

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin dari Perairan Pelabuhan Gresik

Roksun Nasikhin dan Maya Shovitri

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: maya@bio.its.ac.id

Abstrak—Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat bakteri pendegradasi solar dan bensin dari perairan pelabuhan Gresik dan mengetahui viabilitas dari semua isolat yang diperoleh. Kecenderungan genus bakteri pendegradasi solar dan bensin dideteksi melalui karakterisasi biokimiawi sesuai *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Viabilitas isolat diketahui dengan mengukur kerapatan optik sel bakteri pada medium minimal solar atau bensin menggunakan spektrofotometer. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat yang mampu tumbuh dalam medium minimal solar yaitu isolat S1 yang cenderung masuk ke genus *Bacillus*. Isolat S1 memiliki kerapatan optik mencapai 3.62. Sedangkan isolat yang mampu tumbuh dalam medium minimal bensin yaitu isolat B1 yang cenderung masuk ke genus *Vibrio*. Isolat B1 memiliki kerapatan optik mencapai 4.99.

Kata Kunci—Bakteri pendegradasi solar dan bensin, isolasi, karakterisasi, kerapatan optik, spektrofotometer.

I. PENDAHULUAN

MINYAK dan gas bumi merupakan sumber energi utama untuk industri, transportasi dan rumah tangga. Aktivitas industri yang meliputi pengeboran, pengilangan, proses produksi dan transportasi umumnya menghasilkan limbah minyak dan tumpahan minyak baik di tanah maupun perairan [1]. Aktivitas industri, baik yang berada dekat pantai maupun di are lepas pantai belakangan ini semakin meningkat. Hal ini dapat meningkatkan pencemaran lingkungan laut [2]. Limbah minyak bumi merupakan B3 (Bahan Beracun dan Berbahaya yang secara signifikan memberikan kontribusi pada peningkatan penyakit serius serta menimbulkan bahaya potensial bagi manusia dan lingkungan [3].

Produk olahan minyak bumi yang paling banyak digunakan adalah bahan bakar diesel yaitu solar [4] dan bensin [5]. Solar tersusun atas benzena, toluena, xylene, dan berbagai alkil pada hidrokarbon poliaromatik [6] sedangkan bensin atau mogas (*motor gasoline*) tersusun atas campuran monomer heptane dan oktana [5]. Senyawa-senyawa ini akan menimbulkan efek kronik pada mamalia seperti gangguan imunologis, reproduktif, serta timbulnya efek fetotoksik dan genotoksik [6].

Pelabuhan Gresik yang berada di bawah manajemen PT. Pelabuhan Indonesia III (PERSERO) merupakan salah satu pelabuhan terbesar di Indonesia. Pelabuhan Gresik memiliki

trafik yang cukup padat dengan jumlah kapal yang bersandar tiap tahunnya (per-2010) mencapai 5.640 unit kapal dengan volume kapal yang bernilai komersial mencapai 4.461.190 GT (*Gross Tonnage*) dan arus barang mencapai 5.004.753 ton atau setara dengan volume 685.300 m³. Tingginya densitas trafik di pelabuhan gresik menimbulkan konsekuensi baru yaitu kecenderungan meningkatnya volume buangan kapal yang khususnya mengandung minyak [7]. Estimasi jumlah limbah minyak harian pada 7 pelabuhan, salah satunya adalah Pelabuhan Gresik pada tahun 2011 mencapai 194,44 m³ per hari [8].

Sebenarnya, lingkungan memiliki kemampuan untuk mendegradasi pencemar yang masuk ke dalamnya melalui proses biologis dan kimiawi namun seringkali beban pencemaran di lingkungan lebih besar dibandingkan dengan kecepatan proses degradasi zat pencemar tersebut secara alami. Akibatnya, zat pencemar akan terakumulasi sehingga dibutuhkan campur tangan manusia dengan teknologi yang ada untuk mengatasi pencemaran tersebut [3]. Upaya yang dilakukan untuk mengatasi pencemaran minyak secara kimiawi (kemoremediasi) dan fisik (fisikoremediasi) ternyata dikhawatirkan menambah efek toksiknya bagi organisme hidup [9].

Alternatif lain yang dapat digunakan dalam penanggulangan pencemaran minyak bumi adalah bioremediasi. Bioremediasi dapat didefinisikan sebagai proses pemulihan secara biologi terhadap komponen lingkungan yang tercemar [10]. Salah satu teknik bioremediasi adalah biodegradasi [3] yaitu proses penguraian oleh aktivitas mikroba yang mengakibatkan transformasi struktur suatu senyawa sehingga terjadi perubahan integritas molekuler [11] dan toksisitas senyawa tersebut berkurang atau menjadi tidak toksik sama sekali [3]. Beberapa bakteri bisa mengoksidasi hidrokarbon alifatik dengan bantuan enzim monooksigenase dan menghasilkan produk akhir berupa asetil Ko-A yang akan dikatabolisis melalui siklus asam sitrat. Sedangkan hidrokarbon aromatik, akan dikatalisis menggunakan beberapa enzim diantaranya monooksigenase, dioksigenase, sekuensial dioksigenase membentuk beberapa senyawa yang lebih sederhana diantaranya catechol atau cis-cis muconate. Pada tahap selanjutnya dua senyawa ini akan didegradasi menjadi suksinat, piruvat, atau asetil Ko-A sehingga bisa dikatabolisis

melalui siklus asam sitrat [12]. Penggunaan bakteri pendegradasi hidrokarbon pada lingkungan yang tercemar minyak akan lebih efektif apabila bakteri tersebut berasal dari areal tercemar tersebut [7]. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi bakteri pendegradasi solar dan bensin dari perairan Pelabuhan Gresik yang tercemar limbah minyak bumi.

II. METODE PENELITIAN

A. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel air laut dilakukan di stasiun pengisian bahan bakar di terminal umum Pelabuhan Gresik pada elevasi 13 m, koordinat S 07°09'12.0" dan E 112°39'dan46,4". Botol sampel 100 ml disterilkan dengan cara bagian dalam botol diusap kapas yang telah diberi alkohol 70% dan disinari UV dalam keadaan terbuka selama 2 jam. Botol sampel dimasukkan ke dalam kolom air di bawah permukaan air yang tercemar minyak pada kedalaman 0-15 cm. Tutup botol dibuka di dalam air dan dibiarkan terisi air hingga penuh lalu ditutup pada posisi masih di bawah kolom air. Parameter fisik perairan yang diukur adalah salinitas.

B. Pengayaan Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin

Pengayaan bakteri pendegradasi solar dan bensin ini dilakukan menggunakan medium selektif secara aseptis. Medium selektif dibuat dari pepton 0,4 g/liter, *yeast extract* 0,2 g/liter, dan pH 7,5 dilarutkan dalam 980 liter air laut steril. Medium selektif kemudian dihomogenkan dan disterilisasi dan ditambah dengan 20 ml senyawa hidrokarbon (solar atau bensin) sehingga volume total medium menjadi 1000 ml. Penambahan solar atau bensin pada medium adalah sebanyak 2% dari volume total medium [13]. Medium kemudian dituang ke dalam Erlenmeyer 500 ml masing-masing volumenya 225 ml. Medium ini digunakan untuk pengayaan bakteri pendegradasi solar atau bensin tahap pertama, kedua dan ketiga.

Pengayaan tahap pertama dilakukan dengan cara menambahkan 25 ml sampel air laut yang diambil dari perairan tercemar di Pelabuhan Gresik, dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer berisi medium selektif dan diinkubasi di *rotary shaker* pada suhu ruang selama 24 x 7 hari. Sebelum dan sesudah masa inkubasi, dilakukan pengamatan OD (*optical density*) pada panjang gelombang 600 nm sebanyak tiga kali pengulangan. Kontrol pada pengayaan tahap pertama ini adalah medium minimal tanpa penambahan sampel air laut.

Tahap selanjutnya adalah pengayaan tahap kedua. Sumber inokulum adalah pengayaan tahap pertama yang berusia tujuh hari. 25 ml bialan bakteri diambil dan dibiakan ke dalam Erlenmeyer 500 ml berisi 25 ml medium 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.

C. Isolasi Bakteri dan Pemurnian Isolat

Isolasi bakteri dilakukan dengan metode tuang (*pour plate*) secara aseptis. Sumber isolat berasal dari pengayaan tahap ketiga. Medium yang digunakan adalah medium PCA (5.0 gr pepton, 2.5 gr *yeast extract*, 1.0 gr glukosa dan 14.0 gr 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 medium dimurnikan ke medium baru dengan metode 16 gores dan diinkubasi 1 x 24 jam. Pemurnian dilakukan secara bertahap minimal 3 kali sampai diperoleh isolat biakan murni melalui pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Isolat murni ditunjukkan dengan bentuk sel dan ukuran yang sama pada usia yang sama.

D. Karakterisasi Bakteri

Bakteri diidentifikasi berdasarkan karakter biokimianya secara bertahap (*step ways*) sesuai dengan kunci dikotomi *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Isolat yang digunakan untuk uji biokimia merupakan kultur kerja yang diambil dari biakan murni dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Uji biokimia yang dilakukan meliputi pewarnaan Gram, pewarnaan endospora, pewarnaan tahan asam, uji fermentasi glukosa, uji kebutuhan oksigen, uji katalase, uji oksidase, dan uji kebutuhan garam.

E. Pengukuran Pertumbuhan Sel Bakteri

Isolat murni yang sudah dikarakterisasi dibiakan kembali dalam medium minimal solar atau bensin (uji konfirmasi). Sebelumnya dibuat terlebih dahulu starter berusia 1 x 24 jam. 1 ml starter dimasukkan dalam 250 medium minimal pada 500 ml Erlenmeyer 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 sekali sebanyak tiga kali pengulangan. Hasil pengukuran pertumbuhan dibandingkan dengan kontrol (+) dan (-) selanjutnya digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan.

III. HASIL DAN DISKUSI

A. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin

Medium yang digunakan adalah medium minimal [13] dengan menurunkan konsentrasi *yeast extract* [14] yang bertujuan agar setelah inkubasi selama 3 x 7 hari diharapkan bakteri yang tumbuh dalam medium adalah bakteri pendegradasi solar dan bensin yang menjadi sumber karbon terbesar pada medium. Tabel 1 menunjukkan pertumbuhan bakteri pada transfer 1, 2 dan 3. Tabel 1 menunjukkan penurunan kerapatan optik dari transfer 1 ke transfer 3. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri di dalam medium sudah terseleksi dimana pada transfer ke-3, walaupun terlihat hanya sedikit yang tumbuh, namun diduga merupakan bakteri yang mampu menggunakan solar dan bensin sebagai sumber nutrisinya. Penurunan kerapatan optik berkorelasi positif dengan

menurunnya konsentrasi bakteri yang mampu hidup. Pada transfer ke-1 dan ke-2, ada kemungkinan bakteri dalam medium hidup menggunakan nutrisi awal yang berasal dari sampel.

Medium yang digunakan untuk isolasi adalah medium PCA. Sumber karbon utama digantikan dengan *yeast extract* pada medium PCA, karena solar dan bensin tidak bisa digunakan pada medium padat. Solar dan bensin memiliki kelarutan yang rendah sehingga tidak bisa bercampur dengan substansi kimia yang lain di dalam medium agar. Dari proses isolasi, didapatkan 4 isolat bakteri dengan kode S untuk bakteri pendegradasi solar dan dengan kode B untuk bakteri pendegradasi bensin. Isolat tersebut diberi kode S1, S2, B1, dan B2. Kemurnian isolat dideteksi menggunakan mikroskop perbesaran 1000X dengan mengamati bentuk dan ukuran selnya yang seragam.

Berdasarkan pengamatan makroskopis (Tabel 2) dan uji biokimia (Tabel 3), isolat bakteri pendegradasi solar cenderung masuk ke genus *Bacillus* dan *Vibrio* begitu pula halnya dengan isolat bakteri pendegradasi bensin. Selanjutnya isolat-isolat tersebut akan dijelaskan berdasarkan karakter dinding Gram (+) atau Gram (-).

Gram (+) Basil

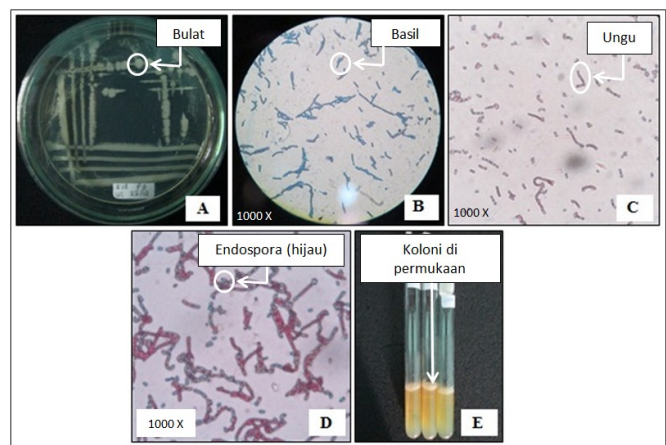
Gram (+) ditunjukkan dengan warna biru sampai ungu pada sel bakteri setelah dilakukan *Gram staining* [15]. Isolat S1 dan B2 cenderung masuk ke genus *Bacillus*. Gambar 1 menunjukkan secara lengkap karakter *Bacillus* isolat S1 meliputi bentuk koloni bulat, bentuk sel basil, Gram (+), endospora (+) dan kebutuhan oksigen (+).

Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang potensial digunakan untuk bioteknologi. Genus *Bacillus* merupakan bakteri yang mempunyai persebaran terluas di alam dan memiliki anggota 57 spesies dari berbagai macam habitat [16]. Genus *Bacillus* dapat dijumpai di tanah, air, termasuk juga air laut. Ukuran bakteri pada genus ini adalah antara 0,3-2,2 µm x 1.2 -7.0 µm. Genus *Bacillus* memiliki peran penting dalam proses penguraian dan dekomposisi. Genus *Bacillus* memiliki sifat fisiologis menarik karena tiap-tiap jenis memiliki kemampuan yang berbeda-beda diantaranya mampu mendegradasi senyawa organik seperti protein, pati, selulosa, dan hidrokarbon [16]. Beberapa spesies dalam genus *Bacillus* yang diketahui mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon diantaranya *Bacillus badius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus coagulans*, dan *Bacillus epiphitus* [3].

Gram (-) Basil

Gram (-) ditunjukkan dengan warna merah pada sel bakteri setelah dilakukan *Gram staining* [15]. Isolat S2 dan B1 cenderung masuk ke genus *Vibrio*. Gambar 2 menunjukkan secara lengkap karakter *Vibrio* isolat S2.

Genus *Vibrio* merupakan bakteri berbentuk basil, termasuk bakteri anaerob fakultatif, Gram (-), oksidase (+), memiliki flagel polar, dan mampu memproduksi asam dan gas pada fermentasi glukosa [12]. Kebanyakan spesies pada Genus



Gambar. 1. Karakter Genus *Bacillus* isolat S1 meliputi bentuk koloni bulat (A), bentuk sel basil (B), Gram (+) (C), endospora (+) (D) dan kebutuhan oksigen (+) (E).

Tabel 1.

Hasil pengukuran OD pengayaan bakteri pendegradasi solar dan bensin

Transfer ke-	Hari ke	Solar	Bensin
1	0	0,16	0,22
	7	2,76	4,24
2	0	0,60	0,46
	7	2,62	4,78
3	0	0,86	0,74
	7	1,00	1,22

Tabel 2.

Karakter makroskopis bakteri pendegradasi solar dan bensin

Kode	Bentuk	Ukuran	Tepi	Warna
S1	Bulat	Rata	Utuh	Putih
S2	Bulat	Rata	Berombak	Kekuningan
B1	Bulat	Rata	Berombak	Kekuningan
B2	Bulat	Rata	Utuh	Putih

Tabel 3.

Karakter biokimiawi bakteri pendegradasi solar dan bensin

Kode	Sel	G	E	O ₂	O	F	N	Cenderung ke Genus
S1	Basil	+	+	+				<i>Bacillus</i>
S2	Basil	-	-		+	+	+	<i>Vibrio</i>
B1	Basil	-	-		+	+	+	<i>Vibrio</i>
B2	Basil	+	+	+				<i>Bacillus</i>

Ket:

G = Gram

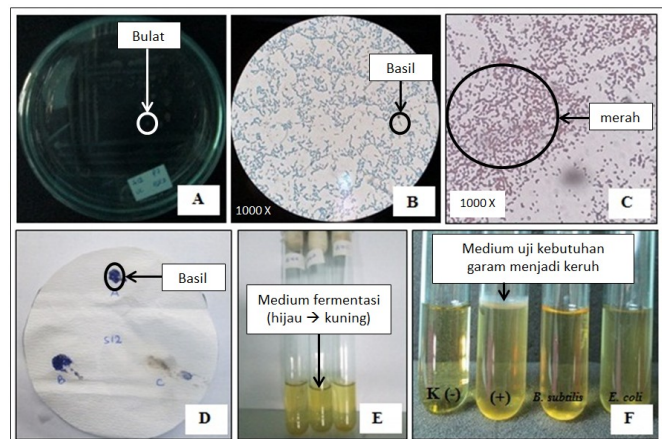
E = Endospora

O₂ = Kebutuhan oksigen

O = Oksidase

F = Fermentasi glukosa

N = Kebutuhan garam (NaCl)



Gambar. 2. Karakter Genus *Vibrio* isolat S2 meliputi karakter koloni bulat (A), bentuk sel basil (B), Gram (-) (C), oksidase (+) (D), fermentasi glukosa (+) (E), dan kebutuhan garam (+) (F).

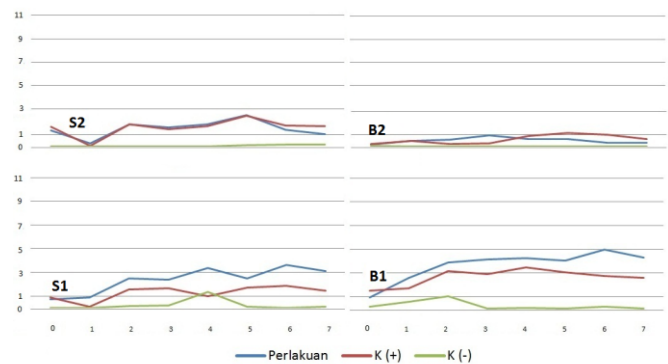
Vibrio ditemukan pada daerah perairan, baik itu air laut, payau atau tawar. Beberapa diantaranya menyebabkan gangguan klinis. *Vibrio cholerae* merupakan bakteri spesifik penyebab penyakit kolera pada manusia yang lainnya. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri yang berhabitat pada lingkungan perairan laut yang merupakan penyebab penyakit gastroenteritis di Jepang [12]. Selain diketahui memiliki efek klinis, Genus *Vibrio* juga dilaporkan mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon [17]. *Vibrio parahaemolyticus* diketahui mampu mendegradasi senyawa phenantherena dan naphthalena yaitu senyawa PAH (poliaromatik hidrokarbon) yang ditemukan pada crude oil menjadi 1-naphthol [18].

B. Pertumbuhan Bakteri Pendegradasi Solar dan Bensin

Medium yang digunakan pada tahap ini sama dengan medium seleksi yaitu medium minimal solar atau bensin. Ada dua kontrol pada tahap ini yaitu kontrol (+) dan kontrol (-). Kontrol (+) merupakan isolat bakteri yang ditumbuhkan pada medium selektif tanpa solar atau bensin. Sedangkan kontrol (-) merupakan medium minimal dengan solar atau bensin, namun tanpa isolat bakteri. Jika pertumbuhan isolat di dalam medium minimal dengan penambahan solar atau bensin lebih baik dari pada kontrol (+), isolat tersebut besar kemungkinan mampu memanfaatkan solar atau bensin sebagai sumber karbon organik. Sedangkan jika sebaliknya, sumber karbon yang digunakan isolat adalah berasal dari *yeast extract*. Kontrol (-) digunakan untuk mendeteksi adanya kontaminasi pada medium. Pertumbuhan isolat divisualisasikan berupa kurva pertumbuhan dengan garis berwarna biru, kontrol (+) berupa garis berwarna merah, dan kontrol (-) berupa garis berwarna hijau. Gambar 3 menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri pada medium minimal.

Tidak semua isolat yang dibiakan pada medium minimal solar mampu tumbuh. Isolat yang mampu tumbuh pada medium minimal solar adalah isolat S1 (genus *Bacillus*) dengan kerapatan optik mencapai 3.62 sedangkan pada medium minimal bensin adalah isolat B1 (genus *Vibrio*) dengan kerapatan optik mencapai 4.99. Kemampuan melakukan aktifitas pertumbuhan di dalam medium minimal solar atau bensin dapat dilihat dari pola fase yang dilalui oleh isolat, yaitu fase lag dan fase log yang lebih tinggi dari pada kontrol (+).

Kemampuan mikroba melakukan metabolisme senyawa hidrokarbon dalam proses degradasi minyak bumi dapat diketahui dengan hilangnya substrat, pertumbuhan mikroba pada substrat, dan terbentuknya produk akhir [3]. Hal itu menunjukkan perlunya dilakukan pengukuran berbagai variabel untuk mengindikasikan terjadinya degradasi minyak bumi. Secara umum, ada tiga variabel yang perlu diukur yaitu variabel biologi, fisika, dan kimia. Secara biologi, khususnya mikrobiologi, terjadinya degradasi minyak bumi dapat diduga dengan mengetahui pengurangan atau penambahan jumlah sel mikroba tiap satuan waktu. Banyaknya sel mikroba dapat diukur dengan berbagai cara salah satunya adalah dengan pengukuran kerapatan optik (*Optical Density*) [3].



Gambar. 3. Kurva pertumbuhan bakteri pendegradasi solar (S1 dan S2) dan bakteri pendegradasi bensin (B1 dan B2) pada medium minimal.

Pertumbuhan bakteri pada medium minimal solar atau bensin menunjukkan bahwa isolat mampu menggunakan solar atau bensin sebagai sumber karbon organik selain *yeast extract*. Kebutuhan vital pada nutrisi bakteri sehingga bakteri mampu hidup dan viabilitasnya meningkat adalah:

1. Sumber energi yang dapat berasal dari cahaya (fototrof) dan karbon organik (kemoorganotrof).
2. Sumber karbon berupa karbon anorganik (karbon dioksida) dan karbon organik (seperti karbohidrat).
3. Sumber nitrogen dalam bentuk garam nitrogen anorganik (seperti kalium nitrat) dan nitrogen organik (berupa protein dan asam amino).
4. Unsur non logam seperti sulfur dan fosfor.
5. Unsur logam (seperti kalium, natrium, magnesium, besi, dan tembaga).
6. Air untuk fungsi – fungsi metabolik dan pertumbuhan [19].

Bakteri dapat tumbuh dalam medium yang mengandung satu atau lebih persyaratan nutrisi tersebut. Medium selektif bakteri pendegradasi solar dan bensin yang digunakan dalam penelitian ini tersusun atas pepton 0,4 g/liter, *yeast extract* 0,2 g/liter dilarutkan dalam 980 liter air laut steril dan ditambahkan 5 ml senyawa hidrokarbon (solar/bensin). Pada struktur minyak bumi, terdapat sejumlah karbon yang didekomposisikan mikroba. Kandungan bahan organik karbon berkurang karena digunakan sebagai sumber energi mikroba, dimana rantai karbon menghasilkan energi yang tinggi [3].

Pepton merupakan sumber nitrogen yang berupa nitrogen organik. Nitrogen ditemukan pada protein, enzim, komponen dinding sel dan asam nukleat dari mikroba. Metabolisme tidak akan terjadi tanpa adanya nitrogen [3]. *Yeast extract* merupakan sumber karbon yang berupa bahan karbon organik. Karbon merupakan elemen paling dasar untuk seluruh bentuk kehidupan dan karbon dibutuhkan dalam jumlah yang lebih besar dari pada elemen-elemen lain. Air laut diambil dari perairan yang tidak tercemar senyawa hidrokarbon minyak bumi di lokasi yang sama dengan titik pengambilan sampel air yaitu di daerah pelabuhan Gresik, sehingga diharapkan makronutrien dan mikronutrien medium, sama dengan habitat asal bakteri pendegradasi solar dan bensin tersebut. Air laut diendapkan dan difiltrasi berulang menggunakan kasa sampai jernih. Air laut kemudian disterilisasi agar mikroorganisme yang ada di dalamnya mati dan yang tersisa adalah mineral-mineral sumber makro dan mikronutrien yang dibutuhkan oleh bakteri seperti sodium klorida, magnesium klorida, sodium

sulfat, kalsium klorida, pottasium klorida dan sodium bikarbonat.

IV. KESIMPULAN/RINGKASAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Dari perairan pelabuhan Gresik yang tercemar limbah minyak bumi berhasil dimurnikan 4 isolat bakteri.
2. Isolat yang mampu tumbuh dalam medium minimal bensin adalah isoalt S1 yang cenderung masuk ke genus *Bacillus* dengan kerapatan optik mencapai 3.62.
3. Isolat yang mampu tumbuh dalam medium minimal bensin adalah isolat B1 yang cenderung masuk ke genus *Vibrio* dengan kerapatan optik mencapai 4.99.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis R.N. mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Diniyah dan Pondok Pesantren KEMENAG RI yang telah memberikan dukungan finansial melalui Program Beasiswa Santri Berprestasi 2008-2013. Penulis juga Menyampaikan terimakasih kepada Dr.rer.nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si., rekan-rekan laboratorium mikrobiologi dan bioteknologi Biologi ITS, serta civitas akademika Biologi ITS atas bantuan moril dan materiil yang tela diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] D. Herdiyantoro, "Biodegradasi Hidrokarbon Minyak Bumi oleh *Bacillus* Sp. Galur ICBB 7859 dan ICBB 7865 dari Ekosistem Air Hitam Kalimantan Tengah dengan Penambahan Surfaktan," Bogor: Sekolah Pasca Sarjana IPB (2005).
- [2] Nursyirwani, K. C. Amolle. "Isolasi dan Karakterisasi bakteri Hidrokarbonoklastik dari Perairan Dumai dengan Sekuen 16S rDNA," *Jurnal Ilmu Kelautan* (2007) 12-17.
- [3] A. Nugroho, *Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi*. Yogyakarta: Grha Ilmu (2006) Ch. 1-Ch. 4.
- [4] Yoeswono, "Pemanfaatan Abu Tandan Kosong Kelapa SAWit sebagai Katalis Basa pada Reaksi Tranesterifikasi dalam Pembuatan Biodiesel," PKMI-08-1. Jurusan Kimia, Fakultas FMIPA, UGM, Yogyakarta (2008).
- [5] USU, "Motor Gasoline (MOGAS) atau Bensin," <http://repository.usu.ac.id/beatstream/123456789/3/chapterII.pdf>. (2012).
- [6] M. V. Mouwerik, S. Peneth, F. S. Serena, S. M. Dubler, dan W. Basham, "*Environmental Contaminant Encyclopedia Diesel Oil*," Colorado: National Park Service (1997).
- [7] R. Rezvani, "*Analisis Penerapan Dissolved Air Flotation sebagai Metode Alternatif Penanganan Limbah Kapal pada Rancangan Port Reception Facility di Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya*." Surabaya: Tugas Akhir Jurusan teknik Sistem Perkapalan ITS (2006).
- [8] E. Eriyanto, "Analisis Penanganan Limbah Minyak di Kawasan Pelabuhan: Tinjauan dari Segi Transportasi Laut," *Jurnal Teknik ITS Volume: 1*. (2012). 11-14.
- [9] Ni'matuzahroh, A. Yahya, dan M. TAndjung, "Studi Perbandingan Biosurfaktan *Pseudomonas aeruginosa* IA7d dan Surfaktan Sisntetik Tween-80 dalam Biodegradasi Solat oleh Mikroba Perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya," *Berkala Penelian Hayati volume: 12* (2006) 13-18.
- [10] K. Baker dan D. Herson. "*Bioremediation*," USA: Mc. Graw-Hill inc..
- [11] D. Sheenan, "*Bioremediation Protocols*," New Jersey: Humana Pers.
- [12] M. T. Madigan, J.M. Martinko, dan J. Parker, "*Brock Biology of Microorganism*," USA: Prentice-Hall inc.
- [13] K. Matalova, "Isolation and Characterization of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Environmental Habitats in Western New York State," Thesis of Departement of Chemistry, Rechester Institute of Technology, Rochester (2005).
- [14] G. Gurujeyalaksmi dan P. Oril, "Isolation of Phenol Degrading *Bacillus stearothermophilus* and Partial Characteristic of The Phenol Hidroxilase," *Appl Environ Microbiol Volume: 55 nomor: 2* (1989), 500-502.
- [15] J. P. Harley dan L. M. Presscott, "*Laboratory Exercice in Microbiology*," New York: The Mc. Graw Hill Companies (2002).
- [16] A. Hatmanti, "Pengenalan *Bacillus* Spp.," *Jurnal Oseana Volume: 25 No: 1-2000 ISSN 0216-1877* (2001) 31-41.
- [17] R. M. Atlas dan R. Bartha, "*Microbial Ecology: Fundamental and Aplication 3rd edition*," Redwood City California: Benjamin Cummings Publishing Company (1992).
- [18] C. B. Smith, C. N. Jhonson dan G. M. King, "Assesment of Polyaromatic Hydrocarbon degradation by Potentially Pathogenic Environmental *Vibrio parahaemolyticus* Isolates fron Coastal Lousiana, USA," *Marine Pollution Buletin Volume: 64* (2012) 138-143.
- [19] S. Afriyani dan H. Lukman, "Karakteristik Dadih Susus sapi Hasil Fermentasi Beberapa Starter Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Dadih Sasi Asal Kabupaten Kerinci," *Agrinak Volume: 01* (2011) 36-42.