

# **SELEKSI TANAMAN HIPERAKUMULATOR DARI FAMILI POACEAE BERDASARKAN ANALISIS GEN *NRAMP3* DAN *NRAMP4* DI BANTARAN SUNGAI GAJAHWONG YOGYAKARTA**

## **I. PENDAHULUAN**

Penambahan jumlah penduduk, peningkatan aktivitas manusia dan upaya pembangunan bangsa melalui vitalisasi kegiatan pertanian dan industri di Indonesia, telah memberikan dampak negatif yang sangat memprihatinkan bagi alam. Hal ini karena upaya untuk meningkatkan kesejahteraan manusia, tidak diselaraskan dengan upaya pemeliharaan kualitas lingkungan yang berkelanjutan. Padahal, tingginya laju degradasi lingkungan dan tingkat pencemaran akan berimbas juga pada manusia.

Salah satu jenis polutan yang banyak mencemari lingkungan, baik air, tanah maupun udara, adalah logam berat. Logam berat sebenarnya merupakan senyawa anorganik yang umumnya terdapat di dalam tanah atau secara alami terkandung dalam batu-batuan. Beberapa jenis logam berat bahkan merupakan senyawa yang diperlukan tumbuhan untuk pertumbuhannya. Akan tetapi, kandungan logam berat yang tinggi justru akan menimbulkan efek toksik bagi organisme yang terpapar. Peningkatan kadar logam berat hingga mencapai kadar toksik terutama disebabkan oleh peningkatan jumlah berbagai limbah yang dihasilkan dari sektor domestik, industri maupun pertanian.

Daerah yang rawan terkontaminasi logam berat diantaranya adalah sungai dan bantaran sungai. Di Indonesia pada umumnya, sungai seringkali dijadikan sebagai terminal pembuangan limbah dari industri, pertanian maupun rumah tangga tanpa adanya pengawasan yang ketat. Di Yogyakarta sendiri, terdapat empat sungai yang tingkat pencemarannya telah melewati ambang batas, yakni kali Code, sungai Winongo, kali Manunggal dan sungai Gajahwong (Tempo. Co, 12 Maret 2014). Menurut hasil

penelitian oleh Nuraini dan Sunardi (2010), sungai Gajahwong sendiri telah tercemar logam Cu dan Cr. Oleh karena itu, kemungkinan adanya bahan pencemar dari berbagai jenis logam lainnya cukup tinggi, mengingat sungai ini melewati daerah pertanian, pemukiman penduduk yang cukup padat, serta beberapa lokasi industri seperti industri perak dan kulit.

Pencemaran logam berat pada tanah maupun air, merupakan permasalahan yang harus segera dicari penanggulangannya. Akan tetapi secara teknis, remediasi lahan maupun perairan yang terkontaminasi logam berat sangat sulit dilakukan (Ahn *et al.*, 2009). Beberapa teknologi remediasi, termasuk perlakuan secara kimiawi dan fisik seperti vitrifikasi, remediasi elektrokinetik atau solidifikasi, telah diterapkan untuk membersihkan lahan yang terkontaminasi logam berat (EPA, 2007; Solís-Domínguez *et al.*, 2007). Namun, metode tersebut cukup kompleks, tidak ramah lingkungan dan sangat mahal (Chan *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 2008; Ahn *et al.*, 2009). Oleh karena itu, selama dua dekade terakhir perhatian mulai diarahkan pada aplikasi remediasi secara biologis menggunakan mikroorganisme dan tanaman.

Metode remediasi berbasis sistem biologi dapat digunakan untuk mengatasi berbagai macam kontaminan dan dapat diaplikasikan untuk berbagai area tercemar, seperti tanah, air permukaan, air tanah, dan sedimen (Arthur *et al.*, 2005). Remediasi menggunakan mikroorganisme, atau dikenal sebagai bioremediasi, dapat diaplikasikan untuk mengatasi pencemaran oleh bahan organik, namun potensi bioremediasi untuk mengatasi pencemaran oleh logam berat yang sulit didegradasi masih terbatas. Sebaliknya, tanaman mampu mengakumulasi logam berat tertentu dalam jaringannya (Zeng *et al.*, 2008; Oliva *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009).

Kemampuan untuk menyerap logam merupakan kemampuan alami yang dimiliki oleh tanaman karena beberapa logam berat merupakan unsur yang esensial bagi pertumbuhan tanaman. Beberapa jenis tanaman yang dikenal sebagai hiperakumulator, khususnya, sangat toleran terhadap logam berat tertentu, dan mampu mengakumulasi konsentrasi logam berat hingga 10-100 kali lipat dari tanaman non hiperakumulator, tanpa menunjukkan gejala toksisitas yang nyata (Solís-Domínguez *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2008; Oomen *et al.*, 2009). Dengan demikian, aktivitas penyerapan logam oleh tanaman dapat dimanfaatkan untuk mengatasi pencemaran akibat logam berat. Oleh karena itu, mulai dikembangkanlah metode remediasi berbasis tanaman hiperakumulator, atau disebut fitoremediasi.

Fitoremediasi memanfaatkan kemampuan sistem perakaran tanaman yang unik dan selektif dalam menyerap bahan-bahan tertentu beserta kemampuan tumbuhan dalam translokasi, bioakumulasi dan penyimpanan/degradasi kontaminan yang diserapnya (Hinchman, *et al.*, 1996). Pertimbangan utama untuk mengevaluasi fitoremediasi sebagai alternatif remediasi yang memungkinkan untuk suatu area adalah tipe media yang terkontaminasi, tipe dan konsentrasi kontaminan, dan vegetasi yang dapat tumbuh secara efektif pada area tersebut. Meskipun fitoremediasi memerlukan waktu yang cukup lama, area remediasi terbatas pada area yang terjangkau akar tanaman dan hasil remediasi terbaik diperoleh pada lahan dengan tingkat pencemaran ringan hingga sedang (Wei *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009), teknologi ini patut dipertimbangkan sebagai metode remediasi alternatif, khususnya di negara-negara berkembang karena fitoremediasi merupakan metode yang ramah lingkungan dan terbilang relatif murah. Dengan mengaplikasikan metode ini, polutan dapat diambil dari area yang tercemar

secara *in situ* sehingga setelah fitoremediasi selesai dilakukan, daerah tersebut dapat digunakan untuk tujuan lain.

Logam berat yang kandungannya di alam semakin meningkat akibat aktivitas manusia, diantaranya adalah Cd dan Zn. Wang *et al.* (2009) menyebutkan bahwa Zn merupakan logam berat yang memiliki konsentrasi tertinggi pada berbagai limbah. Pencemaran oleh Zn bersumber dari pertambangan, berbagai senyawa kimia yang digunakan dalam pertanian yang mengandung Zn, serta berbagai macam kegiatan industri (Bi *et al.*, 2006). Zn merupakan unsur yang esensial bagi tanaman untuk berbagai reaksi biokimia, namun konsentrasi Zn yang tinggi pada lingkungan akan menghambat absorpsi akar terhadap unsur lain sehingga tanaman mengalami klorosis (Ebbs & Kochian, 1997). Sementara itu, polusi Cd meningkat secara signifikan seiring dengan perkembangan industri modern yang menghasilkan limbah mengandung Cd, pertambangan serta pertanian yang menggunakan pupuk fosfat yang mengandung Cd (Dopico *et al.*, 2009). Berbeda dengan Zn, Cd merupakan logam berat non-esensial yang bersifat toksik dan mudah larut dalam air. Dalam konsentrasi rendah, Cd tidak bersifat toksik terhadap tanaman, namun dalam konsentrasi tinggi Cd menyebabkan klorosis dan nekrosis, menghambat pertumbuhan akar serta pembelahan sel (Solís-Domínguez *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Gejala toksisitas muncul ketika tanaman terpapar Zn pada konsentrasi lebih dari 1000 mg/kg (Paschke *et al.*, 2006) dan tanaman hiperakumulator, mampu mengakumulasi Zn hingga lebih dari 10,000 mg/kg di pucuk (Sahac *et al.*, 2009). Menurut Reeves dan Baker, (2000 dalam Tian *et al.*, 2009) ada 18 spesies tanaman yang teridentifikasi mengakumulasi Zn dalam jumlah tinggi. Sementara itu, batas toleransi tanaman terhadap Cd adalah 0.2 mg/kg dan tanaman hiperakumulator mampu

mengakumulasi Cd hingga lebih dari 100 mg/kg berat kering (Solís-Domínguez *et al.*, 2007). Sejauh ini, baru empat spesies hiperakumulator Cd yang telah teridentifikasi, yaitu *T.caerulescens*, *T. praecox*, *A.halleri*, and *Sedum alfredii* (Lu *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2008).

Hiperakumulasi pada tanaman mengimplikasikan adanya mekanisme homeostasis yang mengatur keseimbangan antara tingkat akumulasi dan toleransi tanaman terhadap logam berat tertentu. Adaptasi tanaman saat akumulasi logam tercakup dalam penyerapan logam oleh sistem perakaran, translokasi logam dari akar ke pucuk, dan toleransi terhadap akumulasi logam di daun melalui sequester dan detoksifikasi logam (Xing *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2009). Penelitian fisiologi dan molekuler menunjukkan bahwa kunci penentu tingkat akumulasi logam diantaranya adalah transporter logam pada tanaman (Oomen *et al.*, 2009). Berdasarkan fungsinya dalam mekanisme hiperakumulasi logam oleh tanaman, transporter logam dapat dikategorikan ke dalam tiga kelompok, yaitu transporter untuk pengambilan logam dari lingkungan oleh akar, translokasi logam dan sequestrasi logam di vakuola (Verbruggen *et al.*, 2009). Gen yang terlibat dalam pengambilan logam oleh akar merupakan anggota dari berbagai famili transporter, mencakup *zinc-regulated transporter*, famili *iron-regulated transporter protein* (ZIP), famili *natural resistance associated macrophage protein* (NRAMP), *efflux transporters*, dan anggota P1B-ATPase serta famili *cation diffusion facilitator* (CDF) (Colangelo & Guerinot, 2006 dalam Lin *et al.*, 2009).

Pada keberadaan berbagai macam logam di tanah, laju influks logam ke dalam akar bervariasi. Pada *Thlaspi caerulescens*, keberadaan Zn menurunkan akumulasi Cd (Ebbs *et al.*, 2009), namun hasil sebaliknya terjadi pada *Zea mays* (Wang *et al.*, 2007).

Tampaknya keberadaan berbagai jenis logam menginduksi mekanisme transporter logam yang berbeda dan setiap spesies memiliki strategi yang berbeda untuk mencapai keadaan homeostasis. Zn merupakan unsur yang esensial bagi tanaman sehingga tanaman akan memiliki mekanisme spesifik untuk menyerap Zn dari tanah. Sementara itu, Cd tidak memiliki fungsi fisiologis dan bahkan bersifat toksik untuk tanaman sehingga adanya interaksi antagonis pada penyerapan Zn dan Cd mungkin disebabkan oleh ikatan kompetitif antara dua logam pada transporter logam yang sama. Meskipun demikian, hasil penelitian Assunção *et al.*(2008) mengungkapkan bahwa populasi *T. caerulescens* menunjukkan akumulasi Cd yang tidak dipengaruhi oleh Zn. Hal ini menunjukkan bahwa pengambilan Cd mungkin melibatkan sistem yang spesifik dan Lin *et al.*(2008) memperkirakan bahwa Cd mungkin diperlukan untuk pertumbuhan tanaman yang optimal.

Penelitian fisiologi pada beberapa spesies hiperakumulator Zn dan Cd mengungkapkan bahwa pengambilan logam berat oleh akar melibatkan berbagai sistem (Plaza *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007; Ebbs *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009). Akan tetapi ketika logam berat memasuki akar, tanaman akan memperlakukan logam dalam dua cara, yaitu mengakumulasi logam dalam vakuola akar atau mentransport logam ke pucuk melalui xilem (Xing *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009). Tentu saja, karakteristik yang diinginkan pada tanaman hiperakumulator adalah kemampuan translokasi logam yang diserap ke bagian tanaman yang mudah dipanen (Wojas *et al.*, 2009). Faktor translokasi, ditunjukkan melalui rasio konsentrasi logam pada pucuk terhadap akar, menunjukkan kapasitas translokasi dari akar ke pucuk (Wei *et al.*, 2009). Analisis fisiologi menunjukkan bahwa translokasi dari akar ke pucuk ditentukan oleh rasio sequestrasi

logam di sel akar dibandingkan dengan di sel pucuk (Zeng *et al.*, 2008) serta efisiensi dimuatkannya logam pada xilem (Xing *et al.*, 2008; Tian *et al.*, 2009).

Gen *NRAMP* telah teridentifikasi pada berbagai organisme mulai dari bakteri hingga manusia (Oomen *et al.*, 2009) dan pada tumbuhan gen ini terdeteksi pada beberapa jenis tanaman, baik hiperakumulator maupun non hiperakumulator, seperti padi (Belouchi *et al.*, 1997), tomat (Bereczky *et al.*, 2003), kedelai (Kaiser *et al.*, 2003), dan berbagai spesies dari genus *Arabidopsis* serta *Thlaspi* (Oomen *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2008). Transporter *NRAMP* berperan untuk memfasilitasi transport Mn, Zn, Cu, Fe, Cd, Ni, dan Co (Nevo & Nelson, 2006). Penelitian transkriptomik menunjukkan bahwa ada perbedaan tingkat ekspresi gen *NRAMP* antara tanaman hiperakumulator dan non hiperakumulator. *NRAMP3* lebih terekspresi pada *A. Halleri* (Weber *et al.*, 2004) dan *T. Caerulescens* (van de Mortel *et al.*, 2006) yang merupakan tanaman hiperakumulator dibandingkan dengan *A. thaliana* yang merupakan tanaman non hiperakumulator. Hasil serupa juga diperoleh dari penelitian Oomen *et al.* (2009) yang menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* dari *T. Caerulescens* lebih tinggi dibandingkan ekspresi gen homolognya yang berasal dari tanaman *A. thaliana*. Saat diekspresikan pada khamir, *NRAMP3* dan *NRAMP4* dari *T. caerulescens* dan *A. thaliana* mentransport logam yang sama, yaitu Fe, Mn, dan Cd, kecuali Zn yang hanya ditransport oleh *NRAMP4* (Thomine *et al.*, 2000; Lanquar *et al.*, 2004; Oomen *et al.*, 2009).

Beberapa transporter logam yang terlibat dalam sequestrasi Zn dan Cd adalah famili CDF, atau disebut juga *metal transporter proteins* (MTP) (Peiter *et al.*, 2007), dan *heavy metal transporting ATPase* (HMA) (Hanikenne *et al.*, 2008; Xing *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2009). Menurut Xing *et al.*, (2008) translokasi logam ke pucuk

dipengaruhi oleh keefektifan sequestrasi pada vakuola akar. Dengan demikian, tingkat penyerapan logam oleh akar berhubungan dengan akumulasi logam pada akar dan pucuk (Gustin *et al.*, 2009) karena kemampuan sequestrasi logam dalam kadar yang tinggi dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap keberadaan logam berat. Akan tetapi, peran famili NRAMP untuk translokasi logam dari akar ke pucuk belum diketahui dengan jelas. Jika gen *NRAMP* mengalami overekspresi pada bagian akar maupun pucuk, maka *NRAMP* kemungkinan berperan tidak hanya pada saat penyerapan logam oleh akar, tetapi juga berperan dalam translokasi logam ke pucuk.

Protein NRAMP mampu mentransport berbagai jenis logam sekaligus seperti Mn, Zn, Cu, Fe, Cd, Ni dan Co (Nevo & Nelson, 2006). Gen *NRAMP* sendiri, telah terdeteksi pada beberapa jenis tanaman, baik hiperakumulator maupun non hiperakumulator, seperti padi (Belouchi *et al.*, 1997), tomat (Bereczky *et al.*, 2003), kedelai (Kaiser *et al.*, 2003), dan berbagai spesies dari genus *Arabidopsis* serta *Thlaspi* (Oomen *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2008). Hasil penelitian Oomen *et al.* (2009) menunjukkan bahwa tingkat ekspresi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* lebih tinggi pada tanaman hiperakumulator dibandingkan ekspresinya pada tanaman non hiperakumulator. Hal ini menunjukkan bahwa identifikasi tingkat ekspresi kedua gen tersebut dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman yang potensial sebagai hiperakumulator, khususnya untuk logam Zn dan Cd. Jenis tanaman yang berpotensi sebagai fitoremediator tersebut kemungkinan dapat ditemukan pada bantaran sungai yang tercemar, seperti sungai Gajahwong di Yogyakarta.

Berdasarkan hasil observasi struktur vegetasi (data tidak dipublikasikan), vegetasi yang banyak tumbuh di bantaran sungai Gajahwong adalah tanaman dari famili Poaceae. Beberapa spesies dari famili ini memang merupakan tanaman



hiperakumulator, seperti *Pennisetum clandestinum* (Sögüt *et al.* 2005), *Lolium perenne* L., *Poa pratensis* L. dan *Festuca pratensis* Huds (Jankaitė, & Vasarevičius, 2007). Kelompok tanaman dari famili Poaceae cukup potensial sebagai tanaman fitoremediator karena pertumbuhannya yang cepat dan luas. Walaupun biomasnya cukup kecil, tanaman ini banyak tumbuh di bantaran sungai sehingga secara akumulatif, tingkat penyerapan logam akan lebih tinggi. Kecuali untuk beberapa spesies yang digunakan sebagai pakan ternak, Poaceae jarang dimanfaatkan sebagai sumber pangan maupun pakan sehingga resiko akumulasi logam pada manusia juga rendah. Oleh karena itu, eksplorasi dan seleksi tanaman hiperakumulator pada bantaran sungai Gajahwong memiliki andil terhadap upaya remediasi lahan sekitar sungai yang tercemar akibat rembesan air sungai yang mengandung limbah logam berat.

## **II. RUMUSAN MASALAH, TUJUAN DAN MANFAAT**

### **a. Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah disampaikan sebelumnya, rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini adalah:

1. Di antara spesies tanaman pada famili Poaceae yang kemelimpahannya paling tinggi pada bantaran sungai Gajahwong, spesies tanaman manakah yang berpotensi sebagai tanaman fitoremediator untuk logam Zn dan Cd berdasarkan kemampuan akumulasi logam Zn dan Cd serta tingkat ekspresi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4*?
2. Bagaimanakah homologi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* pada tanaman yang teridentifikasi sebagai hiperakumulator untuk logam Zn dan Cd?

## **b. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Menyeleksi tanaman dari famili Poaceae yang berpotensi sebagai hiperakumulator, khususnya bagi logam Zn dan Cd, pada bantaran sungai Gajahwong Yogyakarta berdasarkan analisis kandungan logam Zn dan Cd pada tanaman dan tingkat ekspresi gen metal transporter *NRAMP3* dan *NRAMP4*.
2. Menentukan tingkat homologi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* pada tanaman yang teridentifikasi sebagai hiperakumulator berdasarkan analisis susunan basa pada cDNA kedua gen.

## **c. Manfaat Penelitian**

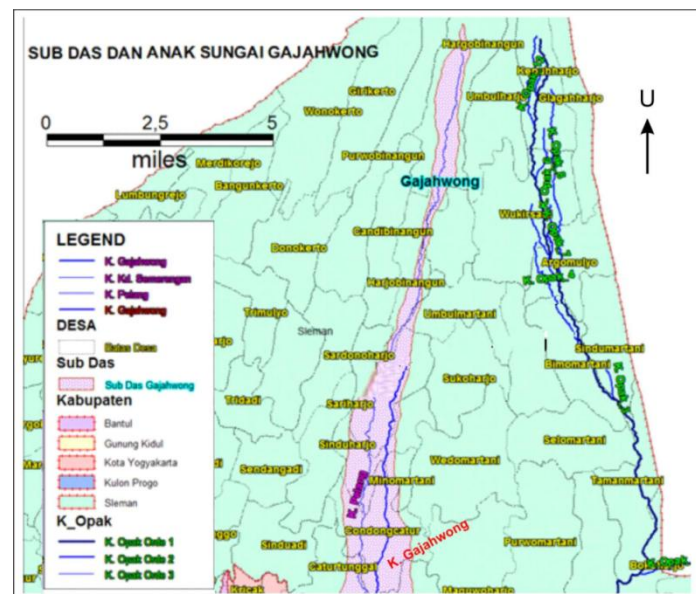
Penelitian ini dilakukan untuk mengatasi pencemaran lingkungan akibat logam berat dengan menggunakan teknik fitoremediasi yang ramah lingkungan dan berbiaya murah. Eksplorasi dan seleksi tanaman potensial hiperakumulator pada bantaran sungai Gajahwong merupakan bentuk kontribusi untuk mendukung upaya remediasi area yang tercemar oleh logam berat, khususnya Cd dan Zn. Selain itu, peran famili NRAMP untuk translokasi logam dari akar ke pucuk belum diketahui dengan jelas. Jika gen *NRAMP* mengalami overekspresi pada bagian akar maupun pucuk, maka *NRAMP* kemungkinan berperan tidak hanya pada saat penyerapan logam oleh akar, tetapi juga berperan dalam translokasi logam ke pucuk. Pemahaman yang lebih baik terhadap jejak akumulasi logam pada tanaman dan mekanisme yang terlibat di dalamnya diperlukan untuk meningkatkan potensi tanaman hiperakumulator pada aplikasi fitoremediasi.

### III. METODE PENELITIAN

#### a. Cara Kerja

##### 1. Pengumpulan sampel

Pengambilan sampel dilakukan di daerah bantaran sungai Gajah Wong (Gambar 2) pada 5 (lima) stasiun pengambilan sampel dari daerah hulu hingga hilir. Pada tiap stasiun pengambilan sampel, dilakukan pengamatan struktur vegetasi dan pengamatan parameter fisik dan kimiawi (mencakup pengukuran pH, suhu, kelembaban tanah, serta intensitas cahaya). Pengukuran parameter fisik dan kimiawi dilakukan sebanyak 3 (tiga) kali ulangan. Sampel tanaman yang diambil terdiri atas 5 (lima) species Poaceae yang kemelimpahannya paling tinggi pada setiap stasiun pengambilan sampel.



Gambar 2. Peta sub das dan anak sungai Gajahwong (Bappeda, 2013)

Kemelimpahan species tanaman di daerah bantaran sungai Gajah Wong diamati pada species-species yang tergolong dalam familia Poaceae, dengan metode kuadrat.

Koleksi data dilakukan dengan menggunakan plot-plot yang jumlahnya menyesuaikan dengan lokasi pengambilan sampel.

## 2. Analisis kandungan logam berat

Analisis kandungan logam berat dilakukan pada sampel tanah dan tanaman (akar dan daun). Pengukuran kandungan logam berat dilakukan dengan menggunakan metode AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometry*), khususnya untuk mendeteksi kandungan Cd (cadmium) dan Zn (seng).

## 3. Isolasi RNA total

Untuk ekstraksi RNA total, sampel daun serta akar tanaman diambil, dibekukan dan dihomogenisasi dalam nitrogen cair. Ekstraksi RNA total dilakukan menggunakan Trizol (Invitrogen) dengan mengikuti petunjuk penggunaan yang tersedia. Pengujian kualitas RNA hasil isolasi dilakukan dengan metode spektrofotometri.

## 4. Analisis ekspresi gen dengan *Real Time-PCR*

Analisis tingkat ekspresi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* menggunakan *Real Time PCR* dari *template* RNA. Amplifikasi gen menggunakan *labeled* primer (*Forward* dan *reverse*): 5'-ATGGTTTTGTGGGTTATGGC-3' dan 5'-CTCGAGCTTCCTTATCCGT-3' untuk gen *NRAMP3*, dan *labeled* primer (*forward* dan *reverse*): 5'-CCAGGACTATCAAACAAGCTGT-3' dan 5'-CAATGGAGTAGTACTTGAGAGCTTC-3' untuk *NRAMP4* (Oomen *et al.*, 2009).

## 5. Sintesis cDNA

Sintesis cDNA gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* dengan metode *Reverse Transcriptase PCR* mengadopsi metode sebagaimana yang dijelaskan dalam Oomen *et al.* (2009). Primer yang digunakan terdiri atas primer (*Forward* dan *reverse*): 5'ATGGTTTTGT GGGTTATGGC-3' dan 5'-CTCGAGCTTCCTTATTCCGT-3' untuk

gen *NRAMP3*, dan primer (*forward* dan *reverse*): 5'-CCAGGACTATCAAACAAG CTGT-3' dan 5'-CAATGGAGTAGTACTTGAGAGCTTC-3' untuk *NRAMP4* (Oomen *et al.*, 2009).

6. Sekuensing dan analisis homologi gen

Sekuensing gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* menggunakan metode elektroforesis kapiler dengan sekuenser ABI Prism 310 *Genetic Analyzer*. Homologi gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* dikaji secara *in silico* dengan membandingkan sekuens gen *NRAMP3* dan *NRAMP4* dari tanaman fitoremediator dengan tingkat ekspresi gen tinggi, dibandingkan dengan gen yang sama pada species fitoremediator lainnya dengan menggunakan data sekuens gen dari *gene bank*. Metode yang digunakan adalah metode *BLAST* dan pohon filogenetik dikonstruksi menggunakan metode *Weighted Neighbor Joining*.

**b. Jadwal Rencana Penelitian**

Kegiatan	Bulan ke :					
	1	2	3	4	5	6
Perizinan	X					
Observasi lapangan	X					
Koleksi data		X	X			
Analisis data			X	X	X	
Penyusunan laporan					X	X

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, C.K., Kim, Y.M., Woo, S.H., & Park, J.M. (2009). Removal of Cationic Heavy Metal and HOC from Soil-Washed Water Using Activated Carbon. *Proceedings of World Academy of Science, Environmental Engineering Science*. Vol. 37. ISSN 2070-3740.
- Arthur, E.L., Rice, P.J., Rice, P.J., Anderson, A., Baladi, M., Henderson, K.L.D. *et al.* (2005). Phytoremediation, An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(2), 109–122.
- Assunção, A.G.L, Bleeker, P., ten Bookum, W.M., Vooijs, R., & Schat, H. (2008). Intraspecific variation of metal preference patterns for hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*: evidence from binary metal exposures. *Plant Soil*, 303, 289–299.
- Bi, X., Feng, X., Yang, Y., Qiu, G., Li, G., Li, F., *et al.* (2006). Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, western Guizhou, China. *Environ. Int.*, 32, 883–890.
- Chan, Y.M., Agamuthu, P., & Mahalingam, R. (2000). Solidification and Stabilization of Asbestos Brake Lining Dust Using Polymeric Resins. *Environmental Engineering Science*, 17(4), 203-213.
- Dopico, E., Linde, A.R., & Garcia-Vazquez, E. (2009). Traditional and modern practices of soil fertilization: Effects on cadmium pollution of river ecosystems in Spain. *Hum. Ecol.*, 37, 235–240.
- Ebbs, S.D., & Kochian, L.V. (1997). Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.*, 26, 776–781.
- Ebbs, S.D., Zambrano, M.C., Spiller, S.M., & Newville, M. (2009). Cadmium absorption, influx, and efflux at the mesophyll layer of leaves from ecotypes of the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist.*, 181, 626–636.
- EPA. (2007). Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report (Twelfth Edition). Diakses 20 April 2009 dari [www.epa.gov/tio](http://www.epa.gov/tio).
- Ghosh, M., & Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1), 1–18.
- Gustin, J.L., Loureiro, M.E., Kim, D., Na, G., Tikhonova, M., & Salt, D.E. (2009). MTP1-dependent Zn sequestration into shoot vacuoles suggests dual roles in Zn tolerance and accumulation in Zn-hyperaccumulating plants. *The Plant Journal*, 57, 1116–1127.
- Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte. *et al.* (2008). Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 453, 391–395.

- Hinchman, R.R., Negri, M.C., & Gatliff, E.G. (1996). *Phytoremediation, Using Green Plants to Clean Up Contaminated Soil, Groundwater, and Wastewater*. USA: Argonne National Laboratory.
- Jankaitė A., & Vasarevičius, S. (2007). Use of Poaceae f. species to decontaminate soil from heavy metals. *Ekologija*, 53(4), 84-89.
- Jensen, P.E., Ottosen, L.M., & Harmon, T.C. (2007). The Effect of Soil Type on the Electrodialytic Remediation of Lead-Contaminated Soil. *Environmental Engineering Science*, 24(2), 234-244.
- Lin, Y.F., Liang, H.M., Yang, S.Y., Boch, A., Clemens, S., Chen, C.C. *et al.* (2009). Arabidopsis IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter. *New Phytologist*, 182, 392–404.
- Lu, L.L., Tian, S.K., Yang, X.E., Wang, X.C., Brown, P., Li, T.Q. *et al.* (2008). Enhanced root-to-shoot translocation of cadmium in the hyperaccumulating ecotype of *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3203–3213.
- Nuraini E., & Sunardi. (2010). Kualitas lingkungan sungai Code dan Gajahwong ditinjau dari kadar Cu dan Cr dalam cuplikan sedimen. *Prosiding Pertemuan Ilmiah XXIV HFI Jateng & DIY*.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H. *et al.* (2009). Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 181, 637–650.
- Paschke, M.W., Perry, L.G., & Redente, E.F. (2006). Zinc toxicity thresholds for reclamation Forb species. *Water, Air & Soil Pollution*, 170, 317-330.
- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pendas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M. *et al.* (2007). A secretory pathway-localized cation diffusion facilitator confers plant manganese tolerance. *PNAS*, 104, 8532-8537.
- Plaza, S., Tearall, K.L., Zhao, F.J., Buchner, P., McGrath, S.P., & Hawkesford, M.J. (2007). Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 58(7), 1717–1728.
- Sögüt, Z., Zaimoglu, B.Z., Erdogan, R., & Sucu, M.Y. (2005). Phytoremediation of landfill leachate using *Pennisetum clandestinum*. *Journal of Environmental Biology*, 26(1), 13-20.
- Solís-Domínguez, F.A., González, C., Carrillo-González, M.C.R., & Rodríguez-Vázquez, R. (2007). Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *J. Hazard. Mater.*, 3, 630–636.
- Sun, Y.B., Zhou, Q.X., & Ren, L.P. (2007). Growth responses of *Rorippa globosa* and its accumulation characteristics of Cd and As under the Cd-As combined pollution. *Environ. Sci.*, 28(6), 1355–1360.
- Sun, Y.B., Zhou, Q.X., An, J., Liu, W.T., & Liu, R. (2009). Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii* Ance). *Geoderma*, doi, 10.1016/j.geoderma.2009.01.016.

- Tempo. Co. (12 Maret 2014). Pencemaran 4 sungai Yogya lewati ambang batas. Diakses tanggal 24 Maret 2014 dari <http://www.tempo.co/read/news/2014/03/12/206561693/Pencemaran-4-Sungai-Yogya-Lewati-Ambang-Batas>.
- Tian, S.K., Lu, L.L., Yang, X.E., Labavitch, J.M., Huang, Y.Y., & Brown, P. (2009). Stem and leaf sequestration of zinc at the cellular level in the hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *New Phytologist*, *182*, 116–126.
- Verbruggen, N., Hermans, C., & Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, *181*, 759–776.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W. *et al.* (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, *75*, 1468–1476.
- Wang, M., Zou, J., Duan, X., Jiang, W., & Donghua L. D. (2007). Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). *Bioresource Technology*, *98*, 82–88.
- Wei, S., Zhou, Q., Sahac, U.K., Xiaoa, H., Hua, Y., Rena, L. *et al.* (2009). Identification of a Cd accumulator *Conyza canadensis*. *Journal of Hazardous Materials*, *163*, 32–35.
- Wei, S.H., Silva, J.A.T., & Zhou, Q.X. (2008). Agro-improving method of phytoextracting heavy metal contaminated soil, *J. Hazard. Mater.*, *150*, 662–668.
- Wojas, S., Hennig, J., Plaza, S., Geisler, G., Siemianowski, O., Sklodowska, A. *et al.* (2009). Ectopic expression of Arabidopsis ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation. *Environ. Pollut.* doi, 10.1016/j.envpol.2009.04.024
- Xing, J.P., Jiang, R.F., Ueno, D., Ma, J.F., Schat, H., McGrath, S.P. *et al.* (2008). Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. *New Phytologist*, *178*, 315–325.
- Zeng, X., Ma, L.Q., Qiu, R., & Tang, Y. (2008). Responses of non-protein thiols to Cd exposure in Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. *Environmental and Experimental Botany*, doi, 10.1016/j.envexpbot.2009.03.003.