

# BIODEGRADASI LIMBAH OLI BEKAS OLEH *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1

Witono Basuki

Peneliti Pusat Teknologi Bioindustri  
Badan pengkajian dan penerapan Teknologi

## Abstract

*Mikroorganism has capability to degrade used engine oil was isolated from soil sample contaminated with used engine oil. One of the selected strain TCP C 2.1 was identified by 16s rDNA as Lycinibacillus sphaericus. The microorganism can use hydrocarbon in used engine oil as the sole carbon source and energy, also it significantly degraded almost all hydrocarbon compounds in used engine oil. With its ability the microorganism has potency to be used as a single microbe for bioremediation of soil polluted by engine oil.*

**Key Words:** biodegradation, used engine oil, *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1.

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang.

Oli mesin adalah campuran kompleks hidrokarbon dan senyawa-senyawa organik lain yang digunakan untuk melumasi bagian-bagian mesin mobil agar mesin bekerja dengan lancar<sup>1)</sup>. Setelah masa pemakaian oli sebagai pelumas berakhir, maka oli bekas akan mengandung lebih banyak logam dan *polycyclic aromatic hydrocarbon* (PAH). Dewasa ini oli bekas sering secara ilegal dibuang di lokasi-lokasi yang tidak selayaknya digunakan untuk membuang limbah, pembuangan ilegal oli bekas adalah suatu pencemaran lingkungan yang berdampak global dan menyebabkan keprihatinan yang menarik perhatian publik di berbagai negara<sup>2)</sup>.

PAH bersifat mutagenik dan karsinogenik<sup>3)</sup>. Senyawa PAH bila masuk

ke dalam darah akan diserap oleh jaringan lemak dan mengalami oksidasi dalam hati membentuk fenol. Berikutnya akan terjadi reaksi konjugasi membentuk glukoronida yang larut dalam air, kemudian masuk ke ginjal. Senyawa antara yang terbentuk adalah epoksida yang beracun dan dapat menyebabkan kerusakan pada tulang sumsum. Keracunan PAH yang kronis dapat menyebabkan kelainan pada darah, termasuk menurunnya sel darah putih, zat beku darah, dan sel darah merah yang menyebabkan anemia. Akibatnya, akan merangsang timbulnya preleukemia, kemudian leukemia yang pada akhirnya menyebabkan kanker<sup>4)</sup>.

Untuk mengatasi pencemaran oli bekas dapat diterapkan metode kimia dan fisika, namun kedua metoda ini memerlukan biaya yang tinggi<sup>5)</sup>. Salah satu cara yang ramah

lingkungan adalah dengan bioremediasi, yaitu biodegradasi senyawa pencemar menjadi produk-produk yang lebih sederhana dan tidak berbahaya.<sup>6)</sup>

Biodegradasi oli bekas pada suatu lokasi dapat terjadi karena bantuan berbagai kelompok mikroorganisme, terutama bakteri yang berasal lokasi yang tercemar. Mikro-organisme kelompok ini yang juga dikenal sebagai kelompok petrofil mampu mendegradasi kisaran luas target yang ada pada cemaran berminyak<sup>7)</sup>. Mikroorganisme yang mampu mendegradasi hidrokarbon minyak bumi, antara lain adalah: *Yokenella spp.*, *Alca-ligenes spp.*, *Roseomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacter spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Providencia spp.*, *Sphingobacterium spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Moraxella spp.*, dan *Bacillus spp.*<sup>8)</sup>. Organisma lain seperti jamur juga mampu mendegradasi hidrokarbon dalam oli mesin sampai tingkat tertentu, tetapi memerlukan waktu yang lebih lama untuk tumbuh dibandingkan dengan bakteri<sup>9)</sup>.

Mekanisme bioremediasi pada prinsipnya adalah proses penguraian bahan organik di biosfer yang dilakukan oleh kelompok mikroba perombak (heterotrofik). Mikroba heterotrofik memiliki kemampuan memanfaatkan senyawa organik, dalam hal ini minyak bumi sebagai substrat. Penguraian minyak bumi akan menghasilkan CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, air, biomassa mikroba, serta hasil samping berupa senyawa yang lebih sederhana<sup>10)</sup>. Mikroba petrofil yang ada dalam biosfer dapat diisolasi dan dimurnikan dalam bentuk isolat. Dari isolat yang dikoleksi dapat dipilih galur mikroba perombak yang paling kuat atau yang spesifik untuk merombak hidrokarbon yang terkandung pada oli bekas.

Pada umumnya isolasi bakteri petrofil menggunakan medium yang diperkaya dengan senyawa-senyawa hidrokarbon murni atau campuran hidrokarbon seperti minyak mentah. Lokasi isolasi dapat dipilih dari tempat yang telah lama terkontaminasi oleh oli bekas. Adanya hidrokarbon di lingkungan

tersebut menghasilkan pengayaan secara alami dengan tumbuhnya berbagai jenis bakteri.

Secara umum, biodegradasi atau penguraian senyawa organik oleh mikroba dapat terjadi bila terjadi transformasi struktur di dalam senyawa sehingga terjadi perubahan integritas molekularnya. Proses ini berupa rangkaian reaksi kimia enzimatik yang memerlukan kondisi lingkungan sesuai dengan pertumbuhan dan perkembangbiakan mikroba<sup>11)</sup>.

Biodegradasi senyawa hidrokarbon terbukti memerlukan keberadaan suatu komunitas mikroba yang terdiri dari beberapa jenis mikroba. Penerapan metoda pengayaan telah menghasilkan isolasi berbagai tipe komunitas pendegradasi minyak dan telah memungkinkan penelitian mengenai interaksi antara organisme yang berbeda. Interaksi mikroba petrofil memberi peran penting dalam biodegradasi minyak bumi di alam. Interaksi itu bisa berupa mutualisme, yaitu semua anggota di dalam kultur campuran memperoleh keuntungan dari anggota lainnya, atau berupa komensalisme, yaitu salah satu anggota komunitas memperoleh keuntungan dengan adanya populasi kedua, sedangkan populasi kedua itu tidak memperoleh keuntungan atau kerugian dari populasi pertama.

## 1.2. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk menguji mikroorganisme yang mampu mendegradasi limbah oli bekas yang banyak terbuang secara ilegal di lokasi-lokasi yang tidak ditunjukkan untuk pembuangan oli bekas.

## 2. METODOLOGI

### 2.1. Bahan.

Sampel tanah yang terkontaminasi oli bekas diperoleh dari tanah yang terkontaminasi oli bekas di Kawasan Tangerang, Banten. Sampel tanah secara

aseptik dikum-pulkan menggunakan soil sampler sampai kedalaman 20 cm, dibungkus dengan aluminium foil dan dibawa ke laboratorium dalam waktu 48 jam, untuk kemudian dilakukan isolasi.

Sampel oli bekas yang digunakan sebagai sumber hidrokarbon adalah oli bekas dengan merk *Synthetic Top One Motor Oil SAE 20W-50*, API SL, SJ For Gasoline Engines dari TOP 1 Oil Products Co. (California, USA) yang diperoleh dari bengkel mobil di wilayah Tangerang.

## **2.2. Isolasi Bakteri Pendegradasi Oli Bekas**

Media tumbuh bakteri pendegradasi limbah oli bekas yang digunakan adalah media Bushnell-Hass<sup>12)</sup> yang diperkaya dengan oli bekas sebanyak 10% (v/v) sebagai sumber karbon tunggal bagi mikroba. Komposisi media Bushnell-Hass terdiri dari:  $K_2HPO_4$  1.0 g/L,  $KH_2PO_4$  1.0 g/L,  $NH_4NO_3$  1.0 g/L,  $MgSO_4$  0.2 g/L,  $CaCl_2$  0.02 g/L, dan  $FeCl_3$  0.05 g/L dengan nilai pH 7,0. Kemudian ke dalam media tersebut ditambahkan 1 gram sampel tanah yang tercemar oli bekas sebagai sumber mikroba. Media diinkubasi pada shaker dengan kecepatan 170 rpm, pada temperatur 30°C, selama 1 minggu.

Setelah 1 minggu, 1 ml media yang diperkaya ditransfer ke dalam 9 ml media yang diperkaya baru dan kemudian diinkubasi lagi pada kondisi yang sama seperti yang diuraikan di atas. Setelah diinkubasi selama 1 minggu, media yang diperkaya baru tersebut kemudian diencerkan dengan seri pengenceran sebanyak 6 kali masing-masing (1/10 kali). Larutan hasil pengenceran kelima dan keenam masing-masing diambil 1 ml, dan disebar ke dalam cawan petri yang berisi media agar Bushnell-Hass. Permukaan agar kemudian dilapisi dengan 100 µl oli bekas dan media diinkubasi pada 30°C selama 3-4 hari.

Isolat-isolat yang tumbuh pada media agar Bushnell-Hass kemudian dimurnikan

dengan teknik gores sampai diperoleh koloni tunggal. Isolat murni kemudian diinokulasi pada agar miring dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam dan disimpan pada suhu 4°C sebagai kultur stok. Komposisi media untuk stok adalah yeast ekstrak dengan komposisi: adalah: pepton 5,0 gr; yeast extract 3,0 gr; agar 1,5 %; dan air destilasi 1.000 ml.

## **2.3. Karakterisasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram.**

Karakterisasi mikroba antara lain dilakukan dengan pewarnaan Gram<sup>13)</sup>.

## **2.4. Identifikasi mikroba pendegradasi oli bekas.**

Identifikasi mikroba diawali dengan isolasi DNA genomic isolat TCP C 1.2, yaitu dengan mengisolasi 16s rDNA, kemudian diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') dan primer 1525R (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'). Selanjutnya DNA genomic hasil amplifikasi di sekuen. Hasil sekuen (500 nt) 16s rDNA dari TCP C 2.1 kemudian diuji similaritasnya menggunakan program BLAST Search<sup>14)</sup> (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

## **2.5. Uji Kemampuan Bakteri dalam Mengonsumsi Oli Bekas**

Untuk menguji kemampuan bakteri mengonsumsi oli bekas dilakukan percobaan sebagai berikut: isolat diprakultur pada 20 ml media yeast extract 0,5 %, dan dishaker pada kecepatan 120 rpm, pada suhu 30°C, selama 24 jam<sup>15)</sup>. Selanjutnya, sebanyak 0,2 ml larutan prakultur dipindahkan ke dalam 20 ml media Bushnell-Hass yang mengandung oli bekas sebanyak 400 mg, kemudian dishaker pada kecepatan 120 rpm, pada suhu 30°C. Setelah fermentasi berlangsung selama 7 hari dan 14 hari, kedalam larutan fermentasi ditambahkan

18 ml chloroform-methanol (3:1 v/v) untuk mengekstrak oli bekas yang tersisa.

Campuran solven dan kultur divortek, dan didiamkan selama 2 jam pada temperatur kamar, untuk memisahkan solven yang mengandung oli bekas dan air. Air yang terpisah kemudian dibuang, sedang solven yang mengandung oli bekas dipindahkan ke tabung sentrifuge dan disentrifuge pada 6.000 x g, selama 10 menit pada temperatur kamar. Pelet yang terbentuk dipisahkan dari oli bekas dalam solven. Solven kemudian diuapkan dalam lemari asam selama 3 hari, sedang oli bekas yang tertinggal ditimbang. Persentase oli bekas yang dikonsumsi oleh mikroba dihitung secara gravimetri sebagai berikut:

$$\text{Konsumsi (\%)} = \frac{\text{berat oli awal} - \text{berat oli akhir}}{\text{berat oli awal}} \times 100 \%$$

## 2.6. Analisa Gas Khromatografi Biodegradasi Oli Bekas

Analisa gas khromatografi dilakukan dengan Shimadzu GC-MS QP 2010 dilengkapi dengan flame ionization detector (FID) dengan kolom kapiler Rtx-1MS 100% dimethyl polysiloxane (30 m x 0.25 µm), J & W Scientific, SA,USA. Helium digunakan sebagai pembawa gas dan kecepatan alir dijaga pada 1.54 ml/menit. Satu µl diinjeksikan dengan suhu injection port

280°C; suhu kolom oven 50°C, tekanan 90.7, temperatur kolom dijaga pada 50°C selama 3 menit, kemudian ditingkatkan menjadi 260°C selama 10 menit.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1. Isolasi Bakteri Pendegradasi Oli Bekas dan kemampuan konsumsi oli bekas

Bakteri diisolasi berdasarkan kemampuannya tumbuh pada media Bushnell Hass yang mengandung oli bekas sebagai sumber karbon. Dari 35 isolat yang tumbuh pada media Bushnell Hass, sebanyak 10 isolat menunjukkan mampu mengkonsumsi oli bekas sebagai sumber karbon, isolat TCP C 2.1 dipilih sebagai salah satu isolat terunggul<sup>16</sup>.

### 3.2. Karakterisasi dan Identifikasi Isolat TCP C 2.1

Hasil pengamatan mikroskopis dan uji pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat TCP C 2.1 merupakan bakteri berbentuk batang (*rod*) dan termasuk bakteri gram negatif. Sementara hasil sekuen 16S rDNA isolat TCP C 2.1 mirip (99%) dengan *Lysinibacillus sphaericus*. Oleh karena itu isolat TCP C 2.1 kemudian diidentifikasi sebagai *Lysinibacillus sphaericus* TCP C 2.1

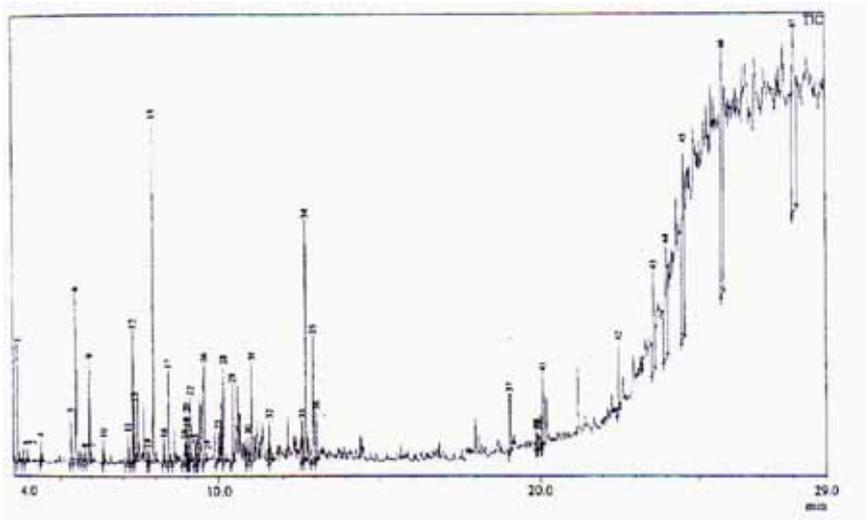
### 3.3. Uji Kemampuan Bakteri dalam Mengkonsumsi Oli Bekas

Tabel 1. Prosentase Oli Bekas yang Dikonsumsi Isolat TCP C 2.1

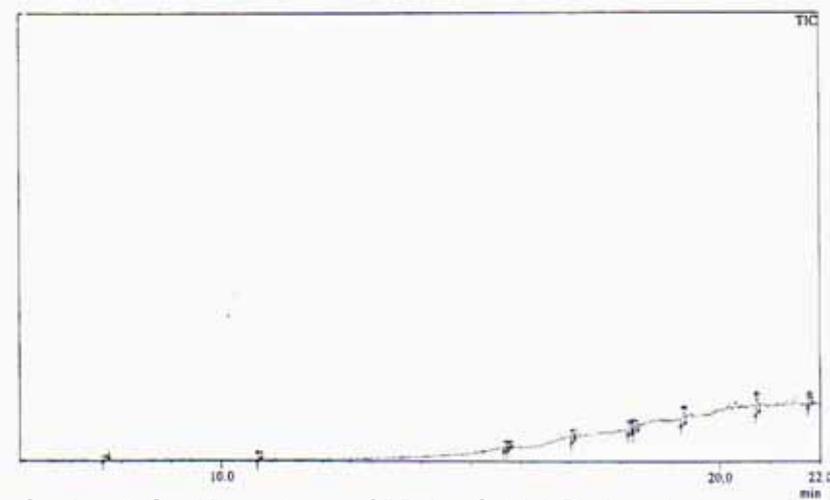
Waktu inkubasi	Berat (Gram)			% Oli bekas yang dikonsumsi
	Berat oli bekas awal	Berat oli bekas akhir	Oli bekas yang dikonsumsi	
1 hari	0.3960	0.3690	0.0000	0.00
7 hari	0.3958	0.3924	0.0034	0.86
14 hari	0.3951	0.3752	0.0199	5.04

Tabel 1 menunjukkan prosentase oli bekas yang dikonsumsi oleh isolat TCP C 2.1. Data tersebut menunjukkan bahwa pada masa inkubasi selama 7 hari, jumlah

oli bekas yang dikonsumsi sebagai sumber karbon adalah sebesar 0.86 %, dan setelah 14 hari, oli bekas yang dikonsumsi sebesar 5.04 %.



Gambar. 1. Gas Khromatogram Oli Bekas Sebelum Biodegradasi.



Gambar. 2. Gas Khromatogram Oli Bekas Setelah Biodegradasi

### 3.4. Analisa Gas Khromtografi Biodegradasi Oli Bekas

Tabel 2. Komposisi Senyawa Penyusun Oli Bekas Sebelum Biodegradasi

No. Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas relatif (%)	Nama Senyawa
1	3,641	1,79	Toluena
2	3,809	0,27	2,5-Dimetilheksana
3	3,939	0,30	2,4-Dimetil heksana
4	4,410	0,38	n-Oktana
5	5,350	0,86	Etilbenzena
6	5,519	3,85	o-Dimetilbenzena
7	5,680	0,45	5-Metilundekana
8	5,815	0,28	3-Metilokatana
9	5,960	1,78	p-Dimetilbenzena
10	6,364	0,37	n-Nonana
11	7,167	0,60	n-Propilbenzena
12	7,314	2,25	m-Etilmetilbenzena
13	7,351	0,97	o-Etilmetilbenzena
14	7,745	0,24	3-Metilonana
15	7,924	5,49	1,3,5-Trimetilbenzena
16	8,271	0,45	n-Decana
17	8,422	1,73	1,2,3-Trimetilbenzena
18	8,622	0,76	Benzosiklopentana
19	8,925	0,50	1,4-Dietilbenzena
20	8,973	0,86	1-Metil-3-propilbenzena
21	9,040	0,64	2-Toliloxirana
22	9,093	1,05	1,4-Dimetil-2-etilbenzena
23	9,238	0,40	1-Methyl-2-propilbenzena
24	9,301	0,21	5,6-Dimetilundekana
25	9,356	0,18	4-Metildekana
26	9,546	2,11	1,2-Dimetil-4-etilbenzena
27	10,009	0,65	n-Undekana
28	10,145	1,75	1,2,3,5-Tetrametilbenzena
29	10,418	1,33	2-Aliltoluena
30	10,910	0,80	Isopropilbenzaldehyd
31	11,048	2,27	Naftalena
32	11,591	0,77	n-Dodekana
33	12,618	1,07	Pentametilbenzena
34	12,732	4,77	2-Metilnaftalena

No. Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas relatif (%)	Nama Senyawa
35	12,956	2,72	3-Metilnaftalena
36	13,047	1,13	n-Tridekana
37	19,071	1,15	n-Oktadekana
38	19,884	0,39	2-Metilantrasena
39	19,936	0,58	1-Metilpenantrena
40	20,042	0,57	1-Metilantrasena
41	20,093	1,61	n-Dodekana
42	22,483	1,57	n-Heneikosana
43	23,602	3,82	n-Eikosana
44	23,985	7,36	n-Tetrakosana
45	24,541	9,41	8-Heksilpentadekana
46	25,776	12,91	Tetrakontana
47	28,025	14,58	n-Tetratriakontana
	Jumlah	100,00	

Tabel 3. Komposisi Senyawa Penyusun Oli Bekas Setelah Biodegradasi

No. Puncak	Waktu Retensi (menit)	Luas relatif (%)	Nama Senyawa
1	7,698	1,16	1,2,5-Tetrametil-1,3-siklo-pentadiena
2	10,748	3,16	3,5-Diisopropil-1,2,4-tritriolana
3	15,717	5,76	2,4-Di-tert-butilfenol
4	15,798	5,63	4-Metil-2,6-di-tert-butilfenol
5	17,064	10,00	n-Heksadekana
6	18,201	10,46	n-Heptadekana
7	18,310	11,87	2,6,10,14-Tetrametilpenta-dekana
8	19,289	21,57	n-Oktadekana
9	20,745	24,23	Asam oleat
10	21,795	6,16	2,5-Dimetil-penantrena
		100,00	

Analisa komponen oli bekas dengan gas kromatografi (GC) ditujukan untuk mengetahui perubahan komposisi yang terjadi pada senyawa hidrokarbon penyusun oli bekas yang diakibatkan oleh aktivitas biodegradasi *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1.

Seperti ditunjukkan pada Gambar 1, hasil analisa GC oli bekas sebelum biodegradasi

menunjukkan bahwa komponen oli bekas terdiri 47 senyawa. Senyawa-senyawa tersebut ditunjukkan oleh puncak-puncak nomor 1 sampai dengan nomor 47 yang muncul pada waktu retensi menit ke-3 hingga menit ke-29. Senyawa-senyawa tersebut terdiri hidrokarbon rantai pendek ( $\leq C_9$ ), hidrokarbon rantai sedang ( $C_{10} - C_{24}$ ), dan hidrokarbon rantai panjang ( $\geq$

C<sub>25</sub>) dalam bentuk linier maupun siklik. Secara lengkap hasil analisa GC komponen senyawa hidrokarbon oli bekas sebelum biodegradasi oli bekas dapat dilihat pada tabel 2. Gambar 2, menunjukkan hasil analisa GC oli bekas setelah biodegradasi *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1. berlangsung selama 14 hari.

Pada hari ke-14 (Gambar 4.9) tampak terjadi penurunan jumlah puncak senyawa hidrokarbon secara signifikan dibandingkan dengan hari ke-1 (Gambar 3). Hidrokarbon rantai panjang ( $\geq C_{25}$ ) dan hidrokarbon rantai pendek ( $\leq C_9$ ) yang terdeteksi pada hari ke-0 (Gambar 1) hilang secara nyata pada hari ke-14. Senyawa hidrokarbon yang ditunjukkan oleh puncak nomor 1 hingga 36 dan puncak nomor 38 sampai 47 pada Gambar 4.8 tidak ditemukan lagi pada hari ke-14 (Gambar 2). Satu-satunya komponen hidrokarbon lama yang masih tersisa dalam jumlah lebih rendah adalah n-Oktadekana. Hal ini menunjukkan bahwa *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1. dapat mendegradasi hidrokarbon rantai panjang dan rantai pendek secara nyata.

Sesuai dengan hasil gas kromatogram oli bekas setelah biodegradasi pada hari ke-14 (Gambar 2), tampak puncak-puncak kecil senyawa baru pada waktu retensi 7 sampai 21 menit yang sebelumnya tidak terdeteksi pada oli bekas sebelum biodegradasi pada hari ke-1. Munculnya senyawa-senyawa baru tersebut diduga merupakan hasil degradasi senyawa berberat molekul tinggi yang tidak terdeteksi oleh kromatografi gas atau merupakan kumpulan fraksi hasil degradasi senyawa-senyawa yang mengalami penurunan luas area puncak<sup>17)</sup>.

Menurut Horowitz<sup>18)</sup>, senyawa-senyawa tersebut memiliki berat molekul rendah karena muncul pada waktu tambat yang lebih awal dan merupakan isomer-isomer alkana bercabang. Secara umum semua hidrokarbon rantai sedang, mulai dari C<sub>10</sub> hingga C<sub>17</sub> kelimpahannya menurun. Menurut Atlas<sup>19)</sup>, hanya sedikit jenis bakteri

yang dapat mendegradasi hidrokarbon yang memiliki percabangan atau struktur cincin, karena hidrokarbon semacam itu sukar untuk masuk ke dalam sel.

Selain terbentuk hidrokarbon rantai sedang, pada hari ke-14 juga terbentuk asam oleat. Terbentuknya asam organik ini diduga disebabkan karena terjadinya pemecahan hidrokarbon rantai pendek. Menurut Cookson<sup>20)</sup>, rantai pendek lebih sulit didegradasi kecuali metana. Untuk mendegradasi rantai pendek tersebut, metana digunakan sebagai *primary substrat* dan mengoksidasi etana, propana, butana sebagai *secondary substrat* membentuk alkohol, aldehyd dan asam karboksilat. Asam organik jenis lain tidak terdeteksi pada hari ke-14, hal ini dapat disebabkan karena terjadinya proses peng-uapan pada asam-asam organik rendah.

## 4. KESIMPULAN DAN SARAN

### 4.1. Kesimpulan

Dari uraian tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1 merupakan mikroba yang secara tunggal potensial untuk mendegradasi limbah oli bekas.

### 4.2. Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang optimasi biodegradasi, peningkatan kemampuan strain, dan uji biodegradasi *Lycinibacillus sphaericus* TCP C 2.1 di lapangan

## DAFTAR PUSTAKA

1. Hagwell, I.S., L.M. Delfino, J.J. Rao. 1992. Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from oil into water. *Environ. Sci. Technol.* 26: 2104-2110.

2. Rolling, W.F.M., M.G. Milner, D.M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R.J.P. Swannell, I.M. Head. 2002. Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient Enhanced Oil Spill Bioremediation. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 68 (11): 5537-5548.
3. Keith LH, WA Telliard 1979. Priority pollutants 1 - a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13: 416-23.
4. Philp, R.B. 1995. Environmental Hazards and Human Health. Lewis Publishers. New York.
5. Metting, F.B. 1993. Soil Microbiology: Application in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. New York.
6. Witono., B. 2007. Bioremediasi Lingkungan Tercemar. *Jurnal Sains, Teknologi dan Budaya Al Azhar Indonesia.* 6 (3): 01-11
7. Barathi S. dan N. Vasudevan. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum contaminated soil. *Environ. Int.* 26: 413 - 416.
8. Bhattacharya, D., P.M. Sarma, S. Krishnan, S. Mishra, B. Lal, 2002. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3): 1435-1441.
9. Prenafeta-Boldu X.F., A. Kuhn, L. Dmam, H. Anke, J.W. Van Groenestijn, J.A.M. De Bont. 2001. Isolation and Characterization of fungi growing on volatile aromatic hydro-carbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Res.* 4: 477-84.
10. Leisinger, A.M. 1981. Microbial Degradation of Xenobiotic & Recalcitrant Compound. London. Academic Press.
11. Sheehan. D. 1955. Bioremediation Proto-cols. Humana Press. New Jersey.
12. Bushnell, L.D. and H.F. Haas. 1941. The utilization of hydrocarbons by micro-organisms. *J. Bacteriol.* 41: 653-673.
13. Balows, A., H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer. 1992. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
14. Program BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
15. Aoshima, H., T. Hirase, T. Tada, N. Ichimura, H. Yamaguchi, M. Taguchi, and T. Myoenzono. 2006. Improvement of Heavy Oil Degradation by *Rhodococcus erythro-polis* C2. *J. Environ. Biotech.* 5(2):107-109.
16. Syahputra, K. dan Witono, B., 2009. Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme Pendegradasi Oli Bekas. Laporan Penelitian Hibah Kompetitif. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan Nasional.
17. Gritter, R.J., J.M.. Bobbin and A.E. Schwating. 1991. Pengantar Khromatografi. Penerbit ITB, Bandung.
18. Horowitz, A., D. Gutnick, dan E. Rosenberg. 1975. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Appl. Microbiol.* 30 (1): 10-19.
19. Atlas, R.M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon: An Environment Perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180.
20. Cockson, J.T. 1995. Bioremediation Engineering: Design and Application. McGraw-Hill, Inc., Toronto.