

Isolation and Selection of Thermophilic Bacteria as Hexavalent Chromium Reducer from Batik Processing Waste Water

(Isolasi dan Seleksi Bakteri Termofilik Pereduksi Kromium Heksavalen dari Limbah Pengolahan Batik)

Wijiastuti¹, I Made Artika^{1*}, dan Novik Nurhidayat²

¹Department of Biochemistry, Bogor Agricultural University, Bogor, 16680, Indonesia

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia

Received : 25 December 2014; Accepted: 30 March 2015

*Corresponding author: Dr. I Made Artika, M.App.Sc; Departemen Biokimia, Jl. Agatis Gd. Fapet Lt. 5, Wing 5, Bogor 16680; Telp/Fax. +62251-8423267; E-mail: imart@ipb.ac.id

ABSTRACT

Hexavalent chromium (Cr VI) in the oxidized state is carcinogenic in humans. Chromium is widely used in various industries, and therefore Cr (VI) can be found in wastes from the industry. Heavy metal Cr (VI) waste, is one type of hazardous wastes, due to the high toxicity of Cr (VI) which is much higher than that of Cr (III). This study was conducted to isolate naturally occurring bacteria from batik wastewater with ability to reduce Cr (VI). Identification of chromate reductase gene was carried out using qPCR method. Results showed that three isolates *Bacillus sp.1a*, *Pseudomonas sp.1b*, dan *Geobacillus sp.1c* have chromate reductase-coding genes. Based on the results of qPCR analysis, the isolate *Bacillus sp.1a* was predicted to have the highest reduction activity. Hence, this isolate was then subjected to Cr(VI) reduction activity test.

Keywords: Chromate, chromate heksavalen, chromate reductase.

ABSTRAK

Kromium heksavalen (CrVI) dalam keadaan teroksidasi bersifat karsinogen pada manusia. Kromium banyak digunakan dalam berbagai industri, sehingga Cr(VI) dapat ditemukan pada limbah-limbah hasil dari industri tersebut. Limbah logam berat Cr(VI), merupakan salah satu jenis limbah berbahaya, karena tingginya toksisitas Cr(VI) yaitu jauh lebih tinggi dibandingkan toksisitas (III). Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi bakteri dari limbah pengolahan batik yang berpotensi mereduksi Cr(VI). Identifikasi gen penyandi kromat reduktase dilakukan dengan menggunakan metode qPCR. Hasil menunjukkan bahwa diperoleh 3 (tiga) isolat yaitu isolat *Bacillus sp.1a*, *Pseudomonas sp.1b*, dan *Geobacillus sp.1c* yang memiliki gen penyandi enzim kromat reduktase. Berdasarkan hasil analisis qPCR, isolat *Bacillus sp.1a* diduga memiliki aktivitas reduksi paling baik,

sehingga terhadap isolat *Bacillus sp.1a* dilakukan uji aktivitas reduksi Cr(VI).

Keywords: kromat, kromat heksavalen, kromat reduktase.

1. PENDAHULUAN

Kromium heksavalen dalam keadaan teroksidasi menjadi perhatian utama dalam kesehatan, keselamatan kerja dan lingkungan hidup karena toksisitasnya yang ekstrim dan bersifat karsinogen pada manusia (OSHA 2013). Kromium digunakan sebagai campuran utama pada *stainless steel*, penyepuhan krom pewarna, sebagai katalis dalam pencelupan dan penyamakan kulit, impregnasi kayu, refraktori batu bata, dan untuk pembuatan pita magnetik (Jacobs dan Testa 2005).

Menurut Factfish (2014), Indonesia mengimpor kromium trioksida sebesar 739.347 kg tahun 2012 dan tahun 2011 Indonesia mengekspor barang-barang, limbah/sisa dan bubuk yang mengandung Cr sebesar 86.711 kg. Limbah-limbah industri dengan kandungan logam-logam berat tidak dapat dibuang langsung ke sungai, waduk atau laut karena keberadaan logam berat sangat berbahaya bagi kehidupan manusia, hewan dan lingkungan (Karamah *et al.* 2008). Limbah logam berat Cr(VI) merupakan salah satu jenis limbah berbahaya sehingga diperlukan proses pengolahan limbah agar Cr(VI) tereduksi menjadi Cr(III) karena toksisitas Cr(III) jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan Cr(VI), yaitu sekitar 1/100 kali (Slamet *et al.* 2005). Fatmawati *et al.* (2010) melakukan pemeriksaan parameter logam Cr pada limbah cair industri tekstil dan menemukan bahwa kandungan logam Cr(VI) 1.108 mg/L dengan pH 6,88. Hasil pengujian Sunardi (2011) menunjukkan bahwa kandungan Cr(VI) dari limbah industri batik di

Solo yaitu 74.298 ppm.

Beberapa cara dapat digunakan untuk mereduksi bentuk kromium (VI) menjadi bentuk trivalen, metode paling mudah dan murah adalah dengan menggunakan bantuan bakteri pereduksi kromat yang memiliki enzim Cr(VI) reduktase. Penggunaan bakteri penghasil kromat reduktase dalam bioremediasi memiliki peran penting dalam proses reduksi biologis Cr(VI) menjadi Cr(III). Pattanapitpaisal dan Reakyai (2013) menyatakan bahwa kromat reduktase dapat bekerja pada variasi suhu dari 28 sampai 80°C pada pH 7.0. Pengamatan serupa dilaporkan pada kromat reduktase dari *Pseudomonas putida* MK1 yang menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu yang sama (80°C) namun pH optimal berbeda (pH 5.0) (Park *et al.* 2000).

Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi bakteri termofilik pereduksi Cr(VI) menggunakan enzim Cr(VI) reduktase dari sampel bakteri yang berasal dari limbah industri pengolahan batik.

2. METODOLOGI

Sampel adalah limbah dari pengolahan batik terdiri atas limbah pewarnaan, pencucian dan perebusan batik. *Bacto* agar, pepton, tripton, NaCl, K₂HPO₄, glukosa, kuadestilata, K₂Cr₂O₄.

Media HTR (heterotrof) padat dengan komposisi 15 gram *bacto* agar, 15 gram pepton, 3 gram tripton, 5 gram NaCl dan 2 gram K₂HPO₄ dilarutkan dalam 1000 mL kuadestilata. Media HTR cair dengan komposisi media cair adalah 15 gram pepton, 3 gram tripton, 5 gram NaCl, 2.5 gram K₂HPO₄ dan 2.5 gram glukosa

dilarutkan dalam 1000 mL kuadestilata. Kedua media tersebut juga ditambahkan $K_2Cr_2O_4$ sebagai sumber Cr(VI).

Master mix dengan komposisi 7 μ L ddH₂O, 10 μ L Evagreen, 1 μ L template, 1 μ L Primer F, 1 μ L primer R. *Primer* spesifik kromat reduktase (CRVIRD) F 5'-CAGCTCAATGGGCGTGATTG-3' ; R 5'-CGCCATAAATTCCGGCTTG-3'. *Primer* dirancang menggunakan data gen kromat reduktase dari *gene bank* (NCBI).

Isolasi dan Pemurnian Bakteri dari Limbah Pewarnaan Batik

Isolasi dilakukan dengan menggores 1 (satu) ose sampel limbah pada media HTR padat yang diperkaya dengan Cr(VI) 100 ppm dan diinkubasi selama 24-48 jam pada 30°C. Isolat-isolat yang diperoleh kemudian diambil 1 (satu) ose dan dipindahkan ke media HTR padat, lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada 30°C, sehingga diperoleh isolat-isolat murni.

Isolat yang telah dimurnikan kemudian disiapkan untuk membuat *starter* dengan melakukan inokulasi isolat-isolat pada media HTR cair yang diperkaya dengan Cr (VI) 100 ppm dan diinkubasi 24-48 jam. Kultur kemudian diukur *Optical Density*-nya (OD) pada 540 nm. OD starter yang digunakan memiliki nilai absorbansi 1. Kemudian starter ini digunakan untuk uji aktivitas reduksi Cr(VI) (modifikasi Holt dan Krieg 1994).

Identifikasi Gen dengan qPCR

DNA isolat diperoleh melalui tahapan ekstraksi. Isolat bakteri yang telah diinokulasi pada media HTR cair dan diinkubasi selama 24 jam kemudian ODnya diukur pada panjang gelombang 600 nm (OD yang diharapkan adalah

0.5). Sebanyak 1.0 mL isolat dipipet kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 12.197 g selama 10 menit. Supernatan dibuang, kemudian pelet isolat dicuci dengan akuadestilata. Pelet yang sudah dicuci ditambah dengan 0.5 mL akuadestilata dan dilakukan vorteks. Isolat yang telah homogen kemudian direnjatpanaskan pada suhu 90°C selama 20 menit dalam penangas air. Isolat kemudian direnjatdinginkan pada suhu -18°C selama 20 menit, lalu isolat dibiarkan pada suhu ruang sampai tidak ada beku. Isolat kemudian divorteks sampai homogen dan disentrifugasi kembali pada 12.197 g selama 1 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian direaksikan dengan pereaksi *master mix* dan *primer* spesifik kromat reduktase (CRVIRD) kemudian diproses pada mesin qPCR (*quantitatif* PCR) (modifikasi Sachse 2002).

Uji Aktivitas Reduksi Cr(VI)

Media yang digunakan adalah media HTR cair dengan berbagai tingkat pH dan konsentrasi Cr, yaitu media dengan pH 5, 7 dan 9. Pada masing-masing pH dibuat variasi konsentrasi Cr (VI) yaitu 50, 125 dan 200 ppm. Masing-masing media kemudian diinokulasikan dengan *starter* isolat sebanyak 10% dan diinkubasi pada suhu 30, 40 dan 50°C selama 24 jam.

Setelah 24 jam, isolat diambil sebanyak 1.5 mL dan disentrifugasi pada 12.197 g selama 10 menit. Sebanyak 1.0 mL supernatan dipipet ditambahkan dengan 50 mL kuadestilata, 2 tetes HNO₃ pekat (pH ~ 1.0) dan 0.5 mL pereaksi difenilkarbazid (250 mg 1,5 - difenilkarbazid dalam 50 mL aseton). Larutan berwarna kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Kontrol adalah media HTR dengan perlakuan pH dan konsentrasi akan tetapi tidak diberi isolat. Aktivitas reduksi dinyatakan

sebagai persentase reduksi Cr. Nilai reduksi Cr(VI) ditentukan berdasarkan jumlah Cr(VI) yang tersisa setelah masa inkubasi (modifikasi APHA 1999).

3. HASIL

Isolat Bakteri dari Limbah Pengolahan Batik

Limbah pengolahan batik yang digunakan dalam isolasi bakteri berasal dari proses pewarnaan, perebusan dan pencucian batik. Isolat yang diperoleh dari limbah pewarnaan adalah isolat 1a, 1b dan 1c. Isolat dari limbah perebusan adalah isolat 2a, 2b dan 2c sedangkan isolat dari limbah pencucian adalah isolat 3. Masing-masing isolat dibedakan berdasarkan karakteristik koloni seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Isolat-isolat dari hasil isolasi tersebut dimurnikan dengan memindahkan masing-masing isolat pada media HTR padat dan diperoleh koloni isolat murni.

Karakteristik Gen Penyandi Kromat Reduktase

Terhadap isolat-isolat yang telah dimurnikan selanjutnya dilakukan identifikasi gen

penyandi kromat reduktase dengan metode qPCR menggunakan primer spesifik CRVIRD. Dari 7 (tujuh) isolat yang dianalisis, hanya isolat 1a, 1b dan 1c dari limbah pewarnaan batik yang menunjukkan adanya gen penyandi kromat reduktase.

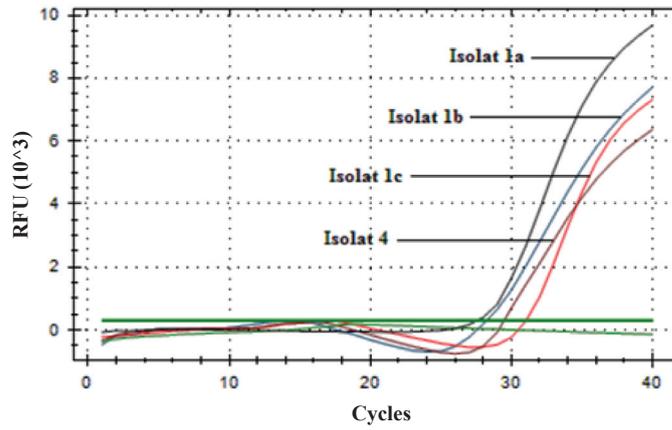
Isolat 1a, 1b, dan 1c kemudian dianalisis kembali dengan qPCR menggunakan primer spesifik CRVIRD sebagai uji karakterisasi gen penyandi kromat reduktase. Hasil qPCR kemudian digunakan untuk mengidentifikasi gen berdasarkan jumlah DNA yang teramplifikasi.

Amplifikasi dilakukan dalam mesin qPCR dan hasil amplifikasi ditampilkan dalam bentuk grafik pada layar komputer. Grafik yang ditampilkan berupa grafik kontrol negatif dan sample uji yang masing-masing memiliki nilai *Ct* (*cycle threshold*), yaitu perpotongan antara kurva amplifikasi dan garis batas kontrol (LTC 2011). Hasil analisis qPCR dari isolat 1a, 1b dan 1c menunjukkan bahwa konsentrasi DNA yang teramplifikasi pada isolat 1a lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi DNA pada isolat lainnya (1b dan 1c) (Gambar 1). Nilai *Ct* isolat 1a adalah 27.46, nilai *Ct* 1b adalah 28.8 dan nilai *Ct* 1c adalah 31.01.

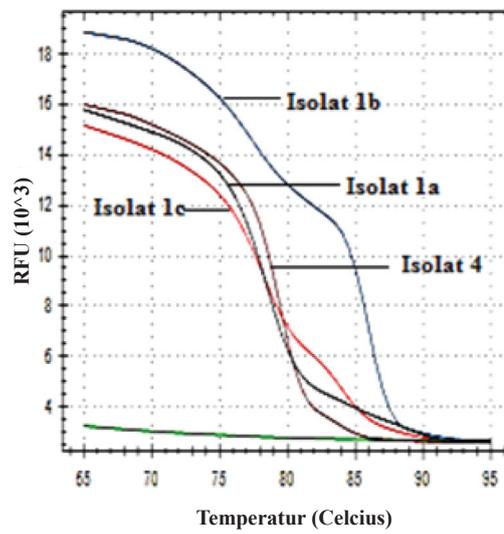
Nilai *Tm* (*melting temperature*) isolat 1a

Tabel 1 Isolat Limbah Pengolahan Batik.

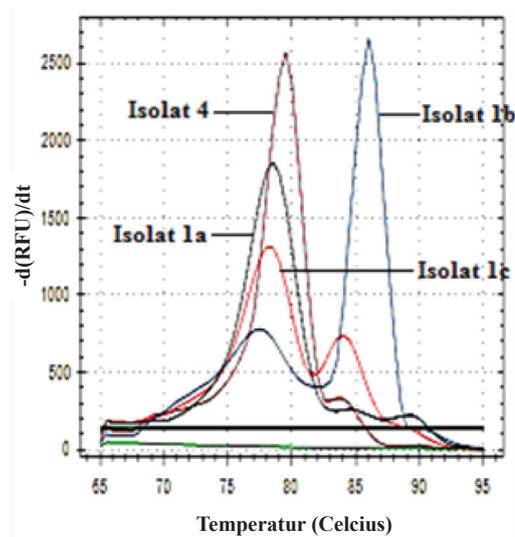
No	Isolat	Karakteristik Koloni
1.	1a	berwarna putih berbentuk bulat dengan tepian rata dan elevasinya flat atau datar
2.	1b	berwarna hijau transparan berbentuk bulat dengan tepian rata dan elevasinya menonjol
3.	1c	berwarna krem bentuk <i>irregular</i> dengan tepian undulate/bergelombang dan elevasinya menonjol
4.	2a	berwarna krem bentuk <i>irregular</i> tepiannya undulate/bergelombang dan elevasinya menonjol
5.	2b	berwarna krem bentuk <i>irregular</i> tepiannya undulate/bergelombang dan elevasinya umbonate
6.	2c	berwarna putih bentuk <i>irregular</i> dengan tepian undulate/bergelombang dan elevasinya menonjol
7.	3	Berwarna krem bentuk <i>irregular</i> tepiannya undulate/bergelombang dan elevasinya menonjol



(a)



(b)



(c)

Gambar 1 Pola amplifikasi gen kromat reduktase dari tiap isolat bakteri terseleksi.

adalah 78.50, isolat 1b adalah 77.50 dan 86.00 serta untuk isolat 1c adalah 84.00 dan 78.00. *Melting curve* pada Gambar 2 menunjukkan bahwa puncak grafik pada isolat 1a berupa *single peak* dan pada isolat 1b dan 1c berupa *multiple peaks*, yang berarti bahwa amplikon pada isolat 1a bersifat homogen, yang menandakan bahwa primer yang digunakan bersifat spesifik untuk isolat 1a tetapi tidak spesifik untuk isolat 1b dan 1c.

Hasil qPCR menunjukkan bahwa jumlah DNA penyandi enzim kromat reduktase yang teramplifikasi pada isolat 1a lebih tinggi dibanding isolat 1b dan 1c, sehingga diduga aktivitas kromat reduktase pada isolat 1a lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya.

Aktivitas Reduksi Cr(VI)

Hasil uji aktivitas reduksi isolat 1a dilakukan pada pH dan suhu yang berbeda yaitu pH 5, 7 dan 9 serta suhu 30, 40 dan 50°C.

Pada pH 5 aktivitas reduksi isolat 1a menunjukkan nilai terendah pada perlakuan konsentrasi awal Cr (VI) 125 ppm dengan suhu inkubasi 30°C yaitu 6.58 %, dan aktivitas tertinggi terjadi pada perlakuan konsentrasi awal

Cr (VI) 50 ppm dengan suhu inkubasi 50°C yaitu 66.64 % (Gambar 2).

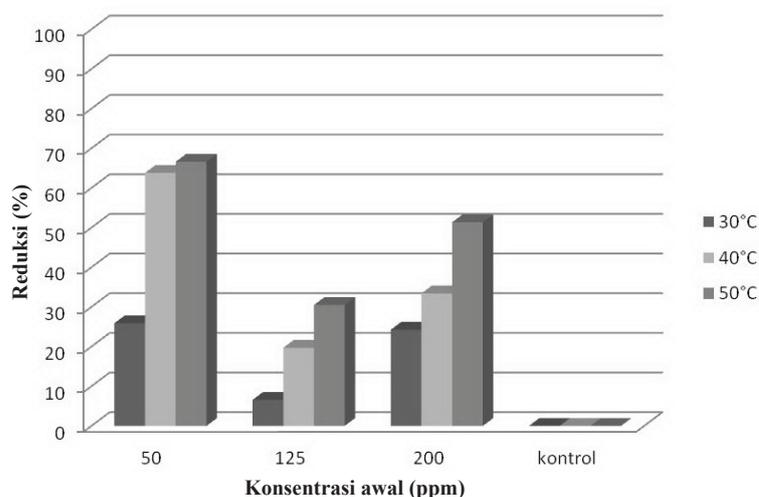
Aktivitas reduksi pada pH 7 mencapai nilai terendah pada perlakuan konsentrasi Cr (VI) 125 ppm dengan suhu inkubasi 30°C (13,05%) dan aktivitas tertinggi pada perlakuan Cr (VI) 50 ppm dengan suhu inkubasi 50°C yaitu 97.36% (Gambar 3).

Pada pH 9 aktivitas reduksinya terendah pada perlakuan konsentrasi awal Cr (VI) 125 ppm yang diinkubasi pada suhu 30°C yaitu 14,62 % dan aktivitas tertinggi pada perlakuan Cr (VI) 50 ppm dengan suhu inkubasi 50°C yaitu 90.64% (Gambar 4).

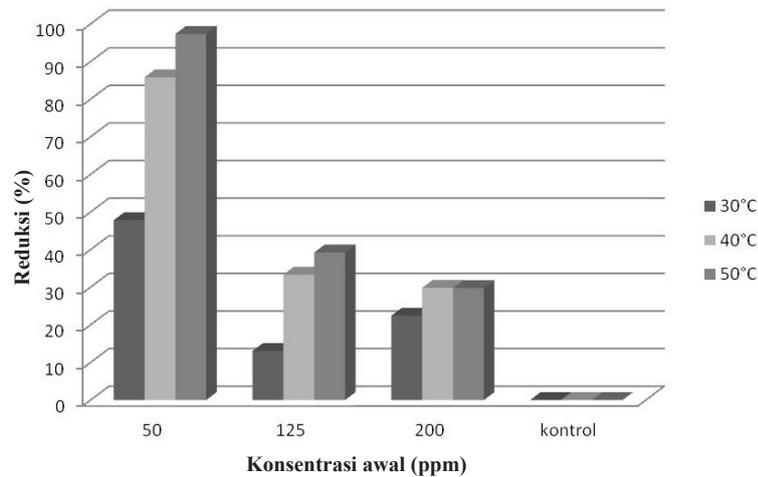
Aktivitas reduksi isolat 1a dengan perlakuan pH berbeda menunjukkan pola aktivitas reduksi Cr(VI) yang sama seperti yang terlihat pada Gambar 2,3 dan 4, yaitu nilai aktivitas terendah maupun tertinggi terjadi pada konsentrasi Cr(VI) 125 ppm dan 50 ppm.

pH optimum aktivitas enzim kromat reduktase isolat 1a adalah pada pH 7 dengan nilai reduksi mencapai 97 %. Sedangkan aktivitas reduksi optimum pada suhu inkubasi 50°C, dan terendah pada suhu inkubasi 30°C.

Isolat 1a teridentifikasi sebagai *Bacillus*



Gambar 2 Aktivitas reduksi isolat *Bacillus sp. 1a* pada pH 5.



Gambar 3 Aktivitas reduksi isolat *Bacillus sp. 1a* pada pH 7.

dan selanjutnya diberi nama *Bacillus sp. 1a*, Isolat 1b adalah *Pseudomonas sp. 1b*, dan isolat 1c adalah *Geobacillus sp. 1c*.

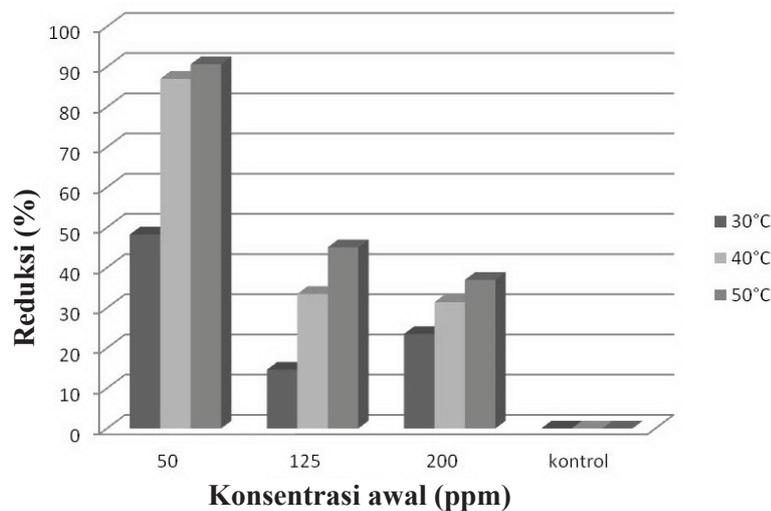
4. PEMBAHASAN

Bakteri dapat mereduksi Cr(VI) secara ekstra dan intraseluler (Cheng *et al.* 2012). Pada penelitian ini reduksi yang terjadi diduga dilakukan oleh enzim kromat reduktase. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Ramirez-Díaz *et al.* (2008) bahwa bakteri mereduksi Cr(VI)

dengan enzim ekstraseluler yang terdapat pada bagian periplasma sel. Sebaliknya, jika Cr(VI) masuk ke dalam sel, akan terjadi stress oksidatif yang dapat merusak protein dan DNA.

Penelitian sebelumnya juga telah melakukan uji aktivitas enzim kromat reduktase pada bakteri-bakteri seperti *Bacillus fusiformis* NTR9, *Pseudomonas putida*, *Thermus scotoductus* (Park *et al.* 2000; Opperman *et al.* 2008; Pattanapitpaisal dan Reakyai 2013).

Pada penelitian oleh Chaturvedi (2011)



Gambar 4 Aktivitas reduksi isolat *Bacillus sp. 1a* pada pH 9.

strain *Bacillus circulans* MN1 mereduksi Cr (VI) lebih efisien pada suhu 30°C dibanding pada 25°C dan 35°C dan pH optimum awal 5,6. pH optimum enzim dalam mereduksi Cr (VI) adalah pH 7,0 dalam buffer fosfat, penurunan aktivitas terjadi pada saat pH sama dengan penggunaan buffer Tris-HCl. Pada suhu 20°C terdeteksi adanya aktivitas enzim mencapai 80%. Kecepatan reaksi meningkat hingga mencapai suhu 30°C. Peningkatan suhu hingga 40°C mengakibatkan penurunan aktivitas, mungkin karena terjadi denaturasi enzim (Conceição *et al.* 2009). Pada penelitian ini aktivitas reduksi isolat *Bacillus sp.1a* pada pH 5 optimal terjadi pada suhu 50°C yaitu 66.64 %, pada pH 7 dan pH 9 aktivitas reduksi paling optimal juga terjadi pada suhu 50°C yaitu 97.36% dan 90.64%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam mereduksi Cr(VI) isolat bakteri *Bacillus sp.1a*. bersifat termostabil, karena aktivitas reduksinya optimal pada suhu 50°C dengan pH optimal 7.

Faktor lingkungan seperti oksigen, pH dan intensitas cahaya dapat mempengaruhi aktivitas reduksi Cr(VI), akan tetapi pada penelitian ini nilai reduksi pada kontrol perlakuan menunjukkan bahwa selama proses inkubasi faktor tersebut tidak mempengaruhi aktivitas reduksi karena pada kontrol tidak ditemukan terjadinya reduksi Cr(VI) (Gambar 2-4).

Berdasarkan hasil qPCR isolat *Bacillus sp.1a*, *Pseudomonas sp.1b* dan *Geobacillus sp.1c* terdeteksi memiliki gen penyandi kromat reduktase. Ketiganya memiliki gen kromat reduktase yang mirip dengan gen kromat reduktase pada mikroba lain yang sudah tersimpan pada *gene bank* (NCBI) seperti *nemaA*, *yieF*, *chrR* pada *Escherichia coli* dan *BBPR_1806* pada *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. Data gen kromat reduktase dari genus *Bacillus*,

Pseudomonas dan *Geobacillus* belum tersimpan pada *gene bank*.

Metode qPCR adalah metode analisis yang dapat mengukur DNA berpotensi dengan akurat (Bustin *et al.* 2009). Nilai *Ct* didefinisikan sebagai jumlah siklus yang diperlukan sinyal fluoresensi untuk mendeteksi tercapainya ambang batas tertentu dan korelasinya berbanding terbalik dengan jumlah cetakan asam nukleat yang ada dalam reaksi (Walker 2002). Nilai *Ct Bacillus sp.1a* adalah 27.46, nilai *Ct Pseudomonas sp.1b* adalah 28.8 dan nilai *Ct Geobacillus sp.1c* adalah 31.01. Artinya analisis qPCR gen kromat reduktase pada penelitian ini menunjukkan jumlah cetakan *DNA gen* kromat reduktase pada *Bacillus sp.1a*. lebih banyak dibandingkan pada *Pseudomonas sp.1b* dan *Geobacillus sp.1c*.

Nilai *Tm* (*melting temperature*) isolat 1a adalah 78.50, isolat 1b adalah 77.50 dan 86,00 serta untuk isolat 1c adalah 84.00 dan 78,00. *Melting curve* pada Gambar 2 menunjukkan bahwa puncak grafik pada isolat 1a berupa *single peak* dan pada isolat 1b dan 1c berupa *multiple peaks*, yang berarti bahwa ampikon pada isolat 1a bersifat homogen dan ampikon pada isolat 1b dan 1c tidak homogen, yang menandakan bahwa primer yang digunakan bersifat spesifik untuk isolat 1a tetapi tidak spesifik untuk isolat 1b dan 1c.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa diperoleh 3 (tiga) isolat, yaitu isolat *Bacillus sp.1a*, *Pseudomonas sp.1b* dan *Geobacillus sp.1c* yang memiliki gen penyandi kromat reduktase. Hasil karakterisasi dengan qPCR menunjukkan bahwa isolat *Bacillus sp.1a* berpotensi lebih baik dibandingkan dengan isolat *Pseudomonas sp.1b* dan *Geobacillus sp.1c* dalam mereduksi Cr(VI). Aktivitas reduksi Cr(VI) isolat *Bacillus sp.1a* bersifat termostabil karena

aktivitas tertinggi terjadi pada suhu inkubasi 50°C, aktivitas menengah pada suhu inkubasi 40°C dan aktivitas terendah pada suhu inkubasi 30°C untuk selang suhu yang diujicobakan (30°-50°C). Nilai pH optimum untuk proses reduksi adalah pada pH 7.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih untuk *home industry* batik tulis Bogor “Tradisiku” dan Balai Penelitian Biologi, LIPI atas kontribusinya selama penelitian.

6. DAFTAR PUSTAKA

- American Public Health Association (APHA). 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellems J., Huggett J, Kubista M., Mueller R, Nolan T., Pfaffl MW., Shipley G.L. Vandesompele Jo,5 and Wittwer C.T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 2009 55:4.
- Cheng Y, Holman H, dan Lin Z. 2012. Remediation of Chromium and Uranium Contamination by Microbial Activity. *Elements*, VOL. 8, PP. 107–112 DOI: 10.2113/gselements.8.2.107.
- Chaturvedi M.K. 2011. Studies on Chromate Removal by Chromium-Resistant *Bacillus* sp. Isolated from Tannery Effluent *Journal of Environmental Protection*, 2011(2):76-82. Doi:10.4236/jep.2011.21008.
- Conceição D.P., dos Passos C.T., Jacques R.J.S., Bento F.M., Simonetti A.B., and Camargo F.A.O. 2009. A Novel Chromate Reductase from *Bacillus* sp. ES29: Characterization and Partial Purification. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, 11(2): 237-256.
- Factfish. 2014. Indonesia: Chromium, articles thereof, waste or scrap, powders, export value [internet]. [diacu 2014 April 22]. Tersedia dari : <http://www.factfish.com>.
- Factfish, 2014. Indonesia: Chromium trioxide, import value [internet]. [diacu 2014 April 22]. Tersedia dari : <http://www.factfish.com>.
- Fatmawati, Sajidan, Suranto. 2010. Potensi mikroorganisme sebagai agen bioremediasi dalam menurunkan kadar Cr (VI) dalam Limbah cair tekstil hasil pewarnaan. Seminar Nasional Pendidikan Biologi, FKIP, UNS.
- Jacobs JA., Testa SM. 2005. Overview of chromium (vi) in the environment: background and history. *Chromium (VI) Handbook*. ISBN 1-56670-608-4, CRC Press, New York.
- Karamah EF, Setijo B, dan Simbolon HM. 2008. Pengaruh ozon dan konsentrasi zeolit terhadap kinerja proses pengolahan limbah cair yang mengandung logam dengan proses flotasi. *Makara. Teknologi*. 12(1):43-47. ISSN 1693–4393.
- Holt J.G. and Krieg N.R. 1994. Enrichment and Isolation. Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology.
- Life Technologies Corporation [LTC]. 2011. Real-Time PCR : Understanding Ct. Life technologies corporation [internet]. [diacu 2014 November 24]. Tersedia dari : www.lifetechnologies.com. Carlsbad
- Occupational Safety & Health Administration [OSHA]. 2013. Chromium. [internet]. [diacu 2014 Februari 21]. Tersedia dari : www.osha.gov/SLTC/chromium/.
- Opperman, Piater, dan van Heerden. 2008. A Novel Chromate Reductase from *Thermus scotoductus* SA-01 Related to Old Yellow Enzyme. *Journal of bacteriology*. 2008, 190(8) : 3076–3082. American Society for Microbiology.
- Park C. H., Keyhan M., Wielinga B., Fendorf S., Matin A. Purification to Homogeneity and Characterization of a Novel *Pseudomonas putida* Chromate Reduktase. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66(5):1788. DOI: 10.1128/AEM.66.5.1788-1795.2000.
- Pattanapitpaisal P, Reakyai T. 2013. Cr(VI) reduction by cell-free extract of thermophilic *Bacillus fusiformis* NTR9. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 35 (4), 407-414.
- Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C.

2008. Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *BioMetals* 21: 321-332
- Sachse K., 2002. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. *Methods in Molecular Biology*, vol. 216: PCR Detection of Microbial Pathogens. Humana Press Inc., Totowa.
- Slamet, Arbianti, Daryanto. 2005. Pengolahan limbah organik (fenol) dan logam berat (Cr^{6+} atau Pt^{4+}) secara simultan dengan fotokatalis TiO_2 , ZnO-TiO_2 , dan CdS-TiO_2 . *Makara. Teknologi*. 9(2):66-71.
- Sunardi. 2011. Penurunan kadar krom(vi) dengan *Sargassum sp*, *Saccharomyces cerevisiae* dan kombinasinya pada limbah cair industri batik. *Ekosains*. 3(1):27-32.
- Walker N.J., Tech. Sight. A technique whose time has come, *Science* 296 (2002) 557-559