

**SENSITIVITAS PERBEDAAN TEMPERATUR STERILISASI DALAM
MEDIUM DEGRADASI TERHADAP KEMAMPUAN BAKTERI
DALAM MENDEGRADASI MINYAK SOLAR**

Oleh:

Ni Putu Ristiati

Jurusan Pendidikan Biologi, FMIPA Undiksha

puturistiati@gmail.com

ABSTRAK

Sumber pencemaran yang paling tinggi disebabkan oleh tumpahan minyak bumi khususnya minyak solar yang terjadi di lingkungan akuatik. Upaya yang dilakukan untuk mengatasi pencemaran tersebut dengan cara fisik, kimia, dan biologis. Penggunaan bakteri merupakan salah satu cara yang paling efisien dan ramah lingkungan untuk melakukan biodegradasi minyak tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui: (1) jenis-jenis bakteri yang mampu mendegradasi minyak solar di perairan pelabuhan Celukan Bawang, (2) sensitivitas perbedaan temperatur sterilisasi terhadap jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar. Penelitian ini tergolong penelitian eksploratif dan eksperimental. Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan dengan dua cara: (1) pengambilan data di lapangan, (2) analisis sampel di laboratorium. Berdasarkan hasil karakterisasi dari penelitian ini didapatkan lima isolat bakteri, yaitu (1) *Bacillus* (isolat E dan G₂), (2) *Pseudomonas* (isolat D dan G₁), (3) *Acetobacter* (isolat H), (4) *Halomonas* (isolat F), dan (5) *Neisseria* (isolat A, B, dan C₂). Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa keanekaragaman bakteri pendegradasi minyak solar di Pelabuhan Celukan Bawang tergolong sedang. Berdasarkan analisis data diperoleh bahwa $F_{hitung} = 84,867 > F_{tabel} = 2,62$ yang berarti ada perbedaan sensitivitas temperatur sterilisasi secara signifikan terhadap jumlah koloni dan kadar asam n-oktanoat. Perbedaan ini terjadi karena temperatur tinggi dapat membunuh bakteri dengan cara mendenaturasi protein.

Kata-kata kunci: temperatur, bakteri, degradasi, minyak solar

1. PENDAHULUAN

Manusia dan lingkungan hidup memiliki hubungan saling ketergantungan antara satu dengan yang lainnya. Pemanfaatan alam secara ekstraktif oleh manusia, kadang kala tidak memperhatikan aspek konservasi lingkungan. Hal ini

menyebabkan terjadinya pencemaran atau penyimpangan kondisi lingkungan yang berakibat buruk terhadap kelangsungan hidup organisme lain. Seperti diketahui, sumber pencemaran yang paling tinggi dewasa ini adalah dari tumpahan minyak bumi. Minyak bumi digunakan sebagai sumber energi utama keperluan dunia dan bahan baku industri petrokimia, diangkut secara besar-besaran ke seluruh penjuru dunia dengan kapal tanker. Dampak pencemaran barang beracun dan berbahaya terutama minyak karena minyak merupakan pencemar terbesar dewasa ini terhadap lingkungan maritim. Apabila minyak tumpah ke laut berdasarkan hasil penyelidikan IMO (*International Maritime Organization*) selama ini akan menyebabkan kerugian di bidang ekologi, tempat rekreasi, lingkungan pelabuhan dan dermaga, instalasi industri, perikanan, hewan, tumbuhan, terumbu karang, dan taman laut (Pieter Batti, 2000).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat-isolat mikroba yang dapat menguraikan minyak bumi khususnya minyak solar, mengetahui sensitivitas perbedaan temperatur sterilisasi terhadap jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar dan jumlah minyak solar yang terdegradasi.

2. METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian untuk isolasi bakteri, tergolong penelitian eksploratif, yaitu penelitian yang bertujuan untuk menjelaskan tentang suatu gejala yang masih sangat kurang (Bawa, 1997). Penelitian tentang temperatur sterilisasi tergolong penelitian eksperimental sungguhan (*true experimental*). Rancangan penelitian eksperimen yang digunakan adalah: *The Randomized Posttest-Only Control Group Design* (Bawa, 1997). Rancangan ini diasumsikan bahwa di dalam suatu populasi tertentu, tiap unit populasi adalah homogen, artinya semua karakteristik antarunit populasi adalah sama, sehingga pengukuran awal tidak dilakukan. Berdasarkan asumsi tersebut, maka digunakan rancangan eksperimen tanpa ada pengukuran awal (*pretest*), tetapi hanya *posttest*. Ulangan dilakukan sebanyak 5 kali yang didapat dari rumus $t(r-1) \geq 20$, dengan t = jumlah perlakuan, r = jumlah pengulangan (Gaspersz, 1991). Jumlah keseluruhan sampel adalah 30 sampel termasuk kontrol.

Prosedur analisis sampel di laboratorium :

I. Untuk isolasi bakteri dilakukan antara lain :

- a) Isolasi Bakteri :1) 1 ml sampel air laut dituangkan ke dalam cawan petri (teknik agar tuang) pada media *Bushnell-Haas Mineral Salts Agar* yang telah ditambahkan dengan minyak solar kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam; 2) dari koloni-koloni yang tumbuh, tiap koloni dengan tipe yang berbeda ditanam pada cawan petri lain hingga diperoleh satu isolat murni; 3) Isolat murni dipindahkan ke media agar miring.
- b) Identifikasi Bakteri : Isolat yang sudah murni selanjutnya diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan biokimia. Identifikasi makroskopis dilakukan melalui pengamatan bentuk dan tipe koloni bakteri. Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan cara pewarnaan, yaitu pewarnaan gram, spora, kapsul, dan tahan asam. Identifikasi biokimia dilakukan dengan menggunakan serangkaian uji fermentasi gula-gula, uji hirolisis pati dan gelatin, uji Motilitas, uji Katalase, uji *Methyl Red*, uji Voges-Proskauer, dan uji H₂S (*Triple Sugar Iron Agar*).

II. Untuk temperatur sterilisasi dilakukan :

- a) Pengambilan sampel air, pengambilan sampel air laut diambil di pelabuhan Celukan Bawang, yaitu di 10 titik di sekitar pelabuhan yang koordinatnya telah ditentukan sebelumnya. Dengan bantuan GPS, koordinat pengambilan sampel kemudian dicari dan dilakukan pengambilan sampel dengan *water sampler*. Sampel air selanjutnya disimpan pada jerigen dan diletakkan pada box berisi es balok bersuhu 4⁰C dan dibawa ke tempat penelitian;
- b) Sampel air laut yang diambil di 10 titik tersebut kemudian dicampur, masing-masing diambil sebanyak 100 ml;
- c) membuat medium pembenihan, medium pembenihan dibuat untuk membiakkan bakteri pendegradasi minyak solar yang diambil dari sampel air laut tersebut. Pembiakan dilakukan untuk mengantisipasi gagalnya penelitian oleh karena sedikitnya bakteri yang terdapat pada sampel air laut. Medium

yang digunakan adalah *Bushnell-Haas Mineral Salt* pada labu Erlenmeyer yang kemudian ditambahkan dengan sampel air laut. Medium pembenihan dibuat sebanyak 4 jenis yang terdiri atas 10 ml sampel air laut dalam 100 ml *Bushnell-Haas Mineral Salt*; 30 ml sampel air laut dalam 100 ml *Bushnell-Haas Mineral Salt*; 60 ml sampel air laut dalam 100 ml *Bushnell-Haas Mineral Salt*, dan 90 ml sampel air laut dalam 100 ml *Bushnell-Haas Mineral Salt*. Medium pembenihan tersebut kemudian diinkubasi selama 16 jam dan dikocok setiap jamnya;

- d) pengujian medium pembenihan. Setelah 16 jam inkubasi, masing-masing medium pembenihan diuji di bawah mikroskop, tanpa dan dengan pewarnaan untuk mengetahui medium pembenihan yang mana jumlah bakterinya paling banyak;
- e) Perlakuan fisik pada sampel. Setelah didapat medium pembenihan dengan jumlah bakteri paling banyak, kemudian dari medium pembenihan tersebut diambil kira-kira 20 ml sampel letakkan pada tabung reaksi dan ditutup dengan aluminium foil kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf sampai jarum penunjuk pada autoklaf menunjukkan angka 100°C ;
- f) Prosedur yang sama dengan kegiatan e untuk temperatur sterilisasi 109°C, 115°C, 121°C, dan 126°C;
- g) Isolasi bakteri dan pengujian kemampuan pertumbuhan koloni bakteri : 1) 1 ml sampel yang telah diberi perlakuan fisik serta yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol, masing-masing dituang ke cawan petri pada media *Bushnell-Haas Mineral Salt Agar* (media padat) yang telah diisi 5 tetes minyak solar, kemudian diinkubasi. 2) Dari masing-masing perlakuan tersebut, diamati pertumbuhan koloni bakterinya selama 2 x 24 jam;
- h) Pengujian kemampuan degradasi minyak solar, 1 ml sampel yang telah diberi perlakuan fisik serta yang tidak diberi perlakuan sebagai kontrol, masing-masing dituang ke dalam labu Erlenmeyer yang telah berisi 100 ml media *Bushnell-Haas Mineral Salt* (media cair) kemudian ditambahkan dengan 10

ml minyak solar selanjutnya diinkubasi. Sebelum diinkubasi, pH medium diukur dengan pH universal untuk mengetahui pH awal;

- i) Pengocokan media, pengamatan perubahan yang terjadi dan pengukuran pH. Pengocokan dilakukan setiap 1 x 24 jam kemudian dilakukan pengamatan perubahan warna, kekeruhan, keadaan minyak, dan perubahan pH yang terjadi. Pengukuran pH sangat penting artinya untuk menentukan waktu dilakukannya titrasi.

Teknik Analisis Data. 1) Untuk isolasi bakteri. Data mengenai karakteristik dari isolat bakteri pendegradasi solar dilihat dari pewarnaan gram, spora, kapsul, dan tahan asam serta hasil dari identifikasi uji secara biokimia yang didapatkan dari penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Data keanekaragaman dianalisis dengan menggunakan rumus diversitas dari Shannon-Wiener (Atlas, 1997). 2) Untuk temperatur sterilisasi data yang telah terkumpul pada akhir penelitian berupa jumlah koloni bakteri serta kadar asam n-okanoat dimasukkan ke dalam tabel kerja. Setelah data ditabulasi ke dalam tabel kerja, selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Analisis Multivariat (MANOVA).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Hasil

Untuk isolasi bakteri, dari pengamatan secara makroskopis didapatkan koloni yang berhasil diisolasi memiliki bentuk menyebar tidak teratur, bulat dengan tepi bergelombang, bulat dengan tepi timbul, bulat, bentuk L, dan filamen. Dilihat dari bentuk tepinya ada yang berbentuk bercabang, bergelombang, lobat, dan halus. Berdasarkan bentuk permukaannya (penonjolan) ada yang berbentuk datar, menonjol, dan konveks, sedangkan dilihat dari warnanya, semua koloni berwarna putih. Bakteri yang ditemukan bersifat Gram negatif (-) dan hanya dua isolat yang bersifat Gram positif (+) yaitu isolat E dan G₂. Dalam pewarnaan gram apabila pH basa, maka bakteri yang dijumpai memiliki sifat Gram positif, sedangkan apabila kondisi lingkungan memiliki pH asam, maka gam negatif akan lebih banyak ditemui (Jenie, 1979). Pada penelitian ini kondisi lingkungan

yang diambil sampelnya memiliki rentangan pH antara 6,4 -7,1. Oleh karena itu, bakteri yang ditemukan kebanyakan bersifat gram negatif. Pada pewarnaan tahan asam, dari semua isolat yang ditemukan bersifat tidak tahan asam (-). Hal ini disebabkan oleh bakteri yang diwarnai tersebut hanya mampu bertahan pada kondisi pH antara netral sampai sedikit asam, sehingga pada saat diberikan pewarnaan tahan asam, semua isolat menunjukkan sifat tidak tahan asam. Sementara itu, dari pewarnaan kapsul ada beberapa isolat yang memiliki kapsul (+) dan ada juga yang tidak memiliki kapsul (-) dan untuk pewarnaan sporanya ada beberapa isolat yang membentuk endospora (+) dan ada yang berupa sel vegetatif (-). Berdasarkan hasil uji biokimia yang dilaksanakan, untuk uji fermentasi glukosa, semua isolat menunjukkan uji positif terhadap gula tersebut, sedangkan untuk fermentasi maltosa dan sukrosa hanya isolat D yang tidak mampu memfermentasinya. Hal ini menunjukkan bahwa hampir semua isolat mampu melakukan fermentasi dari gula-gula tersebut. Untuk fermentasi pada gula laktosa, hanya isolat D, E, dan H yang mampu memfermentasi laktosa tersebut. Untuk uji hidrolisa, pada isolat D, F, dan G tidak mampu menghidrolisa pati, sedangkan untuk hidrolisa gelatin hanya mampu dilakukan oleh isolat D, F, dan G₁. Uji motilitas dan katalase menunjukkan uji positif pada semua isolat. Hal ini menunjukkan bahwa semua isolat dapat melakukan pergerakan dan menghasilkan enzim katalase. Untuk uji *methyl red*, *Voges Proskauer*, dan H₂S didapatkan isolat bereaksi positif dan ada juga isolat yang bereaksi negatif.

Untuk temperatur sterilisasi, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka diperoleh hasil bahwa perlakuan fisik dengan suhu sterilisasi pada sampel memberikan sensitivitas terhadap jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar. Jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar semakin berkurang dengan semakin tingginya temperatur sterilisasi yang diperlakukan pada sampel. Jumlah koloni bakteri berturut-turut semakin berkurang yaitu mulai dari kelompok kontrol, kemudian sampel yang diberi perlakuan fisik temperatur sterilisasi dengan suhu 100°C, 109°C, 116°C, 121°C dan 126°C. Terlihat jelas bahwa pemberian perlakuan fisik berupa temperatur sterilisasi dengan suhu yang berbeda-beda sensitif terhadap jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar

yang tumbuh. Semakin tinggi suhu yang diberikan semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

Untuk isolasi bakteri, hasil analisis menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara signifikan terhadap jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada setiap sampel yang diambil dari ketiga stasiun tersebut. Tidak adanya perbedaan jumlah koloni tersebut diduga terjadi akibat letak geografis dan pengaruh kondisi lingkungan di Pelabuhan Celukan Bawang itu sendiri. Letak pelabuhan yang berupa teluk menyebabkan arus air laut relatif tenang sehingga penyebaran bakteri yang disebabkan oleh arus tidak mengumpul pada satu stasiun tertentu. Selain itu, kondisi lingkungan berupa kecepatan angin dan suhu air laut pada masing-masing stasiun yang relatif sama menyebabkan tidak adanya pergerakan air laut pada permukaan.

Untuk temperatur sterilisasi, berdasarkan hasil pengujian dengan MANOVA pada taraf signifikansi 5% di atas, diperoleh angka signifikansi $< 0,05$ dengan $F_{hitung} = 84,867 > F_{tabel} = 2,62$. Dengan demikian H_0 ditolak dan H_1 diterima yang berarti ada perbedaan jumlah koloni yang tumbuh dan kadar asam oktanoat yang terbentuk dari perbedaan pengaruh temperatur sterilisasi yang diberikan pada sampel. Berdasarkan data hasil penelitian terlihat bahwa penurunan jumlah koloni bakteri berkorelasi dengan penurunan kadar asam oktanoat yang terbentuk sebagai akibat peningkatan perlakuan temperatur sterilisasi yang diberikan. Korelasi tersebut adalah sebesar 0,966 yang berarti berkorelasi sangat kuat positif.

3.2 Pembahasan

Temuan penelitian ini menunjukkan : I. untuk isolasi bakteri, isolat bakteri yang diperoleh dalam penelitian ini, yang ditumbuhkan dalam media *Bushnell-Haas Mineral Salts Agar* berjumlah sembilan isolat. Isolat yang diidentifikasi dapat dikelompokkan ke dalam lima genus bakteri yaitu (1) *Bacillus* (isolat E dan G₂), (2) *Pseudomonas* (isolat D dan G₁), (3) *Acetobacter* (isolat H), (4) *Halomonas* (isolat F), dan (5) *Neisseria* (isolat A, B, dan C₂). Karena indeks diversitas yang diperoleh $\geq 1,0$ dan $\leq 3,0$, maka dapat ditentukan tingkat

keanekaragamannya sedang. Tingkat keanekaragamannya sedang diakibatkan karena tempat pengambilan sampel dilakukan di kolom air saja sehingga bakteri yang didapatkan hanya yang bersifat motil yang mampu bergerak ke permukaan air untuk mencari makanan. Sebaliknya untuk bakteri yang bersifat nonmotil tidak dapat bergerak untuk mencari makanan ke permukaan sehingga akan tertimbun di sedimen.

II. Untuk temperatur sterilisasi, Peningkatan temperatur dan tekanan yang diberikan pada sampel menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Hal ini disebabkan temperatur sterilisasi yang semakin tinggi akan mengganggu metabolisme bakteri dengan cara denaturasi protein. Laju dari sebagian besar reaksi kimia meningkat seiring dengan peningkatan temperatur. Namun, untuk reaksi enzimatik, peningkatan temperatur yang berlebihan (melebihi suhu optimum) secara drastis mengurangi laju reaksi. Penurunan laju reaksi ini disebabkan oleh terjadinya denaturasi protein yang menyebabkan hilangnya bentuk/struktur tiga dimensi dari enzim (konfigurasi tertiana). Denaturasi protein meliputi rusaknya ikatan hidrogen dan ikatan nonkovalen lainnya yang menyokong protein tersebut. Denaturasi protein enzim merubah susunan asam amino pada sisi aktif, mengubah bentuknya, dan menyebabkan enzim kehilangan kemampuan katalisnya. Jika denaturasi berlangsung sampai enzim kehilangan daya larut dan membeku/menggumpal/ mengental, enzim tidak dapat lagi menjadi normal kembali. Denaturasi enzim ini menyebabkan metabolisme dari bakteri menjadi terhambat dan menyebabkan kematian pada bakteri tersebut. Perlakuan dengan tekanan yang tinggi juga akan mematikan bakteri dengan cara yang sama dengan kerja temperatur yaitu denaturasi protein dengan mengubah struktur molekul dari protein dan karbohidrat sehingga metabolisme bakteri menjadi terganggu. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data penurunan jumlah koloni bakteri setiap dilakukan peningkatan tekanan dan temperatur sterilisasi. Namun, dalam penelitian ini juga diketahui bahwa bakteri pendegradasi minyak solar yang terdapat di Perairan Pelabuhan Celukan Bawang masih dapat hidup pada suhu paling tinggi yang diperlakukan, yaitu 126°C dengan tekanan 20 psi pada sampel. Hal ini dapat

dilihat dari jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media agar dengan jumlah rata-rata 65,8 koloni. Ketahanan bakteri dari temperatur dan tekanan yang tinggi disebabkan oleh beberapa bakteri pendegradasi minyak solar dapat membentuk endospora (Totoro, *et al.*, 2007; Prescott, *et al.*, 2003). Selain karena sifat bakteri yang termofilik, juga disebabkan oleh pemberian perlakuan fisik tidak dilakukan selama 15 menit sesuai dengan prosedur standar sterilisasi menggunakan autoklaf.

4. PENUTUP

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut. (1) Bakteri yang ditemukan di perairan Pelabuhan Celukan Bawang yang mampu mendegradasi minyak solar adalah dari genus *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Hallomonas*, dan *Neisseria*. (2) Karakterisasi secara makroskopis didapatkan bakteri bersifat Gram negatif dan Gram positif. Pada pewarnaan tahan asam, semua isolat bersifat tidak tahan asam. Pewarnaan kapsul ada beberapa isolat yang memiliki kapsul dan ada juga yang tidak. Pewarnaan spora ada membentuk endospora dan ada yang berupa sel vegetatif. Berdasarkan hasil uji biokimia, untuk uji fermentasi glukosa, semua isolat menunjukkan uji positif, sedangkan untuk fermentasi maltosa dan sukrosa ada yang tidak mampu memfermentasinya. Uji motilitas dan katalase menunjukkan uji positif pada semua isolat. Karakterisasi secara makroskopis yaitu dengan pengamatan bentuk koloni, didapatkan delapan bentuk yang berbeda. (3) Keanekaragaman bakteri yang mampu minyak solar dimendegradasi perairan pelabuhan Celukan Bawang tergolong sedang. (4) Ada sensitivitas perbedaan temperatur sterilisasi terhadap jumlah koloni bakteri pendegradasi minyak solar. Semakin tinggi suhu yang diperlakukan pada sampel, semakin sedikit jumlah koloni yang tumbuh. Suhu sterilisasi yang paling berpengaruh terhadap penurunan jumlah koloni adalah 126°C. (5) Ada sensitivitas perbedaan temperatur sterilisasi terhadap jumlah minyak solar yang terdegradasi. Semakin tinggi suhu yang diperlakukan pada sampel, semakin sedikit kadar asam n-oktanoat yang terbentuk. Suhu sterilisasi yang paling sensitif terhadap penurunan kadar asam n-oktanoat adalah 126°C. (6) Ada korelasi positif yang sangat kuat antara penurunan jumlah

koloni bakteri dengan penurunan kadar asam n-oktanoat yang terbentuk sebagai akibat perlakuan temperatur sterilisasi dengan besar korelasi adalah 0,966.

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disajikan saran-saran penelitian sebagai berikut. (1) Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengisolasi bakteri yang mampu mendegradasi minyak solar di Pelabuhan Celukan Bawang. Untuk pengambilan sampel dilakukan pada kolom air. Perubahan warna yang dihasilkan pada media cair belum terungkap apa penyebabnya, bagi yang berminat dapat melakukan penelitian lebih lanjut mengenai perubahan warna. (2) Penelitian ini hanya diidentifikasi sampai tingkat genus, diharapkan kepada yang berminat meneliti lebih lanjut agar diidentifikasi sampai tingkat spesies. (3) Bakteri pendegradasi hidrokarbon merupakan bakteri yang sangat berguna dalam mengatasi pencemaran oleh minyak bumi sehingga sangat perlu untuk dikembangkan lebih lanjut.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti. 2001. "Optimasi Konsentrasi 'Crude Oil' dan Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan Oleh Bakteri Hidrokarbonoklatik Dari Sumur Bangko". Tersedia pada <http://www.iatmi-reserch.html> (diakses tanggal 9 Juli 2009).
- Atlas R. & Richard B. 1998. *Microbial Ecology : Fundamental And Applications*. California : Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Austin, B. 1993. *Marine Microbiology*. Great Britain : Cambridge University Press.
- Brock, T.D., Madigan, M.T., Martinko, J. 2003. *Biology of Micoorganism*. New York: Prentice Hall.
- Budiyanto. 2002. *Mikrobiologi Terapan*. Malang: Penerbit UMM.
- Djarwanto, P.S. 1983. *Statistik Nonparametrik*. Yogyakarta: BPFE.
- Fahrudin. 2004. "Dampak Tumpahan Minyak Pada Biota Laut". *Kompas*, 17 Maret. [diakses tanggal 9 Maret 2009]
- Foster, Jhon W., Albert G. Moat dan Michael P. Spector. 2002. *Microbial Physiology*. USA: Wiley-Liss, Inc.

- Weinberg, E.D. 1970. "Biosynthesis of Secondary Metabolites: Role of Trace Metal". *Microbial Physiology*, vol 4. London [diakses tanggal 21 Juli 2009]
- Wrenn. 1994. "Effects of Nitrogen Source on Crude Oil Biodegradation". *Journal of Industrial Microbiology*, 13 (1994) 279-286. [diakses tanggal 19 Juli 2009]
- Zawawi, R. B. M. 2005. "Production of Biosurfactant by Locally Isolated Bacteria from Petrochemical Waste". Tersedia pada http://www.Thesis_RuznizaMohdZawawiMSD2005TTT (diakses tanggal 27 Juli 2009).
- Zobel, C. 1973. "Action of Microorganism on Hydrocarbons". Tersedia pada <http://www.mabr.asm.org> (diakses pad tanggal 30 Februari 2009)