

# Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Pengguna Hidrokarbon dengan Penambahan Variasi Sumber Karbon

## Biosurfactan Production of Hydrocarbon User Bacteria by Adding Carbon Resources Variation

ASTRI NUGROHO ♥

Jurusan Teknik Lingkungan, Universitas Trisakti, Grogol, Jakarta Barat.

Diterima: 27 Juni 2006. Disetujui: 06 September 2006.

### ABSTRACT

A research for biosurfactant production by mix culture bacteria which used hydrocarbon has been done. The isolates were selected for the highest biosurfactant production in SMSS (Stone Mineral Salt Solution) media supplemented with 0,1 % yeast extract b/v and 1 % v/v liquid paraffin by measuring the surface tension decrease. The selected isolate was then used for determination the best inoculum concentration and the carbon source as well for the highest biosurfactant production. Inoculum concentration variation were 5%, 10%, and 15% v/v (106 cells/mL) while the carbon source were glucose, liquid paraffin, hexadecane, and crude oil as the concentration of 1%. The decrease in surface tension was measured as parameter which correlated to biosurfactant production. The mix culture concentration of 10% was the best and decrease surface tension 6,27 dyne/cm. The inoculum concentration of 5% (v/v) and 15% (v/v) decrease surface tension 4,08 dyne/cm and 6,65 dyne/cm respectively. The best carbon source was liquid paraffin which decrease surface tension 8,34 dyne/cm while glucose, hexadecane, and crude oil were 2,81 dyne/cm; 2,46 dyne/cm; and 4,18 dyne/cm respectively. The conclusion of this research was that bacteria showed the highest biosurfactant production at the concentration of 10% and liquid paraffin as the best carbon source.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** inoculum, biosurfactan, surface tension.

### PENDAHULUAN

Kebutuhan akan surfaktan semakin meningkat seiring dengan meningkatnya proses-proses yang membutuhkan senyawa aktif permukaan. Surfaktan banyak dibutuhkan antara lain dalam proses bioremediasi, industri petrokimia, dan dalam meningkatkan perolehan minyak bumi *Enhanced Oil Recovery* (EOR). Metode alternatif sangat diperlukan untuk peningkatan perolehan minyak bumi selain metode konvensional yang selama ini dilakukan dalam EOR (Zajic *et al.*, dan Akit, 1983).

Ketersediaan biosurfaktan menjadi sangat penting setelah diketahuinya beberapa kerugian penggunaan surfaktan sintetis. Di samping harganya mahal, surfaktan sintetis sebagian besar tidak mudah didegradasi dan beberapa bersifat toksik sehingga ada kemungkinan terjadinya pencemaran lingkungan akibat penggunaan senyawa ini. Selain itu Van Dyke (1993) dalam Agustiani (1998) mengemukakan bahwa biosurfaktan lebih bervariasi jenisnya dan lebih efektif untuk keperluan-keperluan yang spesifik dibandingkan dengan surfaktan sintetis.

Biosurfaktan merupakan surfaktan yang dihasilkan oleh metabolisme mikroba. Mikroba yang ada di

lingkungan minyak bumi mampu mendegradasi hidrokarbon dan menghasilkan metabolit berupa biosurfaktan, biopolimer, asam, biomassa, dan gas (Baker dan Herson, 1994). Metabolit yang dihasilkan oleh mikroba ini dapat digunakan untuk meningkatkan perolehan minyak bumi (*Microbial Enhanced Oil Recovery* / MEOR) dan beberapa aplikasi lain.

Sebuah pengujian dilakukan oleh Montgomery dan Fleet (1983 dalam Zajic *et al.*, 1983) menggunakan 60 jenis surfaktan untuk memperoleh bitumen dari tanah tar. Hasil pengujiannya menunjukkan bahwa telah diperoleh bitumen dalam jumlah besar sebagai akibat dari penggunaan surfaktan. Cadangan minyak bumi umumnya terdapat pada batuan pasir. Minyak bumi dan gas tersimpan dalam rongga atau pori-pori batuan tersebut sehingga perolehan minyak bumi tidak dapat maksimum karena adanya bagian yang terjebak dalam batuan. Speight (1980) menyebutkan bahwa kemampuan penyimpanan minyak bumi dalam batuan ditunjukkan oleh besarnya porositas batuan tersebut, sedangkan kemampuan melepaskan minyak bumi dari batuan tersebut berhubungan dengan permeabilitasnya. Biosurfaktan juga dapat menurunkan viskositas minyak bumi yang pekat atau terperangkap sedemikian rupa di dalam batuan reservoir sehingga kemampuannya untuk terbasuh dalam air atau terangkat oleh pendesakan gas yang keluar dari reservoir meningkat (Volkerling *et al.*, 1998).

Biosurfaktan yang dihasilkan masing-masing mikroba berbeda bergantung pada jenis mikroba dan nutrisi yang

---

#### ♥ Alamat Korespondensi:

Gedung K, Lantai 7, Kampus A, Jl. Kyai Tapa No.1, Grogol, Jakarta Barat  
Email: astri@fun-dering.com  
Tel./Fax.: 021-5663232 ext 767

dikonsumsinya. Demikian pula untuk jenis mikroba yang sama, jumlah surfaktan yang dihasilkan berbeda berdasarkan nutrisi yang dikonsumsi (Duvnjak *et al.* 1983). Nutrien merupakan hal yang sangat penting artinya bagi pertumbuhan mikroba termasuk bakteri penghasil biosurfaktan. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa elemen makro yang memegang peranan penting dalam menunjang pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan adalah elemen karbon dan nitrogen (Horowitz *et al.*, 2005). Oleh karenanya optimasi nutrisi menjadi penting dalam produksi biosurfaktan. Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk menginduksi pembentukan biosurfaktan oleh bakteri pendegradasi minyak bumi dengan penambahan berbagai sumber karbon. Hipotesisnya adalah sumber karbon dan konsentrasinya yang berbeda-beda akan menghasilkan jumlah biosurfaktan yang berbeda pula.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Penelitian

Bahan penelitian adalah kultur campuran bakteri pengguna hidrokarbon yang diisolasi dari sampel minyak bumi dan ditumbuhkan pada media dasar *Stone Mineral Salt Solution* (SMSS). Kultur campuran bakteri terdiri dari *Bacillus badius*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Pasteurella avium* dan *Streptobacillus moniliformis*. Sumber karbon yang digunakan sebagai nutrisi penunjang adalah masing-masing heksadekana, glukosa, parafin cair, dan minyak mentah, sedangkan sumber nitrogennya adalah ekstrak ragi.

### Penentuan Konsentrasi Inokulum Terbaik

Variasi jumlah inokulum dilakukan untuk mengetahui jumlah inokulum terbaik yang menunjang produksi biosurfaktan yang terbanyak. Variasi jumlah inokulum pada penelitian ini adalah 5%, 10%, dan 15% (v/v) dengan jumlah sel  $10^6$  sel/mL. Jumlah inokulum terbaik dapat diketahui dari kultur dengan penurunan tegangan permukaan paling besar. Penurunan tegangan permukaan menunjukkan produksi biosurfaktan. Pengukuran tegangan permukaan dilakukan dengan menggunakan alat Tensiometer Du Nouy pada suhu kamar (Cappuccino dan Sherman, 1983).

### Penentuan Sumber Karbon Terbaik

Sumber karbon terbaik dipilih berdasarkan kemampuan menunjang produksi biosurfaktan terbanyak yang dilihat dari penurunan tegangan permukaan media. Pada penelitian ini diuji 4 macam sumber karbon yaitu glukosa, parafin cair, heksadekana, dan minyak bumi. Keempat sumber karbon ini masing-masing dicampurkan ke dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi sebanyak 1% (b/v) sehingga diperoleh 4 macam media SMSS dengan sumber karbon yang berbeda-beda. Keempat media diukur tegangan permukaannya setelah disterilisasi. Sumber karbon terbaik diketahui dari kultur yang penurunan tegangan permukaannya paling besar dan dari kurva pertumbuhannya.

### Penentuan Konsentrasi Karbon Terbaik

Setelah terpilih sumber karbon terbaik, ditentukan konsentrasi sumber karbon yang paling baik untuk menunjang produksi biosurfaktan paling banyak. Media

SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1% (b/v) dan sumber karbon terpilih dibuat dengan konsentrasi sumber karbon bervariasi yaitu 0,5%, 1%, 2,5%, dan 5% (v/v) sehingga diperoleh 4 macam media SMSS dengan konsentrasi sumber karbon berbeda-beda. Tegangan permukaan masing-masing media diukur setelah disterilisasi. Pada akhir pengambilan sampel dilakukan pengukuran tegangan permukaan untuk mengetahui penurunannya. Konsentrasi sumber karbon terbaik diketahui dari kultur yang penurunan tegangan permukaannya paling besar.

### Analisis Pola Produksi Biosurfaktan

Analisis pola produksi biosurfaktan dilakukan dengan mengukur tegangan permukaan kultur setiap 24 jam selama 168 jam sehingga diketahui penurunannya secara bertahap.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Konsentrasi Inokulum Terbaik

Konsentrasi inokulum yang digunakan dalam industri fermentasi biasanya sebesar 3 sampai 10% (Suchanek, 1972 dalam Stanbury dan Whitaker, 1984). Pada penelitian ini dicari konsentrasi inokulum yang optimal agar biosurfaktan diperoleh dalam jumlah yang banyak. Leahy dan Colwell (2000) menjelaskan bahwa degradasi hidrokarbon dan produksi biosurfaktan dengan substrat hidrokarbon oleh kultur campuran mikroba memerlukan inokulum yang cukup banyak karena hidrokarbon merupakan substrat yang tidak mudah didegradasi oleh bakteri. Selain itu degradasi biasanya memerlukan waktu yang cukup lama dibandingkan dengan fermentasi biasa. Masing-masing kultur dengan jumlah inokulum berbeda tersebut pada akhir inkubasi yaitu setelah jam ke-120, diukur tegangan permukaannya. Penurunan tegangan permukaan tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan data penurunan tegangan permukaan tersebut, belum dapat ditentukan konsentrasi inokulum yang paling baik karena masih ada kemungkinan bahwa konsentrasi inokulum di atas 15% menghasilkan penurunan tegangan permukaan yang lebih besar lagi tetapi dari data tersebut sudah dapat ditentukan bahwa konsentrasi inokulum 5% tidak optimal karena penurunan tegangan permukaan yang dihasilkan jauh lebih kecil dibandingkan dengan penurunan tegangan permukaan yang dihasilkan oleh 2 kultur lainnya.

Berdasarkan data di atas dapat dilihat bahwa penurunan tegangan permukaan kultur dengan konsentrasi inokulum 10% tidak jauh berbeda dengan penurunan tegangan permukaan pada kultur dengan konsentrasi inokulum 15%, selisihnya hanya sebesar 0,38 dyne/cm, sehingga ada kemungkinan konsentrasi inokulum 10% merupakan konsentrasi optimal. Hal ini didukung oleh hasil analisis kurva pertumbuhan yaitu dengan menghitung laju pertumbuhan spesifik.

Pada Gambar 2 di atas terlihat bahwa jumlah sel maksimum yang dicapai berbeda-beda. Jumlah sel maksimum yang dicapai oleh kultur dengan konsentrasi inokulum 15% v/v adalah paling besar dibandingkan dengan kultur dengan konsentrasi inokulum 5%, dan 10% (v/v). Berdasarkan pertambahan jumlah sel dapat dilihat bahwa kultur campuran bakteri pada konsentrasi

inokulum 5% mengalami penambahan sel menjadi 8600 kali dari jumlah sel awal, atau penurunan tegangan permukaan 1 dyne/cm membutuhkan penambahan sel sebesar 2422,5 kali jumlah sel awal. Pada konsentrasi inokulum 10% penambahan sel menjadi 2575 kali jumlah sel awal, atau penurunan 1 dyne/cm membutuhkan penambahan sel sebesar 472,5 kali jumlah sel awal. Pada konsentrasi inokulum 15% penambahan sel menjadi 3720 kali jumlah sel awal, atau penurunan tegangan permukaan sebesar 1 dyne/cm membutuhkan penambahan sel sebesar 652,6 kali jumlah sel awal. Berdasarkan data sementara tersebut dapat disimpulkan bahwa konsentrasi inokulum 10% lebih efektif karena untuk menghasilkan penurunan tegangan permukaan sebesar 1 dyne/cm hanya dibutuhkan sedikit sel bakteri dibandingkan dengan kultur dengan konsentrasi inokulum 5% dan 15%.

#### Sumber Karbon Terbaik

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zajic *et al.*, (1977) diketahui bahwa bakteri hidrokarbonoklastik mampu menggunakan 4 macam sumber karbon yaitu glukosa, parafin cair, heksadekana, dan minyak mentah (*crude oil*) untuk menghasilkan biosurfaktan dengan parameter tegangan permukaan yang menurun. Zajic *et al.*, (1977) dan Sheehan (1997) juga mengatakan bahwa bakteri hidrokarbonoklastik juga mampu menggunakan karbohidrat seperti glukosa, fruktosa, dan manitol sebagai sumber karbonnya untuk menunjang produksi biosurfaktan. Hasil penurunan tegangan permukaan keempat kultur dengan sumber karbon yang berbeda-beda tersebut setelah jam ke-120 dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan histogram yang ditunjukkan pada Gambar 3 terlihat bahwa pada keempat media dengan sumber karbon yang berbeda semuanya mengalami penurunan tegangan permukaan. Dengan demikian keempat sumber karbon tersebut mampu menunjang pertumbuhan kultur campuran bakteri untuk menghasilkan biosurfaktan. Terlihat pula bahwa parafin cair dapat menunjang produksi biosurfaktan paling banyak. Pertumbuhan kultur campuran bakteri pada parafin cair menghasilkan penurunan tegangan permukaan sebesar 5,65 dyne/cm. Parafin cair dapat menurunkan hidrokarbon kelompok alkana dengan jumlah atom karbon antara 5 sampai 15 buah (Virmuda, 1999). Menurut Cooper *et al.* (1983), produksi biosurfaktan optimal jika sumber karbonnya merupakan hidrokarbon linier murni dengan jumlah atom karbon 12, 13, dan 14. Davis (1967) juga mengemukakan bahwa normal parafin digunakan oleh banyak golongan mikroba.

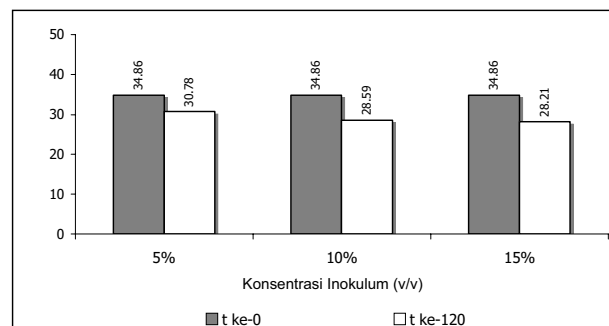
Di dalam minyak bumi terdapat senyawa parafin dalam jumlah yang besar (Marquis, 1993). Normal parafin dan isoparafin dengan cabang satu banyak terdapat dalam fraksi ringan dari minyak bumi. Parafin atau alkana dengan 10 sampai 16 atom karbon merupakan hidrokarbon yang lebih mudah didegradasi oleh mikroba. Di samping itu di dalam minyak bumi juga terdapat senyawa lain yaitu senyawa non hidrokarbon dan hidrokarbon selain parafin dan isoparafin seperti hidrokarbon aromatik yang didegradasinya oleh bakteri membutuhkan waktu lebih lama karena adanya proses pemutusan ikatan siklis menjadi linier terlebih dahulu (Neumann *et al.*, 2001). Dengan demikian kultur campuran bakteri merupakan bakteri pengguna parafin sehingga kultur campuran akan memproduksi biosurfaktan dalam jumlah yang lebih banyak jika sumber karbonnya adalah parafin cair.

Heksadekana merupakan hidrokarbon linier murni dengan jumlah atom karbon yang lebih banyak dari parafin yaitu 16 buah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa parafin cair menunjang produksi biosurfaktan lebih baik dibandingkan dengan heksadekana. Heksadekana hanya menghasilkan penurunan tegangan permukaan sebesar 2,46 dyne/cm, jauh lebih kecil dibandingkan dengan penurunan tegangan permukaan yang dihasilkan oleh parafin. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Zajic *et al.* (1977) yang menyebutkan bahwa bakteri membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mendegradasi hidrokarbon dengan rantai yang lebih panjang seperti heksadekana.

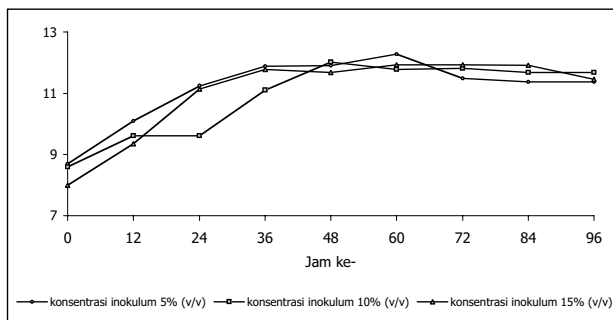
Penurunan tegangan permukaan pada kultur dengan sumber karbon minyak mentah adalah sebesar 4,18 dyne/cm. Penurunan ini lebih rendah daripada kultur dengan sumber karbon parafin. Hal ini terjadi karena minyak mentah merupakan hidrokarbon yang kompleks. Mikroba memiliki kisaran sumber karbon tertentu yang dapat digunakan olehnya, sehingga sangat mungkin bahwa kultur campuran bakteri yang digunakan pada penelitian ini tidak dapat mendegradasi semua jenis hidrokarbon yang terdapat dalam minyak mentah, akibatnya biosurfaktan yang diproduksi dengan sumber karbon minyak mentah rendah. Hal ini merupakan alasan dari perbedaan jumlah biosurfaktan yang dihasilkan oleh kultur campuran bakteri dengan sumber karbon yang berbeda.

Glukosa menghasilkan penurunan tegangan permukaan sebesar 2,81 dyne/cm yang merupakan penurunan terkecil dibandingkan dengan tiga sumber karbon lain. Hal ini terjadi karena glukosa merupakan hidrokarbon yang sederhana dengan 6 buah atom karbon sehingga sangat mudah didegradasi oleh kultur campuran bakteri. Glukosa yang sederhana ini dijadikan sebagai sumber karbon untuk perbanyakan sel, akibatnya karbon yang dipakai untuk produksi biosurfaktan lebih sedikit.

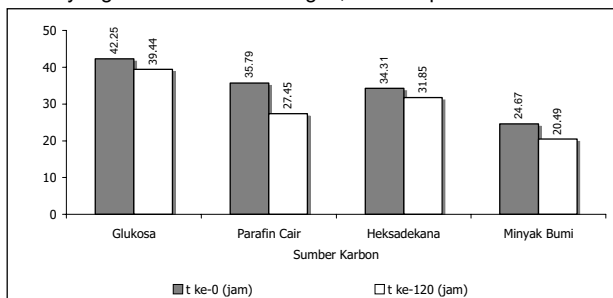
Berdasarkan uraian di atas diketahui bahwa sumber karbon yang berbeda menghasilkan jumlah biosurfaktan yang berbeda, karena rasio C/N pada masing-masing media berbeda. Karbon yang terdapat dalam keempat hidrokarbon memiliki jumlah molalitas yang berbeda karena jumlah atom karbon yang berbeda, sedangkan molalitas nitrogen sama pada setiap media karena konsentrasi ekstrak ragi sebagai sumber N yang ditambahkan ke dalam media sama yaitu 0,1 % b/v.



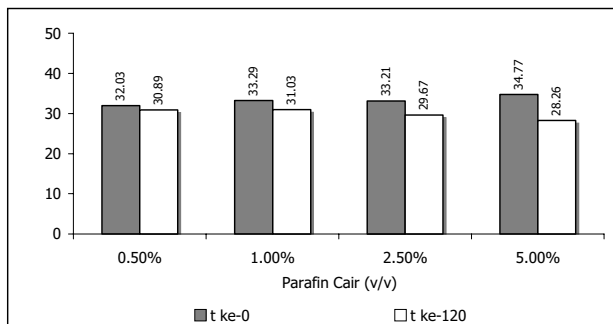
**Gambar 1.** Penurunan tegangan permukaan kultur bakteri dengan konsentrasi inokulum 5% (v/v), 10% (v/v), dan 15% (v/v) dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1% (b/v) dan parafin cair 1%.



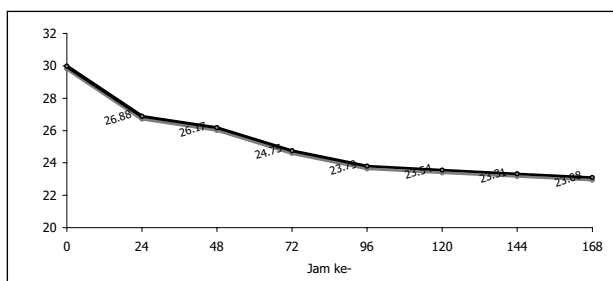
**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan kultur campuran dengan konsentrasi inokulum 5%, 10%, dan 15 % (v/v) dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1 % dan parafin cair 1 %.



**Gambar 3.** Penurunan tegangan permukaan oleh kultur campuran bakteri dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1 % dengan sumber karbon glukosa, parafin cair, heksadekana, dan minyak bumi masing-masing 1% (v/v)



**Gambar 4.** Penurunan tegangan permukaan oleh kultur campuran bakteri dengan konsentrasi parafin cair masing-masing 0,5%, 1%, 2,5% dan 5% (v/v) dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1%.



**Gambar 5.** Kurva tegangan permukaan kultur campuran dalam media SMSS yang ditambah ekstrak ragi 0,1 % dan parafin cair 5% tiap selang waktu 24 jam

Biosurfaktan dapat diproduksi jika terjadi akumulasi lemak pada dinding sel bakteri (Neu, 1996 dalam Agustiani, 1998). Mikroba khususnya bakteri akan mengakumulasi lemak lebih banyak jika nitrogen dalam media berada dalam jumlah yang rendah (Moses dan Springham, 1992). Hal ini terjadi karena sel hanya

membutuhkan nitrogen dalam jumlah yang terbatas yang digunakan untuk sintesis protein selular. Lemak merupakan hasil metabolisme lanjut dari karbon (Davis, 1967). Kultur dengan sumber karbon glukosa memiliki pH yang menurun tajam pada awal inkubasi. Hal ini terjadi karena glukosa merupakan sumber karbon yang sederhana sehingga dapat langsung dipakai untuk metabolisme bakteri menghasilkan asam dan gas. Berbeda dengan jenis hidrokarbon lain seperti parafin, heksadekana, dan minyak bumi yang harus melalui serangkaian reaksi oksidasi untuk menghasilkan asam (Watkinson, 1980).

#### Konsentrasi Sumber Karbon Terbaik

Setelah diketahui sumber karbon terbaik yaitu parafin cair, dilakukan uji konsentrasi parafin cair yang optimal untuk menunjang produksi biosurfaktan yang maksimum. Pada penelitian ini dilakukan uji dengan variasi konsentrasi parafin cair 0,5%, 1%, 2,5%, dan 5%. Penurunan tegangan permukaan media setelah inkubasi selama 120 jam dapat dilihat pada Gambar 4.

Histogram pada Gambar 4 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi parafin dalam media maka semakin tinggi pula penurunan tegangan permukaan yang dihasilkan. Penurunan tegangan permukaan cenderung meningkat secara teratur. Hal ini terlihat dari selisih penurunan tegangan permukaan pada masing-masing kultur. Selisih penurunan tegangan permukaan antara kultur dengan 0,5 % parafin cair dan kultur dengan 1% parafin cair adalah sebesar 1,12 dyne/cm. Selisih antara kultur dengan 1% parafin cair dan 2,5% parafin cair adalah sebesar 1,28 dyne/cm, sedangkan antara 2,5% dengan 5% sebesar 2,97 dyne/cm. Mengacu pada data ini maka diduga peningkatan penurunan tegangan permukaan masih akan terjadi hingga batas tertentu seiring dengan peningkatan konsentrasi parafin cair, sehingga dan penelitian ini belum dapat ditentukan konsentrasi sumber karbon terbaiknya.

Parafin cair digunakan oleh kultur campuran untuk menunjang pertumbuhannya dan untuk produksi biosurfaktan. Konsentrasi parafin cair yang besar berarti hidrokarbon berada dalam jumlah yang besar (Donaldson, 1989). Hal ini menimbulkan akumulasi lemak dalam sel bakteri meningkat sehingga produksi biosurfaktan juga meningkat. Hal inilah yang menyebabkan penurunan tegangan permukaan meningkat bila konsentrasi parafin cair ditingkatkan

#### Analisis Pola Produksi Biosurfaktan

Penelitian ini dilengkapi dengan analisis pola produksi biosurfaktan yang dilakukan dengan cara mengukur tegangan permukaan kultur campuran bakteri setiap 24 jam. Gambar 5. menunjukkan penurunan tegangan permukaan setiap selang waktu 24 jam selama 7 X 24 jam.

Dari Gambar 5 tampak bahwa dalam waktu 24 jam telah terjadi penurunan tegangan permukaan sebesar 3,08 dyne/cm. Selanjutnya tegangan permukaan kembali menurun sampai jam ke-48 sebesar 0,61 dyne/cm, kemudian sampai jam ke-72 menurun kembali sebesar 1,42 dyne/cm. Antara jam ke-96 sampai jam ke-168 relatif tidak terjadi penurunan tegangan permukaan. Penurunan tegangan permukaan keseluruhan dari jam ke-0 sampai dengan jam ke-168 adalah sebesar 6,88 dyne/cm. Berdasarkan kurva pada Gambar 5. dapat diketahui bahwa penurunan tegangan permukaan terjadi sejak awal pertumbuhan.

## KESIMPULAN

Kultur campuran bakteri mampu menghasilkan biosurfaktan dengan kemampuan menurunkan tegangan permukaan sebesar 6,88 dyne/cm. Konsentrasi kultur campuran yang optimal untuk menunjang produksi biosurfaktan adalah 10% (v/v) dengan kemampuan menurunkan tegangan permukaan sebesar 6,27 dyne/cm.

Sumber karbon yang mampu menunjang produksi biosurfaktan dalam jumlah maksimum adalah parafin cair dengan kemampuan menurunkan tegangan sebesar 8,34 dyne/cm. Konsentrasi parafin cair yang optimal pada penelitian ini belum dapat ditentukan, tetapi yang paling baik adalah 5% v/v.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustiani, E.D. 1998. *Penapisan Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Sumur Minyak Bumi*. [Skripsi]. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Baker, C and Herson, D. 1994. *Bioremediation*. USA. Mc Graw-Hill, Inc.
- Cappucino, J.G. dan Sherman. 1983. *Microbiology a Laboratory Manual*. USA : Addison Wesley. Publ. Co.
- Cooper, D.G., Ramsay, B.A., Margaritis, A., Zajic et al., J.E. 1983. *Rhodococcus Bacteria : Biosurfactant Production and Remulsifying Ability In : Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed. Zajic et al., J.E., Cooper, D.G., Jack, T.R., Kosaric, N. Oklahoma, USA : Penn Well Publishing. 61 -63.
- Davis, J.B. 1967. *Petroleum Microbiology*. New York : Elsevier Publishing Company. 54-57,253,293.
- Donaldson, E.C. 1989. *The Subsurface invironment In : Microbial Enhanced Oil Recovery*. New York : Ed. Donaldson, E.C, Chillingarian, G.V., Teh Fu Yen. Elsevier. 28.
- Duvnjak, Z., Cooper, D.G., Kosaric, N. 1983. *Effect on N sources on Surfactant Production by Arthrobacter Parafineus ATCC 19558 In : Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed.
- Horowitz, A., D. Gutnick and E. Rosenberg. 2005. *Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil: Applid Microbiology*. 30(1) p. 10-19
- Leahy, J.G. dan R.R. Colwell. 2000. *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environments: Microbiological Reviews* 54 (3), 305-315.
- Marquis, R.E. 1993. *Barotolerance and Microbial Enhancement of Oil Recovery. Microbial Enhanced Oil Recovery*. J.E Zajic., eds. Penn Well Publishing. Oklahoma. USA. p. 8-15.
- Moses, V. and D. G Springham, 1992. *Bacteria and the enhanced of oil recovery*. New Jersey. Applied Sciences Publishers. London.
- Neumann, H.J., Paczynska-Lahme, B., dan Severin, D. 2001. *Composition and Properties of Petroleum*. New York. Halsted Press. p. 1-17, 28-29, 97-103.
- Sheehan, D. 1997. *Bioremediation Protocols-Methods in Biotechnology*. New Jersey. Humana Press, p. 60-63.
- Speight, J.G. 1980. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Marcel Dekker, Inc. New York. USA. p. 52-77.
- Stanbury, P.F. dan Whitaker, A. 1987. *Principles of Fermentation Technology*. Toronto, Canada : Pergamon Press. 11, 108.
- Virmuda, B. 1999. *Penelitian Awal Ierhadap 8 Isolat Bakteri Reservoir dalam Mengembangkan Volume Minyak Bumi ("Oil Swelling")*. [Skripsi]. Bandung : Intitut Teknologi Bandung.
- Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H. 1998. *Microbiological Aspects of Surfactant Use For Biological Soil Remediation. Biodegradation*. Volume 8. 401 -403.
- Watkinson, R. 1980. *Interaction of Microorganism with Hydrocarbon, In: Hydrocarbon in Biotechnology*. London. Heyden & Son Ltd. P. 11-24.
- Zajic et al., J.E. dan Akit, J. 1983. *Biosurfactant in Bitumen Separation From Tar Sand In : Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed. Zajic et al., J.E., Cooper, D.G., Jack, T.R., Kosaric, N. Oklahoma, USA : Penn Well Publishing. 50.
- Zajic et al., J.E., Guignard, H., Gerson, D.F. 1977. *Emulsifying and Surface Active Agents from Corynebacterium hydrocarboclaclus. Biotechnology and Bioengineering*. Volume XIX. 1287-1290,1299.