

Sistematik Numerik Strain-Strain Anggota Genus *Pseudomonas* Pendegradasi Alkilbenzen Sulfonat Linier Berdasarkan Sifat Fenotip dan *Protein Fingerprinting*

Numerical Systematics of Linear Alkylbenzene Sulphonate-Degrading *Pseudomonas* Strains Based on Phenotype Character and Protein Fingerprinting

Suharjono^{1*}, Langkah Sembiring², Jusup Subagja², Tri Ardyati¹, Lisa Lisdiana¹

1. Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang
E-mail: calistus@brawijaya.ac.id *Penulis untuk korespondensi
2. Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstract

Bacteria strains consisting of *Pseudomonas* sp. strain J and R isolated from river ecosystem polluted and *Pseudomonas* sp. strain A and B isolated from river ecosystem unpolluted by detergent were capable to degrade of LAS. The objective of this research was to determine similarity value by numerically of LAS-degrading *Pseudomonas* strains based on phenotype character and protein fingerprinting using three reference strains consist of *Pseudomonas putida* FNCC071, *P. fluorescens* FNCC070, and *P. aeruginosa* FNCC063. Phenotype characteristics examined are cellular and colony morphology, biochemical nature, capability to degrade polysaccharide, tolerance to various environmental factors and antibiotics, and ability to ferment sugar. Cellular protein fingerprinting was analyzed using SDS-PAGE discontinuous. Strains classification was determined based on Simple Matching Method similarity index by UPGMA (*Unweight Pair Group Method with Average*) algorithm. Based on phenotype nature, all strains have similarity value 0.61; however, based on cellular protein fingerprinting, those strains have similarity value 0.52. All strains of LAS-degraded were including in the genus of *Pseudomonas*.

Key words: *Pseudomonas* strains, phenotype character, numerical systematic, protein fingerprinting, similarity

Diterima: 05 Oktober 2006, disetujui: 28 Februari 2007

Pendahuluan

Linear Alkilbenzen Sulfonat (LAS) merupakan surfaktan anionik yang dominan digunakan dalam formulasi deterjen sintetik (Schoberl, 1989; Jimenez *et al.*, 1991; Campos-Garcia *et al.*, 1999; Jerabkova *et al.*, 1999; Scleheck *et al.*, 2003). Senyawa tersebut saat ini merupakan pencemar utama ekosistem sungai di berbagai kota besar Asia Tenggara (Siguilot dan Nguyen, 1992; Retnaningdyah *et al.*, 1999; Kenzaka *et al.*, 2001). Konsentrasi residu LAS di ekosistem sungai yang sudah melampaui nilai baku 0,5 mg/L bersifat toksik terhadap berbagai organisme akuatik (Zeni dan

Caligiuri 1992; Retnaningdyah *et al.*, 1999 dan 2001). Konsentrasi dan toksisitas residu LAS tersebut dapat direduksi dengan proses biodegradasi menggunakan aktivitas bakteri. Berbagai strain bakteri anggota Genus *Pseudomonas* kelimpahannya predominan dan tersebar luas di ekosistem alami serta berperan dominan dalam mendegradasi senyawa LAS tersebut (Horn *et al.*, 1991; Jimenez *et al.*, 1991; Galli *et al.*, 1992; Van Ginkel, 1996; Campos-Garcia *et al.*, 1999; Jerabkova *et al.*, 1999; Kahnert *et al.*, 2000; Wackett, 2003; Suharjono *et al.*, 2004).

Dua strain yaitu *Pseudomonas* sp. strain J dan R, isolat dari ekosistem Sungai Sawojajar I Kota Malang yang tercemar deterjen, mampu

mendegradasi LAS secara berturut-turut sebesar 52,67% dan 48,9% dalam waktu empat hari. Dua strain lain yaitu *Pseudomonas* sp. strain A dan B, isolat dari ekosistem Sungai Sumbersekar Kabupaten Malang yang tidak tercemar deterjen, mampu mendegradasi senyawa tersebut secara berturut-turut sebesar 41,4% dan 46,1% dalam waktu sembilan hari. Strain-strain anggota genus yang sama tersebut dan berasal dari ekosistem sungai yang berbeda menunjukkan kemampuan biodegradasi yang berbeda terhadap LAS (Suharjono *et al.*, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari lebih mendalam mengenai klasifikasi strain-strain pendegradasi LAS tersebut secara numerik berdasarkan sifat fenotip dan profil pita protein selular menggunakan algoritma UPGMA (*Unweight Pair Group Method with Average*). Sistem klasifikasi ini diharapkan dapat memberikan diskripsi yang baik dan obyektif dari strain-strain tersebut.

Metode Penelitian

Strain-strain bakteri uji

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tiga strain dari ekosistem Sungai Sawojajar I Kota Malang yang tercemar deterjen (*Pseudomonas* sp. strain J, J_{duplo}, dan R), dua isolat dari ekosistem Sungai Sumbersekar Kabupaten Malang yang tidak tercemar deterjen (*Pseudomonas* sp. strain A dan B) serta tiga strain acuan yaitu *Pseudomonas putida* FNCC071, *P. fluorescens* FNCC070, dan *P. aeruginosa* FNCC063. Semua strain tersebut dibiakkan dalam medium *Pseudomonas Agar F Base* yang diberi suplemen CFC (*Cetrimide Fucidine Cephaloridine*) dan mengandung 10 mg/L LAS.

Karakterisasi sifat fenotip bakteri

Identifikasi strain bakteri dengan pendekatan sistematik fenetik dilakukan berdasarkan karakterisasi sifat fenotip secara konvensional menurut Skinner dan Lovelock (1979) serta Collins *et al.*, (1989). Ciri-ciri fenotip bakteri yang diamati meliputi karakter morfologi koloni dan sel, sifat biokimia,

kemampuan biodegradasi, toleransi terhadap berbagai kondisi lingkungan, resistensi terhadap antibiotik, dan pemanfaatan berbagai sumber karbon. Ciri-ciri morfologi koloni yang diamati adalah pigmentasi medium dan koloni, bentuk dan diameter koloni serta kemampuan membentuk biofilm, sedangkan morfologi sel yang diamati meliputi bentuk, panjang, dan diameter sel serta reaksi pewarnaan Gram dan pembentukan endospora. Sifat biokimia strain-strain uji yang dikarakterisasi meliputi motilitas sel, reaksi katalase, koagulase, oksidase, DN-ase, *Methyl Red*, *Voges Proskauer*, reduksi nitrat, pembentukan indol, fermentasi susu, hidrolisis kasein, reaksi BGLB, produksi levan, *Czapek Dox*, pembentukan ammonia, pencairan gelatin, hidrolisis urea dan reaksi simon sitrat, metabolisme dalam media LIA, TSIA, dan SSS. Sifat potensi biodegradasi yang diuji yaitu biodegradasi terhadap amilum, lignin, selulosa, dan ABS. Karakter kemampuan metabolisme menggunakan sumber karbon yang diamati antara lain terhadap senyawa sorbitol, arabinosa, manosa, fruktosa, xylosa, galaktosa, laktosa, manitol, glukosa, sukrosa, dekstrosa, sakarosa, maltosa, ribosa, rhamnosa, melibiosa, dan trehalosa. Sifat-sifat fisiologis strain bakteri yang dikarakterisasi adalah resistensi terhadap antibiotik trimethopim, erythromycin, tetracyclin, chloramphenicol, kanamycin, clarithromycin, cephazolin, ampicilin, aztreonam, azithromycin, apramycin, clindamycin, dan cinoxacin; serta kemampuan tumbuh pada pH 4, 7, dan 9; pertumbuhan pada media dengan NaCl 0,5, 3, dan 6%; pertumbuhan pada suhu 10, 30, 42, dan 60°C.

Karakterisasi profil protein bakteri

Identifikasi strain-strain tersebut dengan pendekatan sistematik kimiawi dilakukan berdasarkan analisis sidik jari protein (*protein fingerprinting*) menurut metode Zarnowski *et al.*, (2001). Protein yang dianalisis berupa total protein selular dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*). Setiap strain dari biakan stok diremajakan ke dalam medium Nutrien Agar yang mengandung 10 mg/L LAS kemudian diinkubasikan 30°C selama 18 jam.

Koloni setiap biakan strain tersebut diambil satu ose penuh dan diinokulasikan ke dalam medium Luria Bertani cair pH 7,0 serta diinkubasikan secara aerobik dalam inkubator *rotary shaker* pada kecepatan 120 rpm, suhu 30°C selama tiga hari. Suspensi biakan setiap strain disentrifugasi pada 10.000 rpm, 4°C selama lima menit. Pelet sel dicuci dengan akuades steril kemudian disentrifugasi kembali. Pelet sel ditambah dengan inhibitor protease *phenyl-methane-sulfonyl-fluoride* satu milimolar dengan perbandingan 1:1 untuk mencegah aktivitas protease.

Pelet yang diperoleh dipanaskan dalam penangas air 39°C selama dua menit kemudian didinginkan 0°C selama 20 menit. Pelet sel tersebut disentrifugasi 10.000 rpm pada 4°C selama lima menit, kemudian disuspensikan dengan 200 µl reagen pelisis sel *Cell lytic™ B-II Bacterial Cell Lysis/Extraction Reagent* (Sigma). Suspensi kemudian diinkubasikan 20 menit pada suhu ruang, selanjutnya disentrifugasi lagi 10.000 rpm pada 4°C selama lima menit. Supernatan disimpan dalam tabung Eppendorf yang baru sebagai sampel protein ekstrak sel bebas debris sel. Sampel tersebut diukur kadar proteinnya dengan metode Biuret menurut Burden dan Whitney (1995).

Sampel protein dianalisis menggunakan *SDS-PAGE* dengan panjang gel 80 mm dan ketebalannya 1,5 mm. Gel yang digunakan adalah gel *discontinuous* yang terdiri atas lima persen *stacking gel* dan 10% *separating gel*. Sampel sebanyak 25 µl diambil dengan *Hamilton syringe* kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel. Protein acuan yang digunakan adalah *Lactate Dehydrogenase* 35 kDa, *Ovalbumine* 45 kDa, *Bovine serum albumine* 66,2 kDa, dan *beta galaktosidase* 116 kDa.

Sampel dalam gel tersebut dielektroforesis pada suhu ruang dengan arus 20 mA. Gel selanjutnya dicuci dengan campuran isopropanol, asam asetat, dan akuades dengan perbandingan 1:3:6 selama 30 menit, setelah itu dicuci dengan campuran methanol, asam asetat, dan akuades pada perbandingan 3:1:6 selama lima menit. Gel kemudian diwarnai dalam satu persen (w/v) *Coomassie Brilliant Blue R-250* selama tiga jam. Warna dalam gel kemudian dilakukan *destaining* menggunakan

campuran larutan methanol, asam asetat, dan akuades pada perbandingan 3:1:6, sampai pita protein terlihat jelas. Masing-masing pita protein dalam gel dari setiap strain bakteri ditentukan berat molekulnya dengan mengukur mobilitas molekul protein dalam gel poliakrilamid berdasarkan kurva baku berat molekul dari protein acuan.

Profil karakter fenotip dan profil sidik jari total protein antarstrain bakteri kemudian dianalisis secara numerik untuk mengetahui nilai similaritasnya. Hasil uji setiap unit karakter yang positif diberi tanda plus (+) sedangkan unit karakter yang negatif diberi tanda minus (-). Data karakter untuk fenotip atau protein yang telah diberi nilai dimasukkan ke dalam komputer dengan menggunakan program *Excell*. Data yang memiliki nilai (+) diubah menjadi 1 dan nilai (-) menjadi 0. Data ini kemudian diolah menggunakan program *CLAD97* (Rahardi, 2002) untuk mengonstruksikan fenogram yang mencerminkan indeks similaritas antarstrain menggunakan algoritma pengklasteran *average linkage (UPGMA: Unweight Pair Group Methode with Arithmetic Average)*. Nilai similaritas ditentukan dengan metode *Simple matching Method (SS_M)* menurut Sneath (1957 *cit.* Sembiring, 2002).

Hasil dan Pembahasan

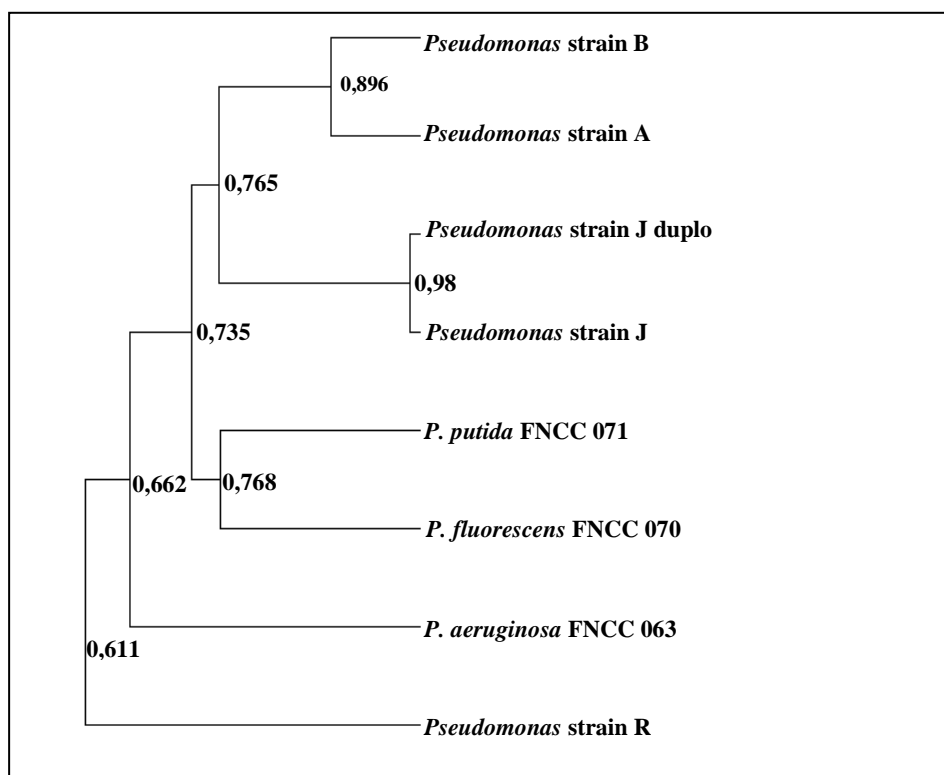
Nilai similaritas paling tinggi berdasarkan sifat fenotipnya (Gambar 1) yaitu 0,99 antara *Pseudomonas* sp. strain J dengan *J_{duplo}*. Kedua strain tersebut berasal dari satu koloni yang dibiakkan secara terpisah. Oleh karena itu kedua isolat tersebut dapat dikatakan satu strain. Kedua isolat tersebut berbeda karena *Pseudomonas* sp. strain J resistensinya intermedier sedangkan *Pseudomonas* sp. strain *J_{duplo}* peka terhadap antibiotik Azithromycin (*AZM15*).

Pseudomonas sp. strain A dan B secara fenotipik memiliki nilai similaritas 0,90. Kedua strain tersebut berbeda pada kemampuan *Pseudomonas* sp. strain A menghasilkan pigmen tidak berfluoresen dan koloni tidak berpigmen sedangkan *Pseudomonas* sp. strain B menghasilkan pigmen berfluoresen yang

terdifusi ke dalam medium *Pseudomonas Agar F Base* dan koloni berpigmen. *Pseudomonas* sp. strain A tersebut juga memiliki sifat tidak mampu menghidrolisis kasein, tidak menghasilkan levan dari sukrosa, mampu mendegradasi lignin dan ABS, sedangkan *Pseudomonas* sp. strain B memiliki sifat sebaliknya. Sifat fenotip lainnya yang berbeda yaitu *Pseudomonas* sp. strain A mampu memfermentasikan arabinosa dan galaktosa menghasilkan asam tanpa gas, tidak memfermentasikan xylosa, responnya intermedier terhadap kanamycin dan mampu tumbuh pada 42°C; sedangkan *Pseudomonas* sp. strain B tidak memfermentasikan arabinosa dan galaktosa, memfermentasikan xylosa menghasilkan asam tanpa gas, peka terhadap kanamycin dan tidak tumbuh pada 42°C. Kedua strain tersebut memiliki nilai similaritas 0,77 terhadap *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo}. Perbedaan fenotip kedua kelompok tersebut yaitu kelompok *Pseudomonas* sp. strain A dan B tidak mereduksi nitrat dan

mampu menggunakan sitrat, sedangkan kelompok strain J memiliki sifat sebaliknya.

Kelompok pertama tersebut juga memiliki sifat memfermentasikan manosa dan glukosa menghasilkan asam tanpa gas, dan memfermentasikan sukrosa, maltosa, rhamnosa, melibiosa, dan trehalosa menghasilkan basa tanpa gas; sedangkan strain J dan J_{duplo} tidak memfermentasikan manosa, rhamnosa, dan melibiosa, memfermentasikan glukosa menghasilkan basa tanpa gas, memfermentasikan sukrosa, maltosa, dan trehalosa menghasilkan asam tanpa gas. Sifat fenotip lainnya pada kelompok pertama yang berbeda dari kelompok kedua yaitu responnya intermedier terhadap tetracyclin dan apramycin serta resisten terhadap clarithromycin, cephalosporin, aztreonam, azithromycin, dan cinoxacin, sedangkan kelompok *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo} peka terhadap tetracyclin, aztreonam, apramycin, dan cinoxacin; responnya intermedier terhadap clarithromycin dan cephalosporin, serta responnya peka atau intermedier terhadap azithromycin.

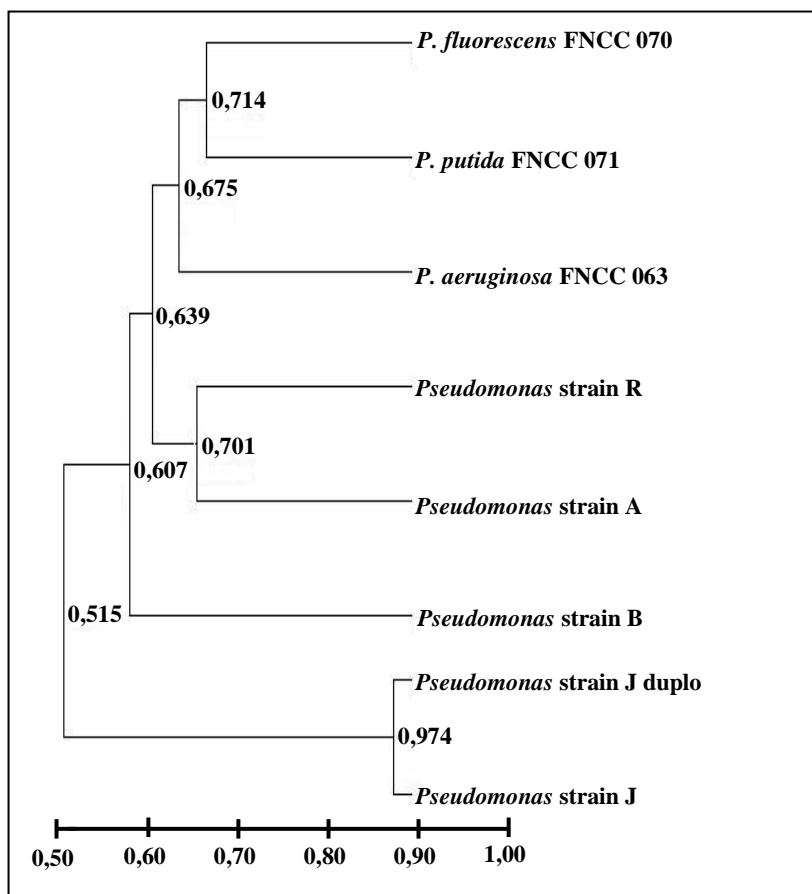


Gambar 1. Fenogram tingkat similaritas delapan strain anggota Genus *Pseudomonas* berdasarkan sifat fenotip

Dua strain acuan yaitu *P. fluorescens* FNCC070 dan *P. putida* FNCC071 memiliki nilai similaritas 0,68. Kelompok kedua strain tersebut secara fenotopik memiliki nilai similaritas 0,73 terhadap kelompok *Pseudomonas* sp. strain A, B, J, dan J_{duplo}; sedangkan *P. aeruginosa* FNCC063 terhadap kelompok besar tersebut memiliki nilai similaritas 0,66. *Pseudomonas* sp. strain R memiliki sifat fenotip yang paling berbeda di antara delapan strain uji, yaitu nilai similaritasnya 0,61 (paling rendah) terhadap kelompok tujuh strain uji lainnya.

Berdasarkan similaritas pita protein selular (Gambar 2 dan 3), menunjukkan bahwa *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo} juga memiliki kemiripan paling tinggi yaitu 0,97. Dari 77 macam protein yang diuji, *Pseudomonas* sp. strain J tidak memiliki protein 89,31 dan 134,13 kDa, sedangkan *Pseudomonas* sp. strain J_{duplo} memiliki kedua protein tersebut. *P. putida* FNCC071 dan *P.*

fluorescens FNCC070 memiliki nilai similaritas 0,71; yaitu keduanya memiliki protein 24,0, 35,0, 39,17, 44,87, 52,47, 66,20, dan 66,34 kDa. Macam-macam protein yang membedakan kedua strain tersebut adalah protein 25,15, 28,50, 30,35, 31,8, 39,59, 41,49, 48,52, 55,85, 59,46, 61,35, 77,58, dan 83,89 kDa dimiliki oleh *P. putida* FNCC071 tetapi tidak dimiliki oleh *P. fluorescens* FNCC070. Protein 27,63, 42,15, 49,28, 56,74, 58,54, 60,4, 63,3, 74,02, 85,21, dan 92,14 kDa dimiliki oleh *P. fluorescens* FNCC070 tetapi tidak dimiliki oleh *P. putida* FNCC071. *P. aeruginosa* FNCC063 lebih mirip dengan kedua strain tersebut dibandingkan dengan strain-strain uji lainnya, dengan nilai similaritas 0,68. Protein-protein yang dimiliki oleh *P. putida* FNCC071 dan *P. fluorescens* FNCC070 tetapi tidak dimiliki oleh *P. aeruginosa* FNCC063 yaitu protein 35,0, 44,87, 52,47, 66,2, dan 66,34 kDa; sedangkan protein 24,0 dan 37,19 kDa dimiliki oleh ketiga strain tersebut.



Gambar 2. Fenogram tingkat similaritas delapan strain anggota Genus *Pseudomonas* berdasarkan sidik jari protein selular

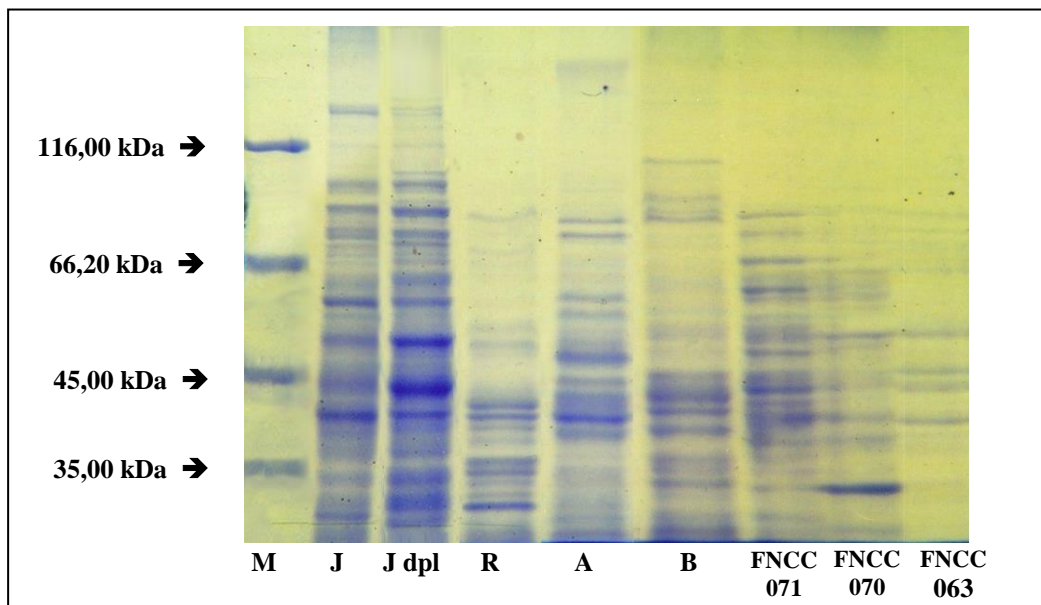
Pseudomonas sp. strain R memiliki nilai similaritas karakter protein selularnya sebesar 0,701 terhadap *Pseudomonas* sp. strain A. Kedua strain tersebut berbeda karena *Pseudomonas* sp. strain R memiliki protein 24,0, 27,63, 28,95, 31,31, 32,81, 34,39, 37,78, 39,59, 57,63, dan 89,31 kDa, sedangkan *Pseudomonas* sp. strain A tidak memiliki protein-protein tersebut tetapi memiliki protein dengan berat molekul 23,63, 25,15, 29,87, 32,30, 35,48, 38,37, 49,28, 54,13, 58,54, 67,39, 71,74, 90,71, dan 154,4 kDa. Kedua strain tersebut memiliki protein 42,15, 44,17, 52,47, 62,32, 78,8, 83,89, dan 95,07 kDa.

Kelompok dua strain tersebut memiliki nilai similaritas 0,64 dengan kelompok ketiga strain acuan. Protein-protein yang dimiliki oleh kelompok tersebut tetapi tidak dimiliki oleh strain acuan yaitu protein 44,17, 62,32, dan 95,07 kDa. *Pseudomonas* sp. strain B memiliki similaritas sifat protein selular 0,61 terhadap kelompok kedua strain tersebut dan ketiga strain acuan, serta protein 40,21, 47,77, 51,65, 81,31, 86,56, 101,21, 130,0, dan 138,39 kDa hanya dimiliki oleh strain tersebut. Kelompok bakteri *Pseudomonas* sp. strain J dan *J_{duplo}* ternyata memiliki similaritas terendah sebesar 0,515 terhadap strain-strain lainnya.

Berdasarkan karakter protein selular, ternyata setiap klaster strain bakteri tersebut memiliki protein spesifik. Kelompok *P. putida*

FNCC071 dan *P. fluorescens* FNCC070 memiliki protein 44,87 dan 66,34 kDa, sedangkan *P. aeruginosa* FNCC063 memiliki protein 34,93, 45,58, dan 52,44 kDa. Kelompok *Pseudomonas* sp. strain R dan *Pseudomonas* sp. strain A memiliki protein spesifik 62,32 dan 95,07 kDa, sedangkan *Pseudomonas* sp. strain B memiliki protein spesifik 40,21, 47,77; 81,31, dan 138,39 kDa. *Pseudomonas* sp. strain J dan *J_{duplo}* memiliki protein yang khas yaitu 24,76, 26,36, 30,82, 36,61, 38,98, 65,31, 72,87, 82,59, 96,57, 116,0, 120,22, dan 125,99 kDa.

Berdasarkan sifat fenotip dan karakter protein selular masing-masing strain uji, menunjukkan bahwa *P. putida* FNCC071 dan *P. fluorescens* FNCC070 memiliki nilai similaritas lebih tinggi dibandingkan terhadap *P. aeruginosa* FNCC063, serta ketiga strain tersebut berada dalam satu kelompok. Hasil ini sesuai sistem klasifikasi berdasarkan kekerabatan 16S rDNA menurut Todar (2004). Sistem klasifikasi berdasarkan pendekatan fenotipik dan protein selular tersebut memberikan hasil yang berbeda. Hal ini disebabkan karakter-karakter fenotip setiap strain uji yang diamati belum mencakup seluruhnya. Berdasarkan sistem klasifikasi secara numerik ini, semakin banyak karakter yang diuji maka hasilnya semakin baik.



Gambar 3. Pola pita protein selular strain-strain bakteri anggota *Pseudomonas* hasil Elektroforesis SDS-PAGE

Berdasarkan sifat fenotipnya, *Pseudomonas* sp. strain A memiliki kemiripan yang tinggi dan satu kelompok dengan *Pseudomonas* sp. strain B, tetapi berdasarkan karakter protein selularnya kedua strain tersebut tidak dalam satu kelompok. Berdasarkan sistem klasifikasi yang pertama tersebut, *Pseudomonas* sp. strain R paling rendah nilai similaritasnya terhadap strain-strain yang lain; tetapi berdasarkan sifat protein, kelompok *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo} yang memiliki similaritas terendah terhadap strain lainnya. Sistem klasifikasi secara numerik berdasarkan protein fingerprinting ternyata lebih efisien, obyektif, dan handal dibandingkan berdasarkan sifat fenotip. Berdasarkan konsep spesies, semua strain uji tersebut merupakan anggota Genus *Pseudomonas* karena memiliki nilai similaritas lebih dari 50% (Vanderpool, 2000), serta *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo} dengan nilai similaritas lebih dari 95% merupakan satu strain.

Kesimpulan

Berdasarkan sifat fenotip dan sidik jari protein, semua strain tersebut merupakan anggota Genus *Pseudomonas*. *Pseudomonas* sp. strain J dan J_{duplo} merupakan satu strain.

Daftar Pustaka

- Burden, D.W. and Whitney, D.B. 1995. *Biotechnology Protein to PCR: A Course in Strategies & Lab. Techniques*. Birkhauser, Boston.
- Campos-Garcia, J., Esteve, A., Vasquez, R., Ramos, J.L. and Soberon-Chaves, G. 1999. The Branched-Chain Dodecyl benzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3730-3734.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. 1989. *Microbiological Methods*. 6th ed. Butterworths, London.
- Galli, E., Silver, S. and Witholt, B. 1992. *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Horn, J.M., Harayama, S. and Timmis, K.H. 1991. DNA Sequence Determination of the TOL Plasmid (pWWO) xyl GFS genes of *Pseudomonas putida*: Implications for the Evolution of Aromatic Catabolism. *Mol. Microbiol.* 5 (10): 2459 – 2474.
- Jerabkova, H., Kralova, B. and Nahlik, J. 1999. Biofilm of *Pseudomonas* C12B on Glass Support as Catalytic Agent for Continuous SDS Removal. *Int. Biodet. Biodeg.* 44: 233 – 241.
- Jimenez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W. and Saylor, G.S. 1991. Mineralization of Linear Alkylbenzene Sulfonate by a four member Aerobic Bacteria Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (5): 1566 – 1569.
- Kahnert, A., Vermeij, P., Wietek, C., James, P., Leisinger, T. and Kartesz, M.A. 2000. The ssu locus Plays a Key role in Organosulfur Metabolism in *Pseudomonas putida* S-313. *J. Bacteriol.* 182 (10): 2869 – 2878.
- Kenzaka, T., Yamaguci, N., Prapagde, B., Mikami, E. and Nasu, M. 2001. Bacterial Community Composition and Activity in Urban Rivers in Thailand and Malaysia. *J. Health Sci.* 47(4): 353-301.
- Rahardi, B. 2002. Pemrograman Aplikasi Konstruksi Kekerabatan Taksonomi Dengan Visual C++6.0. Skripsi. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
- Retnaningdyah, C., Samino, S., Suharjono, Doddy, I. dan Prayitno. 1999. Uji Toksisitas Akut Surfaktan Deterjen LAS dan ABS terhadap Beberapa Gastropoda Sungai. *Natural* 3 (2): 63-74.
- Retnaningdyah, C., Samino, S., Suharjono, Hadi, M. dan Prayitno. 2001. Pengaruh Surfaktan Deterjen (ABS dan LAS) terhadap Kemampuan Regenerasi Planaria (*Dugesia trigrina*). *Natural* 5: 21-26.
- Schleheck, D., Lechner, M., Schonemberger, R., Suter, M.J.F. and Cook, A.M. 2003. Desulfonation and Degradation of the Disulfodiphenylethercarboxylates from Linear Alkyldiphenyletherdisulfonate Surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2): 938 – 944.
- Schoberl, P. 1989. Basic Principles of LAS Biodegradation. *Tens. Surf. Det.* 26(2): 86-94.
- Sembiring, L. 2002. Petunjuk Praktikum Sistematika Mikrobia S-2. Laboratorium Mikrobiologi, fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta.

- Siguillot, J.C. dan Nguyen, M.H. 1992. Complete Oxidation of Linear Alkybenzene Sulfonate by Bacterial Communities Selected from Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1308-1312.
- Skinner, F.A. and Lovelock, D.W. 1979. *Identification Methods for Microbiologist*, 2nd ed. Academic Press, London.
- Suharjono, Ardyati, T. dan Marwati, U. 2004. Seleksi Strain Bakteri Anggota *Pseudomonas* Pengurai LAS (Linear Alkylbenzene Silfonate) Berdasarkan Uji Potensi dan Analisis DNA Plasmid. Laporan Research Grant TPSDP. Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.
- Todar, K. 2004. *Pseudomonas and Its Relatives*. Univ. of Wisconsin-Madison, Dept. of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>.
- Vanderpool, C.R. 2000. *Bacterial Chemistry and Structure*. <http://zoey.med.howard.edu/2003/immuno/3-8-00%208-9AM.htm>. Diakses 19 Januari 2004.
- Van Ginkel, C.G. 1996. Complete Degradation of Xenobiotic Surfactants by Consortia of Aerobic Microorganism. *Biodegradation* 7: 151 – 164.
- Wackett, L. 2003. *Pseudomonas putida* a Versatile Biocatalyst. *Nat. Biotechnol.* 21 (2): 136 – 138.
- Zarnowski, R., Eichel, J., Lewicha, T., Rozycki, H. and Pietr, S.S. 2001. Protein Fingerprinting as a Complementary Tool for the Classification of *Pseudomonas* Bacteria. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6 (4): 913 – 923.
- Zeni, C. and Caligiuri, A.S. 1992. Morphological and Ultrastructural Change Induced by sub Lethal Concentration of an Anionik Detergent on *Ictalurus* species Barbel Taste Buds. *Microbios* 69: 1 – 52.