Jurnal Biologi Tropis

Original Research Paper

Molecular Identification and Evaluation of Growth Curves of Bacterial Isolates from Chromium-Contaminated Soil

Salmaa Nabiilah Sajidah, Wahyu Surakusumah*, Peristiwati, Restu Utari Dewina, Nadiya Syafia Shani

Program Studi Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung, Indonesia;

Article History
Received : October 29th, 2026
Revised : November 13th, 2026
Accepted : November 25th, 2026

*Corresponding Author: **Wahyu Surakusumah**, Program Studi Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung, Indonesia;
Email: wahyu_bioupi@upi.edu

Abstract: Hexavalent chromium Cr(VI) released from leather tanning industries is a major environmental pollutant due to its high toxicity and carcinogenic properties. Rhizosphere microorganisms are known to possess adaptive mechanisms that enable them to survive in heavy metal-contaminated environments and therefore have potential applications in bioremediation. This study aimed to identify chromium-resistant rhizobacteria based on biochemical characteristics and 16S rRNA gene analysis and to evaluate their growth responses under exposure to 500 ppm Cr(VI). A descriptive and experimental approach was employed using four bacterial isolates obtained from the rhizosphere of plants growing in chromium-contaminated areas of Sukaregang, Garut, Indonesia. Identification was performed through colony morphology observation, biochemical characterization, and molecular analysis of the 16S rRNA gene. Bacterial growth was evaluated using growth curve analysis in Nutrient Broth media with and without the addition of 500 ppm Cr(VI). The results identified isolate A3 as *Bacillus* sp., isolate A4 as *Bacillus licheniformis*, isolate B1 as *Brevibacillus borstelensis*, and isolate C5 as *Bacillus anthracis*. Exposure to 500 ppm Cr(VI) reduced bacterial growth in most isolates. Statistical analysis revealed significant differences in the growth of *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, and *Brevibacillus borstelensis* between chromium-treated and untreated cultures, whereas no significant difference was observed in the isolate closely related to *Bacillus anthracis*. These findings indicate that the isolates possess varying levels of chromium tolerance and may serve as promising candidates for future chromium bioremediation applications.

Keywords: 16S rRNA; *Bacillales;* Hexavalent Chromium; Rhizobacteria.

Pendahuluan

Kromium merupakan logam berat yang secara alami ditemukan di lingkungan dengan beberapa tingkat oksidasi, terutama kromium trivalen (Cr(III)) dan heksavalen (Cr(VI)) (Chung, 2024). Cr(VI) memiliki toksisitas lebih tinggi dibandingkan Cr(III), bersifat mudah larut dan mobil di lingkungan, serta berpotensi merusak sistem pernapasan, hati, dan ginjal, bahkan bersifat karsinogenik (den Braver-Sewradj et al., 2021). Salah satu sumber pencemaran kromium berasal dari industri penyamakan kulit yang menggunakan Chromosal B sebagai bahan penyamak untuk membentuk ikatan dengan serat kolagen sehingga menghasilkan kulit yang lentur, awet, dan tahan terhadap pembusukan (Oruko et al., 2020). Penggunaan bahan tersebut berpotensi menghasilkan limbah mengandung kromium apabila tidak disertai pengolahan yang memadai. Fachria et al. (2020) melaporkan bahwa sekitar 99% pelaku usaha penyamakan kulit belum memiliki sistem pengolahan limbah yang memadai, dengan produksi limbah cair mencapai 90.000 liter per bulan.

This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

© 2026 The Author(s). This article is open access

Sukaregang, Kabupaten Garut, Jawa Barat, merupakan salah satu kawasan industri penyamakan kulit yang berpotensi mengalami pencemaran kromium. Tingginya kandungan kromium di kawasan tersebut ditunjukkan oleh hasil pengukuran pada sampel tanah yang mencapai 8.578 ppm (Oktaviani et al., 2026). Kondisi ini menunjukkan tingginya paparan logam berat pada lokasi pengambilan sampel dan menjadikan kawasan tersebut relevan untuk eksplorasi mikroorganisme indigenous. Penelitian sebelumnya berhasil memperoleh empat isolat bakteri toleran kromium, yaitu *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, *Bacillus paralicheniformis*, dan *Brevibacillus borstelensis* (Oktaviani et al., 2026). Keberadaan isolat tersebut menunjukkan potensi bakteri indigenous untuk bertahan pada lingkungan tercemar kromium.

Bioremediasi merupakan alternatif pengolahan limbah yang memanfaatkan aktivitas mikroorganisme untuk mengurangi atau mentransformasi senyawa pencemar menjadi bentuk yang lebih rendah toksisitasnya (Saravanan et al., 2021). Bakteri dapat memiliki mekanisme resistensi terhadap kromium melalui reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III), biosorpsi, dan bioakumulasi (Puskhar et al., 2021). Bakteri dari genus *Pseudomonas* dan *Bacillus* diketahui memiliki kemampuan toleransi terhadap Cr(VI) serta berpotensi dalam proses detoksifikasi kromium melalui mekanisme reduksi enzimatik, biosorpsi, dan bioakumulasi. Beberapa spesies, seperti *Pseudomonas putida, Pseudomonas aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*, telah dilaporkan memiliki kemampuan dalam transformasi dan penghilangan Cr(VI) dari lingkungan tercemar (Ramli et al., 2023; Ataabadi et al., 2023; Pattnaik et al., 2024)

Identifikasi bakteri berdasarkan karakteristik biokimia memberikan informasi awal mengenai sifat fenotipik, aktivitas enzimatik, dan kemampuan metabolisme mikroorganisme. Namun, metode ini memiliki keterbatasan dalam membedakan spesies yang berkerabat dekat karena beberapa bakteri dapat menunjukkan karakteristik fenotipik dan biokimia yang serupa. Oleh karena itu, karakterisasi fenotipik perlu dikombinasikan dengan pendekatan molekuler untuk memperoleh hasil identifikasi yang lebih akurat dan spesifik (Helene et al., 2022; da Silva et al., 2023; Arbefeville et al., 2024). Identifikasi molekuler menggunakan gen 16S rRNA merupakan metode yang banyak digunakan untuk menentukan identitas, klasifikasi taksonomi, dan hubungan kekerabatan bakteri. Hal ini karena gen 16S rRNA memiliki daerah konservatif (*conserved regions*) yang memungkinkan amplifikasi menggunakan primer universal serta daerah *hipervariabel* (*hypervariable regions*) yang menyediakan informasi spesifik untuk membedakan kelompok bakteri berdasarkan variasi sekuens nukleotidanya (Soergel et al., 2012; Pérez-Cobas et al., 2020; Combrink et al., 2023). Selain identifikasi, analisis kurva pertumbuhan diperlukan untuk mengevaluasi respons fisiologis bakteri terhadap paparan Cr(VI), melalui pengamatan fase adaptasi, eksponensial, stasioner, dan penurunan pertumbuhan.

Konsentrasi Cr(VI) sebesar 500 ppm dipilih berdasarkan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa empat isolat bakteri asal tanah Sukaregang mampu tumbuh pada konsentrasi tersebut, bahkan *B. paralicheniformis* mampu tumbuh hingga 1.000 ppm (Christofan et al., 2026). Konsentrasi 500 ppm digunakan sebagai kondisi paparan tinggi yang seragam untuk membandingkan dinamika pertumbuhan setiap isolat. Pengujian ini difokuskan pada respons fisiologis bakteri terhadap tekanan kromium, bukan pada penentuan konsentrasi optimum maupun efisiensi penyisihan Cr(VI).

Penelitian Surakusumah et al. (2026) mengenai bioremediasi kromium menggunakan kombinasi bakteri rizosfer indigenous berhasil mengidentifikasi lima genus, yaitu *Pseudomonas, Citrobacter, Bacillus, Azotobacter*, dan *Micrococcus*. Konsorsium Azotobacter dan Micrococcus menunjukkan dinamika pertumbuhan paling stabil, sedangkan kombinasi *Micrococcus* dan *Pseudomonas* menghasilkan penyisihan kromium sebesar 30,78%. Meskipun demikian, penelitian tersebut berfokus pada kinerja konsorsium dan belum mengintegrasikan identifikasi molekuler dengan evaluasi dinamika pertumbuhan masing-masing isolat tunggal pada paparan Cr(VI) tinggi. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat bakteri toleran kromium berdasarkan karakteristik biokimia dan gen 16S rRNA, menganalisis hubungan kekerabatannya,

serta mengevaluasi dinamika pertumbuhan masing-masing isolat pada medium mengandung Cr(VI) 500 ppm. Hasil penelitian diharapkan memberikan informasi taksonomi dan karakteristik fisiologis bakteri indigenous sebagai dasar seleksi isolat potensial untuk penelitian bioremediasi selanjutnya..

Bahan dan Metode

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan pendekatan deskriptif dan eksperimental. Metode deskriptif digunakan untuk mengkarakterisasi isolat bakteri berdasarkan morfologi koloni, uji biokimia, dan pewarnaan Gram sebagai dasar identifikasi karakteristik fenotipik. Karakterisasi tersebut dilanjutkan dengan identifikasi molekuler melalui analisis sekuens gen 16S rRNA untuk menentukan identitas taksonomi dan hubungan kekerabatan bakteri (Hafezi & Khamar, 2024; Plestenjak et al., 2022; Li et al., 2024).

Metode eksperimental dilakukan untuk mengevaluasi respons pertumbuhan bakteri terhadap paparan kromium pada dua kondisi perlakuan, yaitu media tanpa penambahan kromium sebagai kontrol dan media yang ditambahkan Cr(VI) dengan konsentrasi 500 ppm. Pengaruh paparan Cr(VI) terhadap pertumbuhan bakteri dievaluasi melalui pengamatan perubahan densitas optik (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) secara berkala selama periode inkubasi untuk memperoleh kurva pertumbuhan. Penggunaan pengukuran OD_{600} untuk mengevaluasi respons pertumbuhan bakteri pada berbagai konsentrasi Cr(VI), termasuk 500 ppm, telah diterapkan dalam penelitian bioremediasi kromium (Hamed et al., 2025; Adhikary et al., 2025). Seluruh perlakuan eksperimental dalam penelitian ini dilakukan dengan tiga ulangan (triplo).

Populasi dan sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah bakteri indigenous yang berasal dari tanah di sekitar area penampungan limbah kawasan industri penyamakan kulit Sukaregang, Kabupaten Garut, Jawa Barat. Sampel tanah diambil dari area rizosfer tiga jenis tumbuhan, yaitu *Galinsoga parviflora*, *Amaranthus viridis*, dan *Digitaria ciliaris*. Tanah rizosfer dari lingkungan yang terkontaminasi logam kromium digunakan sebagai sumber isolasi bakteri indigenous yang berpotensi memiliki toleransi terhadap Cr(VI). Pendekatan isolasi dan karakterisasi bakteri dari lingkungan penyamakan kulit yang terkontaminasi kromium juga telah diterapkan dalam beberapa penelitian sebelumnya (Kookhaee et al., 2022; Kumar et al., 2023; Khanam et al., 2024; Kabir et al., 2024). Isolat bakteri yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk karakterisasi morfologi, biokimia, dan molekuler, serta pengujian respons pertumbuhan pada media tanpa penambahan kromium dan media yang mengandung Cr(VI).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi autoklaf, botol kultur, bunsen, cawan petri, *centrifuge*, erlenmeyer, gelas ukur 10, 50, 100, dan 500 mL, *hotplate*, inkubator, jarum ose, kuvet disposable, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, mikropipet, neraca analitik, plastik tahan panas, rak tabung reaksi, rak tabung, *microplate (96 well plate)*, *microplate reader*, spektrofotometer UV-Vis, shaker, tabung reaksi, tip pipet, PCR Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler, UV transiluminator, dan alat elektroforesis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), kalium dikromat ($K_2Cr_2O_7$), akuades, 1,5-diphenylcarbazide (DPC), asam sulfat (H_2SO_4), *buffer* fosfat, *buffer* Tris-EDTA (TE) 1X, bubuk agarosa, *loading dye,* DNA *ladder (marker),* GoTaq® Green PCR Master Mix 2X, nuclease-free water, primer forward 27F dan reverse 1492R, serta GelRed® Nucleic Acid Gel Stain.

Prosedur Penelitian

Tahap persiapan

Sterilisasi basah alat dan bahan yang akan digunakan pada suhu 121°C/15 psi selama 10 hingga 15 menit (Jildeh et al., 2021).

Isolasi Bakteri

Kultur murni diperoleh dengan mengambil satu ose isolat bakteri dari kultur stok penelitian sebelumnya, kemudian diinokulasikan secara aseptis pada media Nutrient Agar (NA) miring steril. Kultur selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam untuk memperoleh pertumbuhan bakteri yang optimal sebelum

digunakan pada tahap karakterisasi dan pengujian selanjutnya (Alamsjah et al., 2024; Hathnagoda et al., 2024).

Karakterisasi Fenotipik Isolat

Bakteri yang telah diisolasi diidentifikasi melalui serangkaian pengujian biokimia untuk menentukan karakteristik fisiologis dan metabolisme sebagai dasar identifikasi pada tingkat genus. Pengujian meliputi hidrolisis pati, lipid, kasein, dan gelatin; uji katalase; produksi hidrogen sulfida (H_2S); motilitas; fermentasi karbohidrat; uji susu litmus; serta uji IMViC (indole, methyl red, Voges–Proskauer, dan citrate). Kombinasi pengujian biokimia tersebut digunakan untuk memperoleh profil fenotipik bakteri yang selanjutnya dikombinasikan dengan identifikasi molekuler untuk meningkatkan ketepatan penentuan taksonomi (Arbefeville et al., 2024).

Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

Identifikasi molekuler dilakukan dengan menganalisis gen 16S rRNA. DNA genom isolat diekstraksi dan diamplifikasi menggunakan PCR dengan primer universal 27F dan 1492R. Produk amplifikasi kemudian divisualisasikan melalui elektroforesis gel agarosa dan disekuensing. Urutan basa nukleotida yang diperoleh dianalisis menggunakan BLAST pada basis data GenBank untuk menentukan identitas spesies berdasarkan tingkat kesamaan sekuens (López-Aladid *et al*., 2023; Paul, 2023).

Kurva Baku dan Kurva Tumbuh Bakteri Tunggal

Isolat bakteri yang telah teridentifikasi masing-masing ditumbuhkan pada dua kondisi media, yaitu Nutrient Broth (NB) tanpa penambahan kromium sebagai kontrol dan NB yang ditambahkan Cr(VI) dengan konsentrasi 500 ppm untuk mengevaluasi toleransi dan respons pertumbuhan bakteri terhadap paparan kromium (Plestenjak et al., 2022; Ruparelia & Patel, 2024). Jumlah bakteri hidup dihitung menggunakan metode Total Plate Count (TPC) dan dinyatakan dalam CFU/mL, sedangkan dinamika pertumbuhan diamati melalui pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) setiap 2 jam selama inkubasi pada suhu 37°C selama 24–48 jam (Adhikary et al., 2025; Hamed et al., 2025). Seluruh pengujian dilakukan dengan tiga ulangan untuk membandingkan kemampuan setiap isolat dalam mempertahankan pertumbuhan pada kondisi terpapar Cr(VI).

Analisis Data

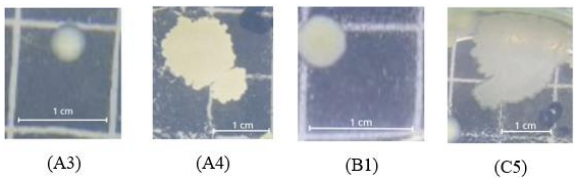
Data pertumbuhan bakteri dianalisis menggunakan IBM SPSS Statistics 26. Kurva pertumbuhan dianalisis menggunakan pendekatan regresi untuk menggambarkan hubungan antara waktu inkubasi dan dinamika pertumbuhan bakteri (Reiter & Vorholt, 2024; Blazanin, 2024). Perbedaan pertumbuhan bakteri antara kelompok kontrol dan perlakuan Cr(VI) dianalisis menggunakan uji Mann–Whitney U apabila data tidak memenuhi asumsi parametrik (Chicco et al., 2025). Pemilihan metode analisis statistik didasarkan pada karakteristik distribusi data dan pemenuhan asumsi pengujian statistik. Seluruh pengujian dilakukan pada taraf signifikansi $\alpha = 0{,}05$.

Hasil dan Pembahasan

Karakterisasi Fenotipik Isolat

Morfologi Bakteri

Gambar 1. merupakan 4 jenis bakteri yang didapatkan dari hasil isolasi bakteri. Penamaaan kode isolat didasari oleh perbedaan morfologi koloni bakteri secara makroskopis. Keempat isolat menunjukkan warna koloni yang seragam, yaitu putih susu. Namun, memiliki perbedaan pada bentuk, tepian, dan elevasi koloni. Isolat A3 dan B1 berbentuk bundar, sedangkan isolat A4 dan C5 berbentuk tidak beraturan. Selain itu, terlihat karakter tepian koloni yang berbeda-beda, yaitu A3 dan A4 bergelombang, B1 bergerigi, atau C5 berfilamen. Elevasi koloni pun ada yang datar maupun timbul pada bagian tengah.



Gambar 1. Morfologi Koloni Bakteri Secara Makroskopis

Uji Biokimia

Karakterisasi isolat selanjutnya dilakukan melalui beberapa uji biokimia sebagai dasar identifikasi awal isolat hingga tingkat genus.

Hasil uji biokimia yang dilakukan terhadap keempat isolat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Biokimia Bakteri

Uji	Isolat			
	A3	A4	B1	C5
Pati	-	+	-	-
Lipid	-	-	+	+
Kasein	+	+	-	+
Gelatin	+	-	-	+
Katalase	+	+	+	+
Produksi H_2S	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-
Motilitas	-	-	-	-
MR	-	-	-	+
VP	-	-	-	-
Sitrat	+	-	-	-
Litmus	+	+	+	+
Fermentasi Karbonhidrat				
Sukrosa	+	+	-	+
Laktosa	-	-	+	-
Dekstrosa	+	+	+	+

Hasil uji biokimia yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan bahwa keempat isolat memiliki karakter fisiologis yang berbeda. Seluruh isolat menunjukkan hasil positif pada uji litmus dan fermentasi dekstrosa, serta negatif pada uji produksi H_2S, indol, dan motilitas. Perbedaan hasil ditemukan pada uji hidrolisis pati, lipid, kasein, gelatin, katalase, sitrat, serta fermentasi sukrosa dan laktosa. Karakteristik tersebut digunakan sebagai dasar identifikasi awal isolat hingga tingkat genus sebelum dilakukan konfirmasi melalui analisis molekuler.

Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

Berdasarkan hasil analisis BLAST terhadap sekuens gen 16S rRNA, Identifikasi hingga tingkat spesies diperoleh pada isolat A4, B1, serta C5. Sedangkan, isolat A3 hanya teridentifikasi hingga tingkat genus. Hal ini diduga disebabkan oleh kualitas data sekuens yang kurang optimal sehingga tingkat kemiripan yang diperoleh belum cukup untuk menentukan spesies secara akurat (Heirgeist *et al.,* 2023). Hasil uji analisis dengan menggunakan BLAST disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Analisis BLAST

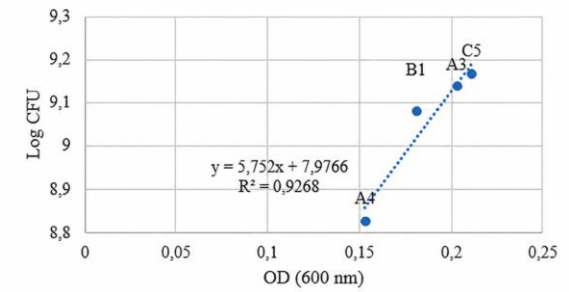
Isolat	Kekerabatan terdekat (closest relationship)	Tingkat kemiripan (similarity level)	Catatan
A3	Bacillus pacificus strain MCCC 1A06182^T (NR_157733.1) Bacillus paramycoides strain MCCC 1A04098^T (NR_157734.1) Bacillus paramanthracis strain MCCC 1A00395^T (NR_157728.1) Bacillus albus strain MCCC 1A02146^T (NR_157729.1) Bacillus cereus ATCC 14579^T (NR_074540.1)	99,84%	639 bp (parsial, primer 27F), Dapat dituliskan sebagai Bacillus sp.
A4	Bacillus paramycoides strain MCCC 1A04098^T (NR_157734.1)	99,86%	1.402 bp
B1	Bacillus paramanthracis strain MCCC 1A00395^T (NR_157728.1)	99,44%	984 bp (parsial)
C5	Bacillus albus strain MCCC 1A02146^T (NR_157729.1)	99,60%	519 bp (parsial, primer 27F)

Berdasarkan Tabel 2, seluruh isolat teridentifikasi sebagai anggota dari ordo *Bacillales*. Isolat A3 memiliki kemiripan tertinggi sebesar 99,84% dengan *Bacillus* sp. strain MCCC 1A01680. Namun, hanya menghasilkan sekuens parsial sehingga identifikasi spesies belum dapat ditentukan secara pasti. Sementara itu, isolat A4, B1, dan C5 berhasil diidentifikasi hingga tingkat spesies dengan tingkat kemiripan masing-masing sebesar 99,38%, 99,44%, dan 99,60%, yang mengarah pada *Bacillus licheniformis*, *Brevibacillus borstelensis*, dan *Bacillus anthracis*. Hasil ini menunjukkan bahwa seluruh isolat termasuk dalam genus *Bacillus* dan

Brevibacillus dengan tingkat kekerabatan yang tinggi terhadap spesies yang teridentifikasi.

Kurva Baku Bakteri Tunggal

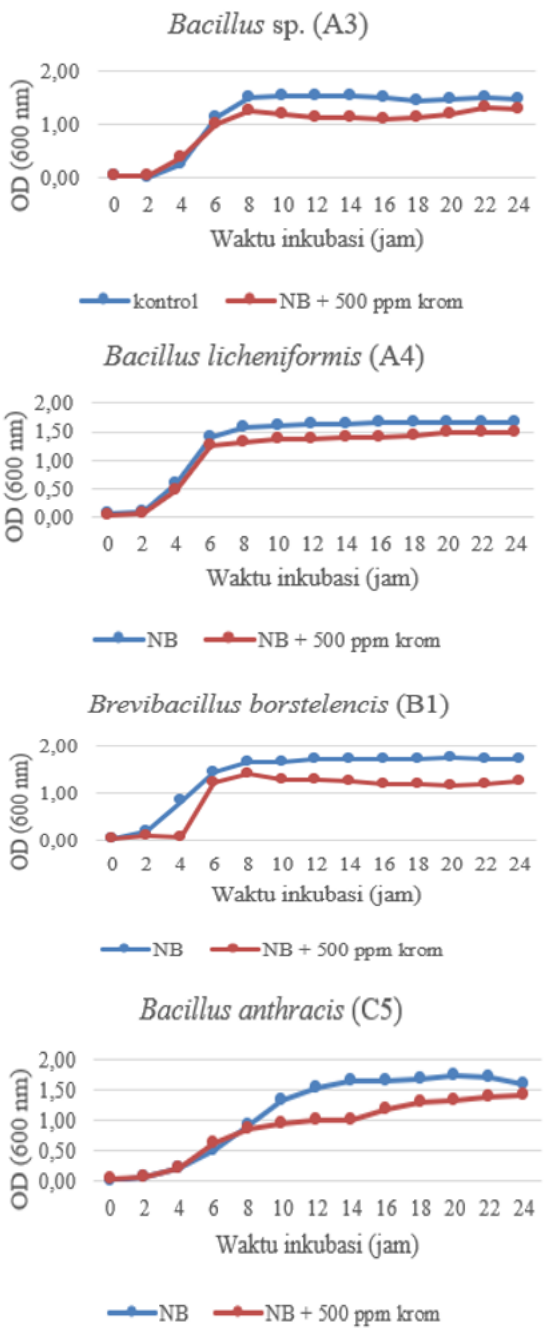
Kurva baku bakteri tunggal digunakan untuk mengetahui hubungan antara nilai absorbansi dan jumlah sel bakteri pada suatu kultur. Kurva baku bakteri tunggal disajikan pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan kurva baku isolat bakteri tunggal pada pengenceran 10^{-6} yang menggambarkan hubungan antara nilai absorbansi pada 600 nm dan jumlah sel bakteri (Log CFU). Persamaan regresi yang diperoleh adalah y = 5,752x + 7,9766 dengan nilai R^2 sebesar 0,9268. Nilai tersebut menunjukkan korelasi yang kuat antara absorbansi dan jumlah sel, sehingga kurva baku dapat digunakan sebagai acuan dalam memperkirakan kepadatan bakteri berdasarkan nilai absorbansi kultur.



Gambar 2. Kurva Baku Isolat Tunggal Pada Faktor Pengenceran 10^{-6}

Kurva Tumbuh Bakteri Tunggal

Isolat yang telah melalui tahap identifikasi dan peremajaan kultur kemudian diinokulasikan ke dalam NB tanpa kromium dan NB yang mengandung 500 ppm kromium. Pertumbuhan bakteri diamati melalui pengukuran nilai absorbansi pada panjang gelombang 600 nm setiap 2 jam selama periode inkubasi 24 jam. Data absorbansi yang diperoleh selanjutnya dibuat dalam bentuk kurva pertumbuhan bakteri yang disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva Tumbuh Bakteri Tunggal

Analisis Data

Tabel 3 menunjukkan bahwa penambahan Cr(VI) 500 ppm memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan *Bacillus* sp., *Bacillus licheniformis*, dan *Brevibacillus borstelensis*. Sedangkan, pertumbuhan *Bacillus anthracis* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara media tanpa Cr(VI) dan media yang mengandung Cr(VI) 500 ppm.

Tabel 3. Hasil Uji Populasi Bakteri Tunggal

Bakteri	Nilai sig (2-tailed)
Bacillus sp	0,016
Bacillus licheniformis	0,010
Brevebacillus borstelensis	0,005
Bacillus anthracis	0,098

Pembahasan

Karakteristik Fenotipik Isolat

Morfologi Bakteri

Karakteristik morfologi koloni merupakan salah satu parameter penting dalam karakterisasi awal bakteri. Pengamatan terhadap bentuk, warna, tepian, elevasi, ukuran, dan tekstur koloni dapat memberikan informasi fenotipik untuk membedakan isolat bakteri sebelum dilakukan identifikasi lebih lanjut (Rattray et al., 2023). Variasi morfologi yang ditemukan pada keempat isolat menunjukkan adanya keragaman karakter fenotipik yang dapat berkaitan dengan perbedaan genetik dan respons bakteri terhadap kondisi lingkungan. Perubahan karakteristik morfologi koloni juga dapat mencerminkan proses diversifikasi fenotipik dan mekanisme adaptasi bakteri selama menghadapi perubahan lingkungan (Kovács, 2023; Spratt & Lane, 2022).

Uji Biokimia

Uji Enzimatik (Pati, Kasein, Gelatin, Lipid)

Hasil uji enzimatik menunjukkan adanya variasi kemampuan hidrolisis substrat organik antar isolat. Isolat A4 merupakan satu-satunya isolat yang menunjukkan hasil positif pada uji pati, yang mengindikasikan kemampuan menghasilkan enzim amilase untuk menghidrolisis ikatan α-1,4-glikosidik pada pati menjadi gula yang lebih sederhana yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi sel bakteri (Farooq *et al*., 2021). Aktivitas proteolitik ditunjukkan oleh isolat A3, A4, dan C5 melalui hasil positif pada uji kasein, sedangkan aktivitas gelatinase hanya ditemukan pada isolat A3 dan C5.

Kemampuan menghidrolisis kasein dan gelatin menunjukkan adanya produksi enzim protease ekstraseluler yang berperan dalam menguraikan protein menjadi peptida dan asam amino yang lebih sederhana (Razzaq *et al*., 2019). Selain itu, isolat B1 dan C5 menunjukkan hasil positif pada uji lipid yang mengindikasikan kemampuan menghasilkan enzim lipase untuk menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan gliserol yang selanjutnya dapat dimanfaatkan dalam proses metabolisme sel (Yao *et al*., 2021). Perbedaan kemampuan hidrolisis substrat tersebut menunjukkan adanya keragaman metabolik antar isolat dalam memanfaatkan sumber nutrien yang tersedia di lingkungan, yang mencerminkan perbedaan kemampuan fisiologis masing-masing isolat.

Uji Katalase

Seluruh isolat menunjukkan hasil positif pada uji katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung setelah penambahan hidrogen peroksida (H_2O_2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa seluruh isolat memiliki enzim katalase yang mampu menguraikan H_2O_2 menjadi air dan oksigen sehingga mengurangi efek toksik senyawa tersebut terhadap sel bakteri (Yuan *et al*., 2021). Enzim katalase merupakan salah satu komponen penting dalam sistem pertahanan bakteri terhadap stres oksidatif yang disebabkan oleh akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Seixas *et al*., 2022).

Kemampuan seluruh isolat menghasilkan enzim katalase mengindikasikan adanya mekanisme adaptasi yang memungkinkan bakteri bertahan pada kondisi lingkungan yang mengandung senyawa oksidatif. Kemampuan tersebut dapat mendukung kelangsungan hidup bakteri pada lingkungan tercemar logam berat karena keberadaan logam berat diketahui dapat meningkatkan pembentukan ROS yang berpotensi merusak komponen sel (Seixas *et al*., 2022).

MR dan VP

Hasil uji Methyl Red (MR) dan Voges Proskauer (VP) menunjukkan adanya perbedaan karakteristik metabolisme fermentatif antar isolat. Isolat C5 menunjukkan hasil positif pada uji MR, sedangkan isolat A3, A4, dan B1 menunjukkan hasil negatif. Hasil positif pada uji MR mengindikasikan bahwa isolat C5 mampu menghasilkan asam-asam organik yang stabil sebagai produk akhir fermentasi sehingga menyebabkan penurunan pH medium secara signifikan (Buckel, 2021). Sebaliknya, hasil negatif pada isolat A3, A4, dan B1 menunjukkan

bahwa ketiga isolat tersebut tidak menghasilkan asam dalam jumlah yang cukup untuk mempertahankan kondisi asam pada medium setelah proses fermentasi. Selain itu, seluruh isolat menunjukkan hasil negatif pada uji VP yang mengindikasikan tidak adanya produksi asetoin sebagai produk akhir utama fermentasi glukosa.

Perbedaan hasil MR antar isolat menunjukkan adanya variasi jalur metabolisme karbohidrat yang dimiliki masing-masing isolat, sehingga mencerminkan keragaman kemampuan fisiologis dalam memanfaatkan sumber karbon (Okano *et al*., 2021). Kemampuan fermentatif yang berbeda antar isolat dapat memberikan keuntungan dalam suatu konsorsium karena memungkinkan pemanfaatan substrat yang lebih beragam serta meningkatkan potensi interaksi sinergis antar mikroorganisme selama proses metabolisme (Rafieenia *et al*., 2022).

Uji Sitrat

Hasil uji sitrat menunjukkan bahwa hanya isolat A3 yang memberikan hasil positif, sedangkan isolat A4, B1, dan C5 menunjukkan hasil negatif. Hasil positif pada uji sitrat mengindikasikan bahwa isolat A3 memiliki kemampuan memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon tunggal melalui aktivitas enzim dan sistem transpor yang memungkinkan sitrat masuk ke dalam sel untuk selanjutnya digunakan dalam proses metabolisme (Jiang *et al*., 2021). Sebaliknya, hasil negatif pada isolat A4, B1, dan C5 menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut tidak mampu memanfaatkan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon pada kondisi pengujian.

Perbedaan kemampuan pemanfaatan sitrat antar isolat menunjukkan adanya variasi karakteristik metabolik yang dimiliki masing-masing isolat. Kemampuan memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon alternatif dapat memberikan keuntungan adaptif bagi bakteri dalam mempertahankan pertumbuhan pada lingkungan dengan ketersediaan nutrien yang terbatas (Okano *et al*., 2021).

Fermentasi Karbohidrat (Sukrosa, Laktosa, dan Dekstrosa)

Hasil uji fermentasi karbohidrat menunjukkan bahwa seluruh isolat mampu memfermentasi sukrosa dan dekstrosa, sedangkan kemampuan memfermentasi laktosa hanya ditemukan pada isolat C5. Kemampuan seluruh isolat memanfaatkan dekstrosa menunjukkan bahwa glukosa dapat digunakan sebagai sumber karbon dan energi utama dalam proses metabolisme sel bakteri (Okano *et al*., 2021).

Hasil positif pada uji fermentasi sukrosa menunjukkan bahwa isolat memiliki kemampuan memanfaatkan sukrosa sebagai sumber karbon melalui proses hidrolisis menjadi monosakarida, yaitu glukosa dan fruktosa, yang selanjutnya dapat digunakan dalam jalur metabolisme energi (Batista *et al.,* 2021). Berbeda dengan sukrosa dan dekstrosa, kemampuan memfermentasi laktosa hanya ditunjukkan oleh isolat C5. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa isolat C5 memiliki kemampuan metabolik untuk memanfaatkan laktosa, yang berkaitan dengan aktivitas enzim β-galaktosidase dalam menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa (Singh *et al.,* 2022). Perbedaan kemampuan fermentasi karbohidrat antar isolat menunjukkan adanya variasi karakteristik fisiologis dan metabolik dalam memanfaatkan sumber karbon. Variasi tersebut dapat mencerminkan perbedaan kemampuan isolat dalam menggunakan substrat karbohidrat tertentu untuk mendukung pertumbuhan dan aktivitas metabolismenya. Keragaman kemampuan tersebut dapat meningkatkan fleksibilitas metabolik suatu konsorsium bakteri karena memungkinkan pemanfaatan substrat yang lebih beragam untuk mendukung pertumbuhan dan aktivitas metabolisme.

Identifikasi Molekuler Berbasis Gen 16S rRNA

Hasil identifikasi molekuler berdasarkan gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh memiliki kekerabatan dekat dengan anggota genus *Bacillus* dan *Brevibacillus*. Analisis gen 16S rRNA merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan dalam identifikasi bakteri karena gen ini memiliki daerah konservatif dan daerah variabel yang memungkinkan penentuan hubungan filogenetik antar mikroorganisme (Johnson *et al*., 2019). Isolat A4 teridentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis*, sedangkan isolat B1 teridentifikasi sebagai *Brevibacillus borstelensis*. Kedua spesies tersebut merupakan bakteri yang umum ditemukan di lingkungan dan telah banyak

dilaporkan berasal dari tanah, sedimen, maupun habitat yang terpapar tekanan lingkungan tertentu (Aulitto *et al.,* 2020; Sharma & Satyanarayana, 2013). Kekerabatan yang dekat antara isolat dan spesies pembanding menunjukkan adanya kesamaan karakter genetik yang diwariskan dari nenek moyang yang sama sehingga menghasilkan hubungan evolusioner yang berdekatan (Johnson *et al*., 2019).

Isolat A3 menunjukkan kedekatan dengan beberapa spesies dalam genus *Bacillus*. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa sekuens gen 16S rRNA yang diperoleh belum memiliki daya diskriminasi yang cukup untuk membedakan spesies-spesies yang berkerabat sangat dekat dalam genus tersebut. Beberapa anggota genus *Bacillus*, khususnya kelompok *Bacillus cereus* diketahui memiliki tingkat konservasi gen 16S rRNA yang sangat tinggi sehingga sering kali sulit dibedakan hanya berdasarkan marker tersebut (Carroll *et al*., 2022; Liu *et al*., 2015). Oleh karena itu, identifikasi hingga tingkat spesies pada kelompok ini umumnya memerlukan marker molekuler tambahan atau pendekatan genomik yang memiliki resolusi lebih tinggi (Liu *et al*., 2015).

Isolat C5 menunjukkan kedekatan dengan *Bacillus anthracis*. Anggota kelompok *Bacillus cereus* termasuk *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, dan *B. paranthracis*, diketahui memiliki hubungan filogenetik yang sangat dekat sehingga batas antarspesies sering kali sulit ditentukan hanya menggunakan gen 16S rRNA (Braun *et al*., 2022; Carroll *et al*., 2022). Secara keseluruhan, hasil identifikasi yang diperoleh telah cukup untuk menunjukkan afiliasi taksonomi isolat, namun pada kelompok bakteri yang memiliki kedekatan genetik tinggi, konfirmasi spesies idealnya didukung oleh analisis molekuler tambahan (Braun *et al*., 2022; Liu *et al*., 2015).

Kurva Baku Bakteri Tunggal

Nilai koefisien determinasi (R^2) yang tinggi menunjukkan bahwa model regresi mampu menjelaskan sebagian besar variasi jumlah sel bakteri berdasarkan nilai optical density (OD). Hal ini mengindikasikan adanya hubungan yang erat antara nilai OD dan kepadatan sel bakteri, sehingga pengukuran OD dapat digunakan sebagai metode tidak langsung untuk memantau pertumbuhan bakteri dalam kultur. Meskipun demikian, hubungan antara OD dan jumlah sel tidak selalu bersifat linear karena nilai OD juga dipengaruhi oleh karakteristik fisik sel, seperti ukuran, bentuk, agregasi, serta pola hamburan cahaya yang dihasilkan oleh suspensi bakteri (Mira et al., 2022).

Pada isolat A4 (Bacillus licheniformis), produksi extracellular polymeric substances (EPS) berpotensi menyebabkan terbentuknya agregat atau flok sel. Kondisi tersebut dapat mengubah distribusi partikel dalam suspensi dan memengaruhi intensitas hamburan cahaya yang terukur, sehingga nilai OD tidak selalu merepresentasikan jumlah sel secara proporsional (Vinothkanna *et al.,* 2021). Sementara itu, isolat B1 (*Brevibacillus borstelensis*) dan C5 (*Bacillus anthracis*) memiliki karakteristik morfologi berbentuk batang. Ukuran sel, susunan sel, serta kecenderungan pembentukan rantai pada bakteri berbentuk batang dapat memengaruhi pola hamburan cahaya dan menghasilkan perbedaan nilai OD pada kepadatan sel yang sama (Koehler, 2009; Mira *et al.,* 2022). Oleh karena itu, interpretasi nilai OD dalam pengamatan pertumbuhan bakteri perlu mempertimbangkan karakteristik morfologi dan kemampuan pembentukan agregat masing-masing isolat. Penggunaan metode *Total Plate Count* (TPC) secara bersamaan juga penting untuk memperoleh estimasi jumlah sel hidup (CFU/mL) dan meningkatkan ketepatan interpretasi hubungan antara nilai OD dan kepadatan populasi bakteri.

Kurva Tumbuh Bakteri Tunggal & Analisis Data

Perbedaan kurva pertumbuhan yang diamati pada masing-masing isolat menunjukkan adanya variasi karakteristik fisiologis dan kemampuan adaptasi bakteri terhadap kondisi lingkungan. Keberadaan kromium dalam medium dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan menyebabkan fase lag berlangsung lebih lama karena sel memerlukan waktu untuk menyesuaikan aktivitas metabolisme serta mengaktifkan mekanisme pertahanan terhadap cekaman lingkungan. Fase lag merupakan periode adaptasi sel sebelum memasuki fase pertumbuhan eksponensial, sedangkan fase stasioner ditandai dengan keseimbangan antara jumlah sel yang tumbuh dan sel yang mengalami

kematian akibat keterbatasan nutrien serta akumulasi produk metabolisme (Fernández-Martínez et al., 2024). Fase stasioner yang relatif panjang pada beberapa isolat dapat mengindikasikan kemampuan mempertahankan populasi sel dalam kondisi nutrisi terbatas, meskipun pengukuran OD saja belum cukup untuk memastikan viabilitas sel selama fase tersebut.

Paparan kromium, khususnya Cr(VI), dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme karena sifat toksiknya dan kemampuannya mengganggu berbagai proses seluler. Cr(VI) dapat memasuki sel melalui sistem transpor anion, kemudian mengalami reduksi intraseluler menjadi bentuk kromium dengan tingkat oksidasi yang lebih rendah. Proses reduksi tersebut berpotensi menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu stres oksidatif dan menyebabkan kerusakan komponen seluler, termasuk protein, lipid, dan DNA (Ayele & Godeto, 2021). ROS merupakan molekul atau spesies reaktif yang mengandung oksigen dan berperan dalam proses pensinyalan fisiologis, tetapi akumulasinya secara berlebihan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel (Sies & Jones, 2020). Selain itu, paparan kromium dapat mengganggu organisasi kromatin dan stabilitas materi genetik, sehingga berpotensi memengaruhi fungsi seluler (VonHandorf et al., 2021). Kondisi stres oksidatif tersebut menyebabkan bakteri perlu mengalokasikan energi dan sumber daya metaboliknya untuk mempertahankan homeostasis serta mengaktifkan sistem perlindungan sel. Akibatnya, sumber daya yang tersedia untuk pertumbuhan dan pembelahan sel dapat berkurang sehingga pertumbuhan bakteri menjadi lebih lambat.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, empat isolat bakteri rizosfer dari tanah tercemar limbah penyamakan kulit di Sukaregang berhasil dikarakterisasi melalui pengujian biokimia dan identifikasi molekuler gen 16S rRNA. Isolat A3 memiliki kedekatan dengan Bacillus sp. (99,84%), isolat A4 teridentifikasi sebagai *Bacillus licheniformis* (99,38%), dan isolat B1 sebagai *Brevibacillus borstelensis* (99,44%). Sementara itu, isolat C5 menunjukkan kemiripan sekuens sebesar 99,60% dengan *Bacillus anthracis*, tetapi identifikasi pada tingkat spesies masih memerlukan konfirmasi menggunakan penanda molekuler tambahan. Paparan Cr(VI) sebesar 500 ppm $K_2Cr_2O_7$ memberikan pengaruh signifikan terhadap pertumbuhan isolat A3, A4, dan B1, sedangkan isolat C5 tidak menunjukkan perbedaan pertumbuhan yang signifikan dibandingkan kontrol. Kepadatan sel akhir seluruh isolat berada pada kisaran 8,826–9,167 log CFU/mL. Hasil tersebut menunjukkan adanya variasi respons pertumbuhan antarisolat terhadap paparan Cr(VI). Penelitian ini memberikan informasi mengenai identitas molekuler dan karakteristik pertumbuhan bakteri rizosfer pada kondisi paparan kromium, yang dapat menjadi dasar untuk penelitian lanjutan mengenai mekanisme toleransi dan potensi bioremediasi. Namun, kemampuan reduksi maupun penyisihan Cr(VI) oleh masing-masing isolat belum dapat disimpulkan karena konsentrasi kromium tidak diukur secara langsung.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) melalui Skema/Program Penelitian Universitas Pendidikan Indonesia dengan Nomor Kontrak 363/UN40.F7/PT.01.01/2026. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Achmad Dinoto, M.Sc. dari Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) atas bantuan dalam proses identifikasi bakteri.

Referensi

Adhikary, S., Saha, B. K., Roy, V., Saha, J., & Pal, A. (2025). Deciphering chromate tolerance and reduction ability of an indigenous *Bacillus* strain isolated from polluted pond sludge for chromium bioremediation. *Scientific Reports, 15*, Article 23323. https://doi.org/10.1038/s41598-025-07031-4

Alamsjah, F., Aswan, D. R., & Agustien, A. (2024). pH and temperature optimization of several bacterial isolates from mangrove waters in the Mandeh Area to produce

cellulase enzyme. *OnLine Journal of Biological Sciences, 24*(3), 367–373. https://doi.org/10.3844/ojbsci.2024.367.373

Arbefeville, S. S., Timbrook, T. T., & Garner, C. D. (2024). Evolving strategies in microbe identification—a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 79*(Supplement 1), i2–i8. https://doi.org/10.1093/jac/dkae275

Ataabadi, M., Hoodaji, M., & Tahmourespour, A. (2023). Chromium (VI) bioremoval from contaminated wastewater using *Pseudomonas aeruginosa* ATHA23 producing biofilm supported on clinoptilolite. *Environmental Geochemistry and Health, 45*(2), 427–442. https://doi.org/10.1007/s10653-022-01345-2

Aulitto, M., Tom, L. M., Ceja-Navarro, J. A., Simmons, B. A., & Singer, S. W. (2020). Whole-genome sequence of *Brevibacillus borstelensis* SDM, isolated from a sorghum-adapted microbial community. *Microbiology Resource Announcements, 9*(48), e01046-20. https://doi.org/10.1128/MRA.01046-20

Ayele, A., & Godeto, Y. G. (2021). Bioremediation of chromium by microorganisms and its mechanisms related to functional groups. *Journal of Chemistry, 2021*, Article 7694157. https://doi.org/10.1155/2021/7694157

Batista, R. D., Melo, F. G., do Amaral Santos, C. C. A., de Paula-Elias, F. C., Perna, R. F., Xavier, M. C. A., & de Almeida, A. F. (2021). Optimization of β-fructofuranosidase production from agrowaste by *Aspergillus carbonarius* and its application in the production of inverted sugar. *Food Technology and Biotechnology, 59*(3), 306–313. https://doi.org/10.17113/ftb.59.03.21.6934

Blazanin, M. (2024). gcplyr: An R package for microbial growth curve data analysis. *BMC Bioinformatics, 25*, Article 232. https://doi.org/10.1186/s12859-024-05817-3

Braun, P., Zimmermann, F., Walter, M. C., Mantel, S., Aistleitner, K., Stürz, I., Grass, G., & Stoecker, K. (2022). In-depth analysis of *Bacillus anthracis* 16S rRNA genes and transcripts reveals intra- and intergenomic diversity and facilitates anthrax detection. *mSystems, 7*(1), e01361-21. https://doi.org/10.1128/mSystems.01361-21

Buckel, W. (2021). Energy conservation in fermentations of anaerobic bacteria. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 703525. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.703525

Carroll, L. M., Cheng, R. A., Wiedmann, M., & Kovac, J. (2022). Keeping up with the *Bacillus cereus* group: Taxonomy through the genomics era and beyond. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 62*(28), 7677–7702. https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1916735

Chicco, D., Sichenze, A., & Jurman, G. (2025). A simple guide to the use of Student's t-test, Mann-Whitney U test, Chi-squared test, and Kruskal-Wallis test in biostatistics. *BioData Mining, 18*, Article 56. https://doi.org/10.1186/s13040-025-00465-6

Christofan, V. B., Surakusumah, W., & Peristiwati, P. (2026). In-vitro chromium bioremediation potential using bacteria consortium from chromium polluted soil. *Jurnal Ilmu Lingkungan, 24*(1), 153–157. https://doi.org/10.14710/jil.24.1.153-157

Chung, S. W. C. (2024). Update on chromium speciation analysis in foods: A review of advances in analytical methods and dietary exposure assessment. Food Additives & Contaminants: Part A, 41(7), 782–789. https://doi.org/10.1080/19440049.2024.2352858

Combrink, L., Humphreys, I. R., Washburn, Q., Arnold, H. K., Stagaman, K., Kasschau, K. D., Jolles, A. E., Beechler, B. R., & Sharpton, T. J. (2023). Best practice for wildlife gut microbiome research: A comprehensive review of methodology for 16S rRNA gene investigations. *Frontiers in Microbiology, 14*, Article 1092216.

https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1092216

da Silva, M. R. F., Souza, K., Bezerra, T., Silva, T., Fernandes, D., Silva, F., Araújo, L., Almeida, A., & Oliveira, M. (2023). Unlocking the molecular realm: Advanced approaches for identifying clinically and environmentally relevant bacteria. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 56*, e12894. https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12894

den Braver-Sewradj, S. P., van Benthem, J., Staal, Y. C. M., Ezendam, J., Piersma, A. H., & Hessel, E. V. S. (2021). Occupational exposure to hexavalent chromium. Part II. Hazard assessment of carcinogenic effects. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 126, Article 105045. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105045

Fachria, R., Ramdan, H., & Aryantha, I. N. P. (2019). Efektivitas pengolahan limbah cair industri penyamakan kulit Sukaregang Garut dengan adsorben karbon aktif dan ijuk. Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan, 3(3), 379–388. https://doi.org/10.36813/jplb.3.3.379-388

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α-amylase: A review. *Archives of Microbiology, 203*(4), 1281–1292. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y

Fernández-Martínez, L. T., Javelle, A., & Hoskisson, P. A. (2024). Microbial primer: Bacterial growth kinetics. *Microbiology, 170*(2), Article 001428. https://doi.org/10.1099/mic.0.001428

Hafezi, A., & Khamar, Z. (2024). The method and analysis of some biochemical tests commonly used for microbial identification: A review. *Comprehensive Health and Biomedical Studies, 3*(2), e160199. https://doi.org/10.5812/chbs-160199

Hamed, M. T., Elwakil, B. H., Hagar, M., Ghareeb, D. A., & Olama, Z. A. (2025). Chromium bioremediation mechanistic action assessment using bacterial consortium isolated from Egyptian Petroleum Refining Company. *Scientific African, 28*, e02642. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2025.e02642

Hathnagoda, R., Gunathilake, P., Buddhinee, T., Welgama, P., Gunarathna, H., Perera, H., & Ranasinghe, K. (2024). Diversity and species composition of midgut symbiotic bacteria in *Culex quinquefasciatus* mosquitoes in Gampaha District, Sri Lanka. *Journal of Tropical Medicine, 2024*, Article 1832200. https://doi.org/10.1155/2024/1832200

Helene, L. C. F., Klepa, M. S., & Hungria, M. (2022). New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. *International Journal of Microbiology, 2022*, Article 4623713. https://doi.org/10.1155/2022/4623713

Hiergeist, A., Ruelle, J., Emler, S., & Gessner, A. (2023). Reliability of species detection in 16S microbiome analysis: Comparison of five widely used pipelines and recommendations for a more standardized approach. *PLOS ONE, 18*(2), e0280870. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280870

Jiang, F., Huang, X., Barbieri, N. L., Logue, C. M., Nolan, L. K., & Li, G. (2021). Citrate utilization under anaerobic environment in *Escherichia coli* is under direct control of Fnr and indirect control of ArcA and Fnr via CitA-CitB system. *Environmental Microbiology, 23*(3), 1496–1509. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15357

Jildeh, Z. B., Wagner, P. H., & Schöning, M. J. (2021). Sterilization of objects, products, and packaging surfaces and their characterization in different fields of industry: The status in 2020. *Physica Status Solidi (A): Applications and Materials Science, 218*(13). https://doi.org/10.1002/pssa.202000732

Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications, 10*, Article 5029.

https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1

Kabir, M. M., Akter, T., Sabur, G. M., Sultana, N., Mamun, M. F. K., Kabir, N., Didar-ul-Alam, M., Islam, M. M., Chaity, F. S., Tijing, L., & Shon, H. K. (2024). Characterization of Cr(VI)-reducing indigenous bacteria from a long-term tannery waste-contaminated soil. *Desalination and Water Treatment, 320*, Article 100861. https://doi.org/10.1016/j.dwt.2024.100861

Khanam, R., Al Ashik, S. A., Suriea, U., & Mahmud, S. (2024). Isolation of chromium resistant bacteria from tannery waste and assessment of their chromium reducing capabilities—A bioremediation approach. *Heliyon, 10*(6), e27821. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e27821

Koehler, T. M. (2009). *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular Aspects of Medicine, 30*(6), 386–396. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.07.004

Kookhaee, F., Bafroee, A. S. T., & Jabalameli, L. (2022). Isolation and characterization of chromium (VI) tolerant bacteria from tannery effluents. *Journal of Environmental Health Science and Engineering, 20*(1), 443–458. https://doi.org/10.1007/s40201-022-00791-5

Kovács, Á. T. (2023). Colony morphotype diversification as a signature of bacterial evolution. *microLife, 4*, uqad041. https://doi.org/10.1093/femsml/uqad041

Kumar, A., Mishra, R., Srivastava, A., Garg, S. K., Singh, V. P., & Arora, P. K. (2023). Diversity of hexavalent chromium-reducing bacteria and physicochemical properties of the Kanpur tannery wastewater. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology, 5*, 205–212. https://doi.org/10.1016/j.enceco.2023.11.001

Li, M.-N., Han, Q., Wang, N., Wang, T., You, X.-M., Zhang, S., Zhang, C.-C., Shi, Y.-Q., Qiao, P.-Z., Man, C.-L., Feng, T., Li, Y.-Y., Zhu, Z., Quan, K.-J., Xu, T.-L., & Zhang, G. F. (2024). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and infectious disease diagnosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 739*, Article 150974. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2024.150974

Liu, Y., Lai, Q., Göker, M., Meier-Kolthoff, J. P., Wang, M., Sun, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2015). Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports, 5*, Article 14082. https://doi.org/10.1038/srep14082

López-Aladid, R., Fernández-Barat, L., Alcaraz-Serrano, V., Bueno-Freire, L., Vázquez, N., Pastor-Ibáñez, R., Palomeque, A., Oscanoa, P., & Torres, A. (2023). Determining the most accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. *Scientific Reports, 13*, Article 3974. https://doi.org/10.1038/s41598-023-30764-z

Mira, P., Yeh, P., & Hall, B. G. (2022). Estimating microbial population data from optical density. *PLOS ONE, 17*(10), e0276040. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040

Okano, H., Hermsen, R., & Hwa, T. (2021). Hierarchical and simultaneous utilization of carbon substrates: Mechanistic insights, physiological roles, and ecological consequences. *Current Opinion in Microbiology, 63*, 172–178. https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.07.008

Oktaviani, A. R., Surakusumah, W., Surtikanti, H. K., Peristiwati, & Dewina, R. U. (2026). Karakterisasi isolat bakteri asal tanah tercemar kromium berdasarkan identifikasi molekuler dan respons pertumbuhan terhadap Cr(VI). *Spizaetus: Jurnal Biologi dan Pendidikan Biologi, 7*(3). https://doi.org/10.55241/spibio.v7i3.851

Oruko, R. O., Selvarajan, R., Ogola, H. J. O., Edokpayi, J. N., & Odiyo, J. O. (2020). Contemporary and future direction of chromium tanning and management in sub Saharan Africa tanneries. Process Safety and Environmental Protection, 133, 369–386. https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.11.013

Pattnaik, S., Dash, D., Mohapatra, S., Pati, S., Devadarshini, D., Samal, S., Pattnaik, M., Maity, S., Mishra, S. K., & Samantaray, D. (2024). Reclamation of chromium-contaminated soil by native Cr(VI)-reducing and PHA-accumulating *Bacillus aryabhattai* CTSI-07. *International Microbiology, 27*(3), 731–742. https://doi.org/10.1007/s10123-023-00421-6

Paul, B. (2023). Concatenated 16S rRNA sequence analysis improves bacterial taxonomy. *F1000Research, 11*, Article 1530. https://doi.org/10.12688/f1000research.128320.3

Pérez-Cobas, A. E., Gomez-Valero, L., & Buchrieser, C. (2020). Metagenomic approaches in microbial ecology: An update on whole-genome and marker gene sequencing analyses. *Microbial Genomics, 6*(8), e000409. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000409

Plestenjak, E., Kraigher, B., Leskovec, S., Mandić Mulec, I., Marković, S., Ščančar, J., & Milačič, R. (2022). Reduction of hexavalent chromium using bacterial isolates and a microbial community enriched from tannery effluent. *Scientific Reports, 12*, Article 20197. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24797-z

Pushkar, B., Sevak, P., Parab, S., & Nilkanth, N. (2021). Chromium pollution and its bioremediation mechanisms in bacteria: A review. *Journal of Environmental Management, 287*, 112279. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112279

Rafieenia, R., Atkinson, E., & Ledesma-Amaro, R. (2022). Division of labor for substrate utilization in natural and synthetic microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology, 75*, Article 102706. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102706

Ramli, N., Othman, A., Kurniawan, S., Abdullah, S., & Abu Hasan, H. (2023). Metabolic pathway of Cr(VI) reduction by bacteria: A review. *Microbiological Research, 268*, 127288. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127288

Rattray, J. B., Lowhorn, R. J., Walden, R., Márquez-Zacarías, P., Molotkova, E., Perron, G., Solis-Lemus, C., Pimentel Alarcon, D., & Brown, S. P. (2023). Machine learning identification of *Pseudomonas aeruginosa* strains from colony image data. *PLOS Computational Biology, 19*(12), e1011699. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1011699

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7*, Article 110. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110

Reiter, M. A., & Vorholt, J. A. (2024). Dashing growth curves: A web application for rapid and interactive analysis of microbial growth curves. *BMC Bioinformatics, 25*, Article 67. https://doi.org/10.1186/s12859-024-05692-y

Ruparelia, J. R., & Patel, H. K. (2024). Harnessing the chromium reduction potential of *Pseudomonas aeruginosa* JRHM33: A comprehensive study on bioinformatics, phenotype microarray, and CCD-RSM optimization. *Heliyon, 10*(15), e35650. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e35650

Saravanan, A., Kumar, P. S., Vo, D.-V. N., Jeevanantham, S., Karishma, S., & Yaashikaa, P. R. (2021). A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. *Journal of Hazardous Materials, 419*, 126451. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126451

Seixas, A. F., Quendera, A. P., Sousa, J. P., Silva, A. F. Q., Arraiano, C. M., & Andrade, J. M. (2022). Bacterial response to oxidative stress and RNA oxidation. *Frontiers in Genetics, 12*, Article 821535. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535

Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Comparative genomics of *Bacillus* species

and its relevance in industrial microbiology. *Genomics Insights, 6*, 25–36. https://doi.org/10.4137/GEI.S12732

Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, 21*(7), 363–383. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3

Singh, P., Arora, S., Singh Rao, P., Kathuria, D., Sharma, V., & Singh, A. K. (2022). Effect of process parameters on the β-galactosidase hydrolysis of lactose and galactooligosaccharide formation in concentrated skim milk. *Food Chemistry, 393*, 133355. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133355

Soergel, D. A. W., Dey, N., Knight, R., & Brenner, S. E. (2012). Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *The ISME Journal, 6*, 1440–1444. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.208

Spratt, M. R., & Lane, K. (2022). Navigating environmental transitions: The role of phenotypic variation in bacterial responses. *mBio, 13*(6), e02212-22. https://doi.org/10.1128/mbio.02212-22

Surakusumah, W., Apriliani, N. I., Kusumawaty, D., Wijanarka, W., Dinoto, A., & Dewina, R. U. (2026). Chromium bioremediation using a combination of two indigenous rhizobacteria in vitro. *Al-Kauniyah: Jurnal Biologi, 19*(2), 271–282. https://doi.org/10.15408/kauniyah.v19i2.44529

Vinothkanna, A., Sathiyanarayanan, G., Balaji, P., Mathivanan, K., Pugazhendhi, A., Ma, Y., Sekar, S., & Thirumurugan, R. (2021). Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine. *International Journal of Biological Macromolecules, 174*, 144–152. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.117

VonHandorf, A., Zablon, H. A., & Puga, A. (2021). Hexavalent chromium disrupts chromatin architecture. *Seminars in Cancer Biology, 76*, 54–60. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.07.009

Yao, W., Liu, K., Liu, H., Jiang, Y., Wang, R., Wang, W., & Wang, T. (2021). A valuable product of microbial cell factories: Microbial lipase. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 743377. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.743337

Yuan, F., Yin, S., Xu, Y., Xiang, L., Wang, H., Li, Z., Fan, K., & Pan, G. (2021). The richness and diversity of catalases in bacteria. *Frontiers in Microbiology, 12*, Article 645477. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645477