

THE DEGRADATION OF ANTRACENE COMPOUND USING BACTERIA ISOLATED FROM PAOTERE PORT WATERWAYS

Degradasi Senyawa Antrasena Dengan Menggunakan Isolat Bakteri Yang Berasal Dari Perairan Pelabuhan Paotere

Mirnawati¹, Nursiah La nafie¹, Seniwati Dali¹

¹Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Hasanuddin University, Jl. Perintis Kemerdekaan 90245, Makassar-Indonesia

Received: Juni 2015 Published: July 2015

ABSTRACT

The objectives of this study are (1) Determine the content of antrasena compound in the waste oil at the waterway of Paotere port (2) Determine the characteristics of antrasena degradation bacteria and (3) Determine the percentage of antrasena degradation. In this research an analysis of antrasena compound was conducted with sea water that had been polluted with oil. The next steps were to isolate and characterize the degrading bacteria of antrasena and to analyze the results of antrasena degradation. The results showed that (1) Concentration of the antrasena compound in the waterway of paotere port is $4,8 \times 10^{-10}$ ppm. (2) The bacteria can degraded of the antracene is *Bacillus cereus* (3) There was evidence that *Bacillus cereus* was able to degrade antracene compound, the highest degradation percentage is 98,11%, it was achieved on 12 day of incubation.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) antracena, isolation of bacteria biodegradation.

PENDAHULUAN

Minyak bumi mengandung ribuan komponen kimia yang berbeda dan lebih dari separuh (50-98%) berupa hidrokarbon. Produk olahan minyak bumi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar diesel yaitu solar dan bensin. Solar tersusun atas benzena, toluena, xylene, dan berbagai alkil pada hidrokarbon poliaromatik sedangkan bensin atau mogas (*motor gasoline*) tersusun atas campuran monomer heptana dan oktana. Senyawa-senyawa ini akan menimbulkan efek kronik pada mamalia seperti gangguan imunologis, reproduktif, serta timbulnya efek fetotoksik dan genotoksik (Herdiyanoro, 2005)

Salah satu pelabuhan di Makassar adalah pelabuhan paotere diperuntukkan bagi kapal perintis dan kapal pinisi. Limbah kapal tersebut menghasilkan limbah minyak yang berasal dari bahan bakar solar maupun bensin yang mengandung senyawa hidrokarbon poliaromatik. Antrasena merupakan senyawa hidrokarbon poliaromatik yang merupakan senyawa polusi yang dapat memberikan efek yang negatif terhadap suatu perairan dengan kata lain

mempengaruhi kualitas air suatu perairan. Kegiatan anjungan minyak, pembakaran minyak bumi yang tidak sempurna akan menghasilkan buangan yang mengandung senyawa HAP.

Banyak cara yang dilakukan untuk mengatasi pencemaran lingkungan akibat limbah minyak bumi, salah satunya adalah dengan melibatkan agen biologis berupa mikroorganisme yang memiliki kemampuan mendegradasi senyawa hidrokarbon yang terdapat di dalam minyak bumi menjadi mineral-mineral yang lebih sederhana (Goenadi, 2003).

Secara alamiah proses pemulihan oleh mikroorganisme di suatu media tercemar sudah terjadi dengan sendirinya, namun proses pemulihan tersebut terjadi sangat lambat karena pengaruh fisik, kimia dan biologis di lokasi pencemaran yang kurang atau tidak mendukung aktivitas mikroorganisme dalam mengurangi atau menghilangkan kadar bahan pencemar. Selain itu, jumlah dari bahan pencemar juga melebihi kemampuan mikroorganisme tersebut sehingga terjadi akumulasi bahan pencemar.

Teknik pemulihan lahan tercemar oleh minyak bumi yang dilakukan dengan menggunakan kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi struktur hidrokarbon ini

dikenal dengan istilah bioremediasi. Bioremediasi banyak digunakan dalam pemulihan pencemaran lingkungan akibat minyak bumi karena lebih efektif dan berwawasan lingkungan dibandingkan dengan metode pemulihan lingkungan baik secara fisika maupun kimia (Nugroho 2006).

Kelompok bakteri yang dapat mendegradasi senyawa HAP adalah *mycobacterium sp*, *bacillus*, *pseudomonas sp*. Tingkat biodegradasi terhadap senyawa fenantren dari isolat *Pseudomonas sp* Kalp3b22 asal Kumai terbukti dapat mendegradasi Fenantren sebesar 59,5 % selama 29 hari kultivasi. Model molekul fenantren terbukti bahwa bakteri ini mampu mendegradasi pada tahap pembukaan cincin aromatik (Murniasih, 2009).

Isolat indigenus bakteri *Pseudomonas putida* dan *Pseudomonas diminuta* merupakan bakteri gram negatif, bersifat aerobik, berbentuk batang dan dapat mendegradasi polutan terutama hidrokarbon aromatik. Kedua isolat ini dapat digunakan untuk menentukan kenitika biodegradasi baik dalam koloni tunggal maupun kultur tercampur (Kurniawan. 2012).

Mengingat limbah HAP yang terdapat pada pelabuhan paotere berbahaya bagi ekosistem laut, maka perlu suatu metode untuk mendegradasi senyawa antrasena. Penggunaan bakteri pendegradasi hidrokarbon pada lingkungan yang tercemar minyak akan lebih efektif apabila bakteri tersebut berasal dari sumbernya. Berdasarkan informasi tersebut, maka perlu dilakukan penelitian ini.

METODOLOGI

Bahan

Sampel air laut, antrasena (merk), diklorometan (merk), Na₂SO₄ anhidrat, alkohol, pepton, *yeast extract*, glukosa, agar, air laut steril, aquades, spiritus, gas nitrogen.

Alat

Cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, jarum ose, bunsen, spatula, pipet volum, kertas saring, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *autoclave*, oven, incubator, spektro UV-Vis, GC-MS (Agilent 7890), PCR-Real time Pocit-Generaach, GPS, pH meter, termometer, refraktometer, timbangan analitik, alat ultrasonik, mikroskop, hot plate, oven, pengaduk, botol vial, plastik wrab, aluminium voil, tisu, botol semprot, kertas pH (merk), spoid, sarung tangan, lampu spiritus.

Prosedur kerja

A. Pembuatan larutan Standar (Salenda, 2011)

1. Pembuatan Larutan Induk antrasena 1000 mg/L

Larutan induk antrasena 1000 mg/L dibuat dengan melarutkan 0.025 gantrasena dengan diklorometan. Setelah larut dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian diencerkan dengan diklorometan hingga tanda batas dan dihomogenkan

2. Pembuatan Larutan Internal Standar antrasena 50 mg/L

Larutan internal standar antrasena 50 mg/L dibuat dari larutan induk 1000 mg/L. Larutan induk dipipet sebanyak 0,5 mL kedalam labu ukur 10 mL kemudian diencerkan dengan diklorometan hingga tanda batas dan dihomogenkan.

B. Analisis antrasena dalam air laut (Salenda, 2011)

Air laut dipipet sebanyak 5 mL ke dalam botol kaca, setelah itu ditambahkan 5 mL pelarut diklorometan. Diekstraksi menggunakan alat ultrasonik selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dipindahkan ke dalam erlenmeyer, residu diekstraksi kembali dengan cara yang sama sebanyak 2 kali dengan 5 mL diklorometan menggunakan ultrasonik selama 15 menit. Hasil ekstrak/supernatan dikumpul pada erlenmeyer dan pelarut diuapkan dengan menggunakan gas nitrogen hingga 1 mL, kemudian ditambahkan natrium sulfat anhidrat, dipipet 0,5 mL ke dalam botol vial untuk diinjeksikan ke alat Kromatografi Gas Spektrofotometri massa.

C. Pengayaan Bakteri pendegradasi (Nasikhin dan Maya,2013)

Pengayaan bakteri pendegradasi dilakukan menggunakan media selektif secara aseptis. Media selektif dibuat dari pepton 0.4 g, *yeast extract* 0.2 g, dilarutkan dalam 1000 mL air laut steril. Media selektif kemudian dihomogenkan, disterilisasi dan ditambah dengan 50 mg/L antrasena. Media kemudian dituang ke dalam erlenmeyer 500 mL masing-masing volumenya 25 mL. Media ini digunakan untuk pengayaan bakteri pendegradasi antrasena tahap pertama, kedua dan ketiga.

Pengayaan tahap pertama dilakukan dengan cara menambahkan 25 mL sampel air laut yang diambil dari perairan tercemar diperairan

pelabuan Paotere, dimasukan ke dalam erlenmeyer berisi media selektif dan di *shaker* pada suhu ruang selama 7 x 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Sebelum dan sesudah masa inkubasi, dilakukan pengamatan OD(optical density) pada panjang gelombang 600 nm. Kontrol pada pengayaan tahap pertama ini adalah media minimal tanpa penambahan sampel air laut.

Tahap selanjutnya adalah pengayaan tahap kedua. Sumber inokulum adalah pengayaan tahap pertama yang berusia tujuh hari. Biakan bakteri 25 mL dan dibiakkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 25 mL media minimal baru. Pertumbuhan bakteri pada tahap ini juga dideteksi sebagaimana tahap pertama. Tahap terakhir adalah pengayaan tahap ketiga. Metode yang digunakan sama dengan pengayaan kedua dan sumber inokulum yang digunakan adalah pengayaan tahap kedua yang berusia 7 hari.

D. Isolasi dan Pemurnian Bakteri (Nasikhin dan Maya,2013)

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode tuang (pour plate) secara aseptis. Sumber isolat berasal dari pengayaan tahap ketiga. Media yang digunakan adalah media PCA (5.0 g pepton, 2.5 g *yeast extract*, 1.0 g glukosa dan 14.0 g agar dalam 1000 ml aquades steril) yang sudah disterilisasi. Cawan Petri berisi isolat bakteri kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Isolat tunggal yang tumbuh di permukaan media dimurnikan ke media baru dengan metode gores dan diinkubasi 1 x 24 jam. Pemurnian dilakukan secara bertahap sampai diperoleh isolat biakan murni melalui pengamatan mikroskopis.

E. Karakterisasi Bakteri(Nasikhin dan Maya,2013)

Bakteri diidentifikasi berdasarkan karakter biokimiawinya secara bertahap (step ways) sesuai dengan kunci dikotomi *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Isolat yang digunakan untuk uji biokimia merupakan biakan murni dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Selanjutnya dilakukan analisis DNA menggunakan PCR.

F. Biodegradasi antrasena

1. Pertumbuhan bakteri pendegradasi antrasena (Nasikhin dan Shovitri, 2013).

Isolat murni yang sudah dikarakterisasi dibiakkan kembali dalam media. Sebelumnya, dibuat terlebih dahulu starter berusia 1x24 jam. Diambil 10 mL starter dimasukkan dalam 100 mL media dan diinkubasi di rotary shaker pada suhu ruang selama 7 x 24 jam. Selama masa inkubasi, pertumbuhan isolat diukur berdasarkan kerapatan optik pada panjang gelombang 600 nm setiap 24 jam. Ada dua kontrol pada tahap ini yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif merupakan isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media selektif tanpa antrasena sedangkan kontrol negatif merupakan media minimal dengan antrasena, namun tanpa isolat bakteri. Hasil pengukuran pertumbuhan dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif selanjutnya digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan.

2. Perubahan konsentrasi antrasena

a. Pembuatan prekulturr bakteri (sarbini, 2012)

Erlenmeyer yang berisi media minimal dan substrat antrasena 50 mg/L dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Media disterilkan selama 15 menit kemudian ditambahkan bakteri yang telah diinokulasi. Prekultur bakteri di inkubasi dalam *shaker incubator* selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm.

b. Pembuatan kultur bakteri

Erlenmeyer yang berisi media minimal dan substrat antrasena 50 mg/L dihomogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Media disterilkan selama 15 menit dan ditambahkan 10 mL kultur bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm dan waktu inkubasi selama \pm 12 hari.

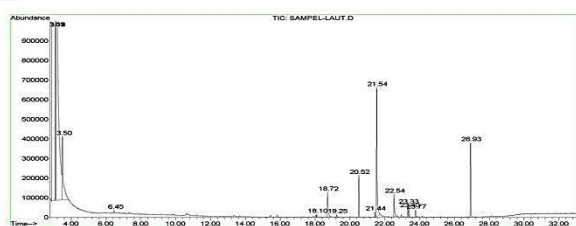
c. Pengukuran konsentrasi antrasena (Murniasih,dkk, 2009)

Sebanyak 5 mL larutan kultur diekstrak dengan diklorometan, kemudian diambil fasa organiknya, selanjutnya untuk menghilangkan kandungan air ditambahkan natrium sulfat. Fase organik dipekatkan hingga volume akhir 1mL, kemudian dilakukan analisa dengan GC-MS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Analisis Antrasena Dalam air laut

Dari data pada tabel 1 dan gambar 1 dapat dilihat konsentrasi antrasena yang diperoleh yaitu $4,8 \times 10^{-10}$ ppm pada titik C. Terdapatnya antrasena C di sebabkan karena lokasi sampling dekat dengan pelabuhan Pelni. Sumber pencemar dapat berasal dari aktivitas transport laut berupa buangan serta tumpahan minyak. Aktivitas pasar ikan di sekitarnya turut mempengaruhi keberadaan pencemaran karena menghasilkan limbah organik.



Gambar 1. Kromatogram air laut pada titik C

Tabel 1 Data konsentrasi antrasena dalam sampel air laut

Sampel	Konsentrasi antrasena (ppm)
Titik A	-
Titik B	-
Titik C	$4,8 \times 10^{-10}$

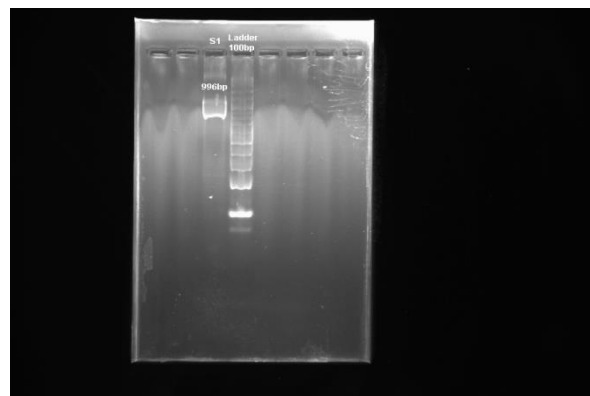
Untuk titik A dan B tidak terdapat senyawa antrasena di sebabkan karena lokasi sampling barada jauh dari pesisir pantai jadi kemungkinan untuk terkontaminasi oleh limbah minyak sangat kecil.

B. Karakterisasi Bakteri

1. Analisis Molekul Gen 16S rRNA Isolat Bakteri

Karakterisasi molekul gen 16S rRNA bakteri dilakukan dengan mengidentifikasi urutan pasangan molekul gen DNA melalui metode *Polimerase Chain Reaction* (PCR). Hasil sekuensing molekul gen DNA diolah dengan menggunakan perangkat software *Bioedit* versi 7.2.5, sehingga diperoleh urutan molekul gen isolat terhadap molekul DNA database yang ada pada *GenBank*, dimana molekul gen 16S rRNA bersifat universal pada bakteri, dari hasil amplikasi isolat di atas dapat disimpulkan bahwa

bakteri yang dihasilkan adalah jenis bacillus. Untuk mengetahui karekterisasi bakteri bacillus dapat dapat dibandingkan dengan urutan RNA sampel (Alamri 2012 dalam Marzuki, 2015).



Keterangan:
 S1 = sampel
 Ladder 100bp = standar
 996bp = area sampel

Gambar 2 Identifikasi PCR

Sekuen DNA gen 16S rRNA ini dianalisis dengan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Hasil penjejarian sekuen sampel dengan sekuen *GenBank* menunjukkan kesamaan deret homolog yang tinggi, yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) bakteri

Sampel	Sekuen Sampel	Sekuen GenBank	Identitas (%)	Spesies
Isolat	1-542	542-1498	942/960 (98%)	<i>Bacillus cereus</i> B12 16S

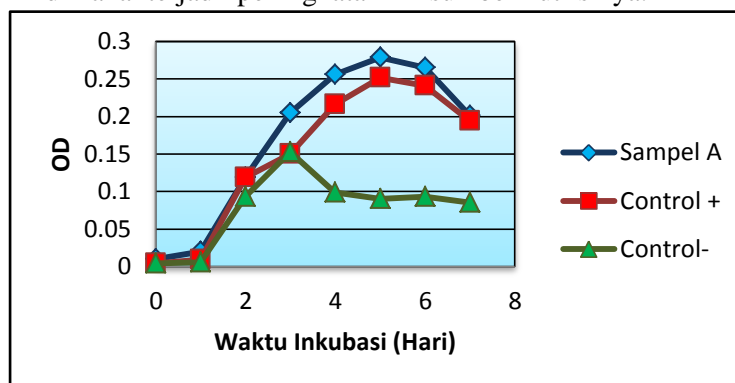
Dari hasil BLAST Analisis urutan sekuen DNA sampel isolat memiliki kesamaan genus yang tinggi yaitu 98% dimana isolat tersebut teridentifikasi jenis *Bacillus cereus*.

C. Biodegradasi Antrasena

1. Pertumbuhan Bakteri Dalam Kultur Biodegradasi

Berdasarkan Gambar 3 di atas untuk isolat dapat dilihat, bahwa pada hari ke 0 sampai hari ke 1 terjadi fase adaptasi lingkungan, fase ini merupakan penyesuaian diri bakteri terhadap lingkungan. Fase eksponensial terjadi pada hari ke 1 sampai ke 4 dimana terjadi peningkatan

bakteri tumbuh lebih baik dibandingkan dengan kontrol (+) dan kontrol (-). Hal ini berarti isolat tersebut kemungkinan besar mampu memanfaatkan antrasena sebagai sumber karbon, sedangkan pada kontrol (+) dengan tidak adanya penambahan antrasena menyebabkan berkurangnya bakteri yang tumbuh dimana bakteri hanya memanfaatkan media sebagai sumber nutrisinya.



Gambar 3 Kurva Pertumbuhan Bakteri

jumlah bakteri. Hal ini disebabkan karena bakteri telah beradaptasi dengan lingkungannya serta nutrisi yang tersedia dalam media mencukupi untuk kelangsungan hidup dan perkembangbiakan bakteri.

Pertumbuhan optimum bakteri terjadi pada hari ke 5 dengan nilai OD yaitu 0.279 dan mulai menurun pada hari ke 6, sedangkan kontrol (+) pertumbuhan optimum terjadi pada hari ke 5 inkubasi. Kecepatan pertumbuhan tergantung dari kadar substrat, oleh karena itu menurunnya kecepatan pertumbuhan sudah terjadi ketika kadar substrat berkurang sebelum substrat habis terpakai. Dengan demikian pengalihan dari fase eksponensial ke fase stasioner terjadi berangsur-angsur. Faktor-faktor lain yang menyebabkan menurunnya kecepatan pertumbuhan antara lain kepadatan populasi yang tinggi dan terjadinya akumulasi bahan toksik, namun pada hari ke 7 terlihat bahwa masih banyaknya bakteri yang hidup. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki fase pertumbuhan yang panjang. Adanya pertumbuhan bakteri pada kontrol (-) disebabkan karena terjadinya kontaminasi selama pengerjaan.

Pada Gambar 3 dapat dinyatakan isolat mampu mendegradasi antrasena. Hal ini dapat dilihat dari perbandingan nilai *Optical Density* (OD) antara media pertumbuhan dengan kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-). Pertumbuhan

Pada Tabel 3 di atas dari hari ke 0 sampai hari ke 12 terbentuk senyawa baru, dimana senyawa yang terbentuk lebih sederhana dan memiliki tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan antrasena.

Tabel 3 hasil pembentukan senyawa lain selama proses degradasi

Hari	Waktu Retensi (RT)	Senyawa yang terbentuk
0	21.54	Antrasena
4	10.67	Morpholine-4-Carbaldehyde
8	18.85	Hexana
12	3.81	Asam aseat

Kecepatan proses biodegradasi antrasena dipengaruhi oleh kelarutan sumber karbon antrasena dalam media pertumbuhan. Data perubahan konsentrasi antrasena sebagai sumber karbon tunggal pada media pertumbuhan oleh *Bacillus cereus* ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4 Data perubahan konsentrasi antrasena dan % degradasi antrasena dari *Bacillus cereus*

Waktu Inkubasi (hari)	Konsentrasi (ppm)	% Degradasi
0	$9,0 \times 10^{-9}$	-
4	$2,1 \times 10^{-9}$	76,66
8	$1,7 \times 10^{-9}$	81,11
12	$1,7 \times 10^{-10}$	98,11

Konsentrasi antrasena dalam kultur biodegradasi selalu terjadi penurunan dari hari ke hari. Hal ini disebabkan karena antrasena telah terdegradasi oleh bakteri, penurunan konsentrasi antrasena menyebabkan persen degradasinya meningkat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Konsentrasi antrasena yang diperoleh dari ketiga titik sampling adalah titik C sebesar 4×10^{-10} ppm, sedangkan titik A dan B tidak terkontaminasi antrasena.
2. Hasil karakterisasi molekul gen 16S rRNA isolat bakteri pendegradasi antrasena yaitu *Bacillus cereus*. Hasil BLAST untuk isolat tersebut mencapai tingkat kesamaan genus tinggi yaitu mencapai 98%.
3. Degradasi senyawa antrasena oleh *Bacillus cereus* pada hari ke 4 sebesar 76,6%, pada hari ke 8 sebesar 81,11%, sedangkan pada hari ke 12 sebesar 98,11%.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas, R. M., dan Bartha, R., 1981. *Microbiology Ecology Fundamentals and Applications*. Addison Wesley Publishing Company, Inc.
- Augustine, D., 2008. *Akumulasi Hidrokarbon Aromatik Polisiklik (PAH) dalam Kerang Hijau (Perna Viridis.L) di perairan Kamal Muara, Teluk Jakarta*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Chapman, P.J., et.al., 1995. *fossil fuel biodegradation; laboratory study*. Environmental Health perspectives. 203.
- Charlena-et.al., 2009. Degradasi hidrokarbon pada tanah tercemar minyak bumi dengan isolate A 10 dan D 8. Jurnal biosains. Seminar Nasional Sain II. Bogor.
- Darmadi Rifni, 2011. Eksplorasi spons (Porifera), spon atau (porifera) 830 spesies dengan kelas yaitu Calcerea, Demospongiae, dan Hexactinellidae, Bioremoval, Metode.
- Herdiyantoro, D., 2005. *Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh Bacillus sp. Galur ICBB 7859 dan ICBB 7865 dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah dengan Penambahan Surfaktan*. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Freedman. B. 2009. *Oil Pullution, environmental ecology the impact of pollution and other stresses on ecosystemstructure function*. Academic press. Inc USA.
- Foght, J. M., dan Westlake, D.W.S., 1987. *Bioremediation of hydrocarbons in freshwater*. In: Vandermeulen & Hruday (Ed). *Oil in Freshwater : Chemistry, Biology, Countermeasure Technology*. Pergamon Press, New York, 213-217.
- Jaringan Advokasi Tambang 2004. Gali beritaP: *Pantai Balikpapan tercemar*, <http://www.jatam.org>, (5 januari 2013).
- Juhasz, A. L., dan Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad* 45 : 57-88.
- Johnson, J. S., Woolhouse J. K., Prommer, H., Barry, A. D dan Christofi, N., 2003. Contribution of Anaerobic Microbial Activity to Natural Attenuation of Benzene in Groundwater. *Eng. Geol.* 70 : 343-349.
- Killops, S. D., dan Killops, V. J., 1993. *An introduction to Organic Geochemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Kurniawan. A., 2012. The Isolation and identification of petrofilic bacteria bacteria from Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) residues under 1% (w/w) of bioremediation process result. ITS-ECO campur.
- Mueller, J. G., Cerniglia., dan Pritchard, P. H., 1998. *Bioremediation of Environments Contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*. In : *Bioremediation: Principles and Application*. ed R.L. Crawford & D.L. Crawford. Cambridge University Press. Cambridge.
- Mustaller, 1996. *Natural resources and development*. Mungrave forest, institute for scientific cooperation, maier, Rottenberg, federal of journal Germany.
- Murniasih, T., Yopi., dan Budiawan., 2009. Biodegradasi Fenantren oleh Bakteri Laut Pseudomonas sp KalP3b22 Asala Kumai Kalimantan Tengah. *Makara Sains* 13(1): 77-80.
- Nasikhin., dan Shovitri, M., 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan

- Gresik.ITS.*Jurnal Sains dan Seni Pomits* 2(2): 2337-3520.
- Nugroho, S. H., 2003. *Degradasi Minyak Bumi Melalui Mikroorganisme*. Situs Kimia. Akses tanggal 9 Oktober 2014.
- Pagoray, H., 2003. *Lingkungan Pesisir dan Masalahnya sebagai daerah aliran buangan limbah*. <http://www.yahoo.com> (5 januari 2013).
- Pastra. D.A., 2011. Penapisan bakteri yang bersimbiosis dengan spons jenis *Aplysina* sp sebagai penghasil antibakteri dari perairan pulau Tegal Lampung, universitas Sriwijaya.
- Peraturan Pemerintah RI Nomor 18 Tahun 1999, *Tentang Pengelolaan Bahan Berbahaya dan Beracun*.
- Pikoli. M.R.P., Aditiawati, & D.I. Astuti 2000. Isolasi bertahap dan identifikasi isolate bakteri termofilik pendegradasi minyak bumi dari sumur bangko. Jurusan Biologi, ITB, Bandung.