

Biodegradasi Minyak Solar Menggunakan Isolat Bakteri Indigenous Mangrove Tritih Kulon, Cilacap

Pangeran Andareas

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Prima Indonesia, Jl. Raya Babelan KM 9,6, Bekasi

Surel: pangeranandareas@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri dari Mangrove Tritih Kulon, Cilacap dan mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam mendegradasi minyak solar. Isolasi dilakukan menggunakan medium SMSS + 2% minyak solar. Diperoleh 8 isolat bakteri yang diduga mampu mendegradasi minyak solar. Skrining terhadap 8 isolat dilakukan dengan metode pewarnaan *lugol's iodine* untuk memilih 2 isolat terbaik dalam mendegradasi minyak solar. Identifikasi terhadap ke 2 isolat menggunakan API 20 NE (Biomeriux), diketahui bahwa Isolat F *Aeromonas hydrophila* dan Isolat H *Burkholderia cepacia*. Uji biodegradasi minyak solar dilakukan menggunakan isolat tunggal, campuran dan kontrol. Sisa minyak solar hasil uji biodegradasi pada isolat F sebesar 41 %, isolat H sebesar 26 %, campuran (Isolat F + Isolat H) sebesar 38 % dan kontrol (tanpa isolat) sebesar 79 %. Hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) menunjukkan beberapa senyawa minyak solar yang mengalami penurunan konsentrasi. Senyawa-senyawa yang diduga mengalami degradasi pada perlakuan kontrol (*hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *dodecane*), *Aeromonas hydrophila* (*heptadecane* dan *pentadecane*), *Burkholderia cepacia* (*heptadecane* dan *pentadecane*) dan campuran (*hexadecanoic acid*, *methyl ester* dan *octadecenoic acid*, *methyl ester*).

Kata kunci : mangrove, biodegradasi, gas chromatography-mass spectroscopy

Abstract

This study aims to obtain bacterial isolates from Mangrove Tritih Kulon, Cilacap and determine the ability of the bacterial isolates to degrade diesel oil. Isolation used SMSS medium + 2% petroleum diesel. Retrieved 8 suspected bacterial isolates capable of degrading diesel oil. Screening for 8 isolates performed with Lugol's iodine staining method for selecting the best 2 isolates in degrading diesel oil. Identification of the 2 isolates used API 20 NE (Biomeriux), F isolate was identified as Aeromonas hydrophila and H isolate was Burkholderia cepacia. Diesel oil biodegradation test used a single isolate, consortium of two and control. Residual diesel oil biodegradation test results on F isolate by 41%, 26% H isolate, consortium (F + H Isolates) by 38% and control (without any isolates) by 79%. The analysis of Gas Chromatography-Mass spectroscopy (GC-MS) indicated that the biodegradation processes decreased the concentration of various compounds. The compounds were thought to be degraded in the control treatment

(*hexadecanoic acid, methyl ester and dodecane*), *Aeromonas hydrophila* (*heptadecane and pentadecane*), *Burkholderia cepacia* (*heptadecane and pentadecane*) and consortia (*hexadecanoic acid and octadecenoic acid methyl ester, methyl ester*).

Keywords: mangrove, biodegradation, gas chromatography-mass spectroscopy

1. Pendahuluan

Ekosistem mangrove dikenal sebagai salah satu ekosistem yang dinamik karena pengaruh fisika, kimiawi dan biologis seperti pasang surut air laut, asupan air tawar dari daratan, akumulasi mineral dan polutan dari daratan dan proses dekomposisi materi, serta aktivitas mikroorganisme (Soedradjat, 2003). Ekosistem mangrove kaya akan bahan organik, hal ini diduga akan mempengaruhi kelimpahan dan keanekaragaman plasma nutfah salah satunya adalah mikroorganisme, sehingga perlu dilakukan upaya eksplorasi untuk pemamfaatan optimum. Kondisi mangrove yang demikian ternyata memiliki tingkat pencemaran perairan yang cukup tinggi.

Salah satu penyebab pencemaran ekosistem mangrove yaitu limbah minyak solar (hidrokarbon) yang bersifat rekalsitran (sulit mengalami biodegradasi atau dekomposisi) dari antara lain kegiatan industri, transportasi, pengeboran, proses produksi, dan tumpahan minyak. Pencemaran tersebut dapat mempengaruhi kehidupan organisme pada lingkungan tersebut, sehingga perlu dilakukan suatu upaya untuk menyelesaikan pencemaran tersebut.

Usaha penyelesaian masalah pencemaran perairan oleh minyak solar dapat dilakukan dengan pemanfaatan mikroba. Mikroba pendegradasi hidrokarbon akan mengurai pencemar lingkungan perairan (minyak solar).

Beberapa jenis bakteri yang merupakan pendegradasi hidrokarbon yang efektif di lingkungan alami telah diisolasi antara lain *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aeromonas* sp., *Alcaligenes paradoxus*, *Bacillus licheniformis*, *Flavobacterium lutescens*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Vibrio paraheamolyticus* (Kayode-Isola *et al.*, 2008)

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri dari Mangrove Tritih Kulon, Cilacap dan mengetahui kemampuan isolat bakteri tersebut dalam mendegradasi minyak solar dengan menggunakan kultur tunggal dan campuran isolat bakteri.

2. Metode Penelitian

a. Isolasi Mikroba Pendegradasi Minyak Solar.

Isolasi mikroba pendegradasi minyak solar dari tanah rhizosfer tanaman mangrove Tritih Kulon, Cilacap dengan menggunakan media yang ditambahkan minyak solar sebagai satu-satunya sumber karbon. Media yang digunakan adalah medium basal *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS) yang merupakan campuran dari CaCO_3 , NH_4NO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , bacto agar, akuades.

b. Seleksi Isolat Bakteri Terbaik Dalam Mendegradasi Minyak Solar.

Proses seleksi dipilih 2 isolat bakteri terbaik dalam mendegradasi minyak solar menggunakan teknik perwarnaan dengan *lugol's iodine* berdasarkan luas zona jernih yang terbentuk disekitar koloni bakteri (Lie *et al.*, 2011).

c. Identifikasi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar.

Identifikasi bakteri dilakukan secara biokimia menggunakan API 20 NE. Proses identifikasi diawali dengan menumbuhkan bakteri pada medium Natrium Agar (NA) dan diinkubasi selama 24 jam.

d. Uji Kemampuan Bakteri Dalam Mendegradasi Minyak Solar (Modifikasi Odjajare *et al.*, 2008).

Isolat bakteri dengan jumlah 10^7 yang telah dimurnikan di inokulasikan ke dalam medium mineral cair (SMSS) yang mengandung 2% (v/v) minyak solar. Medium yang berisi biakan tersebut diinkubasi pada suhu 30°C dan diguncangkan di atas shaker dengan kecepatan 120 rpm. Konsentrasi minyak solar sisa dihitung pada hari ke-0 dan ke-14. Hal tersebut dilakukan pada interval waktu 14 hari dimaksudkan untuk memperoleh nilai yang cukup signifikan pada saat pengukuran konsentrasi minyak solar sisa. Hal yang sama dilakukan pada isolat konsorsium dan perlakuan tanpa penambahan isolat sebagai kontrol sebagai parameter.

e. Ekstraksi Minyak Solar (Modifikasi Greenberg *et al.* 1992, diacu dari Udiharto 1995).

Medium perlakuan diekstraksi pada akhir inkubasi (14 hari) dengan menambahkan 25 ml kloroform ke dalam tabung perlakuan kemudian dimasukkan ke dalam corong pemisah dan dikocok perlahan selama 15 menit sampai larutan terpisah dua bagian, diulangi ekstraksi ini sampai 3 kali. Bagian atas yang berupa air dikeluarkan sedangkan bagian bawah ditampung dalam pinggan porselin. Ekstrak dalam pinggan porselin tersebut dimasukkan ke dalam *rotary evaporator* pada suhu 80 °C selama 15 menit. Ekstrak dimasukkan dalam tabung vial dan dipanaskan menggunakan *hot plate* pada suhu 100 °C selama 30 menit kemudian ditimbang sampai bobotnya konstan.

Bobot minyak solar sisa dihitung dengan menggunakan rumus :

$$KM = \frac{B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

KM = Kadar minyak solar sisa (%)

A = Kadar minyak solar awal (g)

B = Kadar minyak solar setelah uji biodegradasi (g)

f. Perhitungan Jumlah Bakteri

Masing- masing perlakuan diamati populasi mikrobanya dengan metode TPC (*Total Plate Count*) didasarkan pada nilai cfu (*colony forming unit*) dengan cara *pour-plate* pada media NA. Pengamatan dilakukan pada hari ke-0, hari ke-7 dan hari ke-14.

g. Pengukuran Nilai pH

Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan buffer standard (pH= 4,01; 7,01 dan 10,01). Penentuan nilai pH menggunakan pH meter yang dicelupkan ke dalam larutan perlakuan dengan digerakkan perlahan sampai menunjukkan nilai konstan. Setiap kali selesai pengukuran pH larutan, *sensitive head electrode* dicuci dengan akuades. Pengukuran pH dilakukan pada hari ke-0, hari ke-7 dan hari ke-14.

3. Hasil Dan Pembahasan

a. Isolasi, Seleksi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar

Sebanyak 8 isolat bakteri berhasil diisolasi dari rhizosfer tanaman Mangrove Tiritih Kulon, Cilacap. Isolat bakteri yang diperoleh merupakan isolat yang berasal dari koloni representatif yang tumbuh pada permukaan medium (SMSS padat + 2% solar). Hasil isolasi dapat dilihat pada Tabel 1. Koloni yang tumbuh pada permukaan agar diperkirakan koloni bakteri pendegradasi hidrokarbon. Hal tersebut karena medium yang digunakan untuk isolasi merupakan medium selektif yang mengandung senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon. Kemudian untuk menentukan isolat unggul dilakukan seleksi lanjutan, hasilnya disajikan pada Gambar 1.

Konsentrasi minyak solar yang digunakan dalam penelitian sebesar 2% (v/v). Hal tersebut bertujuan agar bakteri dapat menggunakan minyak solar untuk pertumbuhan. Sadouk *et al.*, (2009) melaporkan bahwa konsentrasi minyak solar lebih dari 3% (v/v) akan menghambat pertumbuhan bakteri.

Koloni yang tumbuh pada medium (SMSS pada + 2% solar) selanjutnya diinokulasikan ke medium NA dalam cawan petri untuk dilakukan pemurnian dan karakterisasi menggunakan metode *strek quadrant*. Selanjutnya koloni tunggal yang tumbuh kemudian dipindahkan ke medium miring NA sebagai stok. Isolat yang didapat diberi kode isolat A-H. Seleksi dilakukan terhadap delapan.

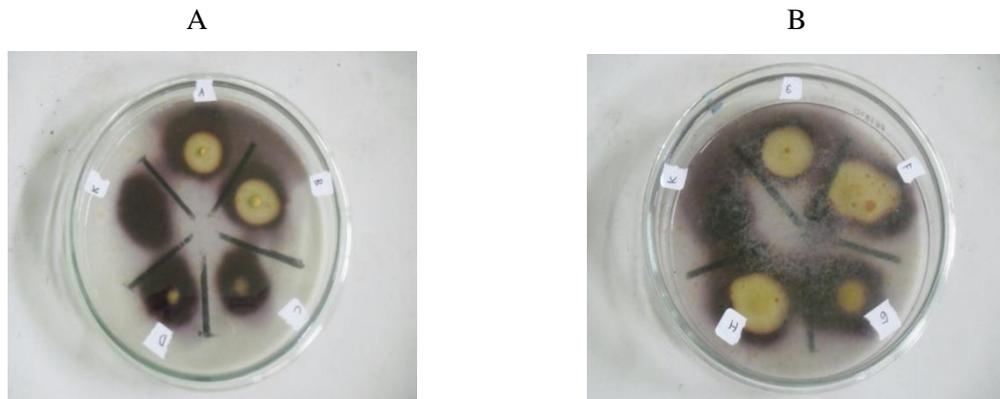
Tabel 1.

Karakterisasi hasil isolasi bakteri pendegradasi minyak solar pada media NA.

Kode Isolat	Bentuk Koloni	Permukaan Koloni	Tepi Koloni	Elevasi Koloni	Warna Koloni	Gram	Morfologi Sel
A	Tak teratur	Kasar	Berombak	Muncul	Putih	Negatif	Batang
B	Bulat	Halus	Halus	Muncul	Putih	Negatif	Kokus
C	Bulat	Halus	Halus	Rata	Putih transparan	Negatif	Kokus
D	Bulat	Halus	Halus	Muncul	Krem	Negatif	Kokus
E	Bulat	Halus	Halus	Muncul	Putih mengkilat	Positif	Batang
F	Bulat	Halus	Berlekuk	Muncul	Putih transparan mengkilat	Negatif	Kokus
G	Bulat	Halus	Halus	Cembung	Krem tua	Negatif	Kokus
H	Bulat	Halus	Halus	Muncul	Putih agak cream mengkilat	Negatif	Kokus

Isolat bakteri yang diperoleh untuk memilih dua isolat terbaik dalam mendegradasi minyak solar. Seleksi isolat-isolat tersebut dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat bakteri pada media NA, kemudian diinkubasi selama 24 jam setelah itu koloni bakteri ditetesi dengan *Lugol's iodine*. Zona jernih yang terbentuk di sekeliling koloni disebabkan oleh tingginya afinitas *lugol's iodine* terhadap biosurfaktan yang dihasilkan bakteri untuk mendegradasi senyawa organik dan anorganik (Lie *et al.*, 2011; Usharani *et al.*, 2012; Fossi dan Tavea, 2013), diduga interaksi tersebut juga terjadi antara *lugol's iodine* dengan enzim pendegradasi minyak solar yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Hasil seleksi isolat-isolat tersebut dipilih dua isolat terbaik dalam mendegradasi minyak solar yaitu isolat F dan H (Gambar 1). Seleksi isolat-isolat tersebut dilakukan berdasarkan zona jernih terluas yang terbentuk di sekeliling koloni.

Dua isolat terbaik hasil seleksi diidentifikasi menggunakan uji biokimia API 20 NE. Hasil identifikasi diketahui yaitu isolat F merupakan spesies *Aeromonas hydrophila*, sedangkan isolat H adalah *Burkholderia cepacia*. Kedua isolat tersebut merupakan bakteri yang memiliki kemampuan dalam mendegradasi hidrokarbon (Supriadi, 2006; Hamzah *et al.*, 2010). Selanjutnya kedua isolat tersebut diujikan pada medium cair yang mengandung minyak solar untuk mengetahui kemampuan degradasi minyak solar.



Gambar 1. Seleksi isolat unggul pendegradasi minyak solar menggunakan teknik pewarnaan *Lugol's iodine*.
(A) Isolat A, B, C, D, Kontrol (K) ; (B) Isolat E, F, G, H, Kontrol (K).

b. Pola pertumbuhan isolat bakteri selama proses biodegradasi minyak solar

Dari hasil pengamatan terhadap isolat bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia* dan isolat campuran dapat tumbuh dan mampu menggunakan minyak solar yang terdapat pada medium, sebagai sumber karbon untuk proses metabolisme. Perhitungan pertumbuhan pada hari ke-0, 7 dan 14 inkubasi menunjukkan pola pertumbuhan yang sama diantara isolat, seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacia* dan

Isolat	Jumlah Sel (CFU/ml)		
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10^7	$6,5 \times 10^9$	$4,12 \times 10^{10}$
<i>Burkholderia cepacia</i>	10^7	$1,36 \times 10^{10}$	$7,12 \times 10^{10}$
Campuran	10^7	$1,09 \times 10^{10}$	$2,46 \times 10^{10}$

Sumber: diolah dari data primer

Tabel 2 menunjukkan bahwa pertambahan waktu inkubasi meningkatkan jumlah sel bakteri, hal ini disebabkan tersedianya nutrisi yang cukup dalam media pertumbuhan. Media pertumbuhan yang merupakan medium biodegradasi SMSS dengan penambahan minyak solar sebagai hidrokarbon. Sampai akhir inkubasi populasi bakteri masih menunjukkan peningkatan populasi hal ini diduga karena medium biodegradasi masih mengandung cukup nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri untuk pertumbuhan. Horowitz *et al.*, (2005) menyatakan bahwa nutrisi yang mengandung karbon dan nitrogen merupakan salah satu faktor yang menunjang pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan.

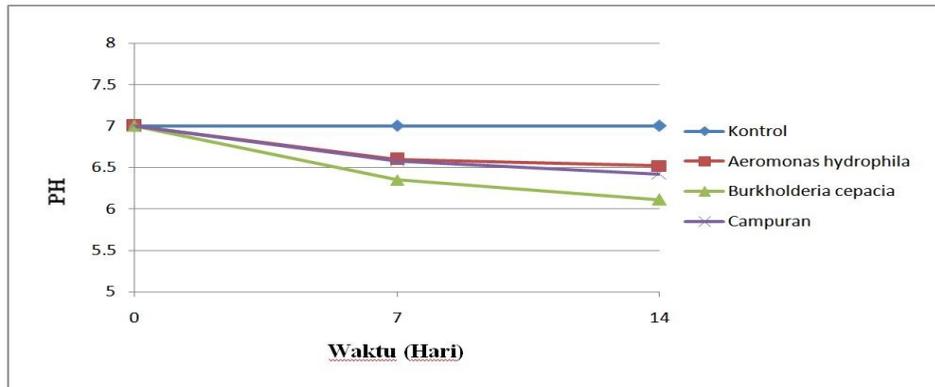
c. Perubahan pH medium biodegradasi

Kondisi pH mempengaruhi pertumbuhan bakteri serta kemampuan bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon minyak solar. Kondisi pH yang normal atau netral membuat pertumbuhan sel spesies optimum. Jumlah sel spesies yang optimum akan meningkatkan kemampuan spesies dalam degradasi senyawa hidrokarbon. Peningkatan tingkat degradasi

diindikasikan dari penurunan nilai kadar minyak solar setiap harinya. Kondisi optimum pH dalam tingkat degradasi minyak solar yang baik adalah pH 7-7,5.

Awal inkubasi nilai pH medium semua perlakuan adalah 7, dimana mayoritas mikroorganismen akan tumbuh subur pada pH tersebut. Selama proses biodegradasi berlangsung nilai pH spesies tunggal dan campuran mengalami penurunan (Grafik 1) diduga disebabkan oleh akumulasi metabolit yang dihasilkan oleh bakteri seperti asam organik (Beilen dan Funhoff, 2007).

Grafik 1. Perubahan PH medium (SMSS + 2% minyak solar) pada masing-masing perlakuan.



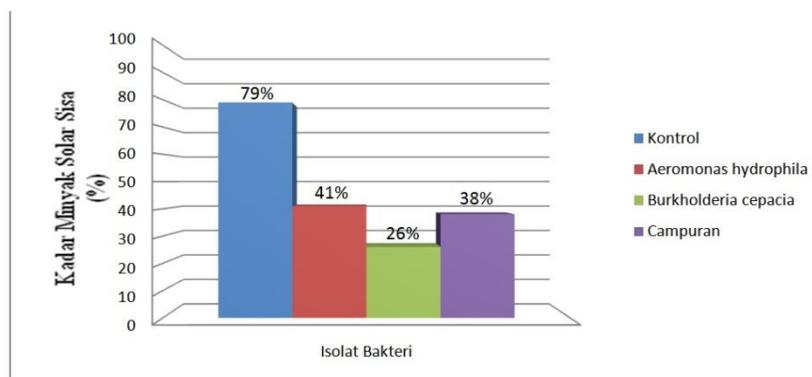
d. Analisis kemampuan degradasi hidrokarbon

1. Kadar minyak solar sisa

Hasil yang diperoleh pada Diagram 1 menunjukkan bahwa penggunaan campuran bakteri memiliki kemampuan lebih rendah dibandingkan dengan kultur tunggal (*Burkholderia cepacia*) dalam menguraikan minyak solar. Hal tersebut menunjukkan bahwa kedua kultur tidak bersifat sinergistik dalam mengurai solar.

Bukti tersebut dapat sebagai indikasi bahwa *A. hydrophila* dan *B. cepacia* kemungkinan bersifat antagonis atau berkompetisi dalam menggunakan substrat atau sumber karbon yang ada di dalam minyak solar sehingga efisiensi isolat bakteri dalam mendegradasi minyak solar tersebut tidak tercapai (Ghazali *et al.*, 2004).

Diagram 1. Kadar minyak solar sisa pada medium (SMSS + 2% minyak solar) setelah inkubasi selama 14 hari.



Dari hasil dapat terlihat bahwa perlakuan tanpa inokulasi bakteri (kontrol) mengalami penurunan konsentrasi komponen penyusun minyak solar. Menurut Tam *et al.*, (2002) menyatakan bahwa perombakan hidrokarbon tidak hanya dilakukan oleh mikroba tetapi juga dapat terurai oleh proses nonbiologis. Misalnya pengaruh suhu (penguapan), foto-oksidasi, oksidasi kimia, bioakumulasi dan absorpsi oleh sedimen partikel.

2. Perubahan konsentrasi senyawa hidrokarbon yang terdegradasi menggunakan GC-MS

Analisis kemampuan degradasi hidrokarbon dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri dalam menggunakan senyawa hidrokarbon sebagai sumber karbon. Kemampuan tersebut dapat dilihat dari perubahan konsentrasi senyawa hidrokarbon awal dan akhir. Perubahan konsentrasi dapat dianalisis menggunakan kromatografi gas dan spektrometer massa dalam bentuk perubahan luas area. Kromatografi gas digunakan karena senyawa hidrokarbon merupakan senyawa yang mudah menguap dan memiliki titik didih yang tinggi. Menurut Milner (2005), sampel yang digunakan pada kromatografi gas harus bersifat mudah menguap dan tidak cocok untuk sampel yang mudah rusak pada suhu tinggi. Penggunaan kromatografi gas dengan spektrometer massa bertujuan untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui (Meier *et al.*, 2000).

Hasil yang diperoleh analisis GC-MS berupa kromatogram dan data *library*. Hasil kromatografi gas dan data *library* pada perlakuan kontrol diketahui dua senyawa yang mengalami penurunan konsentrasi terbesar yaitu, *Hexadecanoic acid, methyl ester* dan *Dodecane*. *Hexadecanoic acid, methyl ester* merupakan senyawa yang memiliki rumus molekul $C_{17}H_{34}O_2$. Penurunan senyawa tersebut secara signifikan terjadi pada masa inkubasi hari ke-14, hingga hanya tersisa 3,37% dari yang semula 15,55%. *Dodecane* merupakan senyawa dengan rumus molekul $C_{12}H_{26}$, hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah konsentrasi senyawa *Dodecane* yang tersisa sebesar 0,60% dari yang semula 1,72%. Penurunan konsentrasi senyawa *Hexadecanoic acid, methyl ester* dan *Dodecane* diduga terdegradasi secara fisik atau kimiawi. Menurut Tam *et al.*, (2002) menyatakan bahwa perombakan hidrokarbon tidak hanya dilakukan oleh mikroba tetapi juga dapat terurai oleh proses nonbiologis. Misalnya pengaruh suhu (penguapan), foto-oksidasi, oksidasi kimia, bioakumulasi dan absorpsi oleh sedimen partikel.

Hasil analisis perlakuan yang diinokulasi *A. hydrophila*, *B. cepacia* dan campuran menunjukkan beberapa senyawa yang mengalami penurunan konsentrasi. Perlakuan inokulasi *A. hydrophila* menunjukkan dua senyawa hidrokarbon yang diduga mengalami degradasi yaitu *Heptadecane* dan *Pentadecane*. Perlakuan inokulasi *B. cepacia* menunjukkan dua senyawa hidrokarbon yang diduga mengalami degradasi yaitu *Heptadecane* dan *Pentadecane*. Perlakuan inokulasi campuran menunjukkan dua senyawa hidrokarbon yang diduga mengalami degradasi yaitu *hexadecanoic acid, methyl ester* dan *octadecenoic acid, methyl ester*. Menurut Madigan *et al.*, (2012), senyawa hidrokarbon akan didegradasi oleh bakteri dengan enzim monooksigenasi yang akan mengubah hidrokarbon menjadi alkohol, selanjutnya alkohol akan diubah menjadi aldehid yang akan diubah menjadi asam dan asam tersebut akan masuk ke dalam jalur β -oksidasi.

4. Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan *Aeromonas hydrophila* dan *Burkholderia cepacia* yang diisolasi dari lingkungan mangrove Tritih Kulon memiliki kemampuan mendegradasi minyak solar. *B. cepacia* memiliki kemampuan terbaik dalam mendegradasi minyak solar dengan sisa minyak

solar sebesar 26 %. Campuran *A. hydrophila* dan *B. cepacia* tidak bersifat sinergistik dalam degradasi minyak solar. Hasil analisis GC-MS menunjukkan terdapat beberapa senyawa yang mengalami penurunan konsentrasi baik secara fisik maupun biologis.

Daftar Pustaka

- Beilen, V.J.B. and E.G. Funhoff. 2007. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiol Biotechnol* 74: 13–21.
- Fossi, B.T. and F. Tavea. 2013. Application of Amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 in Fermentation for Simultaneous Production of Thermostable α -Amylase and Lactic Acid. *INTECH* 27: 633-658.
- Georgiou, G., S. Lin and M.M. Sharma. 1992. Surface active compounds from microorganisms. *Bioresource Technology* 10: 60-5.
- Ghazali, M., F. Zaliha, N. R., Abdul, R. N., Salleh, A. B. dan Basri, M. 2004. Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 61-67.
- Hamzah, A., A. Rabu, R.F.H.R. Azmy dan N.A. Yussoff. 2010. Isolation and characterization of bacterial degradating sumandak and south angsi oils. *Sains Malaysiana* 39(2): 161-168.
- Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai dan K. Shutubo. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology* 1 : 63-70.
- Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg. 2005. Sequential Growth of Bacteria Crude Oil. *Applied Microbiology*. 30(1): 10-19.
- Kayode-Isola, T.M., K.I.T. Eniola, A.B. Olayemi and O.O. Igunnugbemi. 2008. Response of resident bacteria of a crude oil-polluted river to diesel oil. *American-Eurasian Journal of Agronomy* 1(1): 06-09.
- Leahy, J.G. and R.R. Colwell. 1990. *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment*. *Departement of Microbiology, University of Maryland, College Park, Maryland* pp. 305 – 315.
- Lie, Ai-Xia., Li-Zhong Guo, Qiang Fu and Wei-Dong Lu. 2011. A simple and rapid plate assay for screening of inulindegrading microorganisms using Lugol's iodine solution. *African Journal of Biotechnology* 10(46): 9518-9521.
- Madigan, M.T., J. Martinko and J. Parker. 2012. *Brocky Biology of Microorganisms*. 10th ed. San Francisco: Benjamin Cummings. 1044 hal.
- Meier, R.M., I.L. Pepper dan C.P. Gerba. 2000. *Enviromental microbiology*. San Diego: Academic Press. xix + 585 hlm.
- Miller, J.M. 2005. *Chromatography concepts and contrast*. 2nd ed. New Jersey: John Willey & Sons, Inc. xxvi + 490 hlm.
- Odjadjare, E., S.O. Ajisebutu, Etinosa O. I., Olayinka A. A., Maria R. T., and Anthony I. O. 2008. Excravos light crude oil degrading potentials of axenic and mixed bacterial cultures. *Journal of General and Apllied Microbiology* 54: 277-284.

- Sadouk, Z., A. Tazerouti and H. Hacene. 2009. Biodegradation of diesel oil and production of fatty acid esters by a newly isolated *Pseudomonas citronellolis* KHA. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 65-70.
- Soedradjat, R. 2003. Fungsi model hidrodinamika dalam pengelolaan ekosistem mangrove (studi kasus pencemaran minyak di estuari Sungai Donan Cilacap). *Berkala Penelitian Hayati* 8(2): 81-84.
- Supriadi. 2006. Analisis resiko agens hayati untuk pengendalian pathogen tanaman. *Jurnal Litbang Pertanian*. Bogor. 80 hal.
- Tam, N.F.Y., C.L. Guo, W.Y. Yau and Y.S. Wong. 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin* 45: 316–324
- Udiharto, M., Rahayu S.A. dan Haris A., Zulkifliani. 1995. *Peran bakteri dalam degradasi minyak dan pemanfaatannya dalam penanggulangan minyak buangan*. Di dalam: Prosiding Diskusi Ilmiah VIII PPPTMGB; Jakarta, 13-14 Juni 1995. hlm 235-239.
- Usharani, J., T. Rajasekar and B. Deivasigamani. 2012. Isolation and Characterization of SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) Degrading Organisms from SDS Contaminated Areas. *Open Access Scientific Reports* 1: 148.