

Pengaruh pH dan Suhu terhadap Aktivitas Pereduksi Merkuri Bakteri Resisten Merkuri Tinggi *Bacillus cereus* yang Diisolasi dari Urin Pasien dengan Amalgam Gigi

Billy J. Kepel, Widdhi Bodhi, Fatimawali

Bagian Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi Manado

E-mail: billyjohnsonkepel@gmail.com; widdhi_bodhi@yahoo.com; fatimawali@unsrat.ac.id

Abstract: Mercury is a very toxic compound to humans, therefore, a method to overcome its presence in the environment is required. Detoxification of mercury can be done by using mercury resistant bacteria. Mercury-resistant bacteria *Bacillus cereus* isolate FUA have been obtained from the urine of patients with dental mercury amalgam. This study was aimed to determine the mercury detoxification activity of *Bacillus cereus* isolate FUA at varying pH medium and incubation temperature. The study was carried out by growing *Bacillus cereus* isolate FUA on oblique media, then were planted in the growth media of LB broth containing mercury compounds of 10 ppm HgCl₂ with varying pHs of 5, 7, and 9 and incubation temperatures of 15, 25 and 35°C. The amount of bacterial growth was analyzed by using spectrophotometer and mercury levels were analyzed by using CV-AAS method. The results showed that the growth and mercury reducing activity of *Bacillus cereus* isolate FUA were optimum at pH 7 and incubation temperature of 35°C. In conclusion, the growth of *Bacillus cereus* isolate FUA and its mercury reducing activity were optimum at pH 7 and temperature of 35°C. It is expected that the results of this study can be the basis for further research on the process of mercury detoxification

Keywords: *Bacillus cereus*, urine, mercury resistance, pH, temperature

Abstrak: Merkuri adalah senyawa yang sangat beracun bagi manusia sehingga diperlukan metode untuk mengatasi keberadaannya di lingkungan. Detoksifikasi merkuri dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri resisten merkuri. Bakteri yang resisten merkuri *Bacillus cereus* isolat FUA telah diperoleh dari urin pasien dengan amalgam gigi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas detoksifikasi merkuri *Bacillus cereus* isolat FUA pada berbagai variasi pH medium dan suhu inkubasi. Bakteri *Bacillus cereus* isolat FUA ditumbuhkan pada media miring, kemudian ditanam pada media pertumbuhan bakteri LB broth yang mengandung senyawa merkuri 10 ppm HgCl₂ dengan berbagai pH 5, 7 dan 9 dan suhu inkubasi 15, 25 dan 35°C. Jumlah pertumbuhan bakteri dianalisis menggunakan spektrofotometer dan kadar merkuri dianalisis menggunakan metode CV-AAS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas pertumbuhan dan aktivitas pereduksi merkuri *Bacillus cereus* isolat FUA optimum pada lingkungan pertumbuhan dengan pH 7 dan suhu inkubasi 35°C. Simpulan penelitian ini ialah aktivitas pertumbuhan dan pereduksi merkuri *Bacillus cereus* isolat FUA yang optimum pada pH 7 dan suhu 35°C. Diharapkan hasil penelitian ini dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang proses detoksifikasi merkuri.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, urin, resistensi merkuri, pH, suhu

PENDAHULUAN

Sumber daya alam merupakan salah satu tulang punggung pendapatan negara dan juga pendapatan langsung masyarakat. Hal ini membuat lingkungan alam banyak

dieksplorasi, misalnya untuk mendapatkan emas sebagai sumber penghasilan. Eksplorasi emas ini tidak hanya dapat membawa manfaat langsung kepada masyarakat dalam bentuk penambangan emas masyarakat,

tetapi kadang-kadang dapat merugikan karena kegiatan yang tidak terkendali. Masyarakat mengeksplorasi lingkungan dengan hanya mendapatkan emas yang diinginkan tetapi dengan mengorbankan aspek kesehatan lingkungan, misalnya penggunaan merkuri dalam proses pembangunan emas. Hasil limbah merkuri dari pengolahan penambangan emas masyarakat diproses secara sederhana yang hanya berakhir pada pembuangan limbah lingkungan. Pelepasan limbah merkuri ke lingkungan akan mencemari tanah dan air yang merupakan sumber mata pencarian dan akan berdampak pada kesehatan manusia.

Merkuri adalah unsur yang sangat beracun meskipun sangat sedikit konsentrasi dalam tubuh. Meskipun semua bentuk kimiawi merkuri beracun, perhatian kesehatan masyarakat difokuskan pada merkuri organik yang merupakan bentuk merkuri paling beracun. Siklus biogeokimia merkuri di lingkungan berperan dalam mengatur toksitas merkuri, di mana proses metilasi ion merkuri (Hg^{2+}) secara langsung atau tidak langsung atau degradasi metilmerkuri ialah kunci penting untuk toksitas merkuri, baik dalam mekanisme transformasi oleh mikroorganisme dan oleh lingkungan abiotik.¹ Merkuri organik akan terdegradasi menjadi bentuk ion merkuri (Hg^{2+}) oleh enzim organomerkuri liase, dan selanjutnya (Hg^{2+}) akan didetoksifikasi oleh reduktase merkuri menjadi Hg yang mudah menguap.²

Banyak laporan menunjukkan bahwa habitat yang mengandung kontaminasi logam tingkat tinggi selama bertahun-tahun terus memiliki populasi dan aktivitas mikroba meskipun populasi dan aktivitas ini lebih rendah daripada habitat yang tidak terkontaminasi. Hal ini menunjukkan kondisi ekstrem yang dapat diadaptasi oleh mikroba ini, sehingga diasumsikan bahwa bakteri dapat hidup di lingkungan yang terkontaminasi merkuri dengan mekanisme pertahanan spesifiknya.^{3,4} Detoksifikasi atau bioremediasi bakteri terhadap merkuri merupakan bentuk mekanisme pertahanan bakteri melawan merkuri untuk tetap hidup.

Penggunaan bakteri tahan merkuri untuk mengatasi masalah pencemaran

merkuri organik dan anorganik di lingkungan yang berpotensi sangat tinggi merupakan solusi yang menjanjikan. Dalam penelitian sebelumnya oleh Karamoy et al,⁵ ditemukan bakteri resisten merkuri anorganik yang dapat hidup pada media dengan konsentrasi $HgCl_2$ 40 mg/liter yang diisolasi dari urin pasien dengan tumpatan amalgam gigi, yaitu isolat *Bacillus cereus* isolat FUA yang disimpan dalam lemari pendingin di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi Manado. Dengan melihat berbagai ulasan dalam latar belakang maka penulis tertarik untuk menentukan aktivitas reduksi merkuri isolat *Bacillus cereus* isolat FUA pada berbagai media pH dan suhu inkubasi.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan dalam penelitian ini ialah: sarung tangan steril, Erlenmeyer, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet drop, timbangan analitik, batang pengaduk, cawan Petri, jarum ose, lampu spritus, tabung eppendorf, inkubator (Incucell), aliran udara laminar (Biotek), *autoclave* (ALP), mikropipet (Ecopipette), mikroskop (Olympus), kertas label, bungkus plastik, aluminium foil, kapas, kain kasa, dan CV-AAS.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ialah sampel air, aquades, NaCl, kaldu nutrisi, ekstrak ragi, *tryptone*, agar bakteriologis, metilen biru, metil merah, agar nutrient, agar sitrat Simmon, glukosa, laktosa, sukrosa, pereaksi Kovacs, fenil merkuri, merkuri, merkuri klorida ($HgCl_2$), hidrogen peroksida (H_2O_2), asam sulfat (H_2SO_4), alkohol 70%.

Pada tahap pertama, uji morfologik dan fisiologik dilakukan pada koloni isolat FUA yang disimpan di laboratorium untuk membuktikan bahwa bakteri yang dianalisis ialah *Bacillus* yang resisten terhadap merkuri. Uji morfologik dilakukan dengan pewarnaan Gram; uji fisiologik dilakukan dengan menentukan ada tidaknya motilitas berdasarkan Talaro;⁶ uji biokimia yang dilakukan berdasarkan Lay yaitu uji H_2S ;⁷ serta uji fermentasi karbohidrat, uji katalase,

uji sitrat dan uji lisin dibuat berdasarkan Cappuccino & Sherman.⁸ Selanjutnya, identifikasi dilakukan untuk melihat genus.

Penentuan pengaruh pH pada daya pengurangan merkuri FUA isolat yaitu dengan menggunakan 1 öse diambil bakteri resisten merkuri tinggi isolat FUA dari agar miring dan ditanam pada media kaldu nutrisi yang mengandung 10 mg/l HgCl₂ dengan variasi pH 5, 7, dan 9 dengan penambahan 0,1 N HCl dan 0,1 N NaOH dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, 2 tetes H₂SO₄ pekat ditambahkan untuk membunuh bakteri dan analisis merkuri lebih lanjut menggunakan metode analisis CVAAS dan analisis kosong dilakukan.

Penentuan pengaruh suhu terhadap daya pengurangan merkuri FUA isolat yaitu dengan menggunakan 1 öse diambil bakteri resisten merkuri tinggi dari media untuk dimiringkan, ditanam dalam media kaldu nutrisi yang mengandung HgCl₂ 10 mg/L, dan diinkubasi pada variasi suhu 15, 25 dan 35°C selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, 2 tetes H₂SO₄ pekat ditambahkan untuk membunuh bakteri dan kemudian kadar merkuri dianalisis dengan metode analisis CVAAS dan analisis kosong dilakukan.

Penentuan konsentrasi merkuri dengan CV-AAS dilakukan dengan menambahkan 5 ml KMnO₄ 6% dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian KMnO₄ ditambahkan lagi

sampai warna permanganat terjadi selama 5 menit, dan akhirnya 5% K₂S₂O₈ ditambahkan dan dipindahkan dalam labu volumetrik. Campuran dibiarkan semalam kemudian labu ditutup dengan teflon. Analisis dilakukan sesegera mungkin.

HASIL PENELITIAN

Bakteri resistensi merkuri dalam penelitian ini diperoleh dari urin pasien dengan restorasi amalgam merkuri. Sampel urin diperoleh dari 5 pasien di puskesmas Kota Manado. Terdapat satu koloni yang resistan terhadap merkuri tinggi pada 40 µg/mL.

Berdasarkan hasil uji morfologik, fisiologik, dan biokimia, bakteri resisten merkuri tinggi tampak mengkilap pada media agar, berbentuk batang, Gram-positif, dan bakteri motil. Tabel 1 memperlihatkan hasil uji morfologik, fisiologik, dan biokimia yang menunjukkan adanya *Bacillus* spp.

Tabel 2 memperlihatkan hasil analisis kemampuan reduksi merkuri pada beberapa pH medium, yaitu Ph 5, 6, dan 7. Selama inkubasi 24 jam, kontrol negatif memiliki kadar 0% Hg dan kontrol positif dengan kadar Hg tetap 100%. Perlakuan isolat FUA dengan pH medium berbeda, menunjukkan perbedaan kadar Hg yaitu pada pH 5 tetap 21,6%, pH 7 tetap 20,2%, dan pada pH 9 tetap 21,5%.

Tabel 1. Hasil uji morfologik, fisiologik, dan biokimia

No	Uji	Hasil	Identifikasi
I	Morfologik		
	- Pewarnaan Gram	(+)	
	- Bentuk	basil	
II	Fisiologik		
	- Motilitas	Motil	
III	Biokimia		<i>Bacillus</i> spp.
	- Citrat	-	
	- Indol	-	
	- Catalase	+	
	- Glucosa	+	
	- Sukrosa	-	
	- H ₂ S	+	
	- Lisin	-	

Tabel 2. Analisis hasil pengaruh pH pada kemampuan reduksi merkuri isolat FUA

Perlakuan	Sebelum inkubasi	Konsentrasi Hg (%b/v)		
		pH 5	pH 7	pH 9
Kontrol (-)	0	0	0	0
Kontrol (+)	100	100	100	100
+ Isolat FUA	100	21,6	20,2	21,5

Tabel 3. Hasil analisis pengaruh suhu pada kemampuan reduksi merkuri isolat FUA

Perlakuan	Sebelum inkubasi	Konsentrasi Hg (%b/v)			
		Setelah Inkubasi 24 jam	15°C	25°C	35°C
Kontrol (-)	0	0	0	0	0
Kontrol (+)	100	100	100	100	100
+ Isolat FUA	100	35,4	22,7	20,7	

Hasil ini menunjukkan bahwa kekuatan reduksi merkuri yang kuat dari isolat FUA pada pH 7 dapat mengurangi kadar merkuri terbesar yaitu 79,8% dalam 24 jam.

Tabel 3 memperlihatkan hasil analisis kemampuan reduksi merkuri pada beberapa suhu inkubasi, yaitu 15°C, 25°C, dan 35°C. Isolat bakteri resisten merkuri dapat mengurangi kadar merkuri dalam merkuri anorganik selang waktu 24 jam pada suhu 15-35°C.

BAHASAN

Berdasarkan hasil uji morfologik, fisiologik, dan biokimia, bakteri resisten merkuri tinggi tampak mengkilap pada media agar, yang berbentuk batang, Gram-positif, dan bakteri motil dengan hasil identifikasi yang diperoleh ialah *Bacillus* spp.

Secara umum, genus *Bacillus* adalah bakteri berbentuk batang (*bacillus*), dan bersifat Gram positif, umumnya aerob, dan membentuk endospor, hampir semua jenis basil bersifat motil, dan menghasilkan katalase. Berdasarkan identifikasi mikrobiologis, isolat bakteri resisten merkuri yang diperoleh termasuk dalam genus *Bacillus*.⁹

Uji sitrat dilakukan untuk melihat bakteri yang memiliki kemampuan menggunakan sitrat sebagai sumber karbon dan energi. Beberapa bakteri dapat menggunakan sitrat sebagai sumber energi jika tidak

terdapat glukosa atau laktosa. Hal ini dapat terjadi jika bakteri memiliki enzim sitrat permease yang berperan dalam membawa sitrat dari luar sel ke dalam sel. Sitrat akan memasuki siklus Krebs dan hasilnya yaitu terbentuk asam piruvat dan karbon dioksida. Karbon dioksida bereaksi dengan air dan natrium yang terkandung dalam media Simmons sitrat sehingga membentuk natrium bikarbonat. Kehadiran natrium bikarbonat menyebabkan media menjadi basa sehingga warna indikator biru brom-thymol berubah dari hijau menjadi biru.^{7,8}

Pada uji indol, diperiksa apakah bakteri memiliki kemampuan untuk mendegradasi asam amino esensial triptofan yaitu asam amino yang dapat mengalami deaminasi dan hidrolisis oleh bakteri. Enzim yang berperan dalam proses ini ialah triptofanase. Produk metabolit triptofan ialah indol, asam piruvat, dan amonia. Kehadiran indol dideteksi oleh reagen Kovacs yang menyebabkan pembentukan warna merah pada permukaan media yang menunjukkan uji indol positif. Warna merah terjadi karena pembentukan kompleks antara indol dan p-metil amino benzaldehyde dari reagen Kovacs dalam kondisi asam.^{7,8}

Sebagian besar bakteri menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂.⁷ Hidrogen peroksida beracun bagi sel karena bahan ini dapat

mengaktifkan enzim dalam sel. Uji ini penting dilakukan untuk menentukan sifat bakteri terhadap kebutuhan oksigen.

Pada uji fermentasi karbohidrat, bakteri yang mampu memfermentasi glukosa akan membentuk warna kuning di bagian bawah media (*butt*), sedangkan bakteri yang mampu memfermentasi laktosa dan/atau sukrosa akan membentuk warna kuning pada kemiringan (*slant*).

Pada uji pembentukan H_2S , hasil positif terlihat dengan adanya warna hitam di bagian bawah media dan hasil negatif jika tidak terbentuk warna hitam di bagian bawah media.^{7,8} Warna hitam terbentuk pada dasar media sebagai hasil reaksi dengan sulfida (H_2S). Kehadiran H_2S disebabkan oleh bakteri yang mengurangi metabolit sulfur dari natrium tiosulfat di media untuk menghasilkan hidrogen sulfida (H_2S). Ion S^{2-} yang diproduksi oleh bakteri bereaksi dengan ion Fe^{3+} untuk membentuk Fe_2S_3 dalam bentuk endapan hitam. Sulfat merupakan sumber energi anorganik untuk bakteri. Bakteri yang tidak mampu mengurangi sulfur tidak akan menghasilkan H_2S sehingga warna hitam tidak terbentuk pada media.

Deaminasi lisin ialah proses aerobik yang terjadi pada media miring, sedangkan dekarboksilasi lisin ialah proses anaerob yang terjadi pada media *butt*. Hasil positif dari dekarboksilasi ditunjukkan oleh warna ungu pada media *butt*. Hasil negatif ditunjukkan dengan warna kuning kecoklatan pada media *butt*.¹⁰ Hasil identifikasi mikrobiologis memperlihatkan bahwa bakteri isolat FUA menunjukkan karakteristik yang menyerupai genus *Bacillus* sp. Hasil ini konsisten dengan penelitian oleh Parvin et al¹¹ yang mendapatkan bahwa bakteri yang diisolasi dari urin aliran tengah manusia ialah *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., dan *Bacillus* spp.¹² Chrostofel et al (2017) mengisolasi jenis bakteri resisten merkuri dari plak gigi pasien, salah satunya ialah bakteri *Bacillus thuringiensis*.¹³

Bacillus adalah bakteri anaerob Gram-positif, aerob atau fakultatif, berbentuk batang, dan *chemoorganotrophic*.¹³ Narita et al melaporkan bahwa 21 dari 56 spesies *Bacillus* yang diisolasi dari 15 tempat

berbeda di dunia memiliki transposon yang menyerupai TnMERI1, yang kemudian diklasifikasikan menjadi Tn5084, Tn5085, dan TnMERI. Hal ini mungkin berkontribusi pada penyebaran horizontal operon antara *Bacillus*.^{13,14} TnMER/1 termasuk transposon kelas II yang memiliki gen tahan merkuri spektrum luas.¹³ Zulaika et al¹⁵ melaporkan bahwa beberapa *Bacillus* yang diisolasi di Surabaya, Indonesia, tahan terhadap merkuri pada konsentrasi 25 mg/L $HgCl_2$.

Tabel 1 memperlihatkan bahwa selama inkubasi 24 jam, kontrol negatif memiliki kadar 0% Hg, kontrol positif dengan kadar Hg tetap 100%, sedangkan pada perlakuan isolat FUA dengan pH medium berbeda menunjukkan perbedaan kadar Hg yaitu pada pH 5 tetap 21,6%, pH 7 tetap 20,2%, dan pada pH 9 tetap 21,5%. Hasil ini menunjukkan bahwa kekuatan reduksi merkuri yang kuat dari isolat FUA pada pH 7 dapat mengurangi kadar merkuri terbesar yaitu 79,8% dalam 24 jam. Rentang untuk pertumbuhan bakteri pada pH 5,7-pH 7,0. Selain itu, nilai pH optimal ialah pH netral, yang memfasilitasi enzim merkuri reduktase untuk mengurangi merkuri. Sel-sel bakteri mulai membelah ketika mereka menyesuaikan diri dengan lingkungannya dan fase ini disebut fase log. Pada fase log, sel-sel bakteri memulai pembagian reguler dengan pembelahan biner.¹⁶ Selama fase log, faktor lingkungan seperti pH dan suhu penting untuk mendukung pertumbuhan bakteri.¹⁷ Sel bakteri terus tumbuh sampai mencapai jumlah sel tetap konstan. Fase ketiga ini disebut fase stasioner. Hasil yang diperoleh ialah kekuatan reduksi merkuri isolate FUA konsisten dengan kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri pada pH netral. Menurut Vetriani et al,¹⁸ bakteri resisten merkuri tinggi mengandung pengkodean merOperon flavoenzim merkuri reduktase yang dapat mengurangi ion Hg^{2+} menjadi Hg^0 yang kurang toksik.

Hasil analisis pada Tabel 2, menunjukkan bahwa isolat bakteri resisten merkuri dapat mengurangi kadar merkuri dalam merkuri anorganik dalam waktu 24 jam pada suhu 15-35°C. Pada pengaruh suhu, persen-

tase merkuri anorganik (HgCl_2) yang tersisa selama 24 jam inkubasi ialah $15^\circ\text{C} = 35,4\%$; $25^\circ\text{C} = 22,7\%$; dan $35^\circ\text{C} = 20,7\%$, sehingga dapat dikatakan bahwa suhu memengaruhi daya reduksi merkuri dari isolat FUA *Bacillus cereus* karena dapat mengurangi kadar merkuri sebesar 79,3% dalam waktu 24 jam pada 35°C . Prescott et al¹⁹ menge-mukakan bahwa pengaruh suhu pada pertumbuhan mikroba ialah karena sensitivitas reaksi yang dikatalisis oleh enzim. Pada suhu rendah, pertumbuhan akan meningkat dua kali lipat, dengan meningkatnya suhu dan laju reaksi akan meningkat

Enzim yang terlibat dalam proses mengurangi merkuri oleh bakteri ialah merkuri reduktase.^{20,21} Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa semakin tinggi suhu semakin rendah kadar merkuri di media, yang menunjukkan semakin tinggi kadar merkuri berkurang oleh enzim merkuri reduktase yang terkandung dalam bakteri isolat FUA. Selain enzim merkuri reduktase yang terlibat dalam proses detoksifikasi merkuri oleh bakteri, terdapat juga enzim liase organomerkuri yang memutus ikatan merkuri organik dengan bakteri tahan merkuri.²²

Terdapat tiga mekanisme respons terhadap merkuri, yaitu: 1) menghambat metabolisme sel sehingga pertumbuhan sel melambat atau sel mati; 2) menginduksi sistem operon yang tahan merkuri agar bekerja sehingga sel tetap hidup bahkan di bawah kondisi yang menekan; dan 3) plasmid yang mengandung gen tahan merkuri masuk ke dalam sel. Isolat bakteri yang dapat hidup pada media dengan kadar merkuri 10 mg/L, 20 mg/L dan 40 mg/L dapat menggunakan mekanisme respons kedua atau bahkan ketiga sehingga bakteri dapat hidup pada media dengan kadar merkuri yang tinggi. Faktor lain yang memengaruhi penurunan konsentrasi merkuri dalam kultur ialah perbedaan jumlah sel bakteri yang tumbuh di media, yang dapat disebabkan oleh perbedaan kondisi pertumbuhan optimal seperti pH dan suhu dari setiap jenis bakteri.²¹

SIMPULAN

Daya reduksi merkuri dari *Bacillus cereus* isolat FUA dipengaruhi oleh pH media dan suhu inkubasi, yaitu daya reduksi merkuri optimal pada media dengan pH 7 dan suhu inkubasi 35°C .

Disarankan untuk penggunaan *Bacillus cereus* isolat FUA pada proses detoksifikasi merkuri dalam lingkungan.

Pernyataan Terima Kasih

Penelitian ini dibiayai oleh DIPA Universitas Sam Ratulangi Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi, Republik Indonesia, melalui Universitas Sam Ratulangi dengan skema penelitian unggulan (RTUU) tahun fiskal 2018.

Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Barkay T, Wagner-Dobler I. Microbial transformation of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in Applied Microbiology*. New Jersey: Department of Biochemistry and Microbiology Cook College, Rutgers University New Brunswick, 2005.
2. Gupta A, Phung LT, Chakravarty L, Silver S. Mercury resistance in *Bacillus cereus* RC607: Transcriptional organization and two new open reading frames. *J Bacteriol*. 1999;181(22):7080-6.
3. Konopka A, Zakharova T, LaPara TM. Bacterial function and community structure in reactors treating biopolymers and surfactants at mesophilic and thermophilic temperatures. *J Ind Microbiol Biot*. 1999;23:127-32.
4. Summers AO. Metal resistance loci of bacterial plasmids: a tribute to Stuart B. Levy. In: White DG, Alekshun MN, McDermott PF, editors. *Frontier in Antimicrobial Resistance*. Washington DC: American Society for Microbiology, 2005.
5. Karamoy ME, Fatimawali, Kepel BJ. Isolasi dan identifikasi bakteri resisten merkuri melalui analisis gen 16SrRna pada urin pasien dengan tumpatan amalgam.

- eBiomedik. 2017;5(2).
6. Talaro KP. Foundations in Microbiology (7th ed). McGraw-Hill Higher Education, 2008.
 7. Lay BW. Analisis Mikroba di Laboratorium. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada, 1994; p. 168.
 8. Cappuccino JG, Sherman N. Microbiology: A Laboratory Manual (3rd ed). California: Benjamin/Cummings Publishing Company, 1992.
 9. Holt JG, Krieg NR, Piter HAS, Eilliama JT. Bergeys Manual of Determinative Bacteriolog (9th ed). Baltimore: Lippincott William and Wilkins, 1994.
 10. Mac Faddin JF. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
 11. Parvin K, Rahman N, Rahman MM, Islam MA. Isolation and characterization of microflora from human urine. *Microbes and Health*. 2013;2(1):15-8
 12. Mandic-Mulec I, Stefanic P, van Elsas JD. Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2):TBS-0017-2013.
 13. Narita M, Matsui K, Huang CC, Kawabata Z, Endo G. Dissemination of TnMERI-like mercury resistance transposons among *Bacillus* isolated from worldwide environmental samples. *FEMS Microbiol Ecol*. 2004;48(1):47-55.
 14. Matsui K, Yoshinami S, Narita M, Chien MF, Phung le T, Silver S, Endo G. Mercury resistance transposons in *Bacilli* strains from different geographical regions. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(5):fnw013.
 15. Zulaika E, Sembiring L, Soegianto A. Characterization and identification of mercury-resistant bacteria from Kalimas River Surabaya-Indonesia by numerical phenetic taxonomy. *JBASR*. 2012;2(7):7263-9.
 16. Koni TNI, Rusman, Hanim C, Zuprizal. Effect of pH and temperature on *Bacillus subtilis* FNCC 0059 oxalate decarboxylase activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2017;20:436-41.
 17. Tanner A, Borneman S. *Bacillus subtilis* YvrK is an acid-induced oxalate decarboxylase. *J Bacteriol*. 2000;182(18):5271-3.
 18. Vetriani C, Chew YS, Miller SM, Yagi J, Coombs J, Lutz RA, Barkay T. 2005. Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl Environ Microb*. 2005;71(1):220-6.
 19. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. Microbiology (4th ed). New York: McGraw-Hill, 1999; p. 55-90.
 20. Fatimawali, Kepel BJ, Tallei TE. Over-production of mercuric reductase protein expressed by synthetic merA gene and reduction of inorganic mercury HgCl₂. *Biosci Res*. 2017;14:1253-60.
 21. Fatimawali, Kepel BJ, Tallei TE. Potential of organic mercury-resistant bacteria isolated from mercury contaminated sites for organic mercury remediation. *Pak J Biol Sci*. 2019;22(1):45-50.