika Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Unsrat. Lokasi pengambilan sampel adalah perairan pantai Tongkaina.

Kecamatan Molas. Kotamadya Manado, Propinsi Sulawesi Utara.

Persiapan

Hewan Uji

Bulu babi yang digunakan sebagai hewan uji dalam penelitian ini diambil dari spesies *E. mathaei*. Hal ini didasarkan atas beberapa pertimbangan, seperti ketersediaannya di alam, mudah untuk diambil, dan pembentukan membran fertilisasinya terlihat dengan jelas. Hewan uji dewasa diambil dari perairan pantai Tongkaina (tempat pengambilan sampel). Diusahakan sampel bulu babi yang diambil berada pada fase dewasa, agar sampel yang diambil benar-benar telah matang gonad yaitu yang berukuran besar, sehingga mudah dalam proses pembedahan. Hewan uji kemudian dimasukkan dalam wadah plastik yang telah diisi air laut, dan diberi aerasi yang baik. Hewan uji yang diperoleh dibawa ke Laboratorium, dan dipelihara di dalam akuarium kaca berukuran 40 x 30 x 30 cm dengan menggunakan metode statis (air tidak mengalir).

Sebelum fertilisasi dilaksanakan, terlebih dahulu sampel dibersihkan dengan air tawar. Duri-duri yang terletak pada permukaan luar digunting. Selanjutnya dibilas dengan air laut yang telah disaring.

Larutan Uji

Larutan uji yang digunakan adalah Diazinon 60 EC yang mengandung 600 g/l bahan aktif. Rumus kimia senyawa diazinon adalah (O,O-diethyl O-(2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidil) phosphoro-thioate), dan merupakan insektisida organofosfat dengan tingkat kelarutan dalam air pada 20 °C adalah 40 ppm. Diazinon dapat diperoleh dengan cara dibeli di tempat-tempat yang menyediakan perlengkapan pertanian.

Air Wadah

Semua air wadah diambil dari perairan laut (air laut) dimana sampel hewan uji diperoleh. Air laut kemudian dibawa ke

laboratorium lalu disaring (0,45 μm). Hal ini dimaksudkan agar air laut bersih dari kotoran-kotoran serta organisme-organisme lain yang ikut terbawa. Setelah disaring, air laut disterilkan (menggunakan autoclave, suhu 121⁰ C). sebelum digunakan air laut disimpan dalam wadah tertutup.

Kondisi Percobaan

Parameter suhu air, salinitas dan pH yang diukur selama percobaan masing-masing adalah suhu 28⁰ C, salinitas 34 ppt dan pH 7. parameter-parameter tersebut diukur masing-masing dengan Thermometer, Refrakto-salinometer dan kertas lakmus.

Fertilisasi Buatan pada E. mathaei

Bulu babi yang telah dipersiapkan, pada bagian oralnya dibedah dengan gunting. Lentera Aristoteles yang terdapat pada daerah tersebut dikeluarkan sehingga gonad dapat terlihat; gonad terlebih dahulu dibedakan antara jantan dan betina. Untuk membedakan antara gonad jantan dan betina, dilakukan pengamatan visual pada sebagian gonad yang diambil dengan pinset dan dioleskan pada kaca objek. Gonad betina ditandai dengan adanya butiran-butiran telur yang berukuran kecil dan transparan. Telur akan terlihat lebih jelas bila diamati di bawah mikroskop. Gonad jantan apabila dioleskan pada gelas objek akan mengeluarkan cairan putih seperti susu.

Prosedur fertilisasi dimodifikasi dari Horstadius (1973), Dinnel *dkk.* (1987), dan Ringwood (1992). Telur dirangsang keluar dengan menggunakan 0.5 M KCl, dengan cara menginjeksikan pada bagian oral yang telah dibedah. Telur yang keluar ditampung pada gelas beker. Kemudian diambil 0.1 ml telur dengan pipet dan dimasukkan pada gelas arloji berisi air laut yang telah dipersiapkan. Selanjutnya, telur dicuci.

Sperma dapat langsung dikeluarkan dengan menggunakan pinset dan ditampung pada petri disk. Kemudian, sperma (0,1 ml) diencerkan dalam 1 ml air laut di dalam gelas arloji. Sesudah itu diambil 0.1 ml

sperma dari hasil pengenceran dan dimasukkan ke dalam gelas arloji yang berisi telur. Fertilisasi yang terjadi dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop, yang ditandai dengan adanya pembentukan membran fertilisasi. Selanjutnya dilakukan pengamatan pada tahap-tahap pembelahan sel dan waktu pembentukan untuk setiap perkembangan embrio.

Percobaan

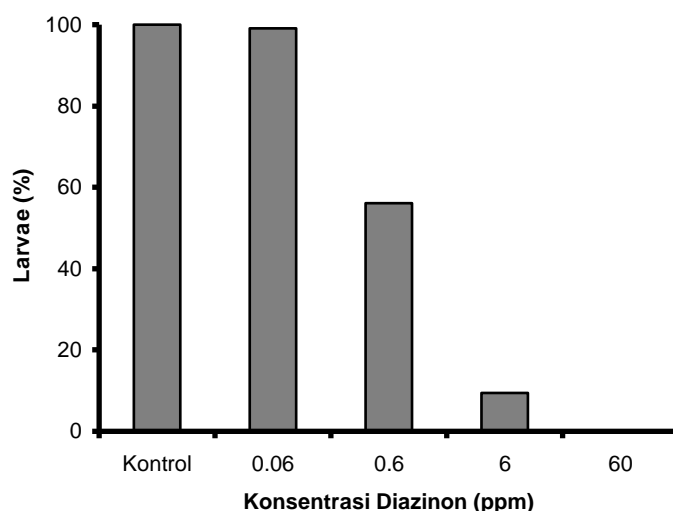
Fertilisasi yang dipengaruhi oleh Diazinon

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh diazinon (dalam beberapa konsentrasi) terhadap perkembangan awal pada *Echinometra mathaei*. Untuk itu fertilisasi buatan dan mengkontaminasi embrio setelah fertilisasi terjadi dengan diazinon melalui air wadah. Pelaksanaannya dilakukan dalam 2 tahap, yaitu Tahap Pendahuluan dan Pengukuran.

Pada Tahap Pendahuluan, Uji pendahuluan dilakukan dengan maksud untuk menentukan konsentrasi subletal (tidak terjadi mortalitas) diazinon yang akan digunakan dalam percobaan. Konsentrasi larutan uji yang dipilih pada tahap ini adalah 0,0001; 0,001; 0,01 dan 0,1 ml/diazinon yang mengandung 0,06; 0,6; 6 dan 60 mg/l (ppm) bahan aktif diazinon ditambah satu kontrol.

Telur yang telah dibuahi yang diperoleh dari hewan uji ditempatkan pada gelas arloji yang berisi 10 ml untuk masing-masing larutan uji. Setelah 36 jam, jumlah larva yang terbentuk dihitung. Apabila proporsi jumlah larva yang terbentuk tidak melebihi 1/2 bagian atau hampir keseluruhan, maka dianggap pada konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi kritis (konsentrasi yang mengakibatkan mortalitas). Setelah mendapatkan kisaran konsentrasi tersebut kemudian dipilih 3 konsentrasi ditambah dengan 1 kontrol untuk digunakan pada tahap berikutnya.

Pada Tahap Pengukuran, ada dua parameter yang diamati/diukur yaitu (1) persentase jumlah larva dan (2) waktu dari



Gambar 1. Prosentase larva bulu babi *E. mathaei* terbentuk pada uji pendahuluan untuk melihat fertilisasi buatan yang dipengaruhi oleh diazinon selama 36 jam

setiap perkembangan embrio. Persentase jumlah larva ditentukan berdasarkan persentasi jumlah larva yang terbentuk setelah fertilisasi buatan dari jumlah telur yang dimasukkan mula-mula. Sperma dan telur yang telah diketahui jumlahnya dimasukkan secara bersamaan pada gelas arloji yang berisi 5 ml untuk masing-masing larutan uji. Larva yang terbentuk dihitung dan dicatat. Dilakukan 3 ulangan untuk setiap percobaan. Pengamatan terhadap waktu dari setiap perkembangan embrio (menit) dimulai setelah membran fertilisasi terbentuk, dimana setelah itu embrio akan memasuki tahapan pembelahan sel. Waktu yang diperlukan untuk melakukan pembelahan dari 1 sel menjadi 2 sel dan selanjutnya ditentukan dan kemudian dibandingkan dengan kontrol. Pengamatan dilakukan untuk setiap konsentrasi larutan uji dan kontrol. Ada 3 ulangan untuk setiap pengamatan.

Analisis Data

Analisis data dilakukan selain untuk mengetahui pengaruh konsentrasi diazinon

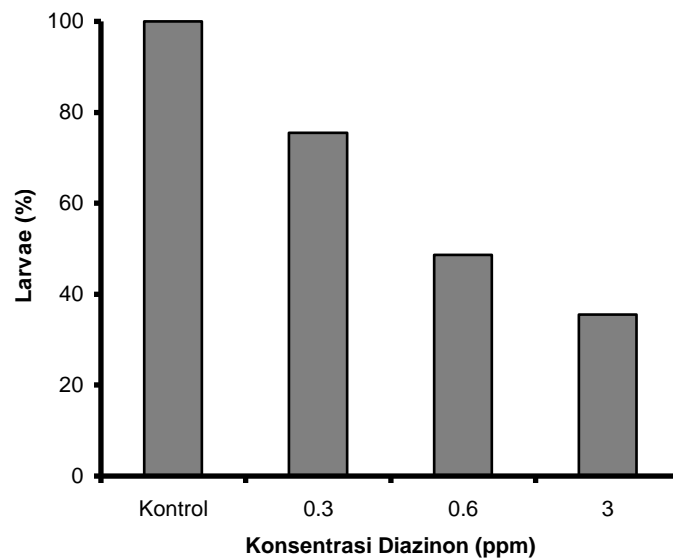
yang berbeda dengan jumlah larva yang dihasilkan, juga untuk mengetahui pengaruh konsentrasi diazinon yang berbeda terhadap waktu yang diperlukan untuk setiap tahap pembelahan. Dengan demikian analisis dilakukan dengan cara menghitung beberapa parameter yang diperoleh selama penelitian, jumlah larva yang diperoleh diekspresikan dalam persentase dimana persentase tersebut merupakan jumlah larva untuk masing-masing perlakuan dan kontrol dibagi jumlah larva kontrol.

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan ANOVA satu arah. Rancangan percobaan terdiri dari 1 faktor yaitu konsentrasi konsentrasi yang digunakan adalah 0,3; 0,6 dan 6 ppm dan satu kontrol.

HASIL

Tahap 1 : Pendahuluan

Setelah 36 jam, rata-rata jumlah larva yang terbentuk pada konsentrasi 0,06; 0,6; 6, dan 60 ppm masing-masing adalah 99,04, 56,03; 9,47; dan 0%, sedangkan pada kontrol adalah 100% (Gambar 1).



Gambar 2. Persentase larva yang terbentuk pada pengukuran fertilisasi buatan bulu babi *E. mathaei* yang dipengaruhi oleh diazinon selama 36 jam.

Dari hasil tersebut di atas maka dapat ditentukan kisaran konsentrasi subletal secara sederhana yaitu terletak diantara konsentrasi 0.06 dan 0.6 ppm. Konsentrasi subletal ini kemudian menjadi patokan bagi pemilihan konsentrasi pada percobaan selanjutnya.

Tahap 2. Pengukuran

1. Persentasi Larva

Nilai rata-rata persentase larva terbentuk yang diperoleh selama 36 jam percobaan pada konsentrasi 3; 0,6; dan 3 ppm masing-masing adalah 35,52; 48,69; dan 75,48 %, sedangkan pada kontrol, sebesar 100 % (Gambar 2).

Hasil pengujian statistika menunjukkan bahwa antara setiap perlakuan dengan kontrol menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($p > 0.01$) dan diazinon berpengaruh secara nyata (signifikan) mulai konsentrasi 0,3 ppm.

2. Waktu Dari Tiap Tahap Perkembangan

Tabel 1 memperlihatkan hasil pengukuran waktu (menit) rata-rata dari setiap tahap perkembangan embrio pada fertilisasi buatan yang dipengaruhi oleh beberapa konsentrasi diazinon.

Pembelahan pertama rata-rata antara 85,66 – 89,33 menit yang membagi telur menjadi dua bagian. Pembelahan kedua rata-rata terjadi antara 155,35 – 159,33 menit menyebabkan embrio menjadi empat sel. Tahapan delapan sel membutuhkan waktu antara 187 – 189,66 menit.

Waktu yang diperlukan pada tahap enam belas sel dan tahap morula rata-rata lebih singkat dari waktu yang diperlukan pada tahap-tahap sebelumnya, yaitu antara 223,66 – 230,33 dan 268.83 – 271.66 menit. Setelah pembelahan kesepuluh (blastula), embrio akan menetas (hatching) dan mulai melakukan gerakan-gerakan untuk berenang. Tahapan ini rata-rata dicapai dalam waktu 523,33 – 526,33 menit. Kemudian larva pluteus akan terbentuk rata-rata 2121,3 – 2123,7 menit setelah inseminasi.

Tabel 1. Waktu (menit) rata-rata tiap tahapan perkembangan embrio bulu babi *E. mathaei* pada fertilisasi buatan yang dipengaruhi oleh beberapa konsentrasi diazinon.

Konsentrasi	2 sel	4 sel	8 sel	16 sel	Morula	Hatching	Larva
Kontrol	86.33	155.33	187.00	223.66	268.33	523.33	2122.00
0.3 ppm	85.66	159.33	189.33	228.00	271.66	526.33	2122.70
0.6 ppm	88.33	159.33	189.00	229.33	270.66	524.33	2121.30
3 ppm	89.33	159.00	189.66	230.33	268.66	524.33	2123.70

Pengujian statistik dilakukan untuk melihat pengaruh waktu pendedahan/kontaminasi larutan uji diazinon terhadap setiap perkembangan embrio. Pada tahap perkembangan 2 sel, 4 sel, 8 sel, 16 sel, morula, blastula, dan perkembangan yang dipengaruhi oleh diazinon tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$)

3. Perkembangan Abnormal

Perkembangan abnormal embrio bulu babi *E. mathaei* juga ditemukan dalam pengamatan yang dilakukan, terutama pada konsentrasi 3 ppm. Pada konsentrasi uji yang lain ditemukan juga bentuk pertumbuhan baik yang normal maupun abnormal.

PEMBAHASAN

Besarnya tingkat keberhasilan larva yang terbentuk dari suatu fertilisasi buatan dalam wadah yang berisi bahan pencemar mengindikasikan besarnya tingkat penghambatan (inhibition) dari bahan tersebut (Kobayashi 1994). Selanjutnya dijelaskan bahwa konsentrasi yang menyebabkan kematian dan/atau malformasi pluteus sebesar 30-49 % disebut penghambatan sedang (moderate inhibition). Dengan demikian, konsentrasi 0.6 dan 3 ppm dapat digolongkan sebagai penghambat kuat, dan konsentrasi 0.3 ppm digolongkan sebagai penghambat sedang.

Cara kerja racun diazinon (insektisida) adalah sebagai pestisida kontak, yang berarti mempunyai daya bunuh setelah tubuh terkontaminasi dengan zat tersebut. Menurut Subiyakto (1991), toksisitas diazinon

dimulai setelah terserap kedalam tubuh melalui kulit atau mulut atau saluran pencernaan dan pernapasan.

Secara fisiologis, pestisida berikatan dengan enzim yang berfungsi mengatur kerja saraf, yaitu enzim Kholinesterase. Apabila Kholinesterase terikat, enzim ini tidak dapat melaksanakan tugasnya terutama untuk meneruskan perintah pada otot-otot tertentu, sehingga otot-otot senantiasa bergerak tanpa dapat dikendalikan.

Pada penelitian ini diperoleh informasi mengenai persentase larva yang dihasilkan setelah dikontaminasikan dengan diazinon. Semakin besar konsentrasi maka akan semakin kecil persentase larva yang akan terbentuk. Kemudian pendedahan diazinon tidak memberikan pengaruh terhadap waktu perkembangan embrio bulu babi *E. mathaei*.

Selain pengaruh pada aspek persentase larva yang dihasilkan, perkembangan embrio bulu babi juga dapat terpengaruh dengan bahan racun lainnya pada aspek yang lain pula. Misalnya, Lintong (1998) mengemukakan bahwa pengaruh racun sianida dapat menghasilkan bentuk 3 sel, multi-sel (poly permy) dan exogastrula.

Bentuk 3 sel terjadi ketika satu sel dalam embrio membelah sedangkan sel yang lainnya tidak dapat melakukan pembelahan, sehingga sel yang terbentuk hanya tiga. Perkembangan multi-sel disebabkan oleh penetrasi dari beberapa sperma ke dalam sebuah telur (poly spermy). Sehingga telur akan terbelah menjadi beberapa sel dalam bentuk yang tidak seimbang. Perkembangan 3 sel dan multi-sel lambat laun akan rusak sehingga tidak dapat melanjutkan

perkembangan secara normal (Kobayashi 1984). Exogastrula terjadi apabila air laut terkontaminasi bahan-bahan toksik. Selama proses gastrulasi jaringan yang menghubungkan endoderm menjulur ke luar, sehingga Archenteron tidak terbentuk (Waterman 1937).

Perkembangan abnormal bulu babi *E. mathaei* nampaknya ditemukan dalam percobaan ini, walaupun pengamatannya tidak dilakukan secara detail. Sebagian besar perkembangan embrio yang tidak normal (malformasi) tersebut ditemukan pada konsentrasi 3 ppm, pada konsentrasi uji yang lain (0.3 dan 0.6 ppm) bentuk perkembangan yang ditemukan selain normal juga terdapat malformasi.

Penelitian untuk melihat efek diazinon terhadap organisme laut telah banyak dilakukan, diantaranya oleh Lasut *dkk.* 1997 mendeterminasi efek diazinon terhadap aspek lethal dan sublethal zooplankton rotifer *Brachionus rotundiformis*, Kaligis & Lasut 1997 untuk mengevaluasi efek diazinon dan salinitas terhadap kerang laut *Haliotis varia*, Lasut *dkk.* 2001 menganalisis pengaruh konsentrasi sublethal diazinon dan glifosat terhadap konsumsi oksigen kerang laut *Septifer bilocularis* (Bivalvia).

Pengujian juga telah dilakukan sebelumnya terhadap beberapa pestisida organoklor (endrin, DDT dan Methoxychlor) yang dilakukan pada suhu 20⁰ dan konsentrasi 7 ppm dengan menggunakan hewan uji *Paracentrotus lividus*, menunjukkan bahwa pada endrin hanya mengakibatkan efek yang kecil; DDT dapat menyebabkan pertumbuhan embrio yang tidak normal; sedangkan methoxychlor sangat beracun bagi embrio dan menyebabkan cytolysis (Bresch & Ahrendt 1977).

Pengamatan pada tahap-tahap perkembangan embrio melalui fertilisasi buatan diperoleh data waktu dari tiap tahap perkembangan. Penelitian serupa juga pernah dilakukan oleh Kobayashi (1984) dengan menggunakan hewan uji

Anthocidaris crassispina pada suhu 28⁰ C. Tercatat bahwa membran fertilisasi terbentuk 3 menit setelah inseminasi, tahap dua sel terjadi selama 45 menit, dan blastula akhir terbentuk setelah 8 jam. Tahap pertengahan gastrula terjadi 12 jam, dan pluteus terbentuk dalam 24 jam.

Bila dibandingkan dengan penelitian ini (walaupun perbandingan tersebut harus dilakukan secara hati-hati karena mempunyai perbedaan dalam kondisi percobaan, organisme uji, dll), dapat diketahui bahwa waktu perkembangan rata-rata bulu babi *E. mathaei* lebih lama dari *A. crassispina*.

Tahap yang terpenting dari seluruh tahapan perkembangan embrio adalah tahap pembelahan pertama. Menurut Kobayashi (1984), telur hasil fertilisasi tidak akan mengalami pembelahan di saat telur atau sperma berada dalam kondisi yang buruk atau jika air laut mengandung substansi beracun. Perkembangan juga akan terhenti pada tahap blastula bila air laut mengandung substansi beracun. Pada penelitian ini konsentrasi larutan uji hanya berpengaruh pada mortalitas embrio. Embrio yang tahan/survive akan terus mengalami perkembangan pada tahap-tahap selanjutnya dengan periode waktu yang relatif sama.

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan-percobaan dapat disimpulkan :

1. Kisaran konsentrasi sublethal diazinon terhadap perkembangan awal embrio bulu babi *E. mathaei* terdapat pada konsentrasi 0.6 dan 0.06 ppm.
2. Diazinon menyebabkan bentuk (formasi) yang terjadi dalam perkembangan awal embrio bulu babi *E. mathaei* menjadi tidak normal.
3. Diazinon berpengaruh secara nyata pada perkembangan embrio yang berhasil mencapai tahap larva. Semakin besar konsentrasi larutan uji, maka akan semakin kecil persentase larva yang berhasil terbentuk.

REFERENSI

- Bresch, H. & U. Ahrendt. 1977. Influence of different of organochlorine pesticides on the development of the sea urchin embryo. *Environmental Research* **13**: 121-128.
- Dinnel, P.A., J.M. Link & Q.J. Stober. 1987. Improved methodology for sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**: 288-295.
- Hortadius, S. 1973. Experimental embryology of echinoderms. Clarendon Press. Oxford. Hal. 13-30.
- Kaligis, F.G. & M.T. Lasut. 1997. Effects of salinity and diazinon on the abalone *Haliotis varia* (Gastropoda: Haliotidae). *Phuket Marine Biological Special Publication* **17**(1): 115-120.
- Kobayashi, N. 1984. Marine ecotoxicological testing with echinoderms. State University of Ghent and Inst. Marine Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 1, 798 hal.
- Kobayashi, N. 1994. Application of eggs of the sea urchin *Diadema setosum* in marine pollution bioassays. *Phuket Marine Biological Center Research Bulletin* **59**: 91-94.
- Lasut, M.T., F.G. Kaligis & A.H. Watung. 2001. Pengaruh konsentrasi sublethal pestisida (diazinon dan glifosat) terhadap konsumsi oksigen kerang laut *Septifer bilocularis* (Bivalvia). *Ekoton* **1**(2): 49-57.
- Lasut, M.T., I.F.M. Rumengan, J. Paulus & J. Rimper. 1997. Effect of diazinon (insecticide) on lethal and sublethal aspects of zooplanton rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Berita Fakultas Perikanan Unsrat* **5**(1-2): 49-56.
- Lintong, O. 1998. Efek lanjut sianida (KCN) terhadap keberhasilan reproduksi bulu babi *Echinometra mathaei*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Program Studi Ilmu Kelautan Unsrat. hal. 34
- Ringwood, A.H. 1992. Comparative sensitivity of gametes and early development stages of sea urchin species (*Echinometra mathaei*) and bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **16**: 23-32.
- Sembel, D.T., F. Kaseger, J. Pongoh & D. Kandowanko. 1991. Pengkajian terhadap penggunaan pestisida oleh petani di Kab. Minahasa dan Bolaang Mongondow, Prop. Sulawesi Utara. *Jurnal Fakultas Perikanan Unsrat* **1**(4): 6-13.
- Subiyakto, S. 1991. Pestisida. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Waterman, A.J. 1937. Effect of salts of heavy metals on development of sea urchin *Arbacia punctulata*. *Dalam* N. Kobayashi (1984). *Marine ecotoxicology testing with echinoderms*. State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Belgia. Vol. 1, 798 hal.