

**EVALUASI *IN VITRO* KAPASITAS BAKTERI *Pseudomonas putida* DAN *Staphylococcus aureus* SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI LOGAM BERAT TIMBAL (Pb)**

**IN VITRO BACTERIA CAPACITY EVALUATION OF *Pseudomonas putida* AND *Staphylococcus aureus* AS BIOREMEDIATION AGENT FOR LEAD HEAVY METAL**

Jajar Pramata Syari<sup>1\*</sup>, Rudiysyah<sup>1</sup>, Puji Ardiningsih<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Pascasarjana Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura,  
Jln. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi 78124, Pontianak

\*Correspondent author :

**ABSTRAK**

Berbagai jenis agen hayati seperti bakteri digunakan sebagai agen alternatif untuk menurunkan ion logam berat dalam air limbah, salah satunya logam Pb. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *P.putida* dan *S.aureus*. Sampel pada penelitian menggunakan larutan induk Pb 1, 3, dan 5 ppm. Percobaan bioremediasi dilakukan dengan penambahan suspensi masing-masing bakteri dengan konsentrasi 5, 10, dan 15% (v/v) dan diinkubasi dengan menggunakan *shacer incubator* dengan temperatur 37°C. Analisa kadar ion logam Pb dan pertumbuhan bakteri dilakukan pada hari ke, 0,1,10, 20 dan 30, masing-masing dengan menggunakan *Automic Absorption Spectrofotometer* (AAS) dan metode *Total Plate Count* (TPC) secara berturut-turut. Hasil menunjukkan bahwa presentase penurunan kadar ion logam Pb pada sampel *P.putida* yang menunjukkan hasil penurunan logam berat Pb yang tertinggi yaitu sebesar 88%, dengan inokulum bakteri *P.putida* 15% (v/v) sedangkan pada sampel *S.aureus* sebesar 99% dengan inokulum bakteri 15%(v/v). Kemampuan bakteri Gram positif dalam menurunkan kadar logam berat Pb lebih efektif digunakan dalam bioremediasi pada limbah perairan dibandingkan bakteri Gram negatif.

**Kata Kunci:** bioremediasi, logam Pb, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*.

**ABSTRACT**

Various biological such as bacteria used as alternative agent to decrease metal ion in waste water, one of which is Pb metal. The bacteria used in this study were *P.putida* and *S.aureus*. The sample in this research use Pb 1, 3, and 5 ppm solution. Bioremediation experiments performed with addition of suspension of each bacteria with concentrations of 5, 10, and 15% (v/v) and using incubator shaker with temperature 37°C. The Pb metal ion content and bacterial growth analysis on 0, 1, 10, 20 and 30 days, using *Automic Absorption Spectrophotometer* (AAS) and *Total Plate Count* (TPC) method respectively. The results showed the decreasing percentage of Pb metal ion content in *P.putida* is the highest decreasing in Pb weight of 88%, with bacterial inoculum *P.putida* 15%(v/v) while in *S.aureus* sample was 99% with bacterial inoculum 15%(v/v). The ability of Gram-positive bacteria to reduce Pb-weight is more effective in bioremediation in aquatic waste than Gram-negative bacteria.

**Keywords:** bioremediation, lead, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus*.

## 1. PENDAHULUAN

Bakteri dapat digunakan sebagai alternatif untuk menurunkan ion logam di dalam air limbah. Pendekatan ini yang dijadikan dasar penelitian untuk mengembangkan bioremediasi menggunakan bakteri. Pemanfaatan bakteri sebagai agen bioremediasi logam berat untuk sistem perairan tercemar perlu dikembangkan karena salah satu alternatif pendekatan biologis yang potensial, ekonomis dan ramah lingkungan untuk pengelolaan kualitas air. Secara alamiah bakteri berkembang dan beradaptasi dengan kondisi lingkungannya (Atlas & Bartha 1993).

Penggunaan logam Pb oleh manusia dalam beberapa jenis industri yang menggunakan logam Pb antara lain : bahan bakar bensin, baterai, cat, pengolahan logam, *pulp* dan kertas, elektronik, galangan kapal, pengolahan kayu, bengkel, dan sebagainya. Hal ini menyebabkan kemungkinan tercemarnya perairan oleh logam Pb juga tinggi (Purnamawati, 2015).

Upaya dalam mengurangi limbah logam Pb dapat dilakukan dengan cara yang ramah lingkungan yaitu memanfaatkan agen biologis, salah satunya adalah bakteri (Suhendrayatna, 2001; Widyawati, 2008 dalam Susanto, 2014). Bakteri yang diketahui mempunyai kemampuan sebagai pendegradasi logam Pb adalah *Pseudomonas sp* (Yulia, 2013), *Listeria* dan *Bacillus sp* (Arinda, 2012), *Micrococcus sp*, *Corynebacterium sp*, *orrococcus*, *Streptococcus agalactie*, *Bacillus circulans*, serta *Xanthobacter autotropichus* (Arrizal *et al*, 2013).

Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian dengan menggunakan bakteri yang dapat dimanfaatkan untuk menurunkan kadar ion logam berat Pb yaitu bakteri *Pseudomonas putida* dan *Staphylococcus aureus* penting untuk dilaksanakan agar kadar logam Pb yang dibuang ke lingkungan dapat diminimalisasi sehingga tidak mencemari lingkungan.

## 2. METODE PENELITIAN

### ALAT DAN BAHAN

#### Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini: alat-alat gelas, *autoclave*, *bluetipe*, *hot plate*, inkubator, labu semprot, *Laminer Air Flow* (LAF), mikropipet, ose bulat, ose jarum, oven, pH meter, rak tabung, seperangkat alat uji *Automic Absorption Spectrofotometer* (AAS)-nyala, *shaker incubator*, *stirer*, termometer, dan timbangan.

## **Bahan**

Mikroorganisme uji yang digunakan adalah inokulan *Staphylococcus aureus* koleksi dari Laboratorium Mikrobiologi Kesehatan Provinsi dan *Pseudomonas putida* koleksi dari Laboratorium Universitas Gajah Mada. Bahan lain yang digunakan adalah akuabides, HNO<sub>3</sub> pekat, larutan pengencer HNO<sub>3</sub> 0,05 M, *Nutrient Agar* (NA), *Muller Hinton* (MH), *Brain Heart Infusion* (BHI), kertas label, plastik *wrap*, dan tisu.

## **CARA KERJA**

### **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan plastik yang tahan panas. Bahan atau media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dipanaskan sampai mendidih diatas hotplate kemudian dimasukkan erlenmeyer ditutup kapas dan dimasukkan kedalam plastik tahan panas. Semua bahan tersebut dimasukan dalam autoklaf untuk disterilisasi selama 15 menit dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm.

### **Peremajaan dan pembuatan inokulum bakteri *S.aureus* dan *P.putida***

Peremajaan isolat bakteri *S.aureus* dan *P.putida* dilakukan pada media padat miring yaitu *Nutrien Agar* (NA) dan media padat *Muller Hinton* (MH). Satu ose bakteri diambil dari stok atau koleksi, kemudian digoreskan pada masing-masing media tersebut dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri *S. aureus* dan *P. putida* hasil peremajaan diambil 2-3 ose dan dimasukan ke dalam tabung yang berisi 100 mL BHI, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### **Preparasi Sampel**

Sampel penelitian larutan induk Pb 1, 3, dan 5 ppm sebanyak 250 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan masing-masing 5, 10, dan 15% (v/v) suspensi *P.putida* dan *S.aureus*. Inkubasi dilakukan selama 30 hari, dengan menggunakan *shaker incubator* dengan temperatur 37°C. Pengamatan kadar logam Pb, populasi bakteri dan derajat keasaman (pH) dilakukan pada hari ke-0, 1, 10, 20, 30, dan 30.

### **Pengukuran *Total Plate Count* (TPC) (Syafrizal, 2010)**

Pertumbuhan bakteri dalam proses bioremediasi *invitro* diamati berdasarkan populasi bakteri dengan menggunakan metode TPC. Sampel yang telah diberi perlakuan diambil 1 mL, kemudian dilakukan pengenceran  $10^{-6}$  sampai  $10^{-10}$  kemudian sampel diinokulasi pada media NA, selanjutnya diinkubasi pada temperatur  $37^{\circ}\text{C}$  selama 30 hari.

### **Pengukuran kadar logam Pb (SNI No:6989.8:2009)**

Sampel sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL, ditambahkan 5 mL  $\text{HNO}_3$  pekat dan ditutup menggunakan corong, dipanaskan perlahan-lahan sampai sisa volumenya 15 mL. Sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuabides sampai tepat tanda tera dan dihomogenkan kemudian diukur absorbansi sampel. Pengukuran sampel dianalisa dengan menggunakan AAS-nyala pada panjang gelombang 217,0 nm, kemudian dicatat hasil pengukuran.

$$\% \text{ penurunan kadar logam Pb} = \frac{C(a) - C(b)}{C(a)} \times 100\%$$

Keterangan :

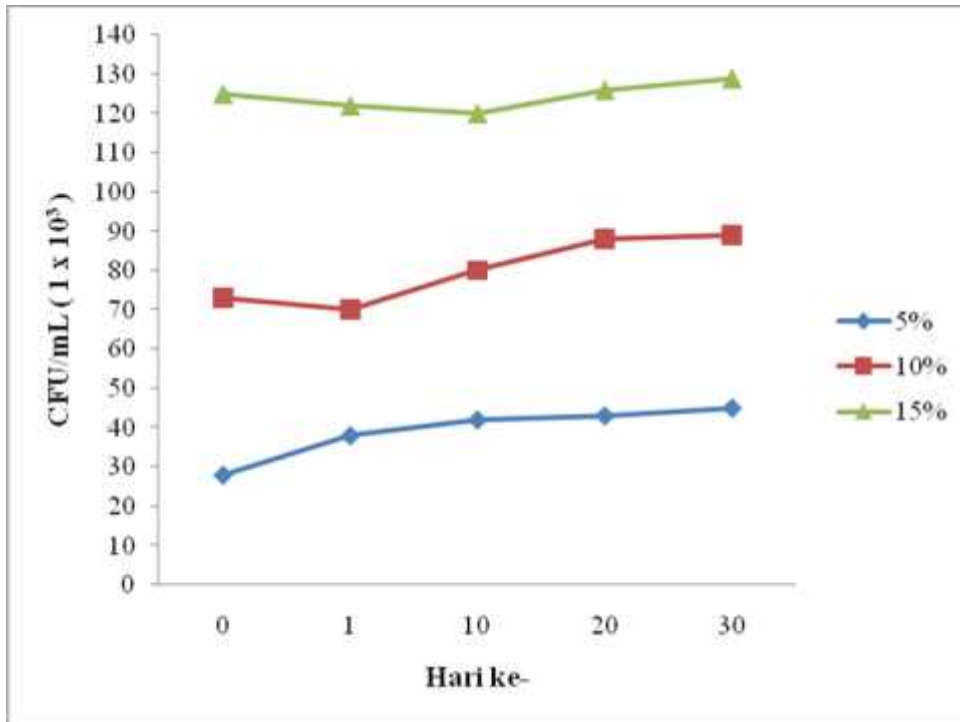
C (a) : Konsentrasi awal Pb (ppm)

C (b) : Konsentrasi akhir Pb (ppm)

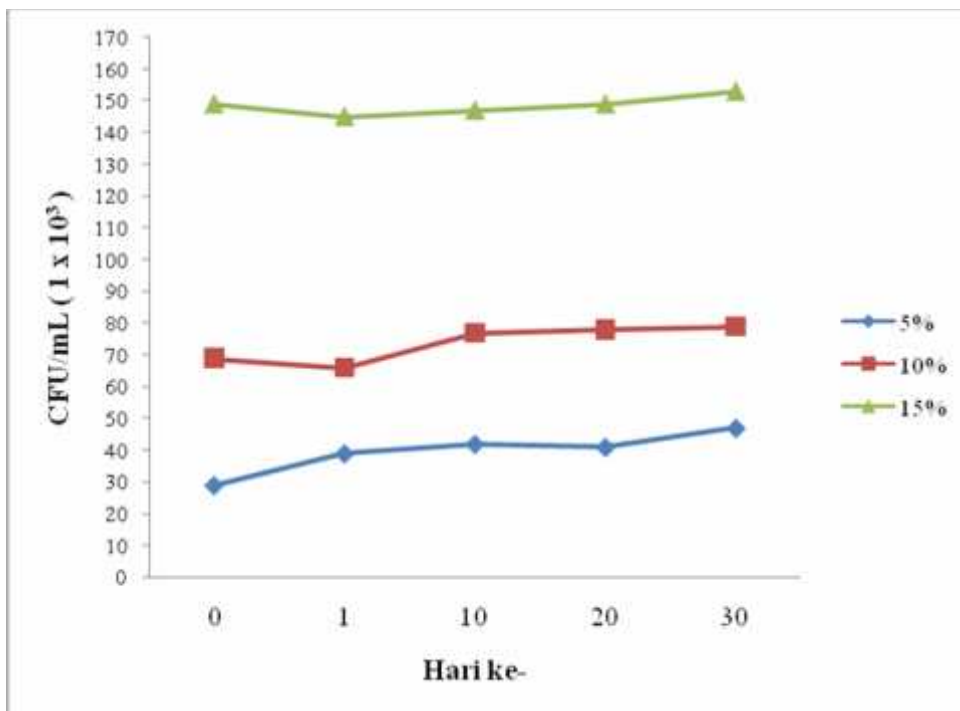
## **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Grafik Pertumbuhan Bakteri *P.putida* dan *S.aureus* pada Sampel**

Pengamatan pertumbuhan bakteri pada penelitian ini menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan memvariasikan waktu inkubasi dan konsentrasi bakteri *Pseudomonas putida* dan *Staphylococcus aureus* untuk mengetahui pertumbuhan dari jumlah total sel bakteri.



Gambar 1 Grafik TPC sel *P.putida* pada sampel logam Pb 1 ppm dengan menggunakan variasi konsentrasi bakteri



Gambar 2 Grafik TPC sel *S.aureus* pada sampel logam Pb 1 ppm dengan menggunakan variasi konsentrasi bakteri

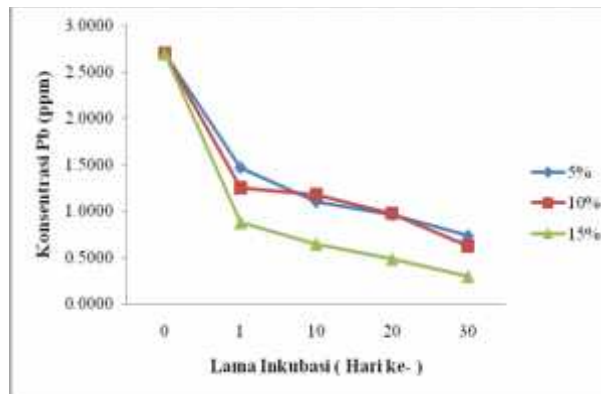
Gambar 1 pemberian bakteri 10% dan Gambar 2 pemberian bakteri 5%(v/v) pada hari ke-0 hingga hari ke-1 mengalami penurunan dikarenakan bakteri mengalami fase adaptasi yang lambat terhadap media. Berdasarkan gambar diatas

dapat diketahui bahwa, konsentrasi 15% jumlah total sel yang lebih tinggi dari konsentrasi yang lainnya, dikarenakan bakteri yang diberikan pada media lebih besar jumlahnya sehingga dapat memperbanyak diri dengan mudah.

Pada perlakuan diatas terdapat perbedaan pertumbuhan, hal ini disebabkan oleh proses adaptasi yang terjadi berbeda-beda pada tiap media dan adanya resistensi bakteri terhadap logam Pb. Bakteri akan menunjukkan perbedaan pola pertumbuhan, periode waktu yang dibutuhkan untuk tumbuh maupun beradaptasi dan metabolit yang dihasilkan (Yuliana, 2008). Jumlah sel yang meningkat dikarenakan bakteri telah beradaptasi dan dapat memanfaatkan sampel sebagai sumber karbon untuk energi dan pembelahan sel bakteri. Pembelahan sel selama proses degradasi juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti pH, oksigen dan nutrien (Malick dan Rai,1993).

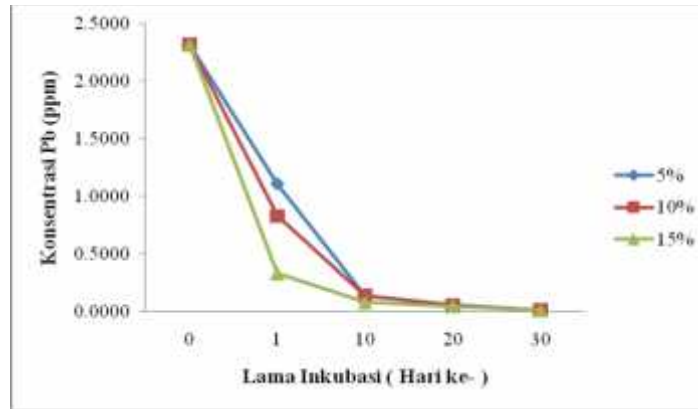
### Pengukuran Kadar Logam Pb

Analisis kadar logam Pb pada sampel selama inkubasi dilakukan dengan menggunakan AAS.



Gambar 3 Grafik pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi bakteri *P.putida* terhadap kadar logam Pb pada sampel

Grafik diatas menunjukkan bahwa sampel mengalami penurunan kadar logam Pb selama inkubasi. Perlakuan dengan menggunakan inokulum *P.putida* memiliki konsentrasi Pb awal yaitu 2,7047 ppm, kemudian setelah hari ke-30 inkubasi tersebut menurun hingga mencapai 0,7341 ppm dengan konsentrasi bakteri 5%, menurun hingga mencapai 0,6252 ppm dengan konsentrasi bakteri 10%, menurun hingga mencapai 0,3003 ppm dengan konsentrasi bakteri 15%.



Gambar 4 Grafik pengaruh lama inkubasi dan konsentrasi bakteri *S.aureus* terhadap kadar logam Pb pada sampel

Grafik menggunakan inokulum *P.putida* memiliki konsentrasi Pb awal yaitu 2,3200 ppm, kemudian setelah hari ke-30 inkubasi tersebut menurun hingga mencapai 0,0113 ppm dengan konsentrasi bakteri 5%, menurun hingga mencapai 0,0085 ppm dengan konsentrasi bakteri 10%, menurun hingga mencapai 0,0124 ppm dengan konsentrasi bakteri 15%.

### Pengaruh inokulum bakteri dan waktu inkubasi terhadap penurunan kadar logam Pb pada sampel

Persentase daya reduksi pengaruh pemberian bakteri *Pseudomonas putida* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Pemberian Bakteri *P. putida* terhadap logam berat Pb

Konsentrasi Sampel (ppm)	Perlakuan		Penurunan Logam Pb (%)
	Konsentrasi Sampel (ppm)	Konsentrasi Bakteri (%)	
1		5	73 <sup>a</sup>
		10	77 <sup>a</sup>
		15	88 <sup>a</sup>
3		5	61 <sup>a</sup>
		10	72 <sup>a</sup>
		15	73 <sup>a</sup>
5		5	43 <sup>a</sup>
		10	52 <sup>a</sup>
		15	63 <sup>a</sup>

Keterangan : Hasil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda dengan  $P < 0,05$

<sup>a</sup>(menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan)

<sup>b</sup>(menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan)

Penurunan logam berat Pb oleh isolat *P.putida* (bakteri Gram negatif) terjadi karena adanya komponen tertentu dalam selnya yang berperan dalam reduksi logam berat Pb. Pada bakteri Gram negatif diketahui adanya *glutathione* yang merupakan suatu komponen thiol non-protein major pada sel hidup yang mempengaruhi detoksifikasi pada logam berat dikarenakan kapasitas reduksinya yang besar. *Glutathione* diketahui hanya terdapat sedikit pada bakteri Gram positif jika dibandingkan dengan pada bakteri Gram negatif (Liu *et al.*, 2012). Persentase penurunan terbaik diperoleh pada konsentrasi sampel 1 ppm dengan pemberian inokulum bakteri *P.putida* sebanyak 15% yaitu sebesar 88%.

Persentase daya reduksi pengaruh pemberian bakteri *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Pemberian Bakteri *S.aureus* terhadap logam berat Pb

Konsentrasi Sampel (ppm)	Perlakuan		Penurunan Logam Pb (%)
	Konsentrasi Bakteri (%)		
1	5		99 <sup>a</sup>
	10		99 <sup>a</sup>
	15		99 <sup>a</sup>
3	5		72 <sup>a</sup>
	10		63 <sup>b</sup>
	15		68 <sup>b</sup>
5	5		69 <sup>a</sup>
	10		72 <sup>a</sup>
	15		82 <sup>a</sup>

Keterangan : Hasil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda dengan  $P < 0,05$

<sup>a</sup>(menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan)

<sup>b</sup>(menunjukkan tidak adanya pengaruh yang signifikan)

Penurunan kadar logam berat Pb yang tertinggi dicapai oleh isolat *S.aureus* yang merupakan bakteri gram positif yaitu sebesar 99%, diketahui lebih tinggi pada bakteri gram positif daripada isolat bakteri gram negatif (Alam *et al.*, 2011), dimana pengikatan logam oleh bakteri gram positif pada umumnya berkaitan dengan adanya polimer anionik spesifik pada struktur dinding sel yang sebagian besar tersusun atas peptidoglikan, asam teioik atau teikuronik (Şahin dan Öztürk, 2005). Gugus fungsional luar seperti karboksil, fosforil, dan hidroksil berperan penting dalam degradasi logam dan mengurangi Pb yang toksik secara signifikan (Srivastava *et al.*, 2007). Logam-logam tersebut terikat pada gugus karboksil pada rantai peptida dan peptidoglikan dan gugus fosfat dari lipopolisakarida. Demikian pula dengan adanya



plasmid pada bakteri yang dapat menyebabkan bakteri resisten terhadap logam berat (Hughes dan Poole, 1989).

Selama proses penurunan kadar logam Pb menunjukkan adanya peningkatan pertumbuhan bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hozumi *et al.* (2000) bahwa semakin banyak bakteri, semakin cepat sampel yang dikonsumsi oleh bakteri sebagai sumber karbon, sehingga berat residu sampel yang terukur juga semakin berkurang. Proses penurunan kadar logam Pb ini terjadi ketika bakteri menempel pada permukaan butiran-butiran sampel dengan mengeluarkan enzim oksidase yang dibutuhkan untuk memecah rantai karbon yang terikat pada membran sel.

Dinding sel bakteri *P. putida* dan *S. aureus* mampu mengikat ion Pb. Faktor kunci bioremediasi logam adalah logam bersifat *non-biodegradable* tetapi dapat melakukan transformasi melalui proses sorpsi, metilasi, kompleksasi dan mengubah nilai valensinya (Imani *et.al.*, 2011). Saat ion logam berat tersebar di sekitar sel, ion logam akan terikat pada elemen yang terdapat pada dinding sel berdasarkan kemampuan daya afinitas kimia yang dimiliki sel tersebut (Droste, 2007). Sebelum ion logam sampai ke membran sel dan sitoplasma sel, ion logam tersebut harus melalui dinding sel mikroba yang mengandung berbagai macam variasi polisakarida dan protein yang memiliki sejumlah sisi aktif yang mampu berikatan dengan ion logam. Terjadi pertukaran ion monovalen dan divalen seperti Na, Mg, dan Ca yang terdapat pada dinding sel digantikan oleh ion-ion logam berat kemudian terbentuk formasi kompleks antara ion-ion logam berat dengan kelompok fungsional seperti karbonil, amino, thiol, hidroksi, fosfat dan hidroksi-karboksil.

Medium pada kedua sampel yaitu isolat *P.putida* dan *S.aureus* dengan penambahan konsentrasi logam Pb 1 ppm paling banyak penurunannya dibanding medium dengan penambahan 3 ppm dan 5 ppm. Hasil perhitungan penurunan logam Pb pada perlakuan penambahan inokulum 15% menunjukkan kecenderungan yang baik dibandingkan dengan penambahan inokulum 5% dan 10% pada konsentrasi sampel sebesar 1 ppm. Dimana nilai persentase penurunannya sebesar 96%, hal ini berarti adanya proses bioremediasi mengubah sifat logam yang semula aktif menjadi tidak aktif. Bila dibandingkan dari penelitian Huang *et al.* (2005) menunjukkan bahwa dengan penambahan jamur *Phanerochaete chrysosporium* sebesar 2% dengan penambahan jerami dalam waktu inkubasi 42 hari dapat mengubah logam Pb dalam fase tertukarkan semula sebesar 258,9 mg/kg berkurang

menjadi 12,5 mg/kg (95%), dan dalam fase *residual* dapat meningkatkan kandungan logam Pb yang semula 8,4 mg/kg menjadi 129,6 mg/kg (1443%).

#### 4. SIMPULAN

Persentase penurunan kadar logam Pb pada sampel logam Pb 1 ppm dengan bakteri *Pseudomonas putida* sebesar 88%, dengan inokulum bakteri 15%, sedangkan pada sampel *Staphylococcus aureus* tertinggi yaitu sebesar 99% pada sampel konsentrasi 1 ppm, dengan inokulum bakteri 15%.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu, terutama kepada kedua orang tua, Ayah PELTU Tukimin dan Ibu Riyami, S.Pd., Bapak Rudiyanasyah, Ph.D., Ibu Puji Ardiningsih, S.Si, M.Si., Dr. Andi Hairil Alimuddin, M.Si., Dr. Anis Shofiyani, S.Si, M.Si., Ir.Rusdi Palureng, MM., Hendra Dwi Prasetyo, A.Md AK., Diana Novita, A.Md AK., Lucky Novita Syari, Muslimin, Indra Johansyah Alam, S.Si., Henri Martua Tampubolon, S.Si., Richo Saputra, A.Md Kesling, Wahdaniah, SKM, M.Kes., Hendra Budi Sungkawa, SKM, M.Kes, beserta mahasiswa Program Studi S2 Kimia angkatan 2015 (Yudi Yustira, M.Si, Dina Yuspita Sari, M.Si, Apt., Yusnita Rahmiyati, S.Si, Putry Apriyani, S.Pd).

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alam M., Ahmad S, dan Malik A., 2011, Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluent and affected soil, *Environ Monit Assess*, **178**: 281-291.
- Arinda, T., Shovitri, M., dan Zulaika, E., 2012, Resistensi Bakteri *Bacillus* terhadap Logam Berat, Scientific Conference of Enviromental Technology IX-2012.
- Badan Standardisasi Nasional, 2009, Air dan air limbah-Bagian 8 : Cara uji timbal (Pb) secara Spektrofotometri Serapan Atom (SSA)-nyala, *Standar Nasional Indonesia*, SNI 6989.8:2009.
- Huang, D. L., Guang M.Z., Xiao, Y.J., Chong, L.F., Hong, Y.Y., Guo, H.H., dan Hong, L.L., 2005. Bioremediation of Pb Contaminated Soil by Incubating with

- Phanerochaete Chrysosporium and Straw, *College of Environmental Science and Engineering*, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China.
- Husain, Dirayah., dan Iran, Haemi Muchtar., 2005, Bakteri Pengkompleks Logam Pb dan Cd dari Limbah Cair PT. Kawasan Industri Makasar, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Hasanudin, *Marina Chimica Avta*, **Vol. 6 No.1** Hal. 25-28 ISSN 1411-2132.
- Leahy, J.G., dan R.R. Colwell, 1990, Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environments : Microbiological Reviews, **54 (3)**, 305-315.
- Liu, Z., Wu, Y., Lei, C., Liu, P., dan Gao, M., 2012, Chromate reduction by a chromate-resistant bacterium, *Microbacterium sp*, *World J Microbiol Biotechnol*, **28**: 1585-1592.
- Mallick, N., and L., C., dan Rai., 1993, Influence of Culture Density, pH, Organic Acids and Divalent Cations on the Removal of Nutrients and Metals by Immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbial and Biotech*, **9**:196-201.
- Purnamawati, F.S., Soeprobowati, T.R., dan Izzati, M., 2015, Potensi *Chlorella vulgaris* Beijerinck Dalam Remediasi Logam Berat Cd Dan Pb Skala Laboratorium, *BIOMA*, **Vol. 16, No. 2**, Hal. 102 – 113.
- Şahin Y., dan Öztürk A., 2005, Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*, *Process Biochemistry*, **40**: 1895-1901.
- Sastrawijaya, Tresna A., 2009, *Pencemaran Lingkungan*, Rineka Cipta, Jakarta.
- Srivastava, S., dan Thakur, IS., 2007, Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter sp.* for removal of hexavalent chromium from tannery effluent, *Biodegradation*, **18**: 637-646.
- Syafrizal, Saka, R.D., dan Astuti, R.S., 2010, Pemanfaatan Surfaktan dalam Pengolahan Limbah Berminyak Secara Bioproses, *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta.
- Volk, A. Wesley dan M.F. Wheeler., 1986, *Mikrobiologi Dasar*, Edisi Kelima, Jilid 2 alih bahasa Soenartono A, Erlangga, Jakarta.
- Waluyo, L., 2005, *Mikrobiologi Lingkungan*, UMM Press, Malang.

Yani, Mohammad, dan Kurniasari, R.M., 2008, Pengaruh Logam Berat Terhadap Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Minyak Diesel, *Seminar Nasional Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI)*, Hal, 22-23.

Yulia, R.L., 2013, Bioremediasi Air Laut Terkontaminasi Minyak Bumi dengan Menggunakan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Skripsi*, ITS, Surabaya.