

## EFEKTIVITAS KHITOSAN SEBAGAI PENGKHELAT LOGAM TIMBAL DAN PENGARUHNYA TERHADAP PERKEMBANGAN AWAL EMBRIO IKAN ZEBRA *Danio rerio*

### Efficacy of Chitosan as Pb Remover and its Effect on Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Development

K. Nirmala, J. Sekarsari dan P. Suptijah

Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,  
Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

#### ABSTRACT

Chitosan is a by-product from crustacean carapas. Chitosan has a cationic polyelectrolyte activity, hence it can be used as remover of heavy metal from polluted water. This study was aimed to determine optimum concentration of chitosan to remove Pb, efficacy time in Pb removal and its effect on early development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The treatments in this study was control, and chitosan concentration of 70, 85 and 100 mg/L. the results of this study showed that maximum reducing of Pb was obtained at the time of 48 and 72 hours after treatment by chitosan, but Pb level was returning to increase after 96 hours of chitosan treatment. Abnormality of zebrafish embryos and survival rate of larvae were similar ( $p>0.05$ ) among treatments, while hatching rate in 100 g/L chitosan was significantly different ( $p\leq 0.05$ ). Thus, chitosan in concentration of 85 mg/L was effective to remove Pb till 81.12% for 3 days, and could increased hatching rate till 59.75%.

Keywords: chitosan, Pb, remover, zebrafish, *Danio rerio*

#### ABSTRAK

Khitosan merupakan hasil sampingan dari limbah perikanan berupa kulit krustasea. Dengan adanya sifat polielektrolit kation dari khitosan, maka khitosan dapat digunakan sebagai pengkhelat logam berat dalam perairan tercemar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi optimum khitosan dalam mengkhelat logam berat timbal (Pb), waktu efektivitas khitosan dalam pengkhelatan Pb dan pengaruhnya terhadap telur ikan zebra *Danio rerio*. Perlakuan pada penelitian ini antara lain kontrol, blanko, khitosan konsentrasi 70, 85 dan 100 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penurunan maksimal persentase Pb masing-masing perlakuan khitosan terjadi pada jam ke-48 dan jam ke-72, namun kembali meningkat pada jam ke-96 hingga akhir perlakuan. Abnormalitas telur dan kelangsungan hidup larva ikan zebra pada setiap perlakuan tidak berbeda nyata ( $P \geq 0.05$ ), namun derajat penetasan telur ikan pada perlakuan 100 mg/l berbeda nyata ( $P \leq 0.05$ ). Dengan demikian, konsentrasi khitosan yang efektif untuk mengkhelat Pb adalah 85 mg/liter hingga 81,12% dengan waktu efektivitas selama 3 hari, serta dapat meningkatkan derajat penetasan telur ikan zebra hingga 59,75%.

Kata kunci: khitosan, timbal, pengkhelat, ikan zebra, *Danio rerio*

#### PENDAHULUAN

Badan air merupakan komponen lingkungan yang relatif mudah tercemar dengan penyebaran yang cukup luas. Sumber bahan pencemar dapat berasal dari limbah industri, transportasi, rumah tangga maupun pertanian. Kondisi perairan yang tercemar sangat merugikan bagi dunia perikanan

khususnya budidaya dan menjadi isu yang selalu diupayakan solusinya hingga saat ini.

Seiring kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi, telah dilakukan berbagai upaya untuk memperoleh air bebas pencemar terutama logam berat. Beberapa cara yang telah diterapkan adalah penyerapan menggunakan karbon aktif (Rama, 1990), penggunaan bahan biomaterial dan non-

biomaterial seperti lumut (Low *et al.*, 1997), daun teh (Tan dan Majid, 1989), sekam padi dan sabut kelapa sawit (Munaf, 1999), zeolit (Ambasari, 1999), perlit dan lumpur aktif. Penggunaan bahan kimia juga telah dilakukan diantaranya adalah penggunaan aluminium sulfat  $\{Al(SO_4)_3\}$ , ferro sulfat  $\{Fe_2(SO_4)_3\}$ , ferri sulfat  $(FeSO_4 \cdot 7H_2O)$ , ferri klorida  $(FeCl_3)$  dan klorinat ferrosulfat  $\{Fe(SO_4)_3FeCl_3 \cdot 7H_2O\}$  (Nemerrow and Dasgupta, 1991). Proses pengendapan secara elektrolisis yang membutuhkan biaya operasional sangat tinggi juga telah dilakukan. Upaya lain adalah penggunaan Na-EDTA yang dapat menyebabkan anemia jika residunya masih terdapat dalam tubuh ikan dan termakan oleh manusia.

Salah satu penemuan lainnya adalah penggunaan khitosan yang merupakan hasil sampingan dari pemanfaatan limbah hasil perikanan berupa kulit krustasea. Bahan dasar khitosan mudah diperoleh, tersedia dalam jumlah yang banyak dan selama ini belum dimanfaatkan secara optimal. Dengan sifatnya yang polielektrolit, kation khitosan yang dihubungkan dengan gugus amino dan hidrosil yang terikat menyebabkan reaktifitas kimia yang tinggi sebagai penukar ion (*ion exchanger*), pengkhelat dan sebagai absorban terhadap logam berat dalam perairan tercemar (Suptijah, 1992). Pemanfaatan khitosan sebagai pengkhelat logam berat dapat dilakukan pada pembenihan ikan hias termasuk pembenihan ikan zebra *Brachydanio rerio*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi optimum khitosan dan waktu efektifitasnya dalam mengkhelat logam berat timbal (Pb).

## BAHAN DAN METODE

### Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk memperoleh konsentrasi optimum serta waktu efektifitas khitosan dalam mengkhelat logam berat timbal (Pb). Konsentrasi khitosan yang digunakan adalah 10 mg/liter, 50 mg/liter, dan 100 mg/liter. Khitosan yang akan digunakan dilarutkan ke dalam asam asetat 1% ( $CH_3COOH$ ) sehingga diperoleh

larutannya. Larutan khitosan tersebut dimasukkan ke dalam air akuarium (volume 5 liter) yang mengandung timbal ( $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ ) sebesar 1 mg/liter dan diaduk dalam air akuarium. Sampling timbal dan kualitas air lainnya dilakukan pada air kolom setiap 24 jam.

### Perlakuan timbal menggunakan khitosan

Penelitian utama dilakukan setelah diperoleh konsentrasi optimum serta waktu efektifitas khitosan dalam mengkhelat logam berat timbal (Pb). Konsentrasi optimum yang didapatkan berdasarkan penelitian pendahuluan adalah 100 mg/liter dengan waktu efektifitas khitosan dalam mengikat timbal adalah selama tiga hari. Kisaran konsentrasi khitosan pada penelitian utama dipersempit menjadi 70, 85 dan 100 mg/liter. Penelitian utama ini dibagi menjadi perlakuan logam berat timbal oleh khitosan dan pengamatan perkembangan awal embrio ikan zebra (*Brachydanio rerio*) yang diinkubasi dalam akuarium perlakuan tersebut.

Desinfeksi terhadap akuarium dilakukan menggunakan klorin dan dinding akuarium dilapisi heksan sehingga timbal tidak terjadi penempelan timbal pada kaca akuarium. Pada penelitian ini, digunakan lima perlakuan yaitu;

- Kontrol (tanpa Pb dan tanpa khitosan)
- Blanko (Pb 1 mg/liter dan tanpa khitosan)
- Khitosan 70 mg/liter (Pb 1 mg/liter dan khitosan 70 mg/liter)
- Khitosan 85 mg/liter (Pb 1 mg/liter dan khitosan 85 mg/liter)
- Khitosan 100 mg/liter (Pb 1 mg/liter dan khitosan 100 mg/liter)

Setiap akuarium (kecuali kontrol), diberi timbal dalam bentuk  $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  masing-masing sekitar 1 mg/liter. Sampling timbal dan kualitas air dilakukan setiap 24 jam pada kolom akuarium (10 cm dari dasar akuarium). Pengukuran timbal dilakukan menggunakan metode AAS. Selama penelitian, tidak dilakukan pergantian air sehingga khitosan tetap berada dalam akuarium perlakuan hingga akhir penelitian. Hal ini bertujuan

untuk mengetahui waktu efektifitas khitosan dalam mengkhelat timbal dalam air.

### Pengamatan perkembangan awal embrio ikan zebra

Berdasarkan penelitian pendahuluan, waktu efektifitas khitosan dalam mengikat logam timbal adalah pada jam ke-48 setelah perlakuan. Telur ikan zebra dimasukkan ke dalam akuarium perlakuan ukuran 20×20×20 cm pada jam ke-53 dengan kepadatan 35 butir/akuarium. Sampling embriogenesis pada setiap akuarium dilakukan dengan mengambil sebanyak 10% dari jumlah telur per akuarium. Pengamatan embriogenesis dilakukan setiap satu jam selama 20 jam pertama setelah pembuahan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 kali. Selanjutnya dilakukan pengamatan setiap 4 jam hingga larva berumur 2 hari dan kuning telur larva ikan habis.

### Pengamatan

Pengamatan dan pengukuran kualitas air dilakukan pada seluruh perlakuan dan ulangan setiap hari sampai akhir penelitian. Metode pengukuran kualitas air disajikan pada tabel 1.

Persentase abnormalitas telur, derajat penetasan telur dan kelangsungan hidup larva masing-masing dihitung berdasarkan rumus berikut;

$$\text{Abnormalitas telur} = \frac{\text{Jml telur atau larva abnormal}}{\text{Jml telur yg ditebar}} \times 100\%$$

$$\text{HR} = \frac{\text{Nt}}{\text{No}} \times 100\%$$

Keterangan:

- HR : *Hatching rate*/Derajat Penetasan Telur (%)
- No : Jumlah telur ikan awal/ditebar (butir)
- Nt : Jumlah telur yang menetas (butir)

$$\text{SR} = \frac{\text{Nt}}{\text{No}} \times 100\%$$

Keterangan:

- SR : Sintasan larva awal air tawar (%)
- Nt : Jumlah larva pada akhir penelitian (ekor)
- No : Jumlah larva awal (ekor)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penelitian pendahuluan

Selama penelitian pendahuluan, kadar timbal dalam akuarium mengalami penurunan pada jam ke-24 setelah perlakuan khitosan (Gambar 1). Kadar timbal dengan perlakuan khitosan 10 mg/liter berubah dari 100% (pada jam ke-0) menjadi 67,62% pada jam ke-24, kemudian 30,57% pada jam ke-48, dan 28,40% di akhir penelitian atau pada jam ke-72. Kadar timbal dengan perlakuan khitosan 50 mg/liter berubah dari 100% (pada jam ke-0) menjadi 70,08% pada jam ke-24, kemudian 16,64% pada jam ke-48, dan 14,67% di akhir penelitian (jam ke-72). Sedangkan kadar timbal dengan perlakuan khitosan 100 mg/liter berubah dari 100% (pada jam ke-0) menjadi 66,39% pada jam ke-24, kemudian 10,08% pada jam ke-48, dan 6,39% di akhir penelitian.

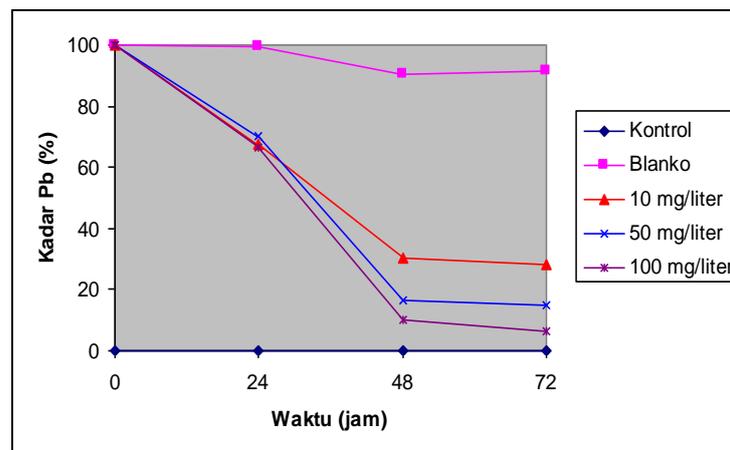
### Efektivitas khitosan dalam mengkhelat logam berat timbal

Pada penelitian pendahuluan, diperoleh informasi bahwa khitosan bekerja cepat dalam mengkhelat logam timbal. Pada jam ke-24, persentase timbal dalam akuarium perlakuan mencapai kurang dari 70% dan terus menurun pada jam-jam berikutnya. Bahkan pemberian khitosan 100 mg/liter mampu mengkhelat logam timbal hingga 93,61% pada jam ke-72 (Gambar 1) sehingga persentase timbal menjadi 6,39%. Dengan demikian, konsentrasi khitosan untuk penelitian utama yang digunakan adalah limit terdekat dengan konsentrasi 100 mg/liter, yaitu 70 mg/liter, 85 mg/liter dan 100 mg/liter.

Pengaruh pemberian khitosan ke dalam air yang tercemar timbal sangat berbeda nyata pada hari ke-3 atau jam ke-72 pada setiap perlakuan. Pada dasarnya, kadar timbal pada semua perlakuan mengalami penurunan yang disebabkan oleh reaksi pengkhelatan sehingga membentuk senyawa kompleks (Gambar 2). Penurunan maksimal persentase timbal pada masing-masing akuarium perlakuan khitosan terjadi pada jam ke-48 dan jam ke-72, kemudian meningkat pada jam ke-96 hingga akhir perlakuan.

Tabel 1. Pengukuran parameter fisika-kimia dan alat yang digunakan

Parameter	Alat Ukur	Metode
Timbal	-	AAS
Suhu	Thermometer	Pembacaan Skala
Oksigen terlarut	DO-meter	Pembacaan skala menggunakan sensor
pH	pH-meter	Pembacaan skala menggunakan sensor
Ammonia	Spektrofotometer	Iodophenol (Phenate)
Alkalinitas	-	Titrimetrik

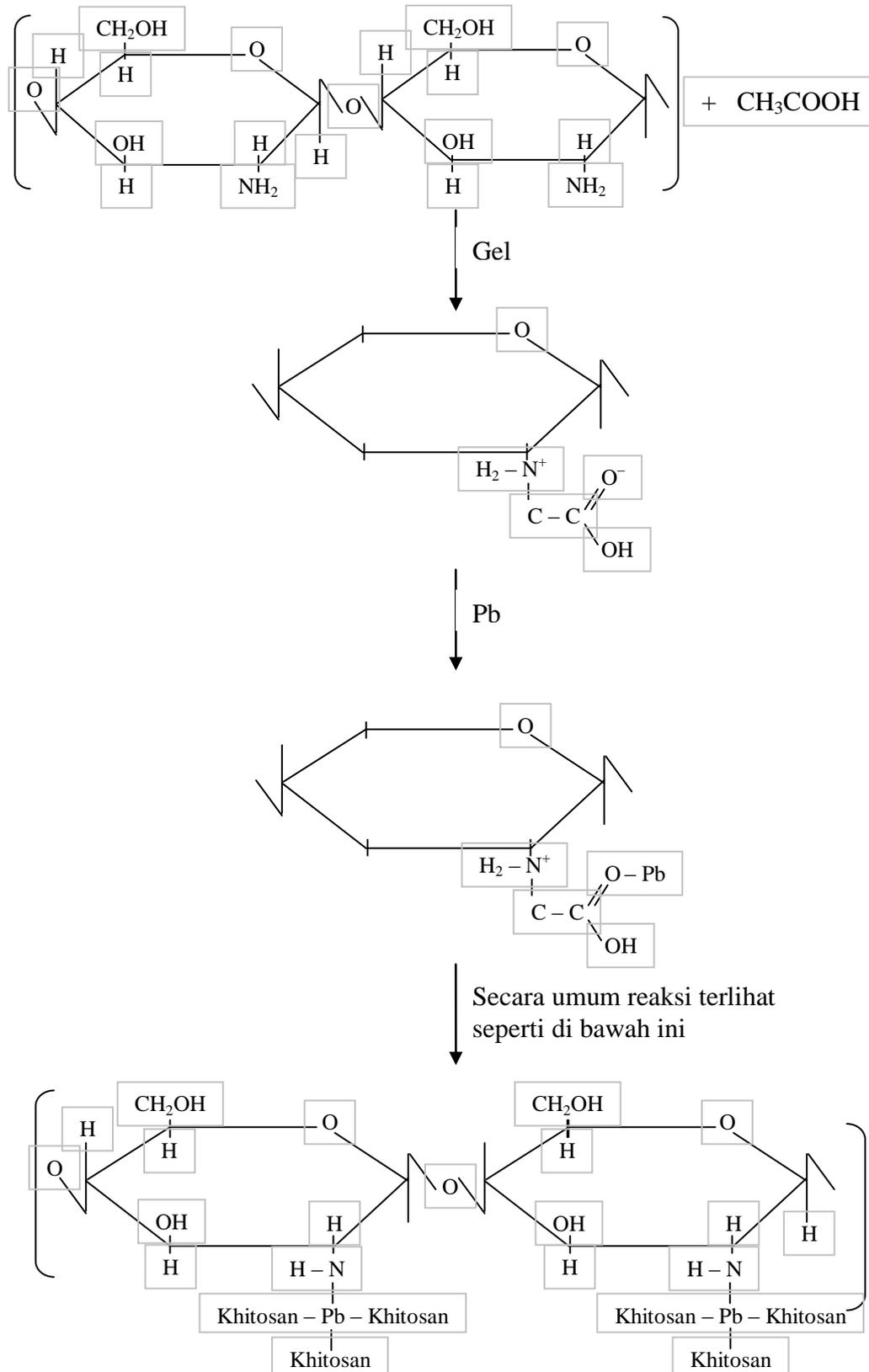


Gambar 1. Kadar timbal dengan perlakuan konsentrasi khitosan yang berbeda selama penelitian pendahuluan.

Timbal yang terdapat dalam air diikat oleh gugus nitrogen dari khitosan yang bersifat kationik kuat sehingga terbentuk koagulasi yang memungkinkan timbal mengendap sehingga kadarnya di perairan semakin berkurang. Menurut Marganof (2003), khitosan dengan sifat polielektrolit kation berhasil mengikat ion timbal di perairan, pengikatan ini terjadi karena adanya asam amino serta gugus hidroksil yang terkandung di dalam khitosan.

Pengikatan timbal oleh khitosan berdasarkan Rahadiyan (2001), membutuhkan waktu yang sangat cepat yaitu sekitar 30 menit setelah larutan khitosan dimasukkan ke dalam air yang tercemar timbal tersebut. Dengan demikian, kadar timbal di air akuarium pada 24 jam pertama sudah menurun berkisar antara 11,14 – 54,05% dari kadar semula. Namun pada umumnya, semua perlakuan khitosan menunjukkan hasil yang berbeda nyata terhadap blanko setiap jam.

Kadar timbal dalam air akuarium dengan perlakuan khitosan kembali meningkat pada jam ke-96 dan terus meningkat hingga akhir penelitian. Hal ini berarti bahwa waktu efektivitas pengikatan timbal oleh khitosan adalah selama tiga hari dan akan terlepas kembali ke perairan. Keberadaan aerasi diduga dapat menyebabkan terlepasnya kembali timbal ke air karena pengadukan yang ditimbulkan. Peluang khitosan untuk bertubrukan dan timbal terlepas dari khitosan cukup besar. Selain itu, pengikatan oleh khitosan yang lemah juga diduga menyebabkan terlepasnya kembali timbal ke air. Pada jam ke-53, telur ikan zebra masuk ke dalam akuarium, dimana kadar timbal mengalami penurunan akibat pengikatan oleh khitosan. Namun karena kadar timbal masih berada di atas baku mutu ( $>0.03$  mg Pb/liter), maka perkembangan embrio ikan mengalami abnormalitas, kecuali di akuarium kontrol.

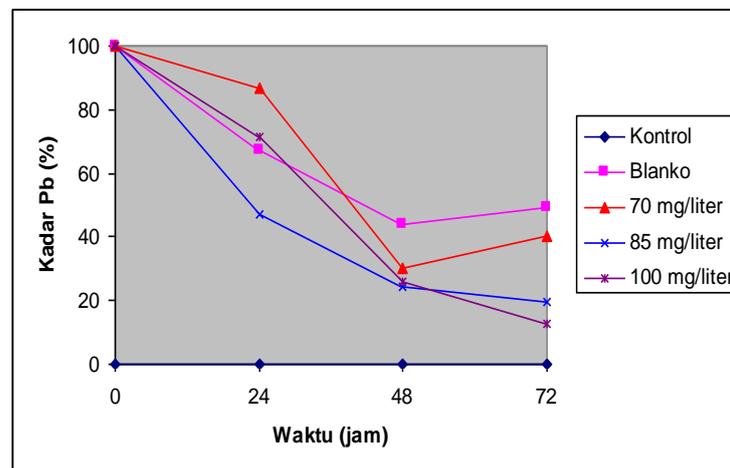


Gambar 2. Bentuk senyawa kompleks pengikatan logam berat oleh khitosan (Hirano, 1988 dalam Rahadiyan, 2001).

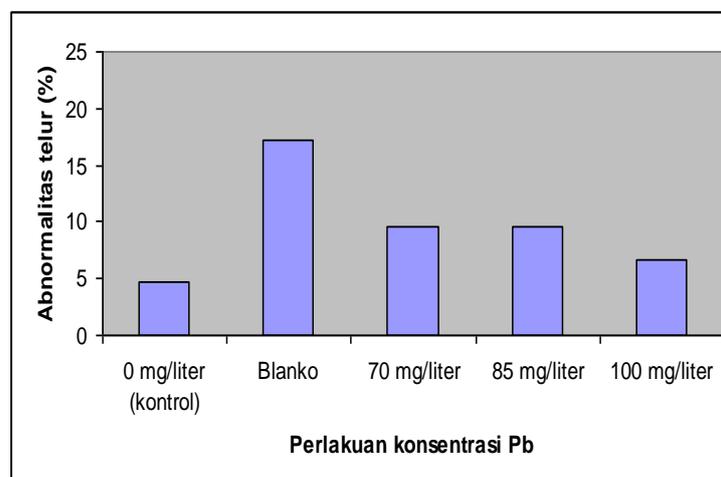
### Abnormalitas telur, derajat penetasan telur dan kelangsungan hidup larva ikan zebra

Persentase abnormalitas telur di seluruh perlakuan berkisar antara 4,76 – 17,14% dan derajat penetasan di seluruh perlakuan berkisar antara 42,86 – 90,48%. Keberadaan khitosan dalam mengkhelat logam timbal tidak menyebabkan abnormalitas telur ikan zebra. Namun persentase abnormalitas pada akuarium blanko terlihat bahwa diantara semua perlakuan, persentase abnormalitas telur di akuarium blanko paling tinggi. Ketidaknormalan telur tertinggi tercatat pada akuarium blanko yang diduga karena timbal terdifusi secara pasif ke dalam kuning telur.

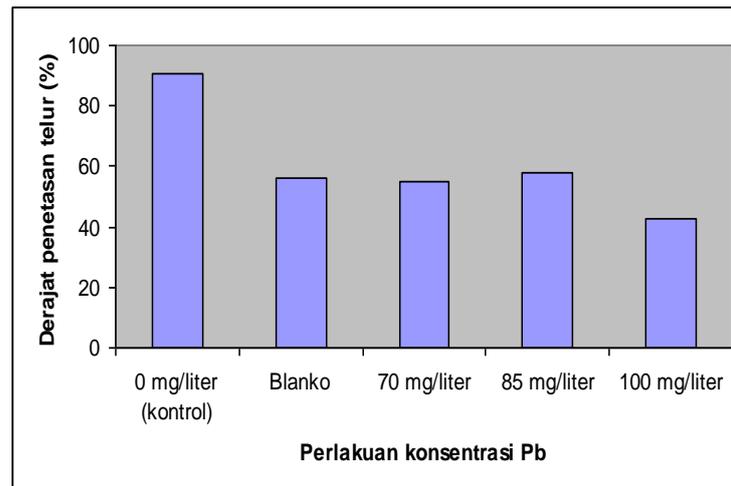
Dengan demikian timbal menggantikan kofaktor logam penting dalam enzim (zink) telur dan menghambat kerja enzim dalam memanfaatkan protein untuk pertumbuhan embrio sehingga perkembangan embrio menjadi tidak normal. Timbal juga terakumulasi dalam jaringan dan merusak jaringan tersebut khususnya tulang. Setelah timbal masuk ke dalam jaringan tulang, terjadi pertukaran ion antara ion logam dengan pembentuk mineral kalsium pada tulang. Akibat pertukaran ion tersebut, tulang larva ikan yang terserang timbal akan mengalami abnormalitas seperti skoliosis, lordhosis atau kiposis.



Gambar 3. Kadar timbal yang diberi perlakuan konsentrasi khitosan yang berbeda.



Gambar 4. Abnormalitas telur ikan zebra pada setiap perlakuan.



Gambar 5. Derajat penetasan telur ikan zebra pada setiap perlakuan.

Hasil yang tidak berbeda nyata antara perlakuan juga terjadi pada kelangsungan hidup larva ikan zebra. Persentase kelangsungan hidup pada seluruh perlakuan berkisar antara 63,33-89,61%. Hal ini berarti bahwa keberadaan khitosan dalam mengkhelat logam timbal tidak berpengaruh terhadap kelangsungan hidup larva ikan zebra. Namun persentase kelangsungan hidup larva ikan zebra pada akuarium perlakuan khitosan 100 mg/liter tercatat paling rendah (63,33%). Rendahnya kelangsungan hidup larva tersebut akibat keberadaan timbal di atas baku mutu terus merusak jaringan pertahanan tubuh larva sehingga penggunaan energi cenderung untuk beradaptasi dan mempertahankan diri terhadap lingkungan daripada untuk pertumbuhan. Selain itu, keberadaan khitosan dengan konsentrasi tinggi diduga membentuk matriks yang menutupi insang sehingga proses respirasi larva terhambat, larva kekurangan oksigen dan akhirnya mati.

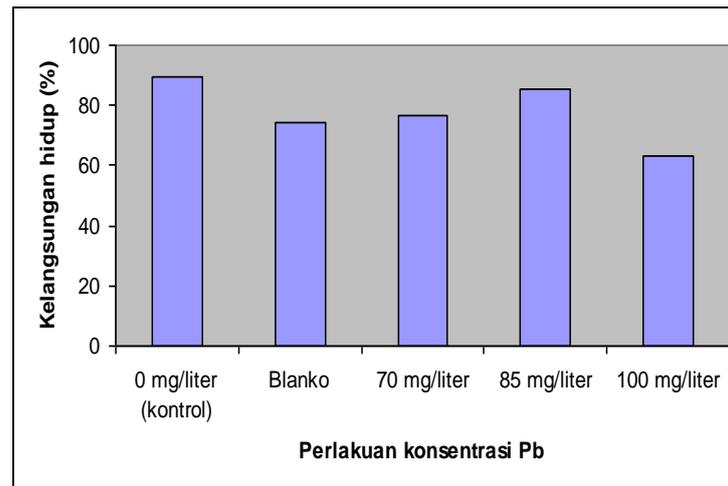
#### Parameter kualitas air lain

Parameter kualitas air yang terukur selama perlakuan menunjukkan kisaran yang normal bagi proses embriogenesis, organogenesis, penetasan telur dan pemeliharaan larva (Tabel 2). Suhu dikondisikan sama untuk setiap perlakuan yaitu berkisar antara 26,5 – 28,0 °C yang merupakan suhu optimum untuk perkem-

bangkan embrio dan penetasan telur ikan. Oksigen terlarut selama percobaan berkisar antara 4,82 – 5,33 mg/liter dan merupakan nilai yang layak untuk. Kisaran nilai pH semua perlakuan adalah 6,07 – 6,47. Nilai alkalinitas yang terukur selama perlakuan juga menunjukkan kisaran yang normal bagi kehidupan organisme air yaitu berkisar antara 28-60 mg CaCO<sub>3</sub>/liter. Kandungan amonia pada air akuarium yang terukur juga menunjukkan kisaran yang baik untuk kehidupan organisme air yaitu berkisar antara 0,000 – 0,004, nilai ini masih berada pada kisaran kadar alamiah amonia perairan yaitu < 0,02 mg/liter (Effendi, 2003).

#### KESIMPULAN

Konsentrasi 85 mg/liter khitosan dapat menurunkan kadar timbal hingga 81,12% pada hari ketiga setelah perlakuan dengan peningkatan konsentrasi timbal yang relatif lebih kecil sesudahnya. Efektivitas 85 mg/liter khitosan juga terbukti dengan pencapaian nilai derajat penetasan tertinggi (59,75%). Persentase abnormalitas telur dan kelangsungan hidup larva ikan zebra *Danio rerio* pada perlakuan tersebut masing-masing sebesar 3,02% dan 90,24% meskipun kedua parameter tersebut menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata.



Gambar 6. Kelangsungan hidup larva ikan zebra pada setiap perlakuan.

Tabel 2. Kisaran Parameter Kualitas Air selama Penelitian

Parameter	Perlakuan				
	Kontrol	Blanko	70 mg/liter	85 mg/liter	100 mg/liter
Suhu (°C)	26,5 – 28,0	26,5 – 27,8	26,5 – 28,0	26,5 – 28,0	26,8 – 28,0
DO (mg/liter)	4,82 – 5,28	4,97 – 5,31	5,17 – 5,29	4,97 – 5,35	4,97 – 5,33
pH	6,09 – 6,43	6,08 – 6,47	6,14 – 6,44	6,16 – 6,45	6,07 – 6,40
NH <sub>3</sub> (mg/liter)	0,000 – 0,001	0,000 – 0,003	0,000 – 0,004	0,001 – 0,004	0,000 – 0,003
Alkalinitas (mg CaCO <sub>3</sub> /liter)	34 – 56	28 – 52	34 – 54	36 – 54	34 – 60

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ambasari, L. 1999. Pengaruh organic chelate-zeolit terhadap kandungan logam berat timbal (Pb) di tambak skala laboratorium. [Skripsi]. Departemen budidaya perairan. Institut pertanian bogor. Bogor.
- Effendi, Hefni. 2003. Telaah kualitas air bagi pengelolaan sumberdaya dan lingkungan perairan. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 258 hal.
- Low, K.S., C.K. Lee and S.G. Tan. 1997. Sorption of trivalent chromium from tannery waste by moss. *Journal Environmental Technology*, 18 : 449-454.
- Marganof. 2003. Potensi limbah udang sebagai penyerap logam berat (timbal, kadmium, dan tembaga) di perairan. Makalah Pribadi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Munaf, E. dan R. Zein. 1999. Pemanfaatan sabut kelapa sawit untuk menyerap ion logam kadmium dan kromium dalam air limbah. *Jurnal Kimia Andalas*, 5 (1) : 10-14.
- Peraturan Pemerintah Nomor 82. 2001. Pengelolaan kualitas air dan pengendalian pencemaran air. Jakarta.
- Rama, D.P., and Rama Krishna Naidu, G. 1990. Enrichment of trace metals in water on activated carbon. *Analyst*, 115 : 1469-1471.

Suptijah, P. 1992. Pengaruh berbagai metode isolasi khitin udang terhadap mutunya. Laporan penelitian. Departemen Teknologi Hasil Perairan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Tan, W.T and A.R. Majid Khan. 1989. Removal of lead, cadmium and zinc by waste tea leaves. *Journal Environmental Technology*, 9 : 1223-1232.