

IDENTIFIKASI BAKTERI PEREDUKSI KROMIUM DARI TANAH SERPENTIN

Aisyah¹, Dindin Hidayatul Mursyidin¹, Hasrul Satria Nur¹, Badruzsaufari^{1*})

¹Program Studi Biologi, FMIPA, Unlam, Banjarbaru
Jl. A. Yani, Km. 36.00, Banjarbaru, Kalimantan Selatan
Email : badruzsaufari@unlam.ac.id

Abstract

Serpentine soil is derived from the weathering of ultramafic rock that characterized by high levels of heavy metals such as Cr, Mn, Co, Ni, Mg, and Fe, but contain low levels of essential elements, for examples Ca, N, and P. Serpentine soil of Mandiangin and Awang Bangkal of Kalimantan Selatan highly contains metals such as Cr, Ni, and Mn, which is a good source for heavy metals-tolerant microbes for bioremediation development. Eight isolates obtained from the soil were able to grow on the LB agar containing 150-200 mg.L⁻¹ of chromium hexavalent (Cr (VI)). The isolates were confirmed able to reduce at least 90 % of Cr (VI) (30 ppm). Seven isolates have 16S rRNA gene DNA sequence which highly similar to *B. cereus* group sequence including *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. myconoides*, dan *B. toyonensis*. The sequence of 16S rRNA gene DNA of this group is highly similar and differs only in a few of nucleotides. Another isolate has highly similar of 16S rRNA gene sequence to that of *Acinetobacter radioresistens* that known able to reduce chromium hexavalent with their chromate reductase.

Keywords: serpent, bioremediation, chromium, reductase, bacteria, gen16S rRNA

PENDAHULUAN

Beberapa lahan bekas tambang di Provinsi Kalimantan Selatan berada pada tanah serpent yang mempunyai kandungan kromium (Cr) yang relatif tinggi, yaitu sebesar 467 – 1.843 mg kg⁻¹ tanah, dan dalam bentuk heksavalen [Cr(VI)] sebesar 0,73 – 1,35 % dari kromium total (Saidy and Badruzsaufari, 2009a, b). Kromium dalam bentuk Cr (VI) bersifat toksik, karsinogen dan sangat mudah larut dalam air (Megharaj et al., 2003), sehingga sangat berbahaya bagi lingkungan jika masuk ke dalam sistem tata air. Salah satu upaya bioremediasi terhadap pencemaran tersebut adalah menggunakan bakteri yang dapat mereduksi Cr (VI) menjadi bentuk Cr lainnya, misalnya Cr (III), yang bersifat tidak toksik. Kebanyakan bakteri pereduksi Cr (VI) yang dilaporkan, diisolasi dan diidentifikasi berasal dari tanah terkontaminasi, pembuangan air, dan limbah pabrik, namun sedikit yang

berasal dari tanah serpent (Pal and Paul, 2004).

Tanah serpent atau ultramafik merupakan hasil pelapukan dan pedogenesis dari batuan ultramafik yang dicirikan oleh tingginya kandungan unsur Cr, Mn, Co, Ni, Mg, dan Fe tetapi kandungan unsur esensial lainnya seperti Ca, N, dan P rendah (Kayama et al., 2005; Ross, 1994). Tanah tersebut bisa menjadi sumber mikroba yang resistan dan dapat mereduksi Cr (VI). Kebanyakan bakteri yang resistan dan bisa mereduksi Cr (VI) diisolasi dari tanah serpent kaya nikel berasal dari genus *Acinetobacter* dan *Ochrobactrum*. Bakteri lainnya diidentifikasi sebagai spesies dari β -*Proteobacteria*, G+C tinggi, dan Gram-positif (Abou-Shanab et al., 2007).

Bakteri yang diisolasi dari tanah serpent Desa Awang Bangkal dan Desa Mandiangin, Kabupaten Banjar, Kalimantan Selatan menunjukkan tahan terhadap dan mampu mereduksi Cr(VI). Bakteri indigenous daerah tersebut

menunjukkan adanya potensi yang dapat dikembangkan untuk bioremediasi kromium (Madhavi et al., 2013) dan bioreporter atau biosensor untuk deteksi pencemaran kromium dengan cara yang lebih murah, jangka waktu panjang, dan sesuai dengan kondisi lingkungan (Branco et al., 2013). Karena sistem dan mekanisme reduksi kromium pada bakteri sangat beragam seperti yang dipapar di atas sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menentukan identitas jenis dan isolat bakteri, agar dapat digunakan dalam pengembangan teknologi bioremediasi dan biosensor untuk kontaminasi kromium.

Identifikasi jenis bakteri dapat berdasarkan pada fenotipe morfologi dan sifat biokimia yang disandarkan pada acuan standar seperti *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. serta bisa dilakukan berdasarkan urutan gen rRNA 16S. Urutan gen tersebut secara evolusi dipertahankan pada bakteri dan laju mutasinya terbatas sehingga menjadi pendekatan yang potensial untuk identifikasi spesies dan isolat yang tidak bisa dikenali secara sifat biokimianya (Janda and Abbott, 2007). Kemudahan pendekatan ini didukung oleh teknik amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan sekuensing yang semakin efisien. Selain itu semakin maju dan mudahnya mengakses teknologi bioinformasi menjadikan metode ini juga dapat digunakan untuk analisis kekerabatan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan media yang digunakan untuk menumbuhkan isolat bakteri adalah Luria Bertani (LB) agar dan LB broth. Bahan dan larutan yang digunakan untuk uji kandung Cr(VI) adalah larutan H_3PO_4 pekat, H_2SO_4 0.2 N, NaCl 1 N, serbuk kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), dan larutan difenilkarbazida. DNA bakteri diisolasi dengan Wizard(R) Genomic DNA

Purification Kit (Promega) dan gen rRNA 16S diamplifikasi dengan GoTaq(R) Flexi DNA Polymerase (Promega) menggunakan primer universal 27 F (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') dan 1492R (5'GGT TAC STT GTT ACG ACT T-3') (Lane, 1991).

Metode

Uji Resistensi dan Reduksi Isolat Bakteri terhadap Kromium Heksavalen

Delapan isolat bakteri yakni AB13, AB2Cr12, AB56ACr1, M1CC10, M2Cr10, M54Cr10, M5ACr10, dan MA33 yang disimpan dalam stok gliserol digoreskan pada media LB agar di cawan petri. Uji resistensi dilakukan secara berangsur-angsur dengan menumbuhkan satu koloni bakteri pada LB agar mengandung Cr (VI) 50 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹, 150 mg.L⁻¹, dan 300 mg.L⁻¹. Isolat yang dipastikan mampu hidup pada LB agar yang mengandung minimal 50 mg.L⁻¹ Cr (VI), kemudian ditumbuhkan ke LB agar mengandung 100 mg.L⁻¹ Cr (VI) demikian berturut-turut sampai diuji pada media mengandung 300 mg.L⁻¹ Cr (VI). Uji reduksi dilakukan dengan mengkulturkan satu koloni bakteri ke dalam Luria Bertani (LB) cair selama 24 jam lalu satu ose digoreskan pada LB agar mengandung 50 mg.L⁻¹ Cr(VI). Selanjutnya satu koloni dari kultur tersebut diinokulasikan dalam 1 ml LB cair selama 24 jam lalu dicampur dengan 9 ml LB cair mengandung 13 mg.L⁻¹ Cr(VI) dalam tabung reaksi atau tabung Falcon 50 ml. Campuran diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 OC sampai turbiditas (OD) sekitar 0.6. Kandungan Cr(VI) dalam campuran tersebut diukur dengan menggunakan metode difenilkarbazida (DPC) berdasarkan SNI 6989.53:2010. Pengukuran konsentrasi Cr (VI) menggunakan standar potasium bikromat ($K_2Cr_2O_7$) pada konsentrasi 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, dan 1.0 mg.L⁻¹ Cr(VI) dengan spektrofotometer UV-Vis (*Genesis*).

Identifikasi dan Uji Kekebabatan

a. Amplifikasi gen rRNA 16S

Gen rRNA 16S dari DNA genomik bakteri yang diisolasi dengan Wizard(R) Genomic DNA Purification Kit (Promega), diamplifikasi secara PCR dengan menggunakan GoTaq(R) Green Master Mix (Promega). Primer yang digunakan adalah primer universal 27 F dan 1492R dengan kondisi amplifikasi adalah 94 °C, 3 menit; 94 °C, 1 menit, 62 °C, 30 s) X30; 72 °C, 90 s; 72 °C, 10 menit. Komposisi pereaksi PCR disesuaikan dengan manual masing-masing kit. PCR produk (amplikon) diuji dengan elektroforesis gel agarosa 1.0 % dan 0,5 x buffer Tris Boric acid EDTA (TBE) dengan tegangan 80 Volt selama 60 menit. Gel diubar dengan Gel Red (Vivantis) dan ukuran band DNA dibandingkan dengan marka DNA 100 bp dan Lambda-*EcoRI/HindIII* (Vivantis). Konfirmasi lainnya untuk ketepatan amplikon dilakukan dengan analisis enzim restriksi menggunakan *EcoRI* dan *BamHI*.

b. Sekuensing DNA gen rRNA 16S.

Produk PCR yang kualitasnya baik tanpa ada band ganda diambil untuk dilakukan sekuensing DNA. Sebanyak delapan PCR produk dikirim ke 1st BASE Sequencing INT [sequencing@base-asia.com], Singapura untuk disekuens dengan metode Sanger menggunakan *automated DNA sequencer* (Applied Biosystem) secara bolak-balik menggunakan kedua primernya. Hasil sekuensing dibaca dengan Sequence Scanner 2.0 (Lifetechnology) untuk mendapatkan elektroforegram dan sekuen DNA format teks.

c. Analisis penjajaran (alignment) DNA dan filogenetik

Hasil sekuensing DNA gen rRNA 16S dari delapan isolat dianalisa kualitasnya berdasarkan *quality value* (QV) dan *background noise* pada elektroferogram secara manual. Sekuen pada ujung 5' dan 3' yang tidak baik dipangkas. Sekuen DNA hasil dari

sekuensing dengan primer reverse dibikin sekuen komplemennya. Lalu sekuen komplemen tersebut dianalisis penjajaran dengan sekuen DNA dari hasil sekuensing dengan primer forward menggunakan *software alignment*. Sekuen konsensus dibentuk berdasarkan kesamaan nukleotida antar dua sekuen dan jika nukleotidanya berbeda dipilih nukleotida yang mempunyai QV terkuat dan background noise terendah.

Untuk mengetahui kemiripan antara sekuen DNA gen rRNA 16S dari delapan isolat bakteri yang digunakan dengan sekuen DNA bakteri dan arkeabakter lainnya maka dilakukan analisis penjajaran dengan Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) terhadap sekuen gen ribosomal RNA 16S (Bacteria+Archea). Analisis kekerabatan (filogeni) antara isolat bakteri yang digunakan dengan bakteri lainnya dilakukan dengan MOLE-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/moleblast/moleblast.cgi>) berdasarkan *multiple sequence alignment* (MSA) dengan 20 sekuen gen rRNA 16S yang memiliki cakupan penjajaran (*query cover*) minimal 60 % dan kemiripan sekuennya (*Identity*) minimal 70%. Analisis tersebut menggunakan metode Neighbour-joining (Saitou and Nei, 1987) berdasarkan jarak Juke-Cantor (Jukes and Cantor, 1969).

HASIL

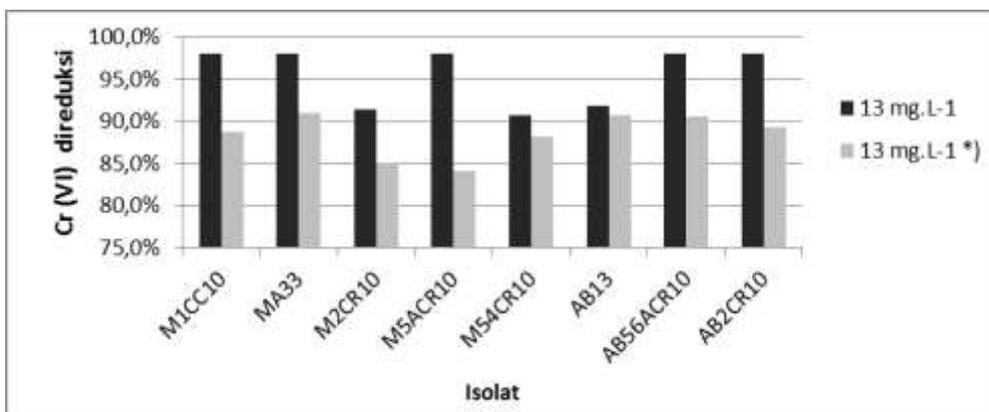
Resistensi dan Kemampuan Reduksi

Hasil pemulihan menunjukkan 7 isolat mampu tahan terhadap Cr (VI) dengan konsentrasi 200 mg.L⁻¹ dan hanya satu isolat tahan hanya sampai 150 mg.L⁻¹ Cr (VI), yakni AB56ACr10 dan belum ada satupun isolat yang kembali tahan terhadap 300 mg.L⁻¹ Cr (VI). Hasil pemulihan ini mengindikasikan bahwa selama penyimpanan dalam kultur agar miring dan stok gliserol yang tanpa mengandung kromium heksavalen dapat

menyebabkan resistensi terhadap logam berat tersebut menurun.

Kemampuan mereduksi kromium heksavalen penting diketahui setelah isolat bakteri mengalami proses pemulihan resistensi. Kemampuan reduksi masing-

masing isolat pada media mengandung 13 mg.L⁻¹ Cr (VI) adalah di atas 90 %. Kemampuan reduksi masing-masing isolat tersebut tidak lebih rendah daripada kemampuan reduksinya pada tujuh tahun lalu (Gambar 1).



Gambar 1. Kemampuan isolat bakteri asal tanah serpentin mereduksi kromium heksavalen (13 mg.L⁻¹) pada media LB broth selama 24 jam. Keterangan : *) diuji pada tahun 2009.

Identifikasi dan Uji Kekebabatan Amplifikasi gen rRNA 16S

Amplifikasi gen rRNA 16S menggunakan DNA genomik isolat bakteri yang mempunyai konsentrasi berkisar 40 ng.ul⁻¹ sampai 270 ng.ul⁻¹ dengan kualitas berdasarkan rasio absorbansi 260/280 nm berkisar antara 1.7 – 1.8. DNA tersebut diamplifikasi menggunakan primer 27F dan 1492R

dengan hasilnya dianalisis dengan elektroforesis yang ditunjukkan pada Gambar 2. Ukuran produk PCR tersebut sudah sesuai dengan posisi primernya. Analisis enzim restriksi dengan *E.co*RI dan *Bam*HI mengkonfirmasi bahwa PCR produk merupakan amplifikasi dari DNA gen rRNA 16S bakteri (data tersedia jika diminta).



Gambar 2. Produk PCR gen 16s rRNA isolat bakteri asal tanah serpentin. Ket : M= marka DNA 100 bp. Marka DNA dilabuh sebanyak 5 ul setara dengan 250 ng.

Sekuen DNA gen rRNA 16S dan analisis kekerabatan

Hasil sekuensing DNA gen rRNA 16S isolat bakteri asal tanah serpentin mempunyai kualitas baik dengan keterbacaan sampai 1400 bp untuk sekuensing masing-masing primer. Hasil analisis BLAST terhadap sekuen-sekuen tersebut menunjukkan bahwa semua urutan DNA isolat bakteri mempunyai kemiripan

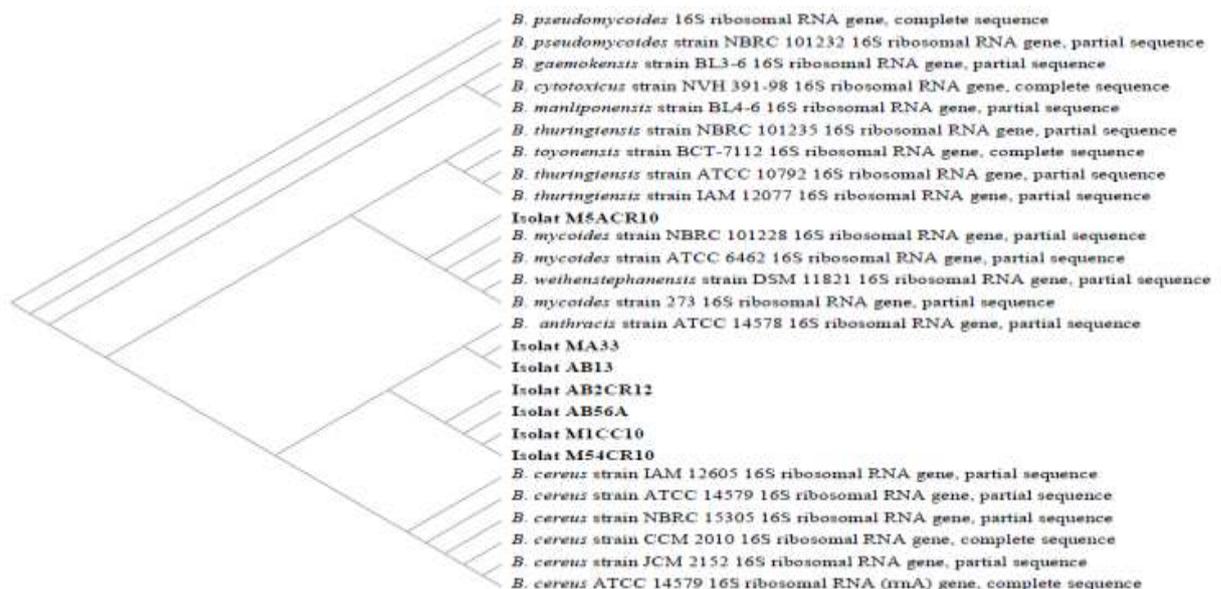
sangat tinggi (99 %) dengan bakteri *Bacillus cereus* dan anggota grupnya seperti *B.anthraxis*, dan *B. toyonensis*, namun tidak ada yang identik 100 % (Tabel 2). Satu isolat yang berbeda genus adalah M2Cr10 yang lebih mirip dengan bakteri *Acinetobacter radioresistens* yang kemiripannya juga 99%.

Tabel 2. Kemiripan sekuen gen rRNA 16S isolat bakteri assal tanah serpentin dengan beberapa galur bakteri berdasarkan BLAST

No.	Isolat	BLAST		
		Galur Bakteri Terdekat	Cakupan (%)	Identitas (%)
1	AB13	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	99	99
2	AB2CR12	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	100	99
3	AB56ACr10	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	99	99
4	M1CC10	<i>Bacillus cereus</i> strain ATCC 14579	99	99
5	M2CR10	<i>Acinetobacter radioresistens</i> strain NBRC 102413	100	99
6	M5ACR10	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	100	99
7	M54ACR10	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	99	99
8	MA33	<i>Bacillus anthracis</i> strain NR 041248	99	99

Analisis kekerabatan tujuh isolat bakteri menunjukkan mereka termasuk dalam grup *B. cereus*, yang terdiri dari enam spesies yang berkerabatan sangat dekat yakni *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis* dan *B. cereus* itu sendiri (Guinebretièrre et al., 2008). Grup bakteri ini terpisah dengan jelas dari kerabat terdekat bakteri lainnya seperti *B. pseudomycooides*, *B. mycotoxicus*, *B. gaemokensis*, dan *B. manliponensis*

(Gambar 2). Isolat M5ACR10 terpisah dari sub group isolat lainnya dan mengelompok dengan *B. myconoides* dan *B. weihenstephanensis*, sedangkan enam isolat lainnya satu sub group dengan *B. anthracis* dan terpisah dari sub group *B. cereus*. Analisis yang serupa dilakukan terhadap isolat M2Cr10 yang menunjukkan isolat tersebut berada dalam satu grup dengan *A. radioresistens* dan berbeda grup dengan spesies *Acinetobacter* lainnya.



Gambar 2. Kladogram isolat bakteri grup *B. cereus* berdasarkan sekuen DNA gen rRNA 16S

PEMBAHASAN

Bakteri pereduksi kromium heksavalen juga mempunyai sifat resistan terhadap unsur tersebut. Kemampuan

mereduksi tersebut dapat dianggap sebagai bagian dari sistem resisten terhadap Cr (VI). Penyimpanan bertahun-tahun dalam stok gliserol tanpa kromium sepertinya dapat menurunkan kemampuan

resistensi isolat bakteri terhadap kromium heksavalen sehingga tidak tahan lagi pada media mengandung $300 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$. Isolat bakteri tersebut dipulihkan secara bertahap pada kultur LB mengandung Cr(VI) mulai dari 50 mg.L^{-1} sampai 300 mg.L^{-1} . Hasil akhir dari proses ini mendapatkan isolat yang resisten pada Cr(VI) hanya sampai konsentrasi 200 mg.L^{-1} . Menurunnya resistensi dan pemulihan kembali secara bertahap mengindikasikan bahwa regulasi resistensi terhadap Cr(VI) adalah secara induktif. Regulasi tersebut diduga diatur oleh gen resisten yang berada di plasmid. Sel bakteri yang diberi perlakuan sodium dodesil sulfat (SDS) pada suhu 45°C cenderung mengalami *plasmid curing*, yakni hilangnya plasmid pada bakteri *Ochrobactrum*, sehingga menyebabkan bakteri tersebut kehilangan resistensi terhadap kromium (Sultan and Hasnain, 2005). Salah satu mekanisme resistensi terhadap kromium adalah dengan melakukan pemompaan keluar sel oleh protein transporter yang disandikan oleh gen *chrA* yang berada di plasmid (Alvarez et al., 1999). Pemulihan secara bertahap tersebut menunjukkan ekspresi gen transporter kromat *chrA1* dapat diinduksi oleh kromium heksavalen sehingga tingkat resisten bakteri terhadap Cr (VI) juga dapat diinduksi (He et al., 2010).

Bakteri yang diisolasi dari tanah serpentin masih tetap mampu melakukan reduksi Cr (VI) meskipun telah disimpan beberapa tahun dalam kultur stok gliserol. Dari Gambar 1 tampak bahwa kemampuan mereduksi Cr (VI) semua isolat tersebut tidak berubah meskipun telah disimpan beberapa tahun dalam media tanpa kromium. Empat isolat yang kemampuan reduksinya terhadap kromium heksavalen tidak mengalami perubahan berarti, terutama isolat AB13 dan M5ACr10. Kedua isolat bakteri tersebut mampu mereduksi sekitar 150 uM Cr(VI) yang setara dengan kemampuan bakteri *Eschericia coli* (Liu

et al., 2015a). Kemampuan reduksi bakteri karena adanya enzim yang terlibat dalam sedikitnya tiga mekanisme, yaitu 1) reduksi oleh enzim dan komponen sitoplasma (Ackerley et al., 2004), 2) reduksi oleh enzim reduktase terlarut (Cheung and Gu, 2007), dan 3) reduksi oleh enzim reduktase terikat pada protein membran (membrane-bound protein) (Cheung and Gu, 2007).

Salah satu isolat bakteri dari tanah serpentin yang mampu mereduksi Cr (VI) yakni M2Cr12 mempunyai urutan nukleotida gen rRNA 16S yang sangat mirip dengan *A. resistens* galur NBRC 102413, yakni sampai 99% dan hanya berbeda tiga nukleotida saja dengan *Acinetobacter radioresistens* serta tidak mempunyai nilai kemiripan yang sama dengan spesies lain. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat tersebut diidentifikasi sebagai *Acinetobacter radioresistens*. Spesies ini resisten terhadap radiasi sinar gamma dan ditemukan pertama kali di kapas dan tanah. Galur dari spesies ini bersifat gram negatif, oksidase negatif, tidak membentuk spora, nonmotil, tidak berfermentasi, fleomorfik cocco-bacillus, dan tidak menghasilkan asam dari sakarida (Nishimura et al., 1988). Belum ada laporan yang menunjukkan adanya *A. resistens* diisolasi dari tanah serpentin, namun terdapat *A. resistens* dari limbah industri penyamakan kulit yang resisten terhadap Cr (VI) dan mampu mereduksinya (Algamdi et al., 2016).

Enam isolat bakteri yang diisolasi dari tanah serpentin memiliki kemiripan sekuen gen rRNA 16S yang sangat tinggi dengan bakteri grup *B. cereus*. Grup ini mempunyai delapan spesies sekerabat yang digolongkan ke dalam kelompok ini yakni, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, dan *B. toyonensis*, dan tiga spesies lainnya seperti *B. gaemokensis*, *B. manliponensis*, *B. bingmayongensis* diusulkan untuk masuk dalam grup ini

(Liu et al., 2015b). Bakteri kelompok ini sudah dikenal luas terdapat di berbagai macam lingkungan, seperti perairan, tanah, hewan, tumbuhan, dan udara. Kelompok ini mempunyai pengaruh penting terhadap kesehatan manusia, pertanian, dan industri makanan. Anggota kelompok ini juga diketahui mampu melakukan reduksi kromium heksavalen seperti *B. cereus* dan *B. thuringensis* yang diisolasi dari limbah air bekas penyamakan kulit (Soni et al., 2012). *B. cereus* pereduksi kromium heksavalen juga dijumpai pada air limbah pabrik baja (He et al., 2010), namun belum ada laporan mengenai anggota grup tersebut yang di isolasi dari tanah serpentin.

Isolat bakteri yang diperoleh dari tanah serpentin mempunyai resistensi terhadap Cr (VI) sampai 200 mg.L⁻¹ dan mampu mereduksi 13 mg.L⁻¹ minimal sampai 80% selama 24.jam. Kemampuan ini menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut berpotensi dikembangkan untuk kegiatan bioremediasi kromium heksavalen. Pengembangan jenis dan galur bakteri tersebut untuk bioremediasi memerlukan kepastian klasifikasi spesies dan galur isolat bakteri yang menjadi dasar dan pendukung dalam mendapatkan informasi sistem genetik dan metabolisme dari galur tersebut. Hasil sekuensing gen rRNA 16S yang dianalisis penjajaran dengan BLAST menunjukkan kemiripan yang tinggi antara sekuen galur bakteri dengan beberapa spesies bakteri dari grup *Bacillus cereus*. Identifikasi dengan menggunakan sekuen gen rRNA 16S adalah sangat berguna karena kemudahannya namun sepertinya daya filogenetiknya pada tingkat spesies adalah rendah, seperti pada grup *B. cereus* (Janda and Abbott, 2007). Hal ini karena sekuen pada grup tersebut sangat mirip dan hanya berbeda beberapa nukleotida saja sehingga tidak efektif untuk membedakan spesies yang berkerabat dekat dalam grup ini (Liu et al., 2015b). Misalnya, isolat MA33 dan ABI13 pada kladogram sangat dekat

dengan *B. anthracis* sehingga bisa menimbulkan kesalahan interpretasi dengan menganggap kedua isolat tersebut tergolong spesies tersebut. Salah satu karakter yang membedakan antara *B. anthracis* dengan anggota grup lainnya adalah resisten terhadap antibiotik β -laktamase (ampisilin) (Vilas-Boas et al., 2007). Isolat ABI33 menunjukkan resistensi terhadap antibiotik ampisilin yang mengindikasikan isolat tersebut tidak termasuk *B. anthracis*. Sekuen gen rRNA 16S yang sangat mirip (99.5 %) tidak memastikan kesamaan spesies, karena kemiripan sekuen tidak linear dengan fenotipe spesies bakteri (Maughan and Van der Auwera, 2011).

KESIMPULAN

Tujuh isolat bakteri yang diperoleh dari tanah serpentin mampu mereduksi kromium heksavalen dan mempunyai kemiripan yang sangat erat dengan grup *Bacillus cereus*, yang meliputi *B. anthracis*, *B. thuringensis*, *B. myconoides*, *B.*, dan *B. toyonensis*, dan satu isolat dapat diidentifikasi sebagai *Acinetobacter radioresistens*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset Teknologi atas dukungan dana melalui Penelitian Fundamental tahun 2015-2016 untuk tiga orang penulis terakhir dengan Nomor Kontrak 024/SP2H/LT/DRPM/II/2016. Terima kasih juga diucapkan kepada Rasyidah, A.Md. yang telah membantu dalam menyiapkan kultur bakteri dan Muddatstsir, S.Si, M.S dalam analisis Cr (VI).

DAFTAR PUSTAKA

Abou-Shanab, R.A., van Berkum, P., and Angle, J.S. (2007). Heavy metal

- resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere* 68, 360-367.
- Ackerley, D.F., Gonzalez, C.F., Park, C.H., Blake, R., 2nd, Keyhan, M., and Matin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 70, 873-882.
- Algamdi, A.Y., Alharbi, S.A., Wainwright, M., and Al-Solaimani, S.G. (2016). Isolation and Identification of Nine Dichromate Cr+6 resistance Bacteria by Modern Techniques. *Journal of Scientific and Engineering Research* 3, 383-391.
- Alvarez, A., Moreno-Sanchez, R., and Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 181, 7398-7400.
- Branco, R., Cristovao, A., and Morais, P.V. (2013). Highly sensitive, highly specific whole-cell bioreporters for the detection of chromate in environmental samples. *PLoS One* 8, e54005.
- Cheung, K.H., and Gu, J.D. (2007). Mechanism of Hexavalent Chromium Detoxification by Microorganisms and Bioremediation Application Potential: A Review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59 8-15.
- Guinebretière, M.-H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., *et al.* (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* 10, 851-865.
- He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S.J., Rensing, C., and Wang, G. (2010). Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol* 10, 221.
- Janda, J.M., and Abbott, R.J. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2761-2764.
- Jukes, T., and Cantor, C. (1969). Evolution of protein molecule. In *Mammalian Protein Metabolism*, H. Munro, ed. (New York, Academic Press), pp. 21-132.
- Kayama, M., Quoreshi, A.M., Uemura, S., and Koike, T. (2005). Differences in growth characteristics and dynamics of elements absorbed in seedlings of three spruce species raised on serpentine soil in northern Japan. *Ann Bot* 95, 661-672.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, E. Stackebrandt, and M. Goodfellow, eds. (New York, NY, John Wiley and Sons), pp. 115-175.
- Liu, X., Wu, G., Zhang, Y., 1, D.W., Li, X., and Liu, P. (2015a). Chromate Reductase YieF from *Escherichia coli* Enhances Hexavalent Chromium Resistance of Human HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 11892-11902.
- Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J.P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., and Shao, Z. (2015b). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports* | 5, 1-11.
- Madhavi, V., Reddy, A.V.B., Reddy, K.G., Madhavi, G., and Prasad, T.N.K.V. (2013). An Overview on

- Research Trends in Remediation of Chromium. *Research Journal of Recent Sciences* 2, 71-83.
- Maughan, H., and Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 789–797.
- Megharaj, M., Avudainayagam, S., and Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Curr Microbiol* 47, 51-54.
- Nishimura, Y., Ino, T., and Iizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 209-211.
- Pal, A., and Paul, A.K. (2004). Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil. *Microbiol Res* 159, 347-354.
- Ross, S. (1994). *Sources and Forms of Potentially Toxic Metals in Soil-Plant System* (Brisbane, John Wiley & Sons).
- Saidy, A.R., and Badruzaufari (2009a). Hubungan antara Konsentrasi Cr (VI) dan Sifat Kimia Tanah : Informasi Awal untuk Remediasi Lahan Bekas Tambang di Kalimantan Selatan. *Jurnal Tanah Tropika* 14 97-103.
- Saidy, A.R., and Badruzaufari (2009b). Pengapuran dan Penambahan Bahan Organik untuk Meningkatkan Reduksi Kromat (VI) : Upaya Bioremediasi Lahan Bekas Tambang di Kalimantan Selatan. *Agroscentiae* 16 45-51.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-427.
- Soni, S.K., Singh, R., Awasthi, A., Singh, M., and Kalra, A. (2012). In vitro Cr(VI) reduction by cell-free extracts of chromate-reducing bacteria isolated from tannery effluent irrigated soil. *Environ Sci Pollut Res* 20, 1661-1674.
- Sultan, S., and Hasnain, S. (2005). Plasmid mediated chromate resistance in bacteria isolated from industrial waste. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8, 1771-1777.
- Vilas-Boas, G.T., Peruca, A.P.S., and Arantes, O.M.N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53, 673–687