

## **PERAN DAN KEBERADAAN ENZIM METALLOTHIONEIN SEBAGAI PENGIKAT LOGAM BERAT Pb PADA PANGKAL DAN UJUNG RUMPUT LAUT *GRACILARIA* sp.**

**Yatris Rambu Tega<sup>1\*)</sup>, Endang Yuli Herawati<sup>2</sup>, Yuni Kilawati<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Teknologi Hasil Perikanan, Universitas Kristen Wira Wacana Sumba,  
Nusa Tenggara Timur

<sup>2</sup>Faculty of Fisheries and Marine Sciences, University of Brawijaya, Malang

<sup>\*)</sup>Penulis korespondensi: [yatrisrambutega@unkriswina.ac.id](mailto:yatrisrambutega@unkriswina.ac.id)

### **ABSTRAK**

Produksi limbah Industri dan juga buangan limbah rumah tangga yang semakin meningkat dan terjadi terus-menerus, menjadikan sungai tempat pembuangan terakhir sehingga dapat mencemari biota yang berada di sekitaran sungai tersebut. Masyarakat di Desa Kupang, Jabon, Sidoarjo memanfaatkan aliran sungai tersebut sebagai sumber air untuk budidaya rumput laut *Gracilaria* sp. Salah satu untuk mengetahui cemaran logam berat pada perairan tersebut dengan mengecek keberadaan kadar *Metallothionein* pada rumput laut, karena sifat *Metallothionein* adalah protein yang dapat mengikat logam esensial maupun non esensial. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar *Metallothionein* pada *Gracilaria* sp. yang terekspresi pada bagian pangkal dan ujung rumput laut *Gracilaria* sp. Metode yang digunakan adalah metode deskriptif. Analisis pengujian kadar *Metallothionein* menggunakan *Eliza reader*. Didapatkan hasil penelitian bahwa kualitas perairan budidaya tambak *Gracilaria* sp. untuk parameter suhu, pH, DO sesuai dengan kondisi perairan tambak, tetapi pada parameter salinitas tidak sesuai yaitu 40 ppt (di atas SNI), karena penguapan yang tinggi pada saat musim kemarau, sehingga kadar garamnya tinggi. Kualitas perairan sangat berpengaruh dengan keberadaan enzim *Metallothionein* pada pangkal dan ujung rumput laut, kadar enzim *Metallothionein* tertinggi terdapat pada bagian ujung *Gracilaria* sp. yaitu berkisar antara 2.026-2.734 µg/mL. Terjadinya penyerapan yang tinggi karena pada bagian ujung terdapat banyak percabangan kecil dan masih muda sehingga proses penyerapannya masih kuat, sedangkan pada bagian pangkal terdiri dari sel-sel yang sudah tua dengan percabangan yang sedikit dan jumlahnya juga sedikit.

**Kata Kunci:** *Gracilaria* sp., Logam Berat Pb, *Metallothionein*

### **ABSTRACT**

*The production of industrial waste as well as household waste disposal is increasing and occurs continuously, making the river the final dumping ground so that it can pollute the biota around the river. The community in Kupang Village uses the river flow as a source of water for the cultivation of Gracilaria sp. One way to see heavy metal warnings in these waters is to check for the presence of Metallothionein levels in seaweed, because Metallothionein is a protein that can bind essential or non-essential metals. This study aims to see the levels of Metallothionein in Gracilaria sp. which was expressed at the base and tip of the seaweed Gracilaria sp. The method used is descriptive method. Metallothionein assay analysis using Eliza rider. The results showed that the condition of Gracilaria sp. For temperature, pH, DO parameters in accordance with the conditions of*

the pond waters, but the salinity parameters are not suitable, namely exceeding SNI 40 ppt, due to high evaporation during the dry season, so that the salt content is high. The quality of the region is very influential with the presence of the Metallothionein enzyme at the base and tip of the seaweed. Enzyme levels are at the end of *Gracilaria sp.* that is, it ranges from 2,026-2,734  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . There is high absorption because at the end there are many small and young branchings so that the absorption process is still strong, while at the base it consists of old cells with little branching and also little instruction.

**Keywords:** *Gracilaria sp.*, Heavy Metal Pb, Metallothionein

## PENDAHULUAN

Logam berat merupakan pencemar yang berpotensi menurunkan dan merusak daya dukung lingkungan, pencemaran dapat ditemukan di perairan menjadi meningkat sesuai dengan perkembangan industri yang ada dan terus menerus (Lakherwal, 2014). Banyaknya kandungan tersebut (logam berat) di suatu perairan menyebabkan kontaminan, akumulasi serta pencemaran pada sekitaran lingkungan tersebut, misalnya sedimen, air, biota dan sebagainya.

Rumput Laut *Gracilaria sp.* merupakan salah satu jenis makroalga yang juga bisa dibudidayakan pada muara sungai ataupun tambak, habitat awal rumput laut tersebut berasal dari laut, namun juga dapat dibudidayakan pada perairan payau. Hal ini disebabkan karena tingkat toleransi rumput laut *Gracilaria sp.* dapat hidup pada salinitas yang cukup tinggi hingga pada salinitas 18 ppt (Ruslaini, 2017). Rumput laut

merupakan salah satu biota perairan yang dapat mengalami dampak negatif yang cukup besar yang dipengaruhi dari pencemaran perairan di tempat rumput laut tersebut berada, seperti pencemaran biota perairan dari logam berat Timbal (Pb), sebab unsur logam ini mudah teradsorpsi dan terakumulasi oleh organisme (Handhani *et al.*, 2017). Rumput laut spesies *Gracillaria sp.* mendapatkan unsur hara dengan menyerap unsur hara yang terdapat di perairan, sehingga juga logam berat akan di air akan ikut terserap dan termasuk kategori daya serap logam berat Pb yang kuat dengan nilai 1,1 ppm, juga penelitian oleh Qumain *et al.* (2016), rumput laut yang dibudidayakan di tambak yang dialiri Sungai Porong mengandung logam berat timbal Pb 0,725 dimana melebihi SNI (0,5) ppm.

*Metallothionein* adalah enzim yang memiliki molekul protein yang rendah dan memiliki kemampuan dalam

mengikat sejumlah unsur transisi (Krizkova *et al.*, 2017). *Metallothionein* merupakan protein sistein yang kaya dalam merespon segala tekanan pada tanaman, seperti stres karena logam berat, kadar garam yang tinggi stres oksidatif dan proliferasi sel (Leignel *et al.* 2005); (Liu *et al.* 2015), juga *Metallothionein* memiliki aktivitas sebagai pengurangan atau pembersihan radikal DPPH, melindungi DNA dari kerusakan induksi yang dihasilkan logam berat (Huang *et al.* 2014). Toksisitas logam yang terjadi dapat menghambat proses pertumbuhan dan fotosintesis, serta kerentanan rumput laut terhadap logam berat. Hal ini *Metallothionein* dapat menyerap dengan konsentrasi logam berat yang tinggi. *Metallothionein* sangat berpotensi dalam mendetoksi logam berat dan juga termasuk yang berperan dalam proses mekanisme toleransi dan otomatis (*homeostasis*) yang dilakukan oleh ion logam esensial didalam sel makhluk hidup (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Rumput laut merupakan salah satu organisme yang telah digunakan untuk monitoring cemaran logam berat, dimana rumput laut ini tidak saja kuat dalam pengambilan unsur hara yang tersedia dalam air (Serbula *et al.* 2012), namun juga efektif dalam menyerap

logam berat seperti Pb (Tonon *et al.* 2011). Mulyaningrum *et al.* 2015, mengatakan proses penyerapan juga dipengaruhi oleh bentuk thallus seperti pada pangkal dan percabangan *Gracilaria* sp. (Tega *et al.* 2016) secara alami *Gracilaria* sp. thallus pada bagian pangkalnya melekatkan diri pada substrat sehingga terjadi proses penyerapan yang berbeda dengan ujung thallus *Gracilaria* sp. (Rueness, 2005; Tega *et al.* 2016), maka perlu dilakukan penelitian tentang peran dan keberadaan enzim *Metallothionein* sebagai pengikat logam berat Pb dibagian pangkal (*holdfast*) dan ujung rumput laut *Gracilarias* sp.

## **METODE**

Pengambilan sampel *Gracilaria* sp. diambil dari Tambak di Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Sidoarjo. Pengukuran kualitas air dilakukan langsung di tambak rumput laut *Gracilaria* sp. meliputi; salinitas, suhu, pH dan DO. Pengujian kadar *Metallothionein* (MT) pada bagian pangkal dan ujung rumput laut *Gracilaria* sp. dilaksanakan di Laboratorium Ilmu FAAL, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini menggunakan metode Deskriptif kuantitatif mengenai kadar enzim *Metallothionein* sebagai

pengikat logam berat Pb pangkal dan ujung rumput laut *Gracilaria sp.*

### Prosedur Penelitian

Sampel Rumput laut *Gracilaria sp.* didapatkan dari dua tambak yang berada di perairan Sidoarjo, dari masing-masing tambak diambil rumput laut yang secara fisik memiliki kualitas paling baik dengan berat sampel 1 kg. Penentuan sampel pada masing-masing tambak diambil pada hari ke 0 hari (Sebelum Tanam), 20 hari (Awal Produksi) dan pada hari ke 40 (Pasca/Panen). Rumput laut yang telah dikumpulkan dicuci menggunakan air bersih lalu dibawa ke Laboratorium untuk dianalisis.

### Metode Analisis Metallothionein (MT)

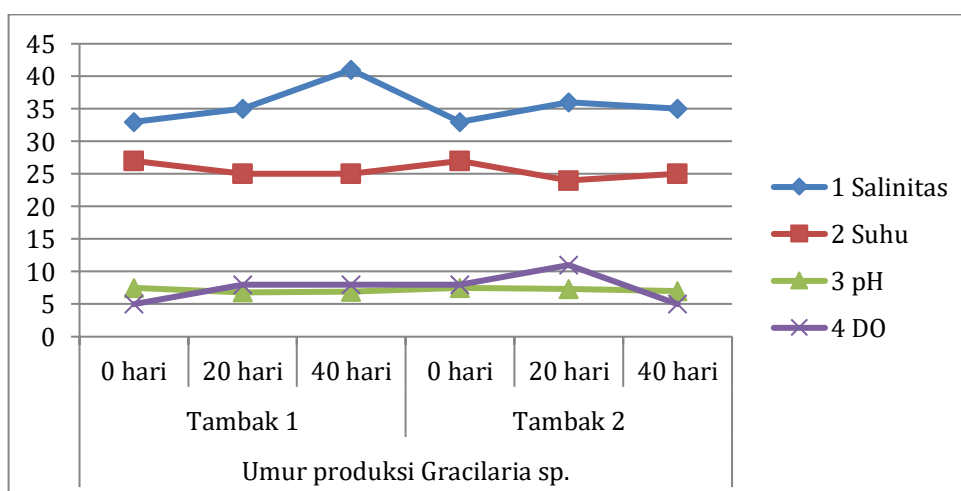
Sampel yang telah dikumpulkan dari 2 (dua) tambak, disimpan dalam

penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Konsentrasi dilaporkan dalam  $\mu\text{g/g}$  (berat basah). Sebelum analisis, sampel di dilakukan pencampuran beberapa zat terkait untuk membentuk suspensi atau emulsi terlebih dahulu (sesuai analisis *Metallothionein*) dan dikeringkan selama 72 jam. *Metallothionein* diukur dengan menggunakan Metode ELISA (Zhou Li *et al*, 2015).

### HASIL DAN BAHASAN

#### Kualitas Air

Lingkungan tempat budidaya sangat berpengaruh terhadap keberhasilan pertumbuhan *Gracilaria sp.* seperti faktor fisika-kimia perairan. Telah dilakukan pengukuran faktor fisika-kimia lingkungan di perairan tempat budidaya *Gracilaria sp.* sebagai faktor penunjang untuk pertumbuhan *Gracilaria sp.* dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Hasil Pengukuran Kualitas Perairan pada Tambak *Gracilaria sp.*

Pengukuran salinitas perairan tempat budidaya rumput laut *Gracilaria* sp. di desa Kupang diperoleh 33-41 ppt pada tambak 1 dan pada tambak 2 berkisar antara 33-36 ppt yang mana melebihi Standar Nasional Indonesia No. 7904 tahun 2013 yaitu 15-30 ppt. Faktor terjadinya salinitas menjadi tinggi dikarenakan pengambilan sampel dilakukan pada bulan panas atau pada musim kemarau, dimana pada musim tersebut terjadinya proses penguapan yang tinggi sehingga kadar salinitas akan meningkat sampai dengan 35 ppt. Rumput laut *Gracilaria* sp. bersifat *eurihalin* (Trono 1974: Harapan *et al.* 2019), dimana *Gracilaria* sp. mampu hidup pada salinitas tinggi, sehingga pada tambak tempat pengambilan sampel *Gracilaria* sp. masih dapat hidup dan tumbuh pada perairan yang kadar salinitasnya tinggi.

Pengukuran suhu pada tambak *Gracilaria* sp. diperoleh 24-27°C. Suhu tersebut masih berada pada kisaran SNI 7904:2013 yaitu 20-28°C. Suhu perairan pada budidaya rumput laut *Gracilaria* sp. di Desa Kupang, masih tergolong baik untuk pertumbuhan *Gracilaria* sp. dimana suhu optimum tersebut dapat meningkatkan proses penyerapan nutrisi/unsur hara yang terdapat pada perairan tersebut

sehingga juga dapat mempercepat laju pertumbuhan rumput laut.

Pengukuran pH pada tambak yaitu 6-7. Derajat Keasaman pada tambak 1 dan tambak 2 masih berada pada kisaran SNI 7578:2010 yaitu 6.8 sampai 8.2. Sinaga dan Muhtadi (2017), juga menyatakan bahwa perairan dengan nilai pH=7 adalah netral, pH <7 dikatakan kondisi perairan bersifat basa. Penurunan pH pada tambak 1 dimana lebih kecil dari 7 (<7) sehingga dikatakan bersifat basa, yang dapat menyebabkan toksitas logam berat menjadi besar. Mukhatasor (2007), juga menyatakan turunnya kadar pH perairan dapat menimbulkan proses bio-akumulasi organisme terhadap polutan akan menjadi meningkat.

Oksigen terlarut (DO) juga sangat berperan penting untuk pertumbuhan *Gracilaria* sp. Pengukuran DO pada tambak 1 diperoleh 5,5-8,0 mg/L dan pada tambak 2 diperoleh 5,0-11,5 mg/L. Sumampou (2015) dan Sanusi (2006), menyatakan bahwa indikator terjadinya pencemaran dapat dilihat dari kandungan oksigen terlarut pada perairan, dengan: (1). Kadar  $\geq 6,5$  mg/L dapat dikategorikan tidak tercemar, (2). Kadar 4,5-6,5 mg/L kategori tercemar sedang, dan (3). Kadar pada <6,5 mg/L termasuk tercemar berat. Kadar oksigen

terlarut pada lokasi budidaya *Gracilaria* sp. yaitu masih dalam kisaran SNI No. 7578 tahun 2010 yaitu >3,0 mg/L. Pengukuran oksigen terlarut pada tambak 1 dan 2 berada di atas nilai 3,0 mg/L, karena pengambilan sampel dilakukan di pagi hari menjelang siang, sehingga pada waktu tersebut terjadinya fotosintesis yang cukup tinggi. Proses tersebut dapat menyebabkan tingginya oksigen melalui pertukaran air, gas dan udara yang dapat menyebabkan nilai DO menjadi meningkat (Andara, *et al.* 2014; Hsia *et al.* 2013).

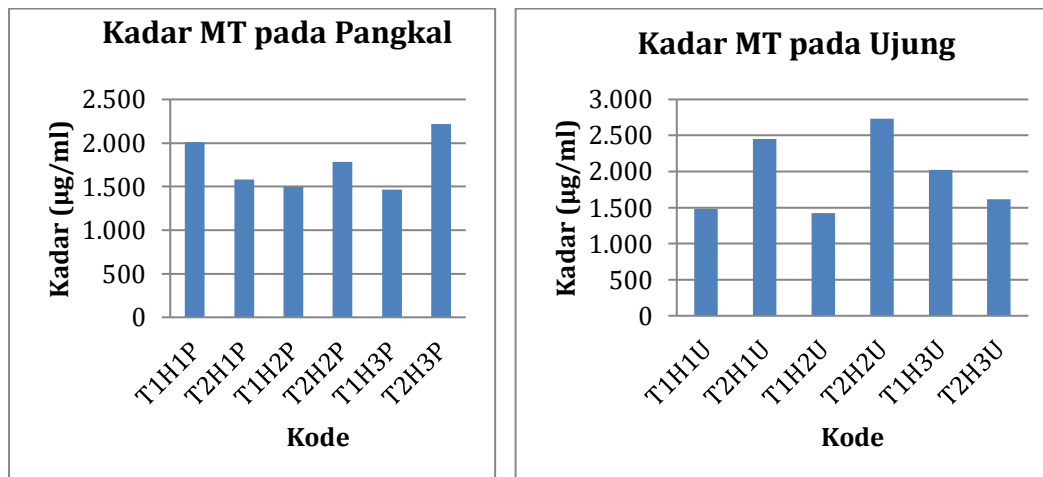
### **Peran *Metallothionein* dan Kadar *Metallothionein* pada Rumput Laut *Gracilaria* sp.**

Enzim merupakan penyusun sebagian besar dari total protein yang terkandung pada sel. Salah satu fungsi enzim yaitu sebagai biokatalisator untuk mempercepat laju (sebagai penghantar) suatu reaksi kimia. Komponen utama penyusun enzim adalah protein. Protein *metallothionein* ini merupakan salah satu protein yang ada akibat dari reaksi logam, seperti askorbat oksidase yang dapat mengikat logam berat timbal, dimana ion *metallothionein* ini merupakan salah satu bentuk kofaktor atau suatu elemen

yang diperlukan untuk aktivitas enzim tertentu. Enzim ini dapat mengatalisis reaksi biokimia jutaan kali lebih cepat (Fibriana, 2017).

*Metallothionein* merupakan protein non-enzimatik berat molekulnya sangat rendah, tetapi memiliki kandungan asam amino sistein yang cukup banyak, serta penghantar panas yang baik dalam proses biomarker (Lagston *et al.*, 1998), serta memiliki peranan mendetoksifikasi ion logam berat. Kadar *Metallothionein* terdiri dari gugus molekul tiol sulfidril yang dapat mengikat logam (Febriani *et al.*, 2004), juga dapat mencegah stres karena adanya proses oksidatif pada organisme tersebut (Amiard *et al.*, 2006). *Metallothionein* merupakan polipeptida yang mengandung asam amino non-polar yang tidak bermuatan positif ataupun muatan negatif sehingga sulit larut di dalam air. *Metallothionein* juga merupakan ko-enzim yang membutuhkan kofaktor berupa molekul organik kecil yang dapat mentransfer elektron dari suatu enzim ke enzim yang lainnya (Liu, 2015). Hasil pengukuran pH pada tambak satu nilainya berada >7 (pH asam), karena keasaman merupakan suatu senyawa yang memberikan proton (Rauf, 2015),

gambar 4. berikut adalah hasil pengukuran kadar *Metallothionein*.



**Gambar 4.** Kadar *Metallothionein* (MT) pada Pangkal dan Ujung *Gracilaria* sp.

Keterangan : T1H1=Tambak 1 pengambilan sampel yang ke 1 umur 0 hari  
T2H1=Tambak 2 pengambilan sampel yang ke 1 umur 0 hari  
T1H2=Tambak 1 pengambilan sampel yang ke 2 umur 20 hari  
T2H2=Tambak 2 pengambilan sampel yang ke 2 umur 20 hari  
T1H3=Tambak 1 pengambilan sampel yang ke 3 umur 40 hari  
T2H3=Tambak 2 pengambilan sampel yang ke 3 umur 40 hari  
P = Pangkal *Gracilaria* sp.  
U = Ujung *Gracilaria* sp.

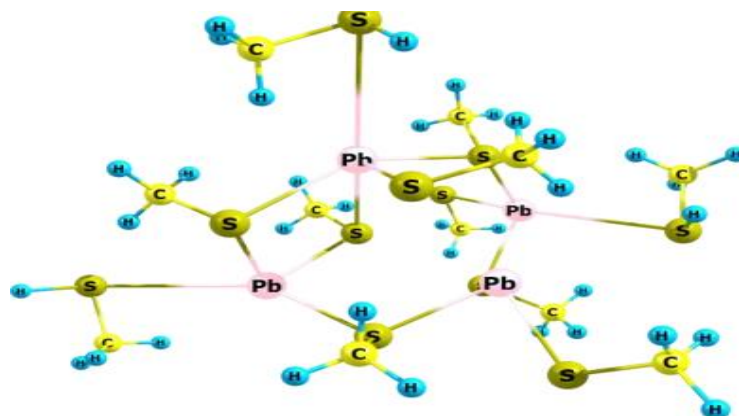
Berdasarkan pengujian *Metallothionein* yang telah dilakukan pada pangkal rumput laut tertinggi terdapat pada kode T2H3P dan T1H1P yaitu 2.217 dan 2.012 µg/mL dimana memiliki kualitas air yang meliputi DO yang rendah yaitu 5 sehingga sangat berpengaruh untuk penyerapan logam berat pada rumput laut, juga Thirumoorthy *et al.* (2007), menyatakan bahwa ekspresi MTs diatur oleh level oksigen di sekitarnya. Pada ujung rumput laut, *Metallothionein* tertinggi terdapat pada kode sampel T2H2U, T2H1U dan T1H3U yaitu 2.734, 2.453 dan 2.026 mg/mL. *Metallothionein*

tinggi ada kaitannya dengan kualitas perairan seperti tingginya salinitas yaitu 33,36 sampai 41, serta memiliki suhu paling rendah yaitu 24 serta DO sebesar 11, sehingga Kualitas perairan sangat berpengaruh juga terhadap kehadiran *Metallothionein* pada pangkal dan ujung rumput laut. Enzim dipengaruhi oleh perubahan pH, suhu, substrat dan konsentrasi ion (Zacka, 2018). Masing-masing parameter fisik dan kimia saling berkaitan. *Metallothionein* adalah koenzim yang memerlukan kofaktor yang berupa molekul organik kecil yang menstansfer gugus kimia atau elektron dari satu enzim ke enzim lainnya.

Seperti NADPH diregenerasi melalui lintasan pentosa fosfat, dan S-adenosilmetionin melalui metionin adenosiltransferase (Liu, 2015). Hasil pengukuran pH pada tambak satu nilainya berada >7 (pH asam), karena keasaman merupakan suatu senyawa yang memberikan proton (Rauf, 2015)

*Metallothionein* juga merupakan enzim yang memiliki sistem toleransi untuk keberadaan ion metal yang terdapat dalam suatu biota. Ekspresi *Metallothionein* itu sendiri tergantung pada regulasi logam yang masuk ke dalam tubuh (Leszczyszyn *et al*, 2013). Struktur *Metallothionein* dan regulasi sintesis dianggap mendasar dan merupakan bentuk adaptasi organisme terhadap keberadaan logam di lingkungan. Protein ini dapat mengikat 7 sampai 12 gram atom (Kay *et al*,

1991), juga menyatakan *Metallothionein* sangat berperan untuk peremajaan logam intraseluler dengan 0,4 fmol kadar/sel, kandungan *Metallothionein* pada biota ada jika pada biota tersebut terdapat logam yang sudah melebihi standar. Ekspresi atau tingginya enzim *Metallothionein* pada biota merupakan salah satu cara untuk mempertahankan kelangsungan hidup pada biota tersebut (Suhy, 1999). Kualitas perairan yang baik MT ini sangat berperan untuk penyimpanan serta mobilisasi logam yang esensial dalam biota (Hall, 2002), sehingga MT adalah salah satu protein yang diinduksi karena adanya logam yang terdapat pada suatu perairan, dan banyak yang telah menggunakannya sebagai biomarker dalam proses pencemaran logam. Gambar 5, merupakan struktur MT aktif



**Gambar 5.** Struktur *Metallothionein* aktif pada logam berat Pb (Peshkov, 2017)



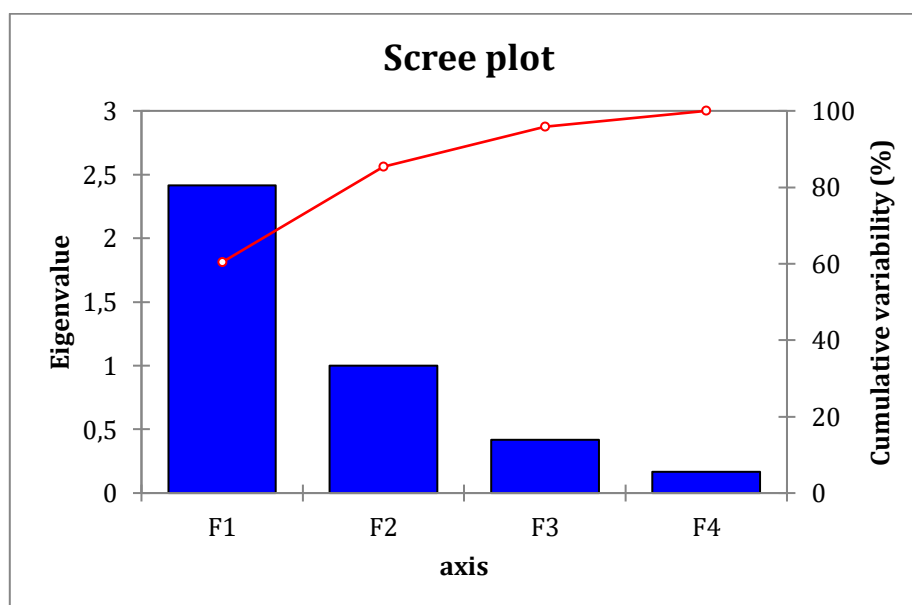
*Metallothionein* juga sangat berperan sebagai antioksidan, dan dijumpai pula pada eukariotik sebagai pelindung terhadap radikal bebas. Peran MT ini sebagai antioksidan, memiliki mekanisme yang diperantarai oleh program kematian sel, serta dipengaruhi oleh tingkat kandungan oksigen di sekitar perairan (Thirumoorthy *et al.*, 2007). MT ini dapat mengikat ion-ion *heavy-metal* dengan mengoordinasikan ikatan untuk membentuk tidak beracun atau minimal kompleks beracun dan juga bertindak sebagai antioksidan untuk melindungi

tanaman dari oksidatif kerusakan (Chen, 2017).

## Analisis Data

### *Principal Component Analysis (PCA)*

Data dianalisis menggunakan metode uji *Principal Component Analysis (PCA)*. PCA digunakan untuk mengetahui pengaruh kualitas air yaitu salinitas, pH, suhu dan DO terhadap keberadaan logam berat Pb pada air, sedimen, pada pangkal dan ujung rumput laut *Gracilaria sp.* Analisa PCA dilakukan dengan menggunakan *software XLStat*. Gambar 6, berikut ini adalah hasil analisis komponen utama atau PCA,



**Gambar 6.** Grafik *Scree plot*, Hubungan antara kualitas air serta bioakumulasi Pb pada perairan tambak *Gracilaria sp.*

Hasil penelitian menunjukkan adanya empat komponen utama yaitu F1 (Salinitas), F2 (Suhu), F3 (pH) dan F4

(DO). Setyaningsih *et al.* (2010), menjelaskan bahwa dari ke empat komponen utama merupakan salah satu

indeks yang dapat menunjukkan paling maksimum ragam individu, dan nilai *eigenvalue* merupakan karakter atau suatu sifat yang menjadi ciri khas atau juga disebut sebuah bilangan skalar.

F1 pada PCA, memiliki *eigenvalue* lebih besar dari satu, dan merupakan komponen yang nilainya paling tinggi dari empat komponen utama, juga menunjukkan bahwa adanya garis lurus, sehingga memiliki hubungan yang sangat erat antara komponen F1, *variability*, *eigenvalue* dan *cumulative* (Ifadah. 2011), Sehingga dari hasil pada ke empat komponen, F1 sangat mempengaruhi akan pertumbuhan rumput laut *Gracilaria* sp. dengan nilai eigen 2.415 (varian sebesar 60.388 %).

## **KESIMPULAN**

Kondisi perairan budidaya tambak *Gracilaria* sp. untuk parameter suhu, pH, DO sesuai dengan SNI namun untuk parameter salinitas tidak sesuai untuk budidaya *Gracilaria* sp. dimana nilai yang diperoleh melebihi SNI yaitu 40 ppt dikarenakan adanya penguapan yang tinggi pada saat musim kemarau, sehingga kadar garamnya menjadi meningkat.

Enzim *Metallothionein* sangat berperan penting dalam proses penyerapan logam, dimana

*Metallothionein* terdiri dari protein dan logam seperti askorbat oksidase sehingga protein tersebut yang dapat mengikat logam berat Pb. Keberadaan enzim MT pada pangkal dan ujung rumput laut *Gracilaria* sp. juga dipengaruhi oleh kualitas perairan sehingga dapat dijadikan sebagai biomarker untuk pencemaran logam berat.

Kadar enzim *Metallothionein* tertinggi terdapat pada bagian ujung *Gracilaria* sp. karena pada bagian tersebut juga masih terdapat banyak percabangan kecil serta masih muda sehingga proses penyerapannya masih kuat, sedangkan pada pangkal *Metalothioneinnya* kecil karena terdiri dari sel-sel yang sudah tua dan percabangan yang sedikit.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Amiard J. C., C. A. Triquet., S. Barka., J. Pellerin and P.S. Rainbow. (2006). Metallothioneins in Aquatic Invertebrates: Their Role in Metal Detoxification and Their Use as Biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76,160–202.  
doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015.
- Andara D. R., Haeruddin dan A. Suryanto. (2014). Kandungan Total Padatan Tersuspensi, *Biochemical Oxygen Demand* dan *Chemical Oxygen Demand* serta Indeks Pencemaran Sungai

- Klampisan di Kawasan Industri Candi, Semarang. *Volume 3, Nomor 3, Tahun 2014, Halaman 177-187*. Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Jurusan Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.
- Chen Y., Z. Junkai, L.Xiaoyu and Z. Hao. (2017). Diversity in Cadmium Accumulation and Resistance Associated with Various Metallothionein Genes (Type III) in *Phytolacca americana* L. National Engineering Laboratory of Tree Breeding, Beijing Forestry University, 100083, China.
- Cobbett C and P. Goldsbrough. (2002). Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2002. 53:159–82.
- Febriani A. D. B., A. Sakamoto., H. Ono., N. Sakura., K. Ueda., C. Yoshii., M. Kubota and J. Yanagawa. (2004). Determination of Total Homocysteine in Dried Blood Spots Using High Performance Liquid Chromatography for Homocystinuria Newborn Screening. *Pediatrics International.* 46, 5–9.
- Fibriana F., dan Susanti R. (2017). Teknologi Enzim. Penerbit Andi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Hall. J. L. (2002). Cellular Mechhanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. Received. School of Biological Sciences, University of Southampton, Biomedical Sciences Building, Southampton SO16 7PX, UK. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 366, pp. 1-11.
- Handhani A. R., A. Ambariyanto, E. Supriyantini. (2017). Reduction of Pb Concentration in Seawater by Seaweed *Gracilaria verrucosa*. Marine Science Department, Faculty of Fisheries and Marine Science, Diponegoro. *AAFL Bioflux*, 2017, 10(4).
- Harapan S.B.S., Mawarti R.Y., dan Mulyono M. (2019). Performansi Pertumbuhan Rumput Laut (*Kapparahycus alvarezii*) dengan Menggunakan Bibit Hasil Kultur dan Non Kultur Jaringan Di BBPBL Lampung. *Jurnal Kelautan Dan Perikanan Terapan*, 2(2), pp 93-99.
- Hsia C. C. W., A. Schmitz., M. Lambertz., S. F. Perry and J. N. Maina. (2013). Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky. Correspondence *Physiol.* 3 (2): 849–915.  
doi:10.1002/cphy.c120003.
- Huang S., Deng J.S., Chen H.J., Lin Y.H., and Huang G.J. (2014). Antioxidant Activities of Two Metallothionein-Like Proteins froms Weet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam. 'Tainong 57') Storage Roots and their Synthesized Peptides. *Botanical Studies* 2014, 55:64.
- Ifadah Ana. (2011). Analisis Metode Principal Component Analysis (Komponen Utama) dan Regresi Ridge dalam Mengatasi Dampak Multikolinearitas dalam Analisis Regresi Linear Berganda. Jurusan Matematika Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.

- Kay J., A. Cryer., B. M. Darke., P. Kille., W. E. Lees., C. G. Norey and J. M. Stark. (1991). Naturally Occurring and Recombinant Metallothioneins: Structure, Immunoreactivity and Metal-Binding Functions. Department of Medical Microbiology, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff CF4 4XN, Wales. *Inf. J. Biochem.* 23(1): 1-5.
- Krizkova S., K. Marta., E. Gabriella., E. Tomas., S. Marie., P. Petra., H. Zbynek and A. Vojtech. (2017). An Insight into the Complex Roles of Metallothioneins in Malignant Diseases with Emphasis on (Sub)Isoforms/Isoforms and Epigenetics Phenomena. *Pharmacology and Therapeutics.* S0163-7258(17)30241.
- Lakherwal D. (2014). Adsorption of Heavy Metals: A Review. ISSN 2249-3131 4(1): 41-48. Department of Environmental Studies, Panjab University, Chandigarh, India.
- Langston W. J., Bebianno M. J. (1998). Metal Metabolism in Aquatic Environments. Published by Chapman & Hall, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London SEt 8HN, UK.
- Leignel V., Hardivillier Y., and Laulier M. (2005). Small Metallothionein MT-10 Genes in Coastal and Hydrothermal Mussels. *Marine Biotechnology.* 7: 236-244.
- Leszczyszyn O. I., C. A. Blindauer and H. T. Imam. (2013). Diversity and Distribution of Plant Metallothioneins: A Review of Structure, Properties and Functions. Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, UK. DOI: 10.1039/c3mt00072a.
- Liu J., K. Hayashi and K. Matsuoka. (2015). Membrane Topology of Golgi-localized Probable Sadenosylmethionine-dependent Methyltransferase in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 Cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* New York University.
- Mukhatasor. (2007). Pencemaran Pesisir dan Laut, Jakarta: Radyna Paramita.
- Mulyaningrum H. R. S., P. Andi., & S. Emma. (2015). Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* dan *Gracilaria gigas* pada Aklimatisasi di Tambak. Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros, Sulawesi Selatan 90512 Indonesia.
- Peshkov S. A., and S. L. Khursan. (2017). Complexation of The Zn, Co, Cd, and Pb ions by Metallothioneins: A QM/MM Simulation. To Appear in: *Computational & Theoretical Chemistry.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2017.02.029>.
- Qumain S., D. Agus., & P. Sitoresmi. (2016). Analisis Perbandingan Kandungan Logam Berat Timbal (Pb) pada Rumput Laut *Gracilaria* sp. dan Agar Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Sidoarjo. Universitas Negeri Malang.
- Rauf Rusdin. (2015). *Kimia Pangan.* Penerbit Andi Yoyakarta. Jl. Beo 38-40 Yogyakarta.

- Rueness Jan. (2005). Life History and Molecular Sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), A New Introduction to European Waters. *Phycologia. Department of Biology, PO Box 1069, Blindern, 0316 Oslo, Norway.*
- Ruslaini. (2017). Kajian Kualitas Air Terhadap Pertumbuhan Rumput Laut (*Gracilaria verrucosa*) di Tambak Dengan Metode Vertikultur. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan Universitas Halu Oleo Kendari.
- Sanusi, H. S. (2006). *Kimia Laut Proses Fisik Kimia dan Interaksinya dengan Lingkungan*. Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Serbula S. M., T. S. Kalinovic., A. A. Ilic., J. V. Kalinovic and M. M. Steharnik. (2012). Assessment of Airborne Heavy Metal Pollution using *Pinus* spp. and *Tilia* spp. *Aerosol and Air Quality*. 13: 563-573.
- Setyaningsih, D., A. Anton dan P.S. Maya. (2010). Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Agro. Institut Pertanian Bogor Press. Bogor.
- Sinaga E. L. R dan A. Muhtadi. (2017). Profil Suhu, Oksigen Terlarut dan pH Secara Vertikal Selama 24 Jam di Danau Kelapa Gading Kabupaten Asahan Sumatera Utara. *Omni-Akuatika* 12 (2): 114-124.
- Standar Nasional Indonesia. (2010). SNI 7578-2010. Produksi Rumput Laut *Gracilaria*. dengan Metode Tebar di Tambak Secara Polikultur. ISC65.150.  
<https://www.scribd.com/doc/261924837/SNI-7578-2010-Produksi-Rumput-Laut-Gracilaria>.
- SNI (Standar Nasional Indonesia). (2013). SNI 7904:2013 Produksi Bibit Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* dengan Metode Sebar di Tambak.
- Suhy J., B. S. J. Evan., E. M. F. Duarte., and R. Ravi. (1999). Li Nuclear Magnetic Resonance Study for the Determination of Li<sup>+</sup> Properties in Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of Neurochemistry*. 71(4).
- Sumampou O. J. (2015). Diktat Pencemaran Lingkungan. Sam Ratulangi University. DOI: 10.13140/RG.2.1.3278.8649
- Tega R. Y., Herawati Y. E., and Kilawati Y. (2016). Heavy Metal (Pb) and Its Bioaccumulation in Red Algae (*Gracilaria* sp.) At Kupang Village, Jabon Sub-District, Sidoarjo District. *J.Exp. Life Sci*. 9(2).
- Thirumoorthy N., K. M. Kumar., A. S. Sundar., L Panayappan and M. Chatterjee. (2007). Metallothionein: An overview. *World Journal of Gastroenterology* ISSN 1007-9327. 21; 13(7): 993-996.
- Tonon A. P., C. O. Mariana., M. S. Eliane and C. Pio. (2011). Absorption of Metals and Characterization of Chemical Elements Present in Three Species of *Gracilaria* (Gracilariaceae) Greville: A Genus of Economical Importance. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(2): 355-360.
- Trono, G. C. (1974). A Review of The Production Technologies of Tropical Species of Economic

Seaweeds. Technical Research Reports. Marine Science Institute, University of the Philippines. Philippines.

<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB728E/AB728E00.htm#TOC>

Zacka Jim. (2018). Introduction to Enzymes. Penerbit Worthington Biochemical Corp. 730 Vassar Ave Lakewood, NJ 08701.  
<http://www.worthington-biochem.com/introBiochem/Enzymes.pdf>

Zhou Li., Y. Zhang., X. Zhang., Y. Peng., E. Merewitz, X. Ma., L Huang and Y. Yan. (2015). The Alterations of Endogenous Polyamines and Phytohormones Induced by Exogenous Application of Spermidine Regulate Antioxidant Metabolism, Metallothionein and Relevant Genes Conferring Drought Tolerance in White Clover. *Environmental and Experimental Botany*. 124, 22–38.