

Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Air Laut Tercemar Minyak Di Pelabuhan Panjang Lampung

Silvana Citra*, Nurhasanah

Dicaftarkan: [15 Oktober 2020] Direvisi: [30 Maret 2021] Terbit: [29 April 2021]

ABSTRAK: Biosurfaktan merupakan suatu produk metabolit yang diproduksi oleh bakteri, jamur dan ragi sebagai produk ekstraseluler. Keunggulan biosurfaktan yaitu memiliki tingkat toksisitas yang rendah dan mudah terurai secara biologi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang. Metode yang digunakan meliputi isolasi bakteri dari air laut, kultivasi bakteri air laut menggunakan Mineral Salt Medium (MSM), parameter uji biosurfaktan meliputi indeks emulsifikasi dan *drop collapse*, karakterisasi biokimia diantaranya uji pewarnaan gram, uji endospora dan uji katalase. Hasil isolasi diperoleh 12 isolat bakteri air laut. Hasil skrining 12 isolat menunjukkan bahwa 12 isolat tersebut positif uji *drop collapse* dilihat dari bentuk tetesan supernatan sampel pada oli bekas yang melebar dan mendarat. Sedangkan diantara 12 isolat tersebut, hanya 8 isolat yang menghasilkan emulsi pada uji emulsifikasi. Emulsi tertinggi dihasilkan oleh isolat ALP D1 sebesar 50%. Karakter biokimia bervariasi terhadap 8 isolat bakteri penghasil biosurfaktan. Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa isolat-isolat bakteri dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang memiliki potensi sebagai penghasil biosurfaktan.

Kata kunci: Biosurfaktan, Indeks Emulsi, *Drop Collapse*, Pelabuhan Panjang.

PENDAHULUAN

Aktivitas distribusi minyak yang berada di Pelabuhan Panjang Lampung berkaitan erat dengan proses bongkar muat minyak oleh kapal tanker. Kegiatan bongkar muat minyak rentan terhadap tumpahan minyak. Apabila tumpahan minyak masuk ke perairan, dapat menyebar di permukaan laut dan menyebabkan dampak negatif bagi lingkungan pesisir dan laut (1). Untuk menangani tumpahan minyak umumnya menggunakan surfaktan kimia sebagai agen pengemulsi. Namun karena masalah lingkungan akhir-akhir ini, penggunaan produk yang ramah lingkungan lebih diutamakan. Sehingga penggunaan surfaktan dapat digantikan dengan biosurfaktan untuk remediasi tumpahan minyak (EOR) di lingkungan. Biosurfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan (ST) dan tegangan antarmuka (IFT) antara minyak dan air (2). Biosurfaktan adalah molekul aktif-permukaan yang disintesis oleh sel mikroba (3). Biosurfaktan merupakan senyawa amfipatik yang tersusun dari komponen hidrofobik dan hidrofilik. Bagian hidrofobik biosurfaktan biasanya terdiri dari asam lemak hidroksi, asam lemak jenuh atau tidak jenuh, dan alkohol lemak dengan panjang rantai atom karbon antara 8 sampai 18. Sedangkan komponen hidrofilik terdiri dari gugus hidroksil, fosfat, gugus karboksil, karbohidrat (mono-, oligo-, polisakarida), atau polipeptida (4). Beberapa bakteri air laut yang telah diteliti sebelumnya memiliki kemampuan dalam menghasilkan biosurfaktan diantaranya yaitu *Rhodococcus* sp. PML026 (5), *Pseudomonas aeruginosa* LBF-1-0132 (6), *Bacillus pumilus* (7), dan *Nocardioopsis* sp. B4

(8). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang Lampung.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Air Laut

Pengukuran suhu dan pH sampel dilakukan untuk mengetahui kondisi fisik sampel air laut. Adapun hasil pengukuran suhu dan pH sampel air laut Pelabuhan Panjang ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Suhu dan nilai pH rata-rata sampel.

Titik sampling	Suhu sampel (°C)	pH sampel
A	36	6,60
B	35	6,69
C	35	6,71
Rata-rata	35,3	6,67

Keterangan:

A: pada aliran air dekat pabrik Bumi Waras

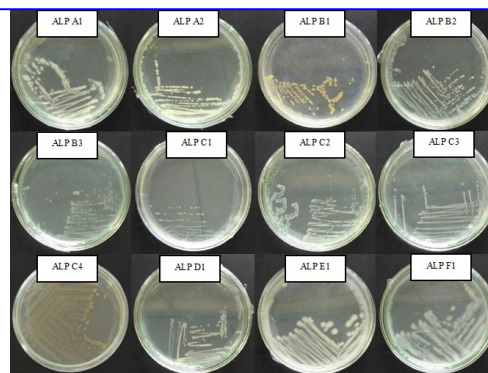
B: di pinggir Pelabuhan Panjang

C: di laut

Berdasarkan **Tabel 1**, diperoleh nilai rata-rata suhu lokasi sampling yaitu 35,3 °C dan nilai pH rata-rata yaitu 6,67.

Isolat Bakteri Air Laut

Adapun isolat terpilih yang akan dilakukan uji lebih lanjut dapat dilihat pada **Gambar 2** berikut.

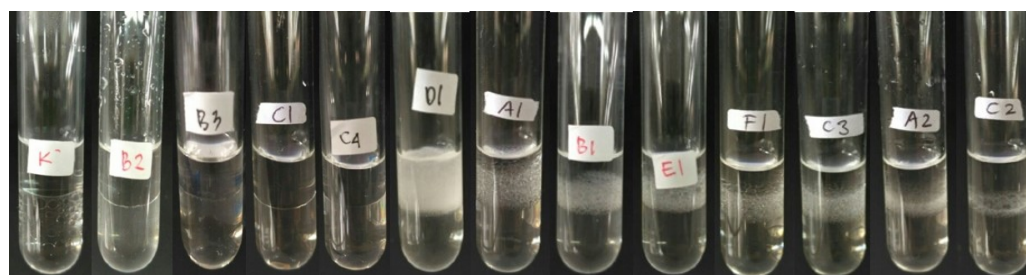


Gambar 2. Isolat bakteri air laut terpilih.

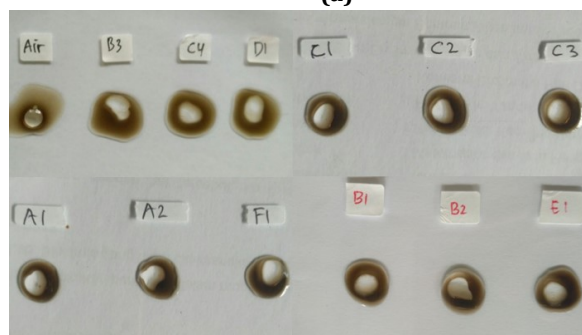
Hasil Isolasi bakteri air laut diperoleh 12 isolat murni yang diberi kode ALP A1, ALP A2, ALP B1, ALP B2, ALP B3, ALP C1, ALP C2, ALP C3, ALP C4, ALP D1, ALP E1, dan ALP F1. Isolat-isolat tersebut dipilih berdasarkan bentuk dan warna isolat yang berbeda.

Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Skrining bakteri penghasil biosurfaktan dilakukan terhadap 12 isolat yang berhasil diisolasi dari air laut Pelabuhan Panjang. Tahap skrining dilakukan dengan mengukur indeks emulsi dan *drop collaps*. Pengukuran indeks emulsifikasi dilakukan pada supernatan bebas sel yang diuji menggunakan hidrokarbon uji n-heksana, sedangkan uji *drop collaps* dilakukan dengan menggunakan oli bekas. Hasil pengujian emulsifikasi yang terbentuk dari masing-masing isolat ditunjukkan pada **Gambar 3(a)** dan hasil uji *drop collaps* ditunjukkan pada **Gambar 3(b)** berikut:



(a)



(b)

Gambar 3. Aktivitas emulsi (a) dan *drop collaps* (b) terhadap 12 isolat bakteri.

Aktivitas emulsi pada **Gambar 3(a)** menunjukkan bahwa 8 dari 12 isolat bakteri dapat menghasilkan emulsi saat diuji menggunakan hidrokarbon n-heksana yaitu isolat ALP A1, ALP A2, ALP B1, ALP C2, ALP C3, ALP D1, ALP E1, dan ALP F1, dengan nilai indeks emulsifikasi ($IE_{24}\%$) bervariasi (**Tabel 2**). Diantara 8 isolat tersebut, isolat yang memiliki indeks emulsifikasi ($IE_{24}\%$) tertinggi yaitu isolat ALP D1 sebesar 50%. Uji emulsifikasi merupakan suatu metode analisis kuantitatif yang lebih baik untuk mengukur biosurfaktan terlarut yang dapat mempertahankan setidaknya 50% volume emulsi selama 24 jam setelah pembentukan emulsi (9). Sedangkan 4 isolat tidak menghasilkan emulsi dengan n-heksana yaitu isolat ALP B2, ALP B3, ALP C1, dan ALP C4. Kontrol negatif menunjukkan tidak adanya aktivitas emulsifikasi antara n-heksana dan akuades, hal ini disebabkan karena n-heksana dan akuades berbeda kepolaran sehingga tidak dapat bercampur.

Parameter uji biosurfaktan lainnya dapat dilihat dari kemampuan biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan pada uji *drop collaps*. Pada **Gambar 3(b)**, kontrol negatif menggunakan akuades dan oli bekas, menghasilkan bentuk tetesan bulat dan tidak melebar. Sedangkan supernatan uji dari 12 isolat bakteri yang diteteskan pada oli bekas menunjukkan hasil *drop collaps* positif yang ditandai dengan bentuk tetesan mendatar dan melebar. Uji *drop collaps* bergantung pada destabilisasi tetesan supernatan. Bentuk

tetes mendatar dan melebar ini menandakan adanya kandungan biosurfaktan pada supernatan uji. Biosurfaktan mampu menurunkan tegangan permukaan antara supernatan dengan permukaan hidrofobik. Uji *drop collaps* merupakan metode yang sensitif dan cepat untuk skrining bakteri penghasil biosurfaktan. Selain itu, uji *drop collaps* juga mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus dan sampel yang dibutuhkan sedikit (10–12). Dari 12 isolat bakteri yang positif uji *drop collaps*, terdapat 4 isolat bakteri yang tidak menghasilkan emulsi pada uji emulsifikasi karena stabilitas tetesan supernatan pada uji *drop collaps* bergantung pada konsentrasi biosurfaktan dan berkorelasi dengan tegangan permukaan tetapi tidak dengan aktivitas emulsi. Tetesan supernatan yang dihasilkan bakteri penghasil biosurfaktan dapat runtuh di atas permukaan minyak. Apabila konsentrasi biosurfaktan yang dihasilkan bakteri sangat rendah, tetesan akan tetap stabil (13).

Karakteristik Biokimia Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Karakterisasi bakteri pada penelitian ini hanya dilakukan pada bakteri yang positif menghasilkan biosurfaktan, ditunjukkan dengan hasil uji emulsifikasi dan *drop collaps* positif. Terdapat 8 isolat positif diantaranya ditunjukkan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Karakteristik isolat penghasil biosurfaktan.

Kode isolat	Indeks emulsi (IE ₂₄ %)	Uji <i>drop collaps</i>	Gram bakteri	Morfologi sel	Endospora	Katalase
ALP A1	37	+	-	Basil	+	+
ALP A2	17	+	+	Kokus	-	+
ALP B1	30	+	-	Kokus	+	+
ALP C2	7	+	-	Basil	+	+
ALP C3	23	+	-	Basil	-	+
ALP D1	50	+	-	Basil	+	+
ALP E1	27	+	-	Basil	+	+
ALP F1	27	+	-	Basil	+	+

Hasil uji pewarnaan gram terhadap 8 isolat bakteri air laut menunjukkan bahwa terdapat 1 bakteri gram positif berbentuk kokus yaitu ALP A2 yang menandakan bahwa bakteri ALP A2 memiliki peptidoglikan yang tebal. Saat penambahan alkohol, pori-pori dinding sel menyempit karena terjadi dekolorisasi sehingga dinding sel dapat menahan kristal violet dan bakteri menjadi berwarna ungu (14). Isolat ALP B1 merupakan gram negatif berbentuk kokus. Sedangkan, isolat ALP A1, ALP C2, ALP C3, ALP D1, ALP E1, dan ALP F1 merupakan gram negatif berbentuk basil. Bakteri gram negatif berwarna merah disebabkan karena pemberian alkohol dapat memperbesar pori-pori dinding sel bakteri dan melarutkan lipid bagian luar sehingga kompleks kristal violet lebih mudah dihilangkan. Karena sel bakteri gram negatif kehilangan warna, maka dapat menyerap pewarna tandingannya sehingga bakteri gram negatif menjadi berwarna merah (15).

Pada uji pewarnaan endospora, 2 isolat bakteri menunjukkan hasil negatif yaitu isolat ALP A2 dan ALP C3. Sedangkan, 6 isolat bakteri menunjukkan hasil positif yaitu isolat ALP A1, ALP B1, ALP C2, ALP D1, ALP E1, ALP F1, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut dapat membentuk spora untuk mengatasi lingkungan yang tidak menguntungkan (16). Endospora merupakan suatu struktur yang diproduksi di dalam sel bakteri. Jika sel semakin tua, maka sel vegetatif akan pecah sehingga endospora akan terlepas menjadi

spora bebas. Perbedaan spora dengan sel vegetatif yaitu spora lebih tahan lama dalam keadaan lingkungan yang ekstrem (panas, kering, adanya bahan kimia beracun) dan lebih tahan terhadap pewarnaan sehingga sangat sulit melepas zat warna (17).

Pada **Tabel 2**, kedelapan isolat bakteri penghasil biosurfaktan positif terhadap uji katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara ketika isolat bakteri ditetesi larutan H_2O_2 3%. Uji katalase dilakukan untuk mengetahui sifat bakteri terhadap kebutuhan oksigen. Gelembung udara yang terbentuk menunjukkan bahwa bakteri bersifat aerobik dan memiliki enzim katalase. Enzim katalase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis peroksida atau dapat mengkatalisasi penguraian H_2O_2 menjadi O_2 dan H_2O (16).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa diantara 12 isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang Lampung, terdapat 8 isolat yang menunjukkan adanya aktivitas emulsi dilihat dari indeks emulsifikasi ($IE_{24\%}$) yang bervariasi. Indeks emulsifikasi ($IE_{24\%}$) terbesar dihasilkan dari isolat ALP D1 yaitu sebesar 50%. Sedangkan untuk uji *drop collapse*, 12 isolat bakteri tersebut menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan bentuk tetesan yang mendatar dan melebar. Karakter biokimia terhadap 8 isolat penghasil biosurfaktan menunjukkan hasil yang bervariasi. Bakteri air laut yang berhasil diisolasi dari Pelabuhan Panjang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan.

PROSEDUR PENELITIAN

Lokasi Sampling

Sampel uji berupa air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang yang diambil dari 3 titik yaitu pada aliran pembuangan limbah dekat pabrik Bumi Waras yang mengarah ke laut (titik A), di pinggir pelabuhan panjang (titik B) dan di laut (titik C). Interval titik sampling antara yang satu dengan yang lain adalah ± 25 meter.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang.

Sampel air laut dari masing-masing titik sampling diambil menggunakan botol plastik. Botol dicelupkan ke dalam air dengan posisi mulut botol searah dengan aliran air (18).

Pengukuran Suhu dan pH Sampel

Suhu sampel diukur menggunakan termometer dengan cara dicelupkan ke dalam sampel air laut dan dibiarkan selama 2 sampai 5 menit hingga termometer menunjukkan nilai yang stabil (19). Pengukuran pH sampel dilakukan dengan menyelupkan elektroda pH meter ke dalam contoh uji sampai menunjukkan pembacaan yang tetap (20).

Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Nutrient agar sebanyak 2,8 gram dilarutkan menggunakan 100 mL akuades di dalam erlenmeyer. Media dipanaskan hingga larut dan disterilkan menggunakan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C.

Nutrient Broth (NB)

Nutrient broth sebanyak 1 gram dilarutkan dengan 20 mL akuades di dalam erlenmeyer 100 ml. Media dipanaskan hingga larut kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.

Mineral Salt Medium (MSM)

Media MSM dibuat dengan melarutkan bahan-bahan ke dalam 1 L akuades; 2 g/L KH₂PO₄, 5 g/L K₂HPO₄, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,01 g/L CaCl₂·2H₂O, 0,01 g/L FeSO₄·7H₂O, 0,002 g/L MnSO₄·H₂O, 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,1 g/L NaCl, 0,03% yeast ekstrak dan 0,03% glukosa. Setelah bahan-bahan tersebut dilarutkan, kemudian disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (21).

Isolasi Bakteri

Sampel air laut yang diambil dari Pelabuhan Panjang, dimasukkan 1 ml ke dalam tabung reaksi steril lalu ditambahkan 9 mL larutan salin (pengenceran 10⁻¹). Kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga pengenceran 10⁻⁵. Sampel pada setiap pengenceran bertingkat diambil 100 µl untuk dituang ke media NA menggunakan metode *spread plate*. Media diinkubasi selama 24 jam di dalam *incubator*.

Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Isolat bakteri terpilih hasil isolasi diinokulasikan pada media NB dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* selama 24 jam, kecepatan rotasi 110 rpm, dan suhu 30°C. Inokulum sebanyak 1% (v/v) pada media NB dipindahkan ke media MSM lalu diinokulasikan menggunakan *shaker incubator* selama 24 jam, kecepatan rotasi 110 rpm, dan suhu 30°C. Supernatan kultur dipisahkan dari sel bakteri dengan cara disentrifugasi menggunakan *centrifuge* selama 20 menit, kecepatan rotasi 10.000 rpm (21).

Uji Emulsifikasi

Uji emulsifikasi dilakukan dengan menambahkan 2 ml hidrokarbon uji ke dalam supernatan bebas kultur dengan volume yang sama. Kemudian dicampurkan dengan cara

divortex selama 2 menit dan didiamkan selama 24 jam. Indeks emulsifikasi ($IE_{24\%}$) dapat diketahui dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$IE_{24\%} = (HE/HT) \times 100\%$$

Keterangan:

HE: tinggi lapisan emulsi (cm)

HT: tinggi total cairan (cm)

(8,22).

Uji Drop Collaps

Uji *drop collaps* dilakukan dengan meneteskan 1 μ l sampel supernatan diatas tetesan hidrokarbon uji menggunakan mikropipet 10 μ l. Hasilnya dipantau secara visual setelah 1 jam. Jika bentuk tetesan mendatar dan melebar maka hasilnya positif (11).

Karakterisasi Biokimia

Uji Pewarnaan Gram

Uji pewarnaan gram dilakukan dengan menyiapkan kaca objek yang sudah ditetaskan air. Isolat bakteri uji diletakkan secara aseptis sebanyak 1 ose, diratakan hingga membentuk lapisan tipis dan difiksasi dengan api kecil. Kemudian teteskan pewarna kristal violet di atas film pada kaca objek dan dibiarkan selama 1 menit. Bilas dengan air dan tetesi dengan larutan lugol yodium selama 1 menit. Dicuci kembali menggunakan air dan dihilangkan warnanya menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik atau sampai warna biru tidak luntur lagi. Setelah dicuci sebentar, diwarnai dengan larutan safranin selama 10-20 detik. Dibilas dengan air, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif (17).

Uji Pewarnaan Endospora

Uji pewarnaan endospora dilakukan dengan menyiapkan kaca objek yang sudah ditetaskan air, bakteri uji diambil menggunakan ose dan disebarakan pada kaca objek. Kemudian difiksasi dengan api kecil. Teteskan pewarna *malachite green* 5% di atas lapisan film pada kaca objek dan dibiarkan selama 20 menit tanpa pemanasan. Cuci dengan hati-hati selama 20-30 detik menggunakan air dan ditetaskan larutan safranin selama 30 detik. Setelah itu dibilas dengan air, dikeringkan dan diamati di bawah mikroskop menggunakan lensa objektif (17).

Uji Katalase

Uji Katalase dilakukan dengan mengambil isolat bakteri dengan menggunakan ose, dioleskan pada kaca objek, kemudian dicampurkan dengan 2 tetes larutan H_2O_2 3%. Hasil positif apabila terdapat gelembung-gelembung udara (23).

INFORMASI TENTANG PENULIS

Penulis Rujukan:

Silvana Citra*
Nurhasanah

Laboratorium Biokimia
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung
Jl. Prof. Dr. Ir. Sumantri Brojonegoro, Gedong Meneng, Kota Bandar Lampung

email: silvanacitra1@gmail.com, nur.hasanah@fmipa.unila.ac.id

PUSTAKA

1. Haryanto NF, Prasetyawan IB, Marwoto J. Pemodelan tumpahan minyak di perairan Teluk Lampung. *Oceanografi*. **2017**;6(1):193–202.
2. Joshi SJ, Al-Wahaibi YM, Al-Bahry SN, Elshafie AE, Al-Bemani AS, Al-Bahri A, et al. Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in Microbiology*. **2016**;7:1–14.
3. Peele KA, Ch VRT, Kodali VP. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. *3 Biotech*. **2016**;6(2):2–7.
4. Kubicki S, Bollinger A, Katzke N, Jaeger KE, Loeschcke A, Thies S. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Marine Drugs*. 2019;17(7):1–30.
5. White DA, Hird LC, Ali ST. Production and characterization of a Trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus* sp., strain PML026. *Journal of Applied Microbiology*. **2013**;115(3):744–55.
6. Safitriani, Thontowi A, Yetti E, Suryani, Yopi. Pertumbuhan Optimal Bakteri Laut *Pseudomonas aeruginosa* LBF-1-0132 dalam Senyawa Piren. *Jurnal Biologi Indonesia*. **2017**;13(1):107–16.
7. Saggese A, Culurciello R, Casillo A, Corsaro MM, Ricca E, Baccigalupi L. A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*. **2018**;16(6):1–13.
8. Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardopsis* sp. B4. *Desalination*. **2012**;285:198–204.
9. Mahalingam PU, Sampath N. Isolation, characterization and identification of bacterial biosurfactant. *European Journal of Experimental Biology*. **2014**;4(6):59–64.
10. Rath K, Singh AB, Chandan S, Vatsala RS. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain *Pseudomonas aeruginosa* SMVIT 1 from oil contaminated soil. *Journal of Scientific and Industrial Research*. **2016**;75(11):681.
11. Sumathi R, Yogananth N. Isolation and identification of biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* from marine sediment samples and its antimicrobial properties. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. **2016**;3(12):200–12.
12. Kurniati TH, Rahayu S, Sukmawati D, Maharani W. Screening of biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Physics: Conference Series*. **2019**;1402(5):1–6.

13. Jain DK, Collins-Thompson DL, Lee H, Trevors JT. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. **1991**;13(4):271-9.
14. Putri ALO, Kusdiyantini E. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari pangan fermentasi berbasis ikan (Inasua) yang diperjualbelikan di Maluku-Indonesia. *Jurnal Biologi Tropika*. **2018**;1(2):6-12.
15. Rahayu SA, Gumilar MH. Uji cemaran air minum masyarakat sekitar Margahayu Raya Bandung dengan identifikasi bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. **2017**;4(2):50-6.
16. Swandi MK, Periadnadi, Nurmiati. Isolasi bakteri pendegradasi limbah cair industri minyak sawit. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. **2015**;4(1):71-6.
17. Artama T. Modul 1; Dasar-dasar praktikum mikrobiologi. In: *Praktikum mikrobiologi dan sanitasi pangan*. Tangerang Selatan: Universitas Terbuka; **2011**. p. 1-44.
18. Badan Standardisasi Nasional. Air dan air limbah – Bagian 59: Metoda pengambilan contoh air limbah. *SNI 6989-59-2008*. **2008**;1-19.
19. Badan Standardisasi Nasional. Air dan air limbah - Bagian 23 : Cara uji suhu dengan termometer. *SNI 06-698923-2005*. **2005**;1-4.
20. Badan Standardisasi Nasional. Air dan air limbah – Bagian 11: Cara uji derajat keasaman (pH) dengan menggunakan alat pH meter. *SNI 06-698911-2004*. **2004**;1-3.
21. Francy DS, Thomas JM, Raymond RL, Ward CH. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*. **1991**;8:237-45.
22. Zhang J, Xue Q, Gao H, Lai H, Wang P. Production of lipopeptide biosurfactants by *Bacillus atrophaeus* 5-2a and their potential use in microbial enhanced oil recovery. *Microbial Cell Factories*. **2016**;15(168):1-11.
23. Rinanda T, Mudatsir, Hayati Z, Yulia W, Mahdani W, Harapan. *Modul praktikum mikrobiologi*. Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala. **2013**. 48 p.