

Zam, SI
2010:2 (4)

**OPTIMASI KONSENTRASI INOKULUM BAKTERI
HIDROKARBONOKLASTIK PADA BIOREMEDIASI LIMBAH
PENGILANGAN MINYAK BUMI DI SUNGAI PAKNING**

Syukria Ikhsan Zam

Dosen Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Sultan Syarif Kasim Riau, Pekanbaru

***Optimizing Hydrocarbonoclastic Bacteria Inoculum Concentration
on Bioremediation of Oil Residue in Pakning River***

Abstract

The purposes of this research were to get the best inoculum concentration and also to identify the ability of mixed culture of hydrocarbonoclastic bacteria in oil waste degradation. The isolats were used are Acinetobacter baumannii, Alcaligenes eutrophus, Bacillus sp1., Methylococcus capsulatus, Bacillus sp2., Morococcus sp., Pseudomonas diminuta, Xanthomonas albilineans, Bacillus cereus and Flavobacterium branchiophiia. Variation of inoculum concentrations were 10%, 15%, and 20% (v/v). Observed parameters in optimization were Total Plate Count (TPC) the culture every 24 hour, Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) and Chemical Oxygen Demand (COD) examined at the end of the bioremediation period. Best optimization result then analyzed with GC/MS. Optimization result indicated the best inoculum concentration was 10% with TPH degradation 61,79% and COD slope 61,75%. It is assumed that the low value of TPH degradation and COD slope at 15% and 20% inoculum concentration were caused by competition inside the bacterial population at that high inoculum concentration. The competition result in low growth and degradation. The chromatogram indicated that hydrocarbon compound from nC₉ – nC₃₂ have been degraded by 9,887% – 88,056%. The conclusions of this research is the best result of bioremediation was obtained concentration inoculum at 10% mixed culture.

Keywords : *bioremediation, hydrocarbonoclastic bacteria, inoculum concentration*

PENDAHULUAN

Peningkatan kebutuhan bahan bakar minyak, mengakibatkan peningkatan eksplorasi dan pengolahannya. Eksplorasi dan pengolahan minyak bumi selain memberikan keuntungan juga memberikan dampak yang buruk bagi lingkungan, yaitu berupa limbah (residu). Limbah hasil pengolahan minyak bumi memiliki komposisi berupa aspal, lilin, logam berat, lumpur bercampur minyak sisa pengilangan (*oil sludge*) dan hidrokarbon (Anonimus, 1994).

Pada umumnya limbah minyak bumi diolah secara fisika dengan penyaringan, penyerapan, pembakaran atau secara kimia dengan menggunakan pengemulsi. Cara-cara ini memang dapat menghilangkan limbah minyak bumi dengan cepat, akan tetapi biayanya mahal dan tidak ramah lingkungan. Sebagai contoh, pembakaran dapat menghancurkan hidrokarbon dengan cepat, tetapi pada saat yang bersamaan menyebabkan polusi udara dan meninggalkan sisa pembakaran yang memerlukan penanganan yang lebih lanjut. Sementara itu penggunaan bahan kimia sintesis selain lebih mahal juga dapat menimbulkan resiko pencemaran baru, sehingga diperlukan suatu cara pengolahan limbah minyak bumi yang lebih ekonomis dan lebih ramah lingkungan (Clark, 1986).

Salahsatu cara untuk pengelolaan dan pemanfaatan limbah dilakukan dengan menggunakan agen biologi yang disebut bioremediasi. Bioremediasi merupakan suatu proses pemulihan (remediasi) lahan yang tercemar limbah organik maupun limbah anorganik dengan memanfaatkan organisme. Pengelolaan dengan menggunakan organisme merupakan alternatif penanggulangan limbah minyak bumi yang murah, efektif, ramah lingkungan dan menyebabkan terjadinya degradasi limbah yang menghasilkan senyawa akhir yang stabil dan tidak beracun, namun metode ini membutuhkan waktu yang lebih lama dibandingkan dengan cara fisika atau kimia (Atlas dan Bartha, 1992).

Organisme yang telah diketahui memiliki kemampuan mendegradasi hidrokarbon terutama adalah mikroorganisme seperti jamur, ragi, dan bakteri (Rosenberg *et al.*, 1992). Pertumbuhan mikroorganisme dalam hidrokarbon sering diikuti dengan pengemulsian sumber karbon yang tidak larut dalam medium kultur karena adanya agen polimer ekstraseluler yang dibentuk selama fermentasi hidrokarbon (Zajic *et al.*, 1977). Bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon disebut bakteri hidrokarbonoklastik (Davids, 1967). Secara alami mikroorganisme ini memiliki kemampuan untuk mengikat, mengemulsi, mentranspor, dan mendegradasi hidrokarbon. Bakteri ini mendegradasi senyawa hidrokarbon dengan cara memotong rantai hidrokarbon tersebut menjadi lebih pendek dengan melibatkan berbagai enzim. Sintesis enzim-enzim tersebut dikode oleh kromosom atau plasmid, tergantung pada jenis bakterinya (Ashok *et al.*, 1995).

Biodegradasi senyawa hidrokarbon yang terdapat pada limbah pengilangan minyak bumi dipengaruhi oleh faktor fisika, kimia dan biologi. Faktor fisika-kimia yang berpengaruh terhadap biodegradasi hidrokarbon antara lain komposisi dan struktur kimia hidrokarbon, konsentrasi hidrokarbon, suhu, oksigen, salinitas, pH, nutrisi, cahaya dan tekanan osmotik. (Englert, 1993; Bossert dan Bartha, 1984). Faktor biologis meliputi mikroorganisme yang ada, karakter, jumlah sel, serta enzim yang dimiliki oleh organisme tersebut (Atlas, 1981; Atlas dan Bartha, 1992;

Leahy dan Colwell, 1990; Udiharto, 1992). Sebagai salahsatu faktor yang mempengaruhi proses bioremediasi, maka perlu dilakukan penelitian tentang konsentrasi inokulum yang tepat agar proses bioremediasi berjalan dengan baik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh inokulum terbaik dan mengetahui kemampuan kultur campuran dalam bioremediasi limbah pengilangan minyak bumi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi SITH Institut Teknologi Bandung. Bahan penelitian adalah isolat bakteri yang diisolasi dari limbah minyak bumi yang berasal dari tempat pembuangan limbah kilang minyak bumi di Pertamina Sungai Pakning. Limbah yang dikirim merupakan limbah cair dengan warna kehitaman, berbau tajam, dan mudah terbakar. Medium pertumbuhan bakteri menggunakan “*Stone Mineral Salt Solution*” (SMSS), dibuat dengan cara melarutkan lima g CaCO_3 ; 2,5 g NH_4NO_3 ; satu g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KH_2PO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; dan 0,2 g $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ke dalam satu liter akuades, pH diatur tetap 6,5 (Sharpley, 1966).

Bahan kimia yang diperlukan dalam pengukuran COD adalah $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,25 N, H_2SO_4 pekat, kristal HgSO_4 , FAS [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$], dan indikator Ferroin. Pengukuran menggunakan metode *Dichromate Reflux Technique Standar* (Anonimus, 2005).

Isolat bakteri yang digunakan adalah *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus* sp1., *Methylococcus capsulatus*, *Bacillus* sp2., *Morococcus* sp., *Pseudomonas diminuta*, *Xanthomonas albilineans*, *Bacillus cereus* dan *Flavobacterium branchiophiia*. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu Erlenmeyer, cawan Petri, tabung reaksi, mikropipet, pipet ukur, labu pemisah, gelas piala dan *shaker incubation*.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Alat dan Bahan

Bahan dan alat tahan panas yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Peralatan yang tidak tahan panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 90%.

Optimasi Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 10%, 15%, dan 20% (v/v) kultur campuran (1:1:1:1:1:1:1:1) setiap tahapan isolasi ke dalam masing-masing labu Erlenmeyer yang berisi SMSSe yang ditambahkan 50% (v/v) limbah minyak bumi dengan jumlah sel 10^6 sel/ml (Mulvey, 2002). Kemudian diinkubasikan pada suhu 28°C selama 7 x 24 jam dengan agitasi 120 rpm. Setiap 24 jam sekali dilakukan enumerasi untuk pembuatan pola pertumbuhan bakteri dengan metode cawan tuang. Pada hari terakhir dilakukan pengukuran tingkat degradasi limbah minyak bumi dan penurunan COD. Perlakuan yang memberikan hasil terbaik dilakukan GC/MS terhadap minyak sisa degradasi.

Tingkat degradasi

Pengukuran tingkat degradasi dilakukan dengan menggunakan metode Gravimetri. Metode ini dilakukan dengan mengekstraksi lima ml sampel dengan menggunakan benzene, pentana, dan dietileter dengan perbandingan 3:1:1 sebanyak lima ml. Minyak yang diperoleh lalu ditimbang untuk mengetahui jumlah minyak yang terkandung dalam sampel. Tingkat degradasi diukur dengan rumus sebagai berikut (Pikoli, 2000; Astuti, 2003) :

$$\% \text{ degradasi} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

- A = Total petroleum hydrocarbon (TPH) awal
B = Total petroleum hydrocarbon (TPH) akhir

TPC (Total Plate Count)

Analisis TPC bertujuan untuk mengetahui pola pertumbuhan bakteri selama proses bioremediasi berlangsung. TPC dilakukan dengan metode cawan tuang yang mengacu kepada Cappuccino dan Sherman (1987). Laju pertumbuhan dihitung dengan menggunakan rumus berikut ini (Crueger dan Crueger, 1984):

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Keterangan :

- X = Konsentrasi biomasa
dX = X - X₀
X = log jumlah sel
dt = t - t₀
t = waktu

COD (Chemical Oxygen Demand)

Pengukuran COD dilakukan untuk mengetahui konsentrasi total bahan kimia yang terdapat pada limbah sebelum dan sesudah bioremediasi. Pengukuran dilakukan di Laboratorium Air Departemen Teknik Lingkungan ITB dengan metode *Dichromate Reflux Technique Standar*. Metode ini dilakukan dengan cara mengambil 25 ml medium sampel dan 25 ml akuades sebagai blanko ke dalam labu Erlenmeyer 500 ml. Ditambahkan satu g HgSO₄, lima ml H₂SO₄ pekat, dan diaduk sampai HgSO₄ larut. Perlahan-lahan ditambahkan 12,5 ml K₂Cr₂O₇ 0,25 kemudian diaduk hingga homogen. Selama pengadukan ditambahkan 35 ml H₂SO₄ pekat, kemudian direfraksi selama 2 jam. Hasil refraksi didinginkan, kemudian ditambahkan akuades hingga volume 175 ml. Kemudian ditambahkan 2 – 3 tetes indikator Ferroin, selanjutnya dititrisi

dengan FAS $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2]$ sampai terjadi perubahan warna menjadi coklat kemerahan. Kandungan COD ditentukan dengan perhitungan berikut (Anonimus, 2005) :

$$\text{COD (mg/l)} = \frac{(a - b) \cdot (N) \cdot 8000}{v}$$

Keterangan :

- a = mL $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ yang digunakan untuk blanko
- b = mL $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ yang digunakan untuk sampel
- N = normalitas $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$
- v = volume sampel

Kromatografi Gas (GC/MS)

Kromatografi gas dilakukan hanya untuk perlakuan terbaik dari hasil optimasi. Tujuan analisis dengan GC/MS adalah untuk mengetahui komposisi dan jenis senyawa yang terkandung di dalam sampel sebelum dan sesudah bioremediasi. Alat yang digunakan adalah GC jenis HP-5890 dengan detektor FID dan suhu $300\text{ }^\circ\text{C}$, kolom GC adalah kapiler kaca (panjang 30 m dan diameter 0,25 mm) dengan tekanan 100 kPa dan aliran kolom 1,6 ml/menit, sedangkan gas pembawa sampel yang akan dianalisis yaitu helium. Tingkat degradasi senyawa hidrokarbon dihitung dengan cara:

$$\% \text{ degradasi} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

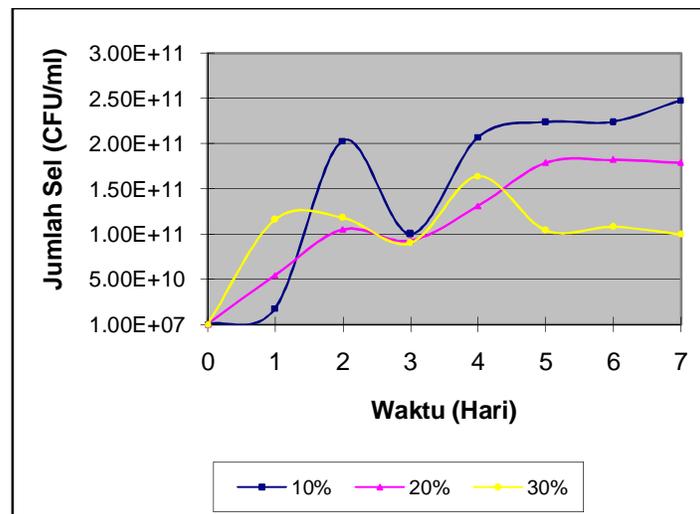
- A = Luas fitana awal : luas area awal
- B = Luas fitana akhir : luas area akhir

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 10%, 20%, dan 30% (v/v). Peningkatan konsentrasi inokulum dilakukan untuk mengetahui apakah peningkatan tersebut dapat mempercepat dan meningkatkan degradasi limbah pengilangan minyak bumi. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Tabel 1 dan 2.

Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi inokulum dapat dilihat bahwa perlakuan yang memberikan hasil perlakuan terbaik secara berturut-turut adalah konsentrasi inokulum 10% dengan tingkat degradasi TPH 61,79% dan penurunan COD 61,74% serta laju pertumbuhan $0,098\text{ jam}^{-1}$, konsentrasi inokulum 15% tingkat degradasi TPH 51,26% dan penurunan COD 60,66 % serta laju pertumbuhan $0,096\text{ jam}^{-1}$, dan konsentrasi inokulum 20% tingkat degradasi TPH 48,75% dan penurunan COD 59,59% serta laju pertumbuhan $0,095\text{ jam}^{-1}$ (Gambar 2 dan

Tabel 2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwasanya peningkatan konsentrasi inokulum menjadi dua kali lipat, bahkan tiga kali lipat tidak meningkatkan proses biodegradasi limbah pengilangan minyak bumi. Hasil penelitian yang dilakukan Satitiningrum (2005) menunjukkan tidak terdapatnya korelasi antara pemberian inokulum dalam jumlah yang banyak terhadap tingkat degradasi dan pertumbuhan mikroorganisme. Pemberian inokulum dengan konsentrasi lebih besar dari 10% mengakibatkan pertumbuhan dan penurunan TPH yang kurang baik (Gambar 2 dan 3). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Astuti (2003) diketahui bahwa konsentrasi inokulum terbaik digunakan dalam degradasi minyak bumi adalah 10%. Pemberian konsentrasi dibawah ataupun lebih dari 10% akan memberikan hasil pertumbuhan dan degradasi yang kurang baik. Mulvey (2002) menyatakan pemberian konsentrasi inokulum melebihi 15% akan mengakibatkan terganggunya pertumbuhan dan biodegradasi minyak bumi.



Gambar 1.

Kurva Pola Pertumbuhan Kultur Campuran dalam Medium SMSSe + 50% Limbah Minyak Bumi pada Optimasi Konsentrasi Inokulum. Kondisi Lingkungan : suhu 28 °C, pH awal medium 6,5, dengan agitasi 120 rpm.

Tabel 1.

Total plate count optimasi konsentrasi inokulum

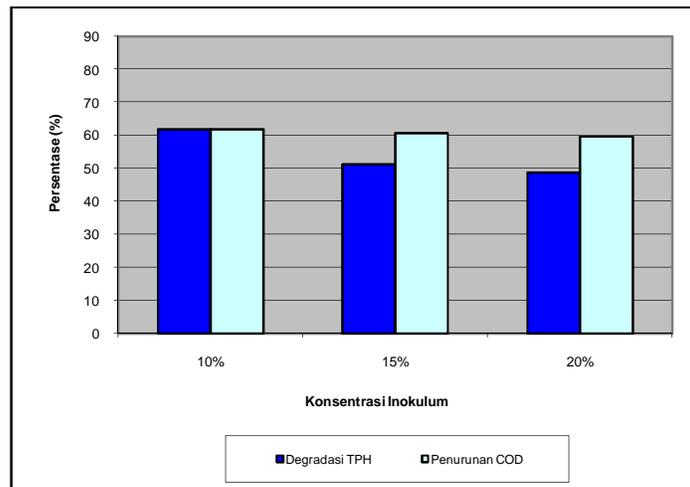
Jumlah Sel (CFU/mL) Hari Ke-	Konsentrasi Inokulum		
	10%	15%	20%
0	3,43 x 10 ⁷	4,80 x 10 ⁷	6,46 x 10 ⁷
1	1,77 x 10 ¹⁰	5,43 x 10 ¹⁰	1,16 x 10 ¹¹
2	2,03 x 10 ¹¹	1,05 x 10 ¹¹	1,18 x 10 ¹¹
3	1,00 x 10 ¹¹	9,25 x 10 ¹⁰	9,01 x 10 ¹⁰
4	2,07 x 10 ¹¹	1,31 x 10 ¹¹	1,64 x 10 ¹¹
5	2,24 x 10 ¹¹	1,79 x 10 ¹¹	1,04 x 10 ¹¹
6	2,24 x 10 ¹¹	1,82 x 10 ¹¹	1,08 x 10 ¹¹

7	$2,48 \times 10^{11}$	$1,79 \times 10^{11}$	$9,95 \times 10^{10}$
Laju Pertumbuhan (sel/jam)	0,098	0,096	0,095

Pemberian konsentrasi inokulum 10% dapat dinyatakan sebagai konsentrasi inokulum yang tepat untuk proses bioremediasi limbah pengilangan minyak bumi ini. Konsentrasi tersebut mendukung untuk pertumbuhan bakteri jika dibandingkan dengan konsentrasi inokulum 15% dan 20%, sehingga pertumbuhan bakteri menjadi lebih baik. Menurut Doelle (1994) konsentrasi inokulum yang mencukupi merupakan salahsatu syarat supaya proses fermentasi dapat berlangsung dengan optimum. Mishra *et al.* (2001) menambahkan kesesuaian antara rasio inokulum dan komposisi substrat dapat mempengaruhi proses degradasi minyak bumi.

Kurang baiknya pertumbuhan dan degradasi limbah pengilangan minyak bumi pada konsentrasi inokulum 15% dan 20% diduga diakibatkan konsentrasi tersebut terlalu banyak sehingga medium kurang memadai untuk pertumbuhan bakteri tersebut. Hal ini mengakibatkan terjadinya kompetisi antar bakteri, sehingga pertumbuhan dan proses degradasi menjadi rendah. Astuti (2003) menyatakan persaingan dalam penggunaan substrat mengakibatkan pertumbuhan kultur menjadi kurang baik, karena pertambahan jumlah sel atau biomassa menjadi rendah.

Pada optimasi ini, penurunan COD pada konsentrasi inokulum 15% dan 20% tidak jauh berbeda dengan konsentrasi inokulum 10%. Hal ini dapat diakibatkan terjadinya kompetisi antar populasi pada perlakuan tersebut, sehingga bakteri-bakteri beradaptasi menggunakan substrat selain hidrokarbon, seperti asam lemak dan senyawa lainnya yang terdapat dalam limbah minyak tersebut. Penggunaan senyawa-senyawa lain ini mengakibatkan penurunan COD yang cukup tinggi, sedangkan degradasi hidrokarbon menjadi rendah. Menurut Slater (1981, dalam Astuti, 2003) jika terdapat lebih dari satu pengguna substrat dalam satu kultur, maka kemungkinan mikroorganismenya untuk termutasi akan lebih besar. Akibat dari mutasi ini mikroorganismenya akan memiliki kemampuan untuk memanfaatkan substrat lainnya untuk pertumbuhan (Black, 1999).

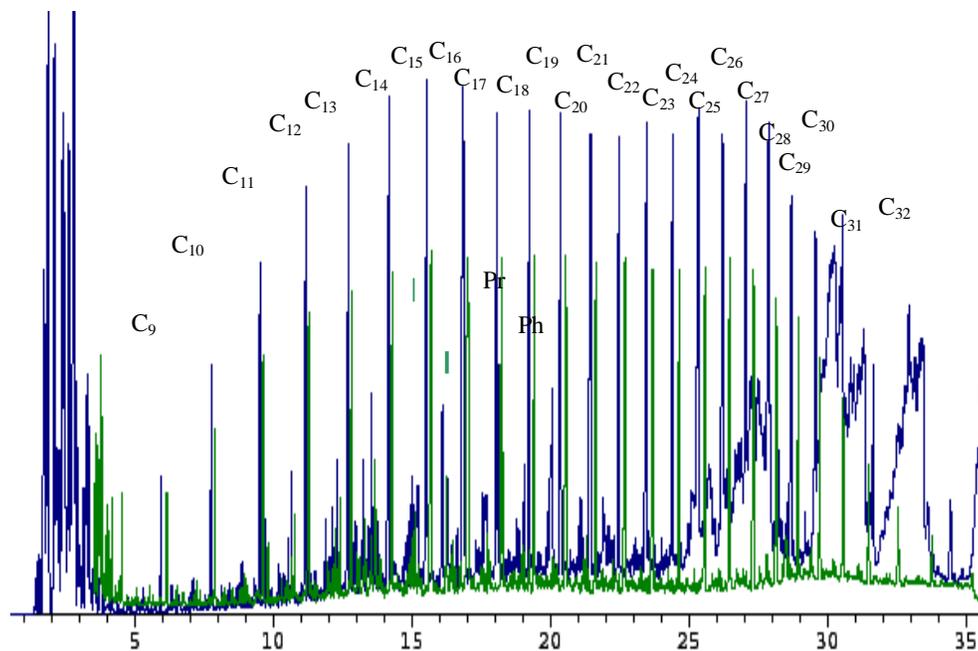


Gambar 2.
Tingkat Degradasi TPH dan Penurunan COD dari Optimasi Konsentrasi Inokulum

Tabel 2.
Penurunan TPH dan COD Hasil Optimasi Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi Inokulum	TPH Awal (g/100ml)	TPH Akhir (g/100ml)	COD Awal (g/100ml)	COD Akhir (g/100ml)
10%	14,500	5,540	91,437	34,975
20%	14,500	7,066	91,437	35,960
30%	14,500	7,430	91,437	36,945

Berdasarkan hasil GC/MS terlihat terjadi degradasi senyawa hidrokarbon $nC_9 - nC_{32}$ berkisar antara 9,887% – 88,056%, dengan degradasi total 43,413% (Tabel 3 dan Gambar 3). Penggunaan GC/MS bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa hidrokarbon yang dapat didegradasi oleh kultur campuran bakteri. Terjadinya proses degradasi senyawa-senyawa hidrokarbon tersebut diduga karena terjadi sinergisme dalam kultur campuran tersebut dan terjadi proses kometabolisme.



Keterangan :

- : Kontrol
- : Hasil proses bioremediasi

Gambar 3.
Kromatogram Hasil Optimasi Konsentrasi Inokulum

Tabel 3.
**Tingkat Degradasi Senyawa Hidrokarbon Dari Hasil
Optimasi Terbaik Setelah Tujuh Hari Inkubasi.**

Senyawa Hidrokarbon	Tingkat Degradasi (%)	Senyawa Hidrokarbon	Tingkat Degradasi (%)
<i>n</i> C ₉	9,887	<i>n</i> C ₂₀	22,507
<i>n</i> C ₁₀	14,704	<i>n</i> C ₂₁	20,693
<i>n</i> C ₁₁	16,222	<i>n</i> C ₂₂	23,374
<i>n</i> C ₁₂	17,626	<i>n</i> C ₂₃	24,721
<i>n</i> C ₁₃	18,842	<i>n</i> C ₂₄	18,702
<i>n</i> C ₁₄	20,669	<i>n</i> C ₂₅	32,233
<i>n</i> C ₁₅	23,129	<i>n</i> C ₂₆	14,640
<i>n</i> C ₁₆	21,084	<i>n</i> C ₂₇	14,289
<i>n</i> C ₁₇	19,765	<i>n</i> C ₂₈	50,331
Pristana	-	<i>n</i> C ₂₉	30,164
<i>n</i> C ₁₈	34,022	<i>n</i> C ₃₀	37,816
Fitana	-	<i>n</i> C ₃₁	86,915
<i>n</i> C ₁₉	16,792	<i>n</i> C ₃₂	88,056
Total		43,413	

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan yang memberikan hasil perlakuan terbaik secara berturut-turut adalah konsentrasi inokulum 10% dengan tingkat degradasi TPH 61,79% dan penurunan COD 61,74% serta laju pertumbuhan 0,098 jam⁻¹, konsentrasi inokulum 15% tingkat degradasi TPH 51,26% dan penurunan COD 60,66% serta laju pertumbuhan 0,096 jam⁻¹, dan konsentrasi inokulum 20% tingkat degradasi TPH 48,75% dan penurunan COD 59,59% serta laju pertumbuhan 0,095 jam⁻¹.
2. Degradasi senyawa hidrokarbon *n*C₉ – *n*C₃₂ dari hasil perlakuan terbaik berkisar antara 9,887% – 88,056%, dengan degradasi total 43,413%.
3. Kultur campuran bakteri hidrokarbonoklastik memiliki kemampuan yang baik dalam bioremediasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Pemerintah Provinsi Riau dan Pemerintah Kabupaten Bengkalis yang telah membantu dalam pendanaan penelitian ini. Ucapan terimakasih ini juga ditujukan kepada Pimpinan PT. Pertamina UP II Sungai Pakning atas kesediaannya memberikan limbah pengilangan minyak bumi. Dan tak lupa pula penulis ucapkan terima kasih kepada Ibu Nuryati Juli yang telah memberikan kritikan, saran dan ide-ide cemerlangnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 1994. Limbah Cair Berbagai Industri di Indonesia : Sumber, Pengendalian dan Baku Mutu. Project of the Ministry of State For the Environment RI, Jakarta.
- Anonimus. 2005. Chemical Oxygen Demand (COD). Oasis Environmental Ltd., New York.
- Ashok, B. T., Saxena, S., Susarrat, J. 1995. Isolation and Characterization of Four Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria From Soil Near on Oil Refinery. Letter in Applied Microbiology. The Society for Applied Bacteriology. 21, 246 – 248.
- Astuti, D, I. 2003. Pemanfaatan Kultur Campuran Isolat Mikroba Lokal Untuk Degradasi Minyak Bumi dan Produksi Biosurfaktan. Disertasi Doktor Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon : An Environmental Perspective. Microbiol. Rev. 45, 297 – 308.
- Atlas, R. M., and Bartha, R. 1992. Microbial Ecology. Benjamin Cummings Science, California.
- Black, J. 1999. Microbiology Principles and Explorations. Prentice Hall Upper Saddle River, New Jersey.
- Bossert, I., and Bartha, R. 1984. The Fate of Petroleum Soil Ecosystems. Petroleum Microbiology. Mcmillan, New York.
- Capucino, J. B., and Sherman, N. 1987. Microbiology : A Laboratory Manual. Addison Wesley Publ. Co., Massachusetts.
- Clark, R. B. 1986. Marine Pollution. Clarendon Press, Oxford.
- Crueger, W., Crueger, A. 1984. Biotechnology : A Textbook of Industrial Microbiology. Sinauer Associates, Inc. Sunderland.

- Davids, J.B. 1967. Petroleum Microbiology. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
- Doelle, H. W. 1994. Microbial Process Development. Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore.
- Englert, C. J. 1993. Bioremediation of Petroleum Product in Soil. Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soil. Lewis, Michigan.
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons In The Environment. Microbiol. Rev. 54, 305 – 315.
- Mishra, S. J., Jyot, R. C., Kuhad, and B, Lal. 2001. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate In Situ Bioremediation of Oily Sludge Contaminated Soil. App. And Environ. Microbial. 67 (4), 1675 – 1681
- Mulvey, P. 2002. Treatment, Recovery and Disposal Technology: Bioremediation Techniques for Petroleum Facilities. Environmental and Earth Sciences Pty Ltd., North Sydney.
- Pikoli, M. R. 2000. Isolasi Bertahap Bakteri Termofilik Pendegradasi Minyak Bumi dari Sumur Bangko. Tesis Magister Biologi Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R., Adler, E., and Ron, E. Z. 1992. Petroleum Bioremediation – A Multiphase Problem. Biodeg. 3, 213 – 226.
- Satitiningrum, Y. 2005. Optimisasi Proses Bioremediasi Menggunakan Bakteri Hasil Isolasi Dari Sludge dan Oilly Cutting Secara Landfarming. Tesis Magister Biologi Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Sharpley, J. M. 1966. Elementary Petroleum Microbiology. Gult. Publ. Co., Texas.
- Udiharto, M. 1992. Aktivitas Mikroba Dalam Mendegradasi Crude Oil. Diskusi Ilmiah VII. Hasil Penelitian Lemigas.
- Zajic, J. E., Guignard, H., and Gerson, F. D. 1977. Emulsifying and Surface Active Agents From *Corynebacterium hydrocarbonoclastus*. Biotechnology and Bioengineering. 19, 1285 – 1301.