

DAYA RESISTENSI *Pseudomonas stutzeri* TERHADAP MERKURI DAN POTENSINYA MENGHASILKAN ENZIM MERKURI REDUKTASE

RESISTANCE LEVEL OF *Pseudomonas stutzeri* AGAINST MERCURY AND ITS ABILITY IN PRODUCTION OF MERCURY REDUCTASE ENZYME

Purkan^{1*}, Safita Nurmalyya¹, Sofijan Hadi¹

¹Laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*email: purkan@fst.unair.ac.id

Received 28 August 2016; Accepted 8 November 2016; Available online 29 November 2016

ABSTRAK

Merkuri reduktase merupakan enzim yang mampu mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 yang bersifat non toksik. Enzim ini banyak dihasilkan oleh bakteri yang bersifat resisten merkuri. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan daya resistensi isolat lokal *Pseudomonas stutzeri* terhadap merkuri dan aktivitas enzim merkuri reduktase yang dihasilkan. Uji resistensi terhadap ion merkuri menunjukkan bahwa isolat *Pseudomonas stutzeri* mampu bertahan hidup dalam media yang mengandung $HgCl_2$ hingga konsentrasi 80 μM . Bakteri *Pseudomonas stutzeri* dapat menghasilkan merkuri reduktase secara optimum pada jam ke 24 waktu fermentasi. Enzim yang dihasilkan menunjukkan aktivitas optimum pada pH 7 dan suhu 45 °C.

Kata Kunci : *Pseudomonas stutzeri*, merkuri reduktase, merkuri

ABSTRACT

Mercury reductase is an enzyme that is able to reduce Hg^{2+} to Hg^0 non toxic. This enzyme is usually produced by mercury resistant bacteria. The research wanted to determine the resistance of indigenous *Pseudomonas stutzeri* isolate toward mercury and to explore the mercury reductase activity which is produced by the bacteria. The results of resistance assay of the *Pseudomonas stutzeri* toward mercury ion showed that the isolate could survive in media containing $HgCl_2$ up to a concentration of 80 μM . The bacteria could produce mercury reductase optimally at the 24th of fermentation time. The enzyme showed optimum activity at pH 7 and temperature of 45 °C

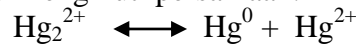
Keyword : *Pseudomonas stutzeri*, mercury reductase, mercury

PENDAHULUAN

Logam berat adalah logam yang memiliki densitas lebih dari 5 mg/L dan bersifat toksik (Dash & Das, 2012). Salah satu logam berat yang bersifat toksik dan menyebar luas sebagai polutan yang dihasilkan oleh pencemaran industri yang mengendap dalam ekosistem adalah merkuri. Merkuri memiliki tingkat toksisitas yang tinggi bagi semua organisme. Hal ini disebabkan oleh

kekuatan afinitasnya untuk berinteraksi dengan gugus tiol dari residu tirosin pada molekul protein (Takeuchi & Sugio., 2005). Interaksi ini dapat memicu timbulnya penyakit pada organ seperti kerusakan otak, kerusakan syaraf motorik, *cerebral palsy*, dan retardasi mental (Zeroual *et al*, 2003). Di alam, merkuri terbagi menjadi tiga bentuk yaitu Hg^0 (logam merkuri), Hg^{2+} (ion merkuri), dan alkil merkuri (Metil dan dimetil merkuri),

yang berada dalam keseimbangan struktur kimia mengikuti persamaan:



(Robinson dan Tuovinen, 1984)

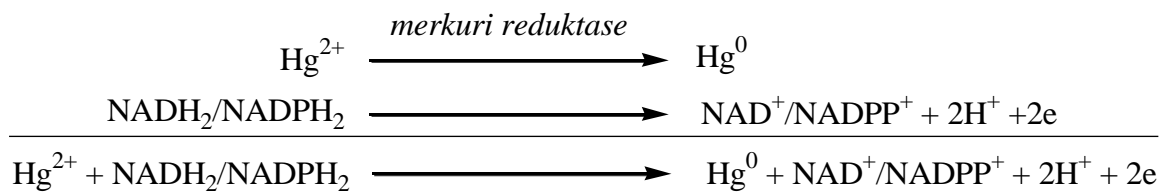
Peran bakteri resisten merkuri sangat diperlukan untuk detoksifikasi ion merkuri di lingkungan. Bakteri ini sangat diperlukan untuk bioremediasi lingkungan yang tercemar merkuri. Bakteri resisten merkuri merupakan bakteri yang dapat hidup di habitat yang tercemar merkuri dan mampu mereduksi Hg^{2+} menjadi bentuk *inert* dan *volatile* yaitu dalam bentuk Hg^0 , yang selanjutnya didifusikan keluar oleh sel bakteri melalui membran (Kannan & Khrisnamoorthy, 2006). Sejumlah penelitian melaporkan bahwa bakteri resisten merkuri memiliki sistem gen “*mer operon*”, yang ekspresi proteinnya diperlukan untuk mendetoksifikasi ion merkuri. Berdasarkan daya kerentangannya terhadap merkuri, terdapat dua tipe *mer operon*, yaitu *mer* spektrum sempit yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan *mer* spektrum luas yang resisten terhadap merkuri organik dan merkuri anorganik (Brown *et al.*, 2002). Sistem *mer operon* bakteri memiliki banyak gen *mer* yang kesemuanya terlibat dalam fungsi untuk detoksifikasi ion merkuri.

Sistem *mer operon* terdiri dari dari gen struktural yaitu gen merkuri reduktase (*mer A*) dan gen transport protein yaitu *mer T* dan *mer P* yang saling bersebelahan dengan gen metaloregulator (*mer R*) dan *mer D* yang melibatkan regulasi ekspresi gen struktural dalam respon ion garam merkuri (Brown *et al.*, 2002). *Mer A* memiliki fungsi untuk mereduksi ion merkuri yang bersifat toksik menjadi

logam merkuri Hg^0 yang memiliki sifat kurang toksik dan mudah menguap pada suhu kamar. Sedangkan *mer B* memiliki fungsi untuk mengkatalisis pemutusan ikatan merkurikarbon, menghasilkan senyawa organik dan ion Hg^{2+} (Barkay, Miller, dan Summers, 2003).

Bakteri resisten merkuri tersebar di alam secara meluas terdiri dari bakteri gram positif dan gram negatif (Takeuchi dan Sugio., 2005). Beberapa bakteri gram negatif yang diketahui resisten terhadap logam merkuri diantaranya adalah *Flavobacterium sp*, *Thiobacillus sp*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp*, *Xanthomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Erwinia sp*, *Rhodococcus sp*, *Oerskovia sp*, *Staphylococcus sp*, *Micrococcus roseus*, dan *Citreobacterium*. Sedangkan bakteri gram positif yang resisten terhadap logam merkuri yaitu *Bacillus sp*, dan *Staphylococcus aureus* (Olson, Porter, Rubinstein, dan Silver, 1982). Bakteri resisten merkuri dapat mereduksi ion merkuri dengan melibatkan enzim merkuri reduktase dan NADPH melalui persamaan reaksi redoks (**Gambar 1**).

Bakteri *Pseudomonas stutzeri* telah berhasil diisolasi dari sampah organik di wilayah Surabaya. Pengembangan potensi *Pseudomonas stutzeri* yang telah ditemukan ini untuk proses bioteknologi, terutama untuk agen bioremediasi, memerlukan kajian tentang uji daya resistensi bakteri terhadap merkuri dan juga karakteristik enzim merkuri reduktase yang dihasilkan. Paper ini melaporkan daya resistensi *P. stutzeri* isolat lokal dan aktivitas merkuri reduktase yang dihasilkan.



Gambar 1. Reaksi redoks reduksi ion merkuri dengan melibatkan enzim merkuri reduktase dan NADPH

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah *autoclave electric* model No. 25X, *mikro pipet*, pH meter Mettler Toledo, termometer, peralatan gelas yang umum digunakan dalam laboratorium, spektrofotometer UV-VIS Shimadzu UV-1800, *sonikator* tipe cup-horn, *orbital shaker* TS-330A, *incubator* Memment-Sanstant, *Water Bath* tipe SYK-382-M dan Gerhardt, *Laminar Air Flow* Kottermann 8580, sentrifus, *colony counter*. Bahan kimia yang digunakan terdiri atas *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB), NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, MgSO₄, Na-EDTA, NADPH, dan β -Merkaptoetanol.

Pembuatan Media

Media padat *Nutrient Agar* (NA) dibuat dari komponen 0,3% (b/v) *beef extract*, 0,5% (b/v) peptone, dan 1,5% (b/v) *bacto* agar. Sedangkan media cair *Nutrient Broth* (NB) memiliki komponen yang sama dengan media NA, tetapi tidak mengandung *bacto* agar.

Pembiakan Bakteri

Isolat bakteri *P. stutzeri* ditumbuhkan pada media *Nutrient Agar* (NA) miring, dan diinkubasi selama 24 jam. Satu ose dari isolat bakteri yang dihasilkan ditumbuhkan pada 10 mL media *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam dengan pengocokan 150 rpm sehingga mencapai *Optical Density* (OD) 0,1 pada λ 600 nm (Barkay *et al.*, 2003). Isolat bakteri yang dihasilkan disebut dengan isolat induk.

Uji Resistensi *Pseudomonas stutzeri* terhadap Merkuri

Isolat induk bakteri *P. stutzeri* dimasukkan ke dalam sebanyak 2% (v/v). Sebanyak 20 mL media NB yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi 0; 20; 40; 60; 80; 100; dan 150 μ M ditambah isolat induk bakteri *P. stutzeri* sebanyak 2 % (v/v), lalu setiap kultur diinkubasi

pada suhu 37 °C. Kekeruhan kultur diukur pada λ 600 nm untuk interval waktu inkubasi 0, 8, 16, 24, 48, dan 72 jam.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan *P. stutzeri* ditumbuhkan pada media NB yang mengandung HgCl₂ tertinggi, dimana bakteri *P. stutzeri* masih mampu bertahan hidup. Pada interval waktu fermentasi 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, dan 48 jam pada suhu 37 °C dilakukan pengukuran pertumbuhan dengan metode turbidimetri pada λ 600 nm (Barkay *et al.*, 2003), dan metode *pour plate* dengan pengenceran kultur hingga 10¹¹ kali.

Isolasi Enzim Merkuri Reduktase

Satu koloni isolat bakteri ditumbuhkan dalam 20 mL media NB yang mengandung 80 μ M HgCl₂ dan difermentasi pada suhu 37 °C dengan pengocokan 150 rpm selama waktu fermentasi tertentu, dimana pertumbuhan bakteri mencapai fase logaritmik. Kultur yang diperoleh selanjutnya disebut sebagai inokulum. Sebanyak 10% (v/v) inokulum ditambahkan pada media NB yang mengandung HgCl₂, lalu difermentasi selama 0, 8, 16, 24, 32, 40, dan 48 jam. Suspensi sel yang diperoleh dari masing – masing kultur disentrifugasi dengan kecepatan 9.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan dibuang, dan pelet selnya disuspensikan kembali dengan 30 mL buffer Na-fosfat pH 7. Suspensi sel yang diperoleh dilisis dengan sonikasi 600 watt dan amplitudo 50% selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dari proses lisis merupakan ekstrak kasar enzim merkuri reduktase (Zeroual *et al.*, 2003).

Uji Aktivitas Enzim Merkuri Reduktase

Dibuat 3 mL larutan MRA (*Mercury Reduction Assay*) yang terdiri dari campuran 50 mM buffer Na₃PO₄ (pH 7), 0,5 mM EDTA, 0,2 mM MgSO₄, 0,1% (v/v) β -merkuptoetanol, dan 0,1 mM NADPH. Ke dalam campuran,

lalu ditambahkan 1 mL 80 µM HgCl₂ dan 0,1 mL ekstrak kasar enzim merkuri reduktase. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C, dan pada setiap interval 1 menit dilakukan pengukuran kadar NADPH sisa pada λ 340 nm hingga serapan menunjukkan fase stasioner. Kontrol dalam uji aktivitas dilakukan dengan memanaskan terlebih dahulu ekstrak enzim yang ditambahkan pada suhu 100 °C selama 15 menit, sehingga enzim menjadi tidak aktif. Satu unit aktivitas didefinisikan sebagai banyaknya enzim untuk menghasilkan µM NADPH teroksidasi per menit pada kondisi percobaan (Zeroual *et al.*, 2003). Pada kondisi yang sama dilakukan pengukuran kadar NADPH untuk pembuatan kurva standar.

Penentuan Suhu dan pH optimum Merkuri Reduktase

Suhu optimum enzim ditentukan dengan cara pengujian aktivitas merkuri reduktase pada variasi suhu 25, 37, 45, 55 dan 65 °C selama 15 menit. Sementara untuk penentuan pH optimum enzim, dilakukan uji aktivitas merkuri reduktase pada interval pH 4 – 8. Larutan uji pH 6-8 diatur dengan bufer fosfat, sedang pH 4-5 diatur dengan buffer asetat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daya Resistensi *Pseudomonas stutzeri*

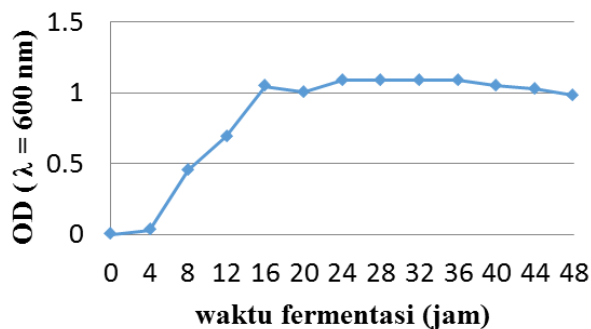
Uji resistensi *P. stutzeri* dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri terhadap kandungan merkuri di dalam

media. Kemampuan ini sangat berhubungan dengan kemampuan sistem enzim bakteri untuk mendetoksifikasi ion merkuri yang bersifat toksik. Semakin tinggi daya resistensi bakteri terhadap merkuri, maka makin tinggi pula kerja sistem enzim yang dimiliki bakteri dalam mendetoksifikasi merkuri tersebut, dan sebaliknya.

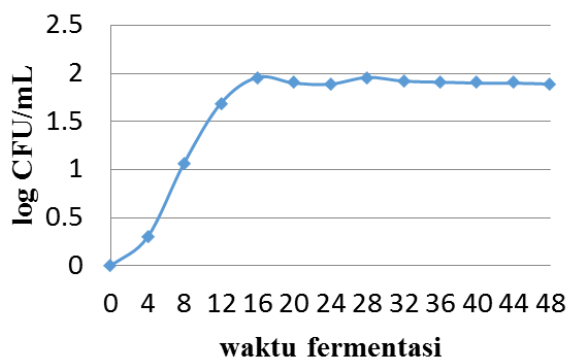
Bakteri *Pseudomonas stutzeri* dapat tumbuh bagus pada media yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi 0 µM hingga 80 µM. Pada media yang mengandung HgCl₂ dengan konsentrasi 100 µM dan 150 µM, bakteri tidak mampu tumbuh dengan baik. Pertumbuhannya mulai terganggu dengan adanya 100 µM dan 150 µM HgCl₂ pada media (**Tabel 1** dan **Gambar 2**), yang ditunjukkan dengan nilai OD yang sangat rendah. Hal ini dapat dijelaskan bahwa dalam jumlah yang tinggi, merkuri menghambat proses pertumbuhan pada bakteri *Pseudomonas stutzeri*, bahkan pada jam ke 72 waktu fermentasi, respon pertumbuhan *P. stutzeri* menurun dengan sangat drastis. Penurunan ini juga dipicu oleh adanya bakteri yang mulai mati karena adanya nutrisi di media yang mulai berkurang, selain itu juga karena efek HgCl₂ kadar tinggi yang mampu menghambat laju pertumbuhan bakteri. Daya resistensi *P. stutzeri* yang tinggi ini, ke depan patut dikembangkan potensinya untuk agen bioremediasi di lingkungan yang tercemar merkuri.

Tabel 1. Respon pertumbuhan *P. stutzeri* terhadap merkuri pada λ 600 nm

Jam	OD dengan konsentrasi HgCl ₂ (µM)						
	0	20	40	60	80	100	150
0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
8	1,296	1,206	1,107	1,052	0,963	0,194	0,153
16	1,685	1,481	1,439	1,391	1,369	0,268	0,199
24	1,857	1,661	1,680	1,629	1,576	0,391	0,222
48	1,864	1,619	1,484	1,377	1,088	0,491	0,350
72	1,361	1,101	0,885	0,758	0,643	0,261	0,174



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan bakteri *P. stutzeri* berdasarkan metode turbidimetri



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan bakteri *P. stutzeri* berdasarkan metode *pour plate*

Kurva Pertumbuhan bakteri *P. stutzeri*

Kurva pertumbuhan bakteri *Pseudomonas stutzeri* ditentukan dengan dua metode, yaitu turbidimetri dan *colony counter* menggunakan cara *pour plate*.

Metode *colony counter* dilakukan untuk mengetahui *P. stutzeri* yang hidup saja dalam kultur, hal ini dikerjakan dengan menumbuhkan kultur bakteri dengan pengenceran 10¹¹ kali ke media cawan petri, lalu ditambahkan agar steril yang mengandung HgCl₂ 80 μM. Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas stutzeri* pada media yang mengandung HgCl 80 μM yang ditentukan dengan metode turbidimetri menunjukkan kurva sigmoid (**Gambar 2**). Demikian juga pertumbuhan isolat bakteri dengan metode *colony counter* (**Gambar 3**).

Kurva pertumbuhan *P. stutzeri* (**Gambar 2** dan **3**) menunjukkan pertumbuhan bakteri diawali pada fase lag atau adaptasi dari jam ke 0 hingga 4 waktu fermentasi. Pada fase ini bakteri mulai menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Pada jam 8 waktu fermentasi,

pertumbuhan *P. stutzeri* mulai meningkat. Fase ini disebut dengan fase logaritmik atau fase eksponensial karena terjadi peningkatan jumlah sel. Pada saat ini bakteri mulai memanfaatkan nutrisi yang terdapat dalam media untuk proses pembelahan sel secara optimum (Pelczar and Chan, 2010). Mulai jam ke 20 waktu fermentasi, laju pertumbuhan *P. stutzeri* konstan. Pada saat ini bakteri *P. stutzeri* memasuki fase stasioner, fase dimana jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Palczar and Chan., 2010). Hal ini dapat terjadi akibat berkurangnya nutrisi di media dan juga mulai adanya produk limbah yang terbentuk di media.

Oleh karena bakteri *P. stutzeri* tumbuh secara optimal pada jam ke 0 – 16 waktu fermentasi, maka kultur bakteri yang berada pada fase log tersebut, untuk selanjutnya digunakan sebagai kultur inokulum. Waktu fermentasi 15 jam dipilih untuk pembuatan inokulum karena pada jam tersebut bakteri mempunyai kualitas dan kuantitas yang baik sebagai

inokulum untuk produksi enzim merkuri reduktase.

Aktivitas Enzim Merkuri Reduktase

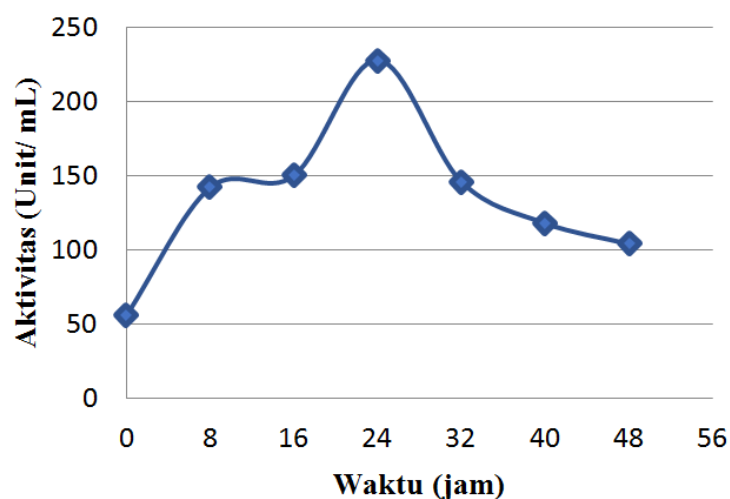
Untuk melihat kemampuan *P. stutzeri* dalam menghasilkan merkuri reduktase, maka dilakukan isolasi dan uji aktivitas enzim. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *P. stutzeri* dapat menghasilkan merkuri reduktase secara optimum pada saat fermentasi memasuki jam ke 24 jam (**Tabel 2**). Aktivitas merkuri reduktase yang dihasilkan adalah sebesar 324 Unit/mL. Enzim ini mampu mereduksi ion merkuri sebesar 32,4 µM. Enzim merkuri reduktase yang difermentasi selama 0 jam memiliki aktivitas yang sangat rendah yaitu 56 Unit/mL dengan jumlah Hg yang tereduksi sebesar 5,6 µM. Penyebab dari

rendahnya aktivitas enzim merkuri reduktase ini disebabkan karena waktu fermentasi 0 jam merupakan awal proses fermentasi. Sehingga bakteri belum mampu menghasilkan enzim merkuri reduktase dengan jumlah banyak.

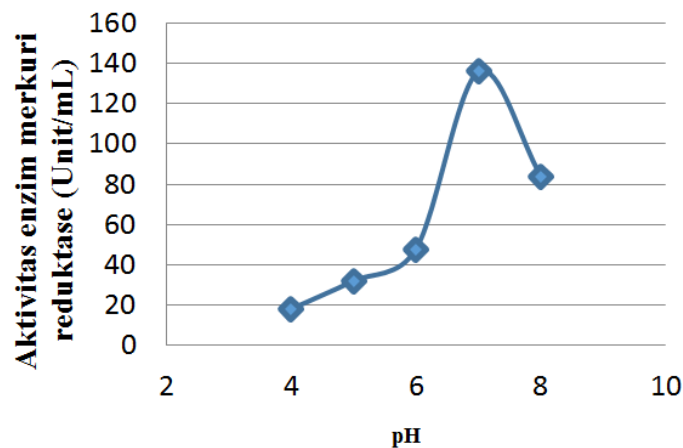
Aktivitas enzim merkuri reduktase pada waktu fermentasi 32 jam menurun. Penurunan aktivitas berjalan terus menerus hingga waktu fermentasi 48 jam yaitu mencapai 104 Unit/mL dengan jumlah Hg yang tereduksi sebesar 10,4 µM. Penurunan aktivitas enzim merkuri reduktase yang dihasilkan pada waktu fermentasi 32 hingga 48 jam disebabkan karena sel bakteri mulai mengalami fase kematian. Sehingga sel yang dihasilkan cenderung menurun (**Tabel 2, Gambar 4**).

Tabel 2. Aktivitas enzim merkuri reduktase pada berbagai waktu fermentasi

Waktu Fermentasi (Jam)	HgCl ₂ (µM)	NADPH Teroksidasi (µM)	Aktivitas enzim (Unit/mL)	Hg tereduksi (µM)
0	80	5,6	56	5,6
8	80	15	150	15
16	80	22,8	228	22,8
24	80	32,4	324	32,4
32	80	14,6	146	14,6
40	80	11,8	118	11,8
48	80	10,4	104	10,4



Gambar 4. Profil aktivitas enzim merkuri reduktase pada berbagai waktu fermentasi *Pseudomonas stutzeri*.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim merkuri reduktase

Karakteristik Enzim Merkuri Reduktase

Kondisi pH optimum

Enzim memiliki derajat keasaman (pH) yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas enzim berjalan secara maksimal. Namun, pH optimum enzim tidak selalu sama dengan pH lingkungan normalnya (Lehninger, 2010). Hasil uji aktivitas merkuri reduktase pada berbagai pH, menunjukkan aktivitas merkuri reduktase optimum pada pH 7.

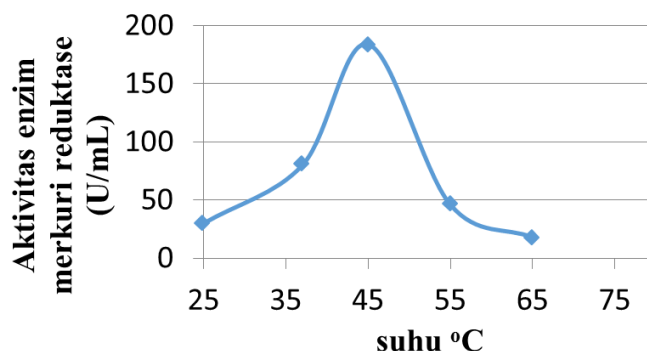
Perubahan pH di luar kondisi optimum dapat memicu perubahan ionisasi pada residu asam amino penyusun protein enzim, dan pada tahap selanjutnya dapat mengubah struktur enzim sehingga memperantarai penurunan aktivitas katalitiknya. Di luar pH 7 aktivitas katalitik merkuri reduktase *P. stutzeri* menurun (**Gambar 5**).

Kondisi Suhu Optimum

Suhu berkaitan dengan energi yang diperlukan enzim untuk bereaksi dengan substrat. Jika suhu rendah, energi yang digunakan untuk bereaksi antara enzim dan substrat tidak mencukupi sehingga reaksi yang terjadi tidak mampu berjalan dengan baik. Pada suhu optimum, energi yang diterima enzim sama dengan energi yang diperlukan untuk memulai reaksi

antara enzim dan substrat. Sehingga reaksi dapat berlangsung dengan baik. Sedangkan diatas suhu optimum, enzim dapat mengalami denaturasi struktur yang menyebabkan reaksi enzimatik tidak mampu berjalan dengan baik (Meryandini *et al.*, 2009). Hasil uji pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim, menunjukkan merkuri reduktase memiliki aktivitas optimum pada suhu 45 °C (**Gambar 6**).

Enzim merkuri reduktase *P. stutzeri* mengalami aktivitas rendah pada suhu 25 °C dan 37 °C, yaitu sebesar 30 Unit/mL dan 80 Unit/m (**Gambar 6**). Aktivitas enzim mencapai optimum pada 45 °C, dan kemudian menurun lagi untuk suhu di atasnya. Tingginya aktivitas enzim pada suhu 45 °C ditengarai bahwa pada kondisi ini, interaksi antara enzim dan substrat dapat dukungan energi kinetik untuk yang tinggi. Sementara pada suhu 55 °C dan 65 °C, enzim mengalami penurunan aktivitas yang sangat drastis yaitu 46 Unit/mL dan 18 Unit/mL. Penurunan aktivitas enzim merkuri reduktase ini dapat disebabkan oleh faktor suhu yang tinggi dapat memicu perubahan struktur enzim sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim. Adanya perubahan struktur dapat menyebabkan enzim terdenaturasi (Giovanela, Cabral, Bento, Gianello, dan Camargo, 2016).



Gambar 6. Kurva pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas enzim merkuri reduktase

KESIMPULAN

Isolat lokal *Pseudomonas stutzeri* memiliki daya resistensi terhadap HgCl_2 hingga konsentrasi 80 μM . Bakteri *P. stutzeri* dapat menghasilkan merkuri reduktase secara optimum pada jam ke 24 jam waktu fermentasi. Aktivitas enzim merkuri reduktase *P. stutzeri* terjadi optimum pada pH 7 dengan suhu 40 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Barkay, T., Miller, S. M., & Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 355-384.
- Brown, N. L., Shih, Y. C., Leang, C., Glendinning, K. J., Hobman, J. L., & Wilson, J. R. (2002). Mercury transport and resistance. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 715-718.
- Dash, H. R., & Das, S. (2012). Mercury resistant marine bacterial population from Bhitarkanika mangrove ecosystem, Odisha. In *Proceedings of National Conference on Mangrove Wetlands and Near Shore Marine Ecosystems from Sustainability Issues to Management and Restoration*. School of Environmental Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi (pp. 48-49).
- Giovanella, P., Cabral, L., Bento, F. M., Gianello, C., & Camargo, F. A. O. (2016). Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas sp.* B50A. *New biotechnology*, 33(1), 216-223.
- Kannan, S. K., & Krishnamoorthy, R. (2006). Isolation of mercury resistant bacteria and influence of abiotic factors on bioavailability of mercury—a case study in Pulicat Lake North of Chennai, South East India. *Science of the Total Environment*, 367(1), 341-353.
- Lehninger, A.L. (2010), *Dasar Dasar Biokimia*, Jilid 1, Penerjemah Maggy Thenawidjaya, Penerbit Erlangga, Jakarta, 159-160, 235-250.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., & Satria, H. (2009). Isolasi bakteri selulolitik dan karakterisasi enzimnya. *Makara Sains*, 13(1), 33-38.
- Olson, G. J., Porter, F. D., Rubinstein, J., & Silver, S. (1982). Mercuric reductase enzyme from a mercury-volatilizing strain of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of bacteriology*, 151(3), 1230-1236.
- Pelczar, M.J., and Chan, E.C.S. (2010), *Dasar – Dasar Mikrobiologi*, Jilid 1, Penerjemah: Hadioetomo, R.S., Penerbit UI Press, Jakarta, 132-142, 326-327
- Robinson, J. B., & Tuovinen, O. H. (1984). Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury

- compounds: physiological, biochemical, and genetic analyses. *Microbiological reviews*, 48(2), 95-124.
- Takeuchi, F., & Sugio, T. (2005). Volatilization and recovery of mercury from mercury-polluted soils and wastewaters using mercury-resistant *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains SUG 2-2 and MON-1. *Environmental sciences: an international journal of environmental physiology and toxicology*, 13(6), 305-316.
- Zeroual, Y., Moutaouakkil, A., Dzairi, F. Z., Talbi, M., Chung, P. U., Lee, K., & Blaghen, M. (2003). Purification and characterization of cytosolic mercuric reductase from *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of microbiology*, 53(2), 149-160.