

Viabilitas *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 pada Medium yang Terpapar Logam Cadmium (Cd)

D.A. Prasidya, dan E. Zulaika

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: enny@bio.its.ac.id

Abstrak— Kadmium adalah salah satu logam berat yang beracun walaupun dalam konsentrasi yang rendah. Beberapa bakteri genus *Azotobacter* resisten terhadap logam kadmium. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan genus *Azotobacter* yang resisten terhadap CdCl₂. Uji resistensi menggunakan medium *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung CdCl₂ 10-50 mg/L. Uji viabilitas *Azotobacter* dilakukan pada 3 isolat yang dipilih dari uji resistensi. Isolat tersebut dikategorikan lebih resisten dari isolat yang lain. Uji viabilitas dilakukan pada medium *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung CdCl₂ 10, 20, dan 30 mg/L. Kepadatan sel diukur dengan *Spektrofotometer UV-Vis* pada panjang gelombang 600 nm selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan isolat *Azotobacter* A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, A10 resisten pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung CdCl₂ sampai dengan konsentrasi 50 mg/L. Kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* yang tercekam CdCl₂ relatif lebih rendah dibandingkan isolat *Azotobacter* yang tidak tercekam CdCl₂.

Kata Kunci— *Azotobacter*, kadmium, konsentrasi, resistensi.

I. PENDAHULUAN

KADMIUM (Cd) merupakan logam berat yang dapat ditemukan pada lingkungan dan memiliki efek toksik yang tinggi, walaupun pada konsentrasi yang rendah [1]. Kontaminan Cd pada lahan pertanian berasal dari pupuk fosfat berbasah dasar batuan fosfat yang mengandung Cd [2]. Sedangkan kontribusi logam berat Cd di perairan berasal dari limbah industri, di antaranya industri bahan bangunan, pertambangan, dan industri logam [3]. Menurut [4], Cd memiliki efek toksik yang tinggi dan memiliki waktu paruh yang panjang di dalam tubuh organisme. Cd juga dapat bersifat karsinogenik pada manusia, menyebabkan kanker paru-paru, prostat, pankreas, dan ginjal [5]. Selain itu, Cd dapat mengganggu proses metabolisme, menghambat pembentukan asam nukleat, dan sintesis protein. Beberapa penelitian tentang efek paparan logam berat Cd pada hewan telah banyak dilaporkan dapat memicu kematian sel [6], menghambat pengambilan nutrisi, serta menghambat aktivitas enzim, termasuk sistem antioksidan organisme hidup [7].

Beberapa bakteri resisten terhadap logam Cd dan bahkan dapat dijadikan sebagai agen pereduksi konsentrasi Cd pada lingkungan yang tercemar logam berat. Bakteri resisten kadmium biasanya memiliki gen resisten kadmium yang disebut gen *cad-operon* [8]. Bakteri Gram positif resisten Cd²⁺

mempunyai jalur masuk logam Cd²⁺ melalui *Mn Transport*, pada bakteri Gram negatif menggunakan *Metal Ion Transport* (MIT) atau *Mn uptake System* [9].

Bakteri yang telah diteliti dan mampu mengurangi konsentrasi Cd adalah *Bacillus anthracis* PS2010 [10]. Salah satu mikroorganisme yang banyak diteliti dan resisten terhadap logam berat adalah *Azotobacter*. Berdasarkan penelitian [11], genus *Azotobacter* yang diisolasi dari hilir sungai Kali Mas resisten terhadap logam berat Cu. Menurut penelitian [14], isolat *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS resisten terhadap HgCl₂ sampai dengan konsentrasi 5 mg/L.

Penelitian mengenai isolat diatas baik *Azotobacter* yang diisolasi dari hilir Kali Mas maupun dari lahan *Eco Urban Farming* ITS telah diketahui resistensinya dan mampu me-removal HgCl₂, namun isolat tersebut belum diketahui resistensinya terhadap CdCl₂.

II. METODOLOGI

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2014 hingga bulan Februari 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS.

B. Uji Resistensi *Azotobacter* Terhadap CdCl₂

Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung CdCl₂ dan sampai dengan konsentrasi yang dapat ditoleransi isolat. Satu ose isolat diinokulasikan secara aseptis dengan metode *streak slant* pada medium miring NA-CdCl₂ dengan konsentrasi 10 mg/L CdCl₂ selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Isolat yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap CdCl₂.

C. Uji Viabilitas Isolat *Azotobacter* yang Tercekam CdCl₂

Satu ose isolat secara aseptis diinokulasikan pada 20 ml medium *Nutrient Broth* (NB), dihomogenkan dan diinkubasi dengan *rotary shaker* berkecepatan 100 rpm dalam suhu ruang selama 24 jam.

Kultur isolat yang telah diinkubasi selama 24 jam ditambahkan ke dalam 180 ml medium NB steril tanpa CdCl₂, diinkubasi kembali dengan *rotary shaker* 100 rpm pada suhu ruang. Pada jam ke-0 dilakukan pengukuran kepadatan sel

(Optical Density) menggunakan *Spectrophotometer Spectronic GENEYS 20@* ($\lambda = 600 \text{ nm}$). Pengukuran OD dilakukan selama 24 jam dengan interval waktu 1 jam. Pengukuran OD juga dilakukan pada CdCl_2 dengan konsentrasi sesuai *range finding test* ($x_1, x_2, \text{ dan } x_3 \text{ mg/L}$).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

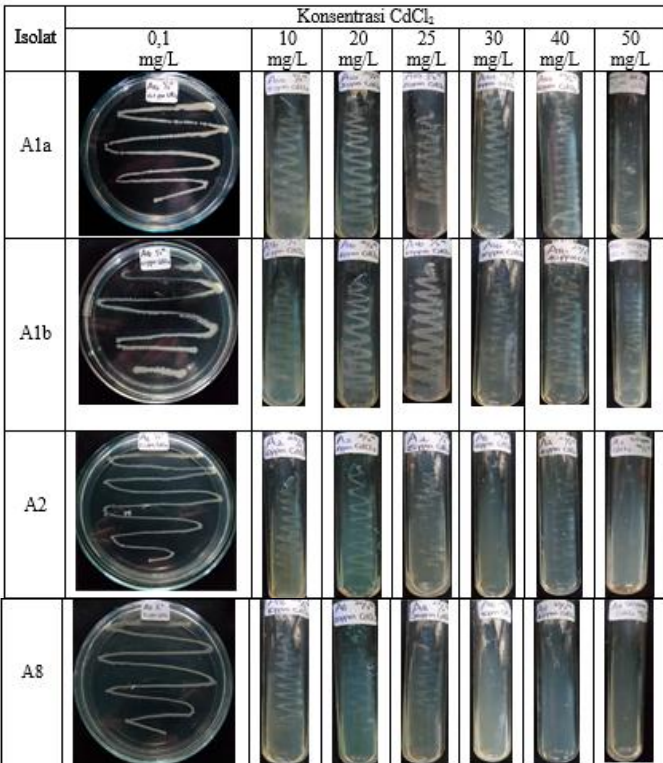
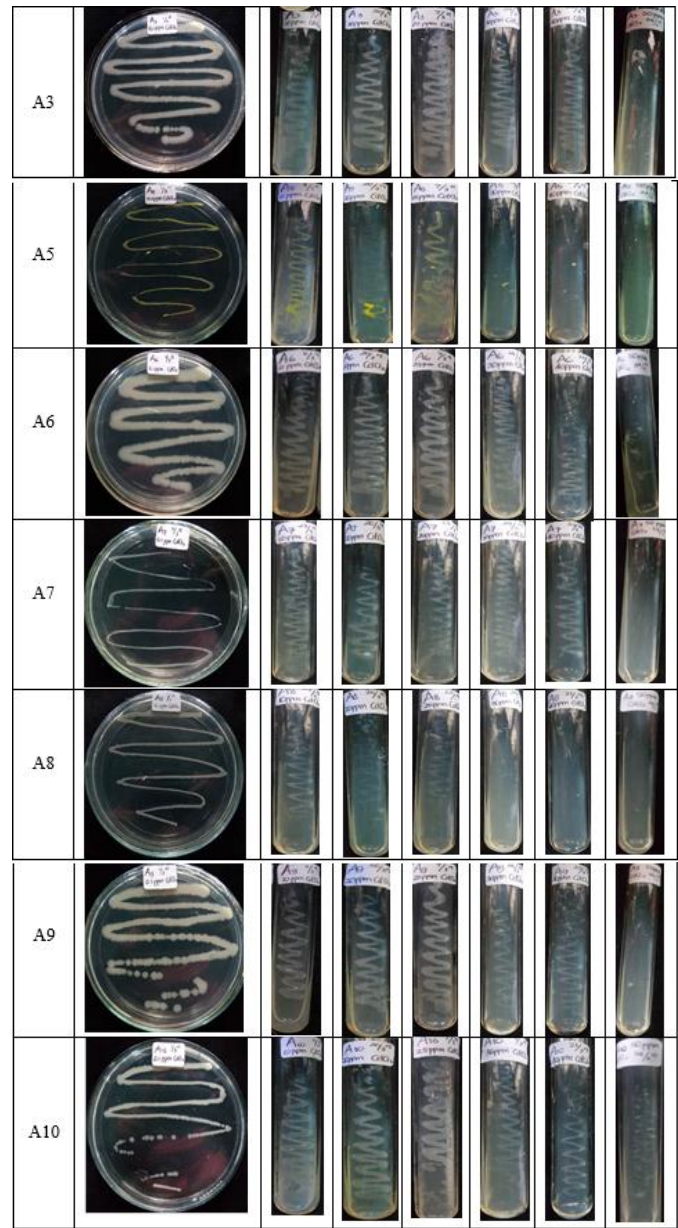
A. Uji Resistensi *Azotobacter* Terhadap CdCl_2

Semua isolat *Azotobacter* resisten pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung CdCl_2 . Pada konsentrasi 40 mg/L CdCl_2 , tiga isolat (*Azotobacter* A1a, A1b, dan A10) tumbuh sangat baik. Empat isolat (*Azotobacter* A3, A6, A7, dan A9) tumbuh baik. Dua isolat (*Azotobacter* A2 dan A5) tumbuh kurang baik, serta satu isolat (*Azotobacter* A8) tidak tumbuh (Tabel 1 dan Gambar 1).

Tabel 1. Resistensi *Azotobacter* Terhadap CdCl_2

Pertumbuhan isolat <i>Azotobacter</i> pada medium NA- CdCl_2 (mg/L)	Isolat <i>Azotobacter</i>									
	A1a	A1b	A2	A3	A5	A6	A7	A8	A9	A10
10	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
20	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+++
25	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
30	+++	+++	+	+++	+	+++	++	-	++	+++
40	+++	+++	+	+++	+	++	++	-	++	+++
50	+	++	-	+	+	-	-	-	-	-

Keterangan: +++ (sangat baik); ++ (baik); + (kurang baik).



Gambar. 1. Hasil Resistensi Isolat *Azotobacter* terhadap CdCl_2

Beberapa spesies dari genus *Azotobacter* dapat resisten terhadap beberapa logam berat seperti Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , dan Pb^{2+} [12]. *Azotobacter* yang diisolasi dari tanah tercemar logam berat dapat hidup dan mengurangi konsentrasi logam berat Cd di lingkungan sebesar 20 mg/L [13]. Berdasarkan penelitian [11], isolat *Azotobacter* S8 yang diisolasi dari hilir sungai Kali Mas sangat resisten terhadap kadmium CdCl_2 sampai pada konsentrasi 50 mg/L. Sedangkan pada penelitian [14], isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari *Eco Urban Farming* ITS resisten terhadap logam merkuri HgCl_2 dengan konsentrasi sebesar 5 mg/L. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa genus *Azotobacter* yang diisolasi dari *Eco Urban Farming* ITS merupakan salah satu genus bakteri yang resisten terhadap logam berat.

Bakteri dikatakan resisten terhadap logam kadmium apabila bakteri tersebut dapat bertahan pada lingkungan yang tercemar kadmium dengan konsentrasi diatas 1 mg/L karena pada

konsentrasi tersebut, kadmium dapat menyebabkan tingkat pertumbuhan berkurang, fase lag yang panjang, densitas sel yang lebih rendah, dan bahkan dapat menyebabkan kematian bakteri [15].

Resistensi bakteri terhadap Cd dapat disandi oleh suatu gen yaitu gen *cad-operon* [8]. Bakteri mampu menurunkan akumulasi logam berat di sel melalui sistem pompa efluks yang didorong oleh protein resistensi, P-type ATPases, fasilitator difusi kation dan protein Porter [16]. Bakteri resisten Cd pada bakteri Gram negatif menggunakan *Metal Ion Transport (MIT)* atau *Mn uptake system* [9]. Pada bakteri Gram negatif, efluks ion Cd^{2+} memerlukan protein *CzcA*, *CzcB*, dan *CzcC* dan diregulasi oleh *CzcD* [17].

Menurut [18], bakteri, alga, dan jamur dapat menghasilkan polisakarida ekstraseluler atau *exopolysaccharides* (EPS) sebagai agen aktif pada permukaan dinding sel untuk mengkelat logam berat. EPS merupakan polimer dari gula pereduksi dengan berat molekul tinggi yang disekresikan oleh mikroorganisme ke lingkungan eksternalnya. EPS umumnya terdiri dari monosakarida dan beberapa substituen non-karbohidrat seperti asetat, piruvat, suksinat, dan fosfat [19] juga biomolekul seperti protein, asam nukleat, dan lipid. Adsorpsi logam berat dengan EPS adalah proses interaksi antara kation logam dan muatan negatif dari gugus fungsional asam EPS [18]. *Azotobacter* merupakan genus bakteri yang memproduksi lapisan *exopolysaccharides* yang mampu melindungi sel dari kontaminan logam berat di lingkungan [12].

Isolat *Azotobacter* menunjukkan tingkat resistensi yang berbeda-beda. Perbedaan tingkat resistensi terhadap kadmium $CdCl_2$ dapat disebabkan oleh produksi EPS pada setiap spesies yang berbeda [20].

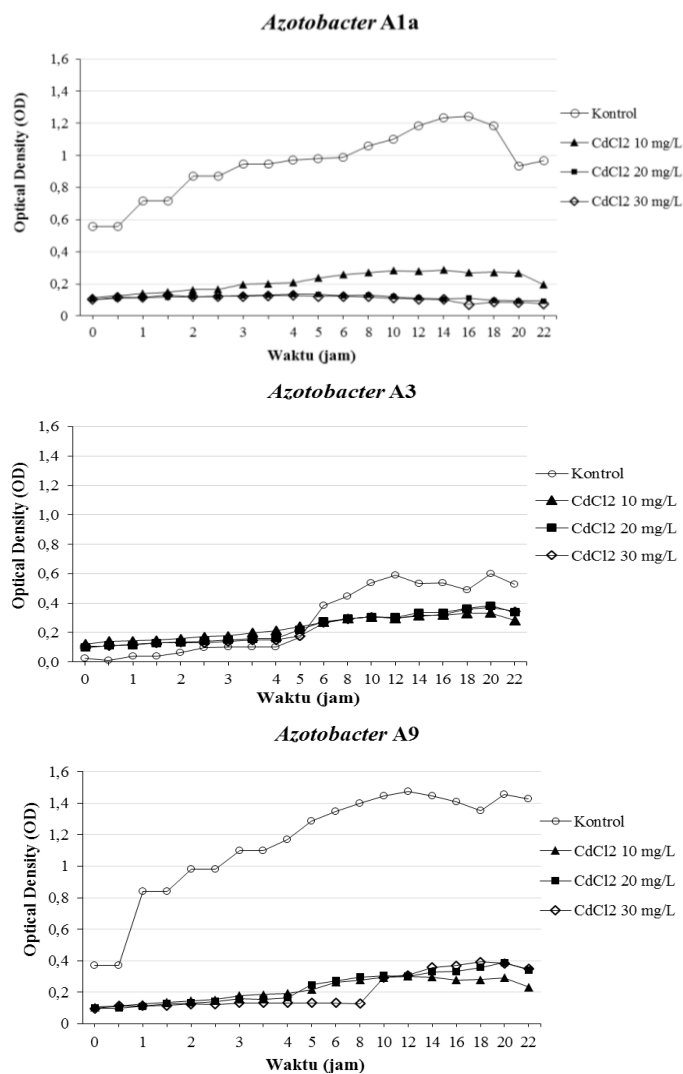
B. Uji Viabilitas Isolat *Azotobacter* yang Tercekam $CdCl_2$

Pertumbuhan isolat *Azotobacter* pada medium tanpa logam $CdCl_2$ (kontrol) dengan isolat *Azotobacter* yang tumbuh pada medium yang mengandung logam $CdCl_2$ dengan konsentrasi 10 mg/L, 20 mg/L, dan 30 mg/L terjadi perbedaan yang menyolok. Ketiga isolat *Azotobacter* pada medium tanpa logam menunjukkan pertumbuhan lebih baik, hal ini ditunjukkan dengan nilai OD yang lebih tinggi daripada ketiga isolat *Azotobacter* yang tercekam logam $CdCl_2$. Kemampuan setiap isolat untuk tumbuh di beberapa konsentrasi $CdCl_2$ tidak sama. Pertumbuhan isolat *Azotobacter* A1a memiliki kemampuan tumbuh lebih baik pada medium yang mengandung $CdCl_2$ 10 mg/L dibandingkan pada medium yang mengandung $CdCl_2$ 20 dan 30 mg/L (Gambar 2). Isolat *Azotobacter* memiliki daya hidup di semua medium yang mengandung $CdCl_2$ 10, 20, dan 30 mg/L walaupun nilai OD yang kecil tetapi masih terlihat adanya penambahan nilai OD.

Pola pertumbuhan pada *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 memasuki fase lag terlebih dahulu. Fase lag merupakan fase adaptasi yang diperlukan untuk sel bakteri pada kondisi lingkungan baru [21]. Selama fase lag terjadi proses perbaikan kerusakan makromolekul yang terakumulasi selama fase stationer dan peningkatan sintesis komponen seluler seperti RNA yang diperlukan untuk pertumbuhan. Selama fase lag,

jumlah ribosom per sel akan meningkat demikian juga dengan proses translasi protein [22].

Isolat *Azotobacter* A3 dan A9 membutuhkan fase lag atau fase adaptasi lebih panjang daripada *Azotobacter* A1. Menurut [23], hal ini dapat terjadi karena medium mengandung logam $CdCl_2$ yang dapat menyebabkan fase lag menjadi lebih panjang, densitas sel yang lebih rendah, dan bahkan dapat menyebabkan kematian bakteri. Sedangkan menurut [21], ada tidaknya fase lag pada kurva pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh waktu inokulasi dan usia inokulum. Apabila inokulum diinokulasikan pada medium baru yang sama pada saat fase eksponensial, maka pertumbuhan bakteri langsung melanjutkan fase eksponensial tanpa melalui fase lag lagi.



Gambar. 2. Kurva Pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 yang Tercekam $CdCl_2$.

Sedangkan apabila inokulum diinokulasikan ke medium baru pada saat memasuki fase kematian, maka pertumbuhan bakteri akan mengalami fase lag terlebih dahulu sebelum ke fase eksponensial. Isolat akan memasuki fase eksponensial setelah fase lag terlewati.

Isolat *Azotobacter* A1a mulai memasuki fase eksponensial pada jam ke-3 sampai dengan jam ke-14. *Azotobacter* A1a

yang tercekam CdCl₂ 10 mg/L menunjukkan pertumbuhan yang lebih signifikan daripada isolat A1a yang tercekam CdCl₂ 20 mg/L dan 30 mg/L. *Azotobacter* A3 mulai memasuki fase eksponensial pada jam ke-4 sampai dengan jam ke-18, sedangkan *Azotobacter* A9 memasuki fase eksponensial pada jam ke-4 sampai dengan jam ke-16. Namun, untuk *Azotobacter* A9 yang tercekam logam CdCl₂ 30 mg/L mulai memasuki fase eksponensial pada jam ke-8 sampai dengan jam ke-18 dan kurva pertumbuhannya menunjukkan pertumbuhan yang lemah karena medium mengandung logam CdCl₂ dengan konsentrasi tinggi yang dapat menghambat pertumbuhan isolat tersebut. Isolat *Azotobacter* A9 mengalami pertumbuhan yang lebih stabil dan lebih resisten terhadap medium yang mengandung CdCl₂ mulai dari konsentrasi 10 mg/L, 20 mg/L, dan 30 mg/L daripada isolat A1a dan A3, karena nilai OD pada fase eksponensial mencapai hampir 0,400.

Resistensi bakteri Gram negatif terhadap Cd dikarenakan adanya *czc* operon yang terdapat dalam plasmid bakteri. *Czc* operon terdiri dari tiga struktur gen yaitu *czcC*, *czcB*, dan *czcA* yang menghasilkan kompleks kation dengan *efflux pump* [24]. Tingkat resistensi bakteri terhadap Cd ditentukan oleh tingkat ekspresi dari *czc* operon, sehingga semakin tinggi ekspresi *czc* operon maka tingkat resistensi bakteri juga semakin tinggi. Sedangkan berdasarkan [20], paparan CdCl₂ dalam konsentrasi tinggi menyebabkan peningkatan produksi EPS untuk adsorpsi Cd²⁺ supaya tidak memasuki proses fisiologis bakteri. Berdasarkan [25] membuktikan bahwa EPS pada *Azotobacter* sp. strain AC2 dapat mengadsorpsi logam berat Zn²⁺ yang memiliki struktur kimia mirip dengan Cd²⁺.

Pada fase stationer terjadi penurunan jumlah sel pada populasi, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Hal ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi dalam medium dan kemungkinan bakteri juga tercekam logam berat CdCl₂.

Logam berat dengan konsentrasi tinggi beracun bagi mikroorganisme, dapat mengganggu membran sel, mengganggu reaksi enzimatik dan pembentukan protein, serta DNA [12]. Sedangkan fase kematian adalah fase dimana sel-sel bakteri mengalami kematian yang disebabkan karena nutrisi dalam medium habis. Pada gambar 4.2 fase kematian terlihat setelah memasuki jam ke- 22 pada semua isolat.

Kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 yang tercekam logam pada medium *Nutrient Broth* (NB)-CdCl₂ berbeda dengan hasil resistensi *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 dengan medium NA- CdCl₂. Uji resistensi dengan medium menunjukkan *Azotobacter* A1a, A3, dan A9 sangat resisten terhadap CdCl₂ 30 mg/L yang ditandai dengan pertumbuhan isolat yang baik. Perbedaan tipe medium dari medium padat ke medium cair juga dapat mempengaruhi pertumbuhan dan viabilitas bakteri meskipun nutrisi dalam medium yang digunakan adalah sama. Pada medium padat, pertumbuhan bakteri melekat pada permukaan medium (*attached growth*), sedangkan pada medium cair tipe pertumbuhannya menyerupai suspensi terlarut (*suspended growth*) [26]. Bakteri dalam keadaan tersuspensi akan tumbuh merata di semua bagian medium baik di permukaan, di kolom air, atau di dasar [27].

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Sepuluh isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *Eco Urban Farming* ITS resisten terhadap CdCl₂. Isolat yang resistensinya sangat baik pada medium *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung sampai dengan 40 mg/L adalah isolat *Azotobacter* A1a, A1b, dan A10. Kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter* yang tercekam CdCl₂ relatif lebih rendah dibandingkan kontrol.

UCAPAN TERIMA KASIH

D.A.P mengucapkan terima kasih kepada Dr. Enny Zulaika, MP atas bimbingan dan dukungan pendanaan melalui PNPB ITS dengan nomor kontrak 003246.256/IT2.11/PN.08/2015 tahun anggaran 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] J.A. Almeida, R.E. Barreto, L.B. Novelli, F.J. Castro, and S.E. Moron, "Oxidative Stress Biomarkers and Aggressive Behavior in Fish Exposed to Aquatic Cadmium Contamination," *Neotropical Ichthyology*, Vol. 7 (2009) 103-108.
- [2] S.H. Chien, G. Carmona, L.L. Prochnow, and E.R. Austin, "Cadmium Availability From Granulated and Bulk-blended Phosphate-potassium Fertilizers," *Journal Environ. Qual* 32 (2003) 1911-1914.
- [3] M. Maanan, "Biomonitoring of Heavy Metals Using *Mytilus galloprovincialis* in Safi Coastal Waters, Morocco," *Environmental Toxicology*, Vol. 22, Issue 5 (2007) 525-531.
- [4] L. Patrick, "Toxic Metals and Antioxidants Part II the Role of Antioxidant Ni Arsenic and Cadmium Toxicity – Toxic Metals part II," *Review, Alternative Medicine* (2003).
- [5] S.J.S. Flora, "Metal Poisoning: Treatment and Management," *Review Article, Al Ameen Journal Medicine Science*, Vol. 2 (2009) 4-26.
- [6] J. Gzy, K. Rymer, and E.A. Gwozdz, "Differential Response of Antioxidant Enzymes to Cadmium Stress in Tolerant and Sensitive Cell Line of Cucumber (*Cucumis sativus* L), *Acta Biochemica Polonica* Vol. 56 (2009) 723-727.
- [7] R. John, P. Ahmad, K. Gadgila, and S. Sharmab, "Heavy Metal Toxicity: Effect on Plant Growth, Biochemical Parameters and Metal Accumulation by *Brassica juncea* L.," *International Journal of Plant Production*, Vol. 3 (2009) 65-76.
- [8] M.R. Bruins, S. Kapil, and F.W. Oehme, "Microbial Resistance to Metals in the Environment (Review)," *Exotoxicology and Environmental Safety* Vol. 45 (2000) 198-207.
- [9] D.H. Nies, "Efflux-mediated Heavy Metal Resistance in Prokaryotes," *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews* 27 (2003) 313-339.
- [10] S.E. Elsilik, A.E.R. El-Shanshoury, and P.S. Ateya, "Accumulation of some heavy metals by metal resistant avirulent *Bacillus anthracis* PS2010 isolated from Egypt," *African Journal of Microbiology Research* Vol 8 (2014) 1266-1276.
- [11] A. Luqman, M. Shovitri, dan E. Zulaika, "Resistensi Bakteri *Azotobacter* Terhadap Logam Berat. Seminar Nasional Scientific Conference of Environmental Technology IX "Advances in Agricultural and Municipal Waste Technology to Anticipate Food and Energy Crisis, July 10 (2012). Teknik Lingkungan, FTSP-ITS Surabaya Indonesia.
- [12] A.E. Abo-amer, M.A. Abu-gharbia, E.M. Soltana, and W.M. Abd El-Raheem, "Isolation and Molecular Characterization of Heavy Metal-Resistant *Azotobacter chroococcum* from Agricultural Soil and their Potential Application in Bioremediation," *Geomicrobiology Journal* Vol. 31(2014) 551-561.
- [13] P.M. Joshi, dan A.A. Juwarkar, "In Vivo Studies To Elucidate The Role Of Extracellular Polymeric Substances From *Azotobacter* In Immobilization Of Heavy Metals," *Environmental Science & Technology* Vol. 43, No. 15 (2009) 5884-5889.
- [14] K. Khotimah, dan E. Zulaika, "*Azotobacter* sebagai Bioakumulator Merkuri," *Jurnal Sains Pomits*. Vol. 2 (2013).

- [15] H. Abd-Elnaby, G.M. Abou-Elela, and N.A. El-Sersy, "Cadmium resisting Bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and Optimization of Cadmium Bioaccumulation by *Vibrio harveyi*," African Journal of Biotechnology Vol. 10, No. 17 (2011) 3412-3423.
- [16] T.I. Stuczynski, G.W. McCarty, and G. Siebielec, "Response of Soil Microbiological Activities to Cadmium, Lead, and Zinc Salt Amendments. Journal Environ. Qual Vol. 32 (2003) 1346-1355.
- [17] D.H. Nies, "Microbial Heavy Metal Resistance: Molecular Biology and Utilisation for Biotechnological Processes," Appl. Microbiol Biotechnol Vol. 51 (1999) 730-750.
- [18] B.A. Rasulov, A. Yili, and H.A. Aisa, "Biosorption of Metal Ions by Exopolysaccharide Produced by *Azotobacter chroococcum* XU1. Journal of Environmental Protection (2013) 989-993.
- [19] S.A.F.T. van Hijum, GS van, H. Rahaoui, D.M. van, and L. Dijkhuizen, "Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides," Appl. Environ. Microbiol Vol. 68 No. 9 (2002) 4390-4398.
- [20] R. Hindersah, D.H. Arief, S. Soemitro, dan L. Gunarto, "Pengaruh $CdCl_2$ terhadap Produksi Eksopolisakarida dan Daya Hidup *Azotobacter*," Jurnal Natur Indonesia Vol. 12 No. 1 (2009) 34-37.
- [21] M.T. Madigan and J.M. Martinko, "*Brock Biology of Microbiology. Prentice-Hall*" (2000).
- [22] M.D. Rolfe, C.J. Rice, S. Lucchini, C. Pin, A. Thompson, A.D.S. Cameron, M. Alston, M.F. Stringer, R.P. Betts, J. Baranyi, M.W. Peck, and J.C.D. Hinton, "Lag Phase is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation," Journal of Bacteriology (2012) 686-701.
- [23] H. Abd-Elnaby, G.M. Abou-Elela, and N.A. El-Sersy, "Cadmium resisting Bacteria in Alexandria Eastern Harbor (Egypt) and Optimization of Cadmium Bioaccumulation by *Vibrio harveyi*," African Journal of Biotechnology Vol. 10, No. 17 (2011) 3412-3423.
- [24] R. Choudhury, and S. Srivastava, "Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria," Review Article Current Science Vol 81 No. 7 (2001) 768-775.
- [25] G. Emtiazi, Z. Ethemadifar, and M.H. Habibi, "Production of Extracellular Polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal by Exopolymer," Africa Journal Biotechnology Volume 3 (2004) 330-333.
- [26] C. Li, and H.H.P. Fang, "Fermentative Hydrogen Production from Waste Water and Solid Wastes by Mixed Cultures Cr," Rev Environ Sciences Technology Volume 37 No.1 (2007) 31-39.
- [27] N. Hidayah, dan M. Shovitri, "Adaptasi Isolat Bakteri Aerob Penghasil Gas Hidrogen pada Medium Limbah Organik. Jurnal Sains dan Seni ITS Volume 1 (2012).