

**EKSPLORASI BAKTERI PENGHASIL BIOSURFAKTAN DARI SAMPEL AIR KOLAM  
GATHERING STATION PT. BUMI SIAK PUSAKO PROVINSI RIAU**

*M. Hasbi, Budijono, Tetty Marta Linda, Dan Wiwik Widiarti*

*Staf Ahli Laboratorium Teknologi Pengolahan Limbah MSP FAPERIKA Unri, kepala Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA UNR I, Mahasiswa Tahun Akhir Jurusan Biologi FMIPA UNRI*

**ABSTRAK**

Kajian isolasi bakteri penghasil biosurfaktan dari sampel air kolam pemisah air limbah dan minyak mentah Gathering Station (GS) dan CLTS/CMTF PT. Siak Bumi Pusako Siak Sri Indrapura telah dilakukan. Ditemukan 8 isolat bakteri murni. Uji Indeks Emulsi ( $IE_{24}$ ) mendapatkan bahwa semua isolat yang diperoleh menghasilkan biosurfaktan dengan tingkat produksi yang berbeda-beda. Ditemukan dua isolat yang paling tinggi potensi sebagai penghasil biosurfaktan dengan aktivitas emulsi sebesar 100% yaitu S1A<sub>1</sub> dan S2A<sub>2</sub>. Uji Indeks Emulsi ( $IE_{24}$ ) lebih akurat dibandingkan *Uji blood agar untuk mendeteksi isolat penghasil biosurfaktan*.

*Kata kunci: biosurfektan, Isolat bakteri, penghasil biosurfaktan, uji emulsi*

**PENDAHULUAN**

Riau sebagai penghasil lebih 50 % minyak bumi skala nasional (Surjadi, 2000), justru menghadapi masalah pencemaran tumpahan minyak yang serius (Green and Trett, 1989) yang bersumber dari berbagai aktivitas. Kecelakaan tanker tercatat lebih dari delapan kali di perairan Selat Malaka dan perairan kepulauan Riau lainnya (Feliatra, 2002). Skala global kecelakaan kapal tanker Amoco Cadiz di Bretoni Coat dan Exxon Valdez di Alaska tumpah lebih dari 263 ribu ton, di Iraq lebih dari 1,5 juta ton ke perairan Teluk Persia (Lang and Wagner in Kasaric, 1993), ke perairan sungai diperkirakan lebih 1,5 juta ton setiap tahunnya (Green and Trett, 1989). Akibatnya dampak pencemaran yang kentara adalah terjadinya perobahan dan berkurangnya komposisi vegetasi, menurunnya keanekaragaman hayati, perobahan dominansi dan kematian tanaman air, burung-burung dan berbagai biota laut lainnya. Bahkan menyebabkan berkurangnya jumlah spesies invertebrata serta dapat meracuni berbagai jenis ikan dan amphibia (Green and Trett, 1989).

Berbagai upaya pengendalian pencemaran minyak telah dilakukan dengan pembiayaan yang sangat mahal, akan tetapi sering menimbulkan dampak baru, karena bersifat toksik dan nonbiodegradasi (Bangkok Post, 1992). Satu metode yang telah diteliti untuk menjawab masalah diatas adalah menggunakan surfaktan yang diproduksi secara alami oleh mikroorganisme, yang dikenal biosurfaktan. Biosurfaktan yang diproduksi secara alami, lebih ramah lingkungan dan dapat diurai secara biologi, tidak seperti kebanyakan surfaktan sintetik. Beberapa keunggulannya adalah dapat diuraikan secara biologi (biodegradable), toksisitas yang rendah, bahan baku tersedia di alam dalam jumlah besar dan murah, dapat diproduksi dari buangan industri, digunakan sebagai pengendalian lingkungan terutama pengendalian tumpahan minyak dan sebagainya (Kosaric, N. 1992 dan Lin, S. C. et al. 1994). Biosurfektan mempunyai banyak jenis yang dihasilkan oleh yeast, bakteri dan fungi (Fiechter, A. 1992), tak kurang dari 29 jenis mikroorganime (Banat, I. M. 1995) dan 8 Murni, M. M. M. (1998) menemukan bakteri *Bacillus macerans* strain TS9- yang diisolasi dari kilang Penyulingan Minyak PETRONAS di Kertih Terengganu Malaysia,

Propinsi Riau sebagai salah satu penghasil minyak terbesar di Indonesia hingga saat ini belum ada laporan tentang koleksi bakteri penghasil biosurfaktan yang diperoleh dari lokasi ladang minyak, lokasi pemisahan minyak gathering Station, kilang penyulingan minyak Dumai dan dari perairan pelabuhan Dumai sebagai penerima berbagai limbah industri di kawasan Dumai. Oleh sebab itu studi ini ingin mengkaji dan mengisolasi bakteri penghasil biosurfaktan yang diperoleh dari lokasi air kolam pemisahan sisa minyak mentah pada Gathering Station (GS) PT. Bumi Siak Pusako, Propinsi Riau.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA-UNRI. Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan November 2007 sampai Mei 2008.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, Ose, lampu spiritus, oven, autoklaf, *shaker*, vortex, mikroskop, inkubator, alat pengukur tegangan permukaan, *hot plate*, mikropipet, aluminium foil, kapas dan kassa. Adapun bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah Medium *Trypton Soya Agar* (TSA) (Merck), *Blood Agar* (Merck), *Mineral Salt Medium* (MSM) dan minyak tanah (kerosin).

### Pengambilan Sampel

100 gram sampel air yang terkontaminasi minyak bumi diambil dari masing-masing dua kolam tempat pembuangan limbah minyak bumi dari lokasi eksplorasi pengeboran atau Gathering Station dan di Centralized Land Treatment Support (CLTS) PT. Bumi Siak Pusako, Propinsi Riau. Masing-masing kolam (stasiun) ada tiga titik sampel dan dikompositkan dimasukkan ke dalam botol kaca yang sudah disterilkan terlebih dahulu. Kemudian disimpan ke dalam refrigerator (suhu 4°C) sebelum isolasi dikerjakan.

### Penyiapan Medium

#### a. Media *Trypton Soya Agar* (TSA)

Media isolasi adalah medium TSA, untuk mengisolasi bakteri penghasil biosurfaktan. Medium ini dibuat dengan mencampurkan 40 g TSA (Merck) ke dalam 1 liter aquades steril, lalu dididihkan sampai larut dan diaduk sampai homogen. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit, pH media = 7,3 (Murni, 1998)

#### b. Media *Blood Agar*

Media *Blood Agar* digunakan untuk skrining bakteri yang memiliki sifat mampu menghemolisis sel darah merah. Medium ini dibuat dengan mencampurkan 40 g *Blood Agar* (Merck) ke dalam 1 liter aquades steril, lalu dididihkan sampai larut dan diaduk sampai homogen. Sterilisasi dilakukan dengan autoklaf pada 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit, pH media = 6,8. Setelah itu media didinginkan sampai 45°C dan ditambahkan darah biri-biri yang sudah defibrinasi (Jenning *et al*, 2000).

#### c. Media *Mineral Salt Medium* (MSM)

Media MSM digunakan untuk media fermentasi bakteri penghasil biosurfaktan. Komposisi media

adalah  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,05 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,03 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,04 g,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Yeast extract 0,1 %, dan gliserol 2 %. Semua bahan tersebut dilarutkan dalam 1 liter aquades steril, lalu disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit, pH media = 6,7-7,2 (Cooper *et al*, 1981; Kofli *et al*, 2000).

### **Isolasi Bakteri**

Isolasi bakteri dari sampel air dilakukan dengan mengambil 1 gram sampel kemudian ditambahkan 10 ml larutan NaCl 0,85 % steril ke dalam tabung reaksi. Larutan tersebut diencerkan hingga  $10^{-4}$  dan divorteks untuk menghomogenkan sampel dengan larutan NaCl. Pengenceran  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$  diinokulasikan ke dalam media TSA (Merck) dengan metode *pour plate*. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh dimurnikan lagi pada media TSA sehingga didapatkan koloni tunggal. Isolat murni disimpan/ dipelihara pada agar miring TSA dan diletakkan dalam refrigerator.

### **Penyiapan inokulum untuk uji Fermentasi**

Inokulum untuk fermentasi dipersiapkan untuk melakukan uji emulsifikasi dengan mengambil 1 ose isolat murni ditumbuhkan pada 50 ml media MSM. Kultur diinkubasi dengan *inkubator shaker* pada suhu kamar kecepatan 200 rpm selama 3 hari. Setelah hari ke 3, kemudian dihitung populasi sel bakteri sampai mencapai populasi  $10^6$  (Tabatabaee *et al*, 2005).

### **Fermentasi untuk Persiapan Uji Emulsifikasi**

Prekultur yang telah dipersiapkan dipindahkan 1 ml (populasi  $10^6$ ) secara aseptis ke dalam Erlenmeyer 250 ml yang telah berisi 50 ml larutan MSM ditambah gliserol 2 %. Selanjutnya diinkubasi dengan menggunakan *shaker* pada temperatur kamar dan kecepatan 200 rpm selama 3 hari. Bakteri yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan ditandai dengan terbentuknya busa (*foam*) pada larutan fermentasi. (Tabatabaee *et al* 2005). Kultur hasil fermentasi ini selanjutnya digunakan untuk uji emulsifikasi.

### **Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan**

#### **a. Uji Hemolisis (Blood Agar)**

Semua isolat bakteri mumi yang disimpan pada media TSA diseleksi untuk menentukan bakteri penghasil biosurfaktan. Masing-masing isolat ditotolkan pada media *Blood Agar* untuk menentukan bakteri yang mampu menghemolisis sel darah merah. Setelah itu diinkubasi pada suhu kamar selama 24-48 jam. Bakteri yang mampu menghemolisis sel darah merah ditandai dengan terbentuknya zona bening disekeliling koloni. Kemudian zona bening diukur (Jenning *et al*, 2000). Bakteri yang dapat menghemolisis sel darah merah dijadikan sebagai penduga terhadap bakteri penghasil biosurfaktan.

#### **b. Uji Emulsifikasi**

Uji emulsifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsi lapisan lemak. Dalam penelitian ini digunakan kerosene sebagai substrat lemak yang akan diemulsi. Perbandingan antara kerosene dan kultur cair adalah 6: 4. Dimasukkan 6 ml kerosene ke dalam tes tube setelah itu ditambahkan kultur cair 4 ml hasil fermentasi, kemudian divorteks dengan kecepatan tinggi selama 2 menit. Setelah itu dibiarkan selama 24 jam untuk melihat kestabilan emulsi. Kemudian diukur indeks emulsifikasi dengan menggunakan rumus Cooper dan Goldenberg (1987).

Untuk menghitung indeks emulsifikasi, digunakan rumus sebagai berikut:

$$IE_{24} = \frac{\text{Tinggi Lapisan Emulsi}}{\text{Tinggi lapisan minyak} + \text{lap. Emulsi}} \times 100\%$$

## Pengamatan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah dua kelompok bakteri yaitu bakteri yang menghasilkan biosurfaktan dan bakteri yang tidak menghasilkan biosurfaktan melalui uji hemolisis dan uji emulsifikasi yang ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian diuraikan dalam bentuk naratif deskriptif untuk mendapatkan kesimpulan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

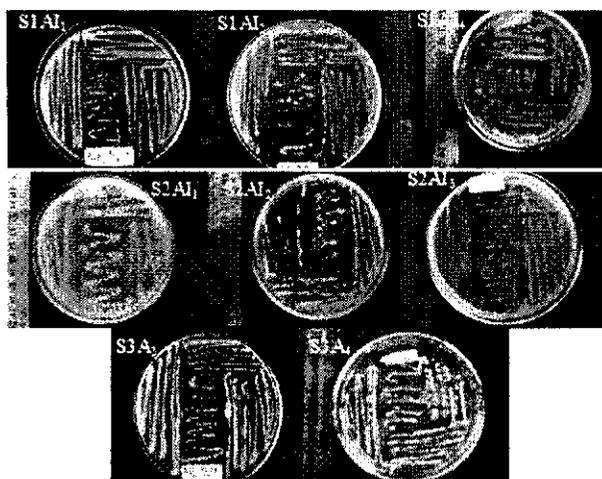
#### Isolasi Bakteri dari Sampel Air

Hasil penseleksian dan pengisolasian bakteri dari sampel air kolam Gathering Station (GS) telah diperoleh isolat-isolat murni. Stasiun I ditemukan tiga isolat, Stasiun II ditemukan tiga isolat dan Stasiun III dua isolat. Kesemua hasil isolasi dan pemurnian bakteri dari sampel diberi kode sebagaimana yang ditampilkan pada Tabel 1. dan Gambar 1.

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri dari Sampel Air

NO	STASIUN	KODE ISOLAT	Suhu Lingkungan ( °C)
1	I	S1A <sub>1</sub>	29,5
2		S1A <sub>2</sub>	
3		S1A <sub>4</sub>	
4	II	S2A <sub>1</sub>	29
5		S2A <sub>2</sub>	
6		S2A <sub>3</sub>	
7	III	S3A <sub>3</sub>	30
8		S3A <sub>4</sub>	

Keterangan : S= Stasiun, Angka: Stasiun ke ...; A= Air ; I= Isolat, Angka: isolat ke ...



Gambar 1. Hasil Isolasi Bakteri dari Sampel Air

### Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Seleksi isolate bakteri penghasil biosurfaktan dapat dilakukan dengan beberapa metode. Pada penelitian ini hanya menggunakan dua metode yaitu dengan uji aktivitas haemolisis dan aktivitas emulsi melalui tes emulsifikasi. Uji emulsifikasi merupakan uji lebih spesifik dalam menentukan bakteri penghasil biosurfaktan. Sedangkan uji hemolisis merupakan cara yang paling mudah dan paling cepat untuk penduga awal bakteri penghasil biosurfaktan (Jennings dan Tanner, 2000., dan Tabatabaee *et al*, 2005), akan tetapi metode ini kurang akurat (Youssef, N.H. 2004).

### Uji Hemolisis

Semua hasil isolasi bakteri dari sampel air yang tumbuh di media TSA, diseleksi dengan metode hemolisis menggunakan media *Blood Agar*. Metode uji hemolisis merupakan kemampuan bakteri menghancurkan sel darah merah pada *Blood Agar Plate* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekeliling koloni (Chamanrokh *et al*, 2007). Hasil uji ini diperoleh sebanyak enam isolate bakteri yang mampu menghancurkan sel darah merah (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji Hemolisis dan Uji Emulsifikasi

Stasiun	Kode Isolat	Aktivitas Hemolisis (+/-)	Diameter (cm)	Emulsi tes (%)	Jenis Hemolisis	
					Jenis	Warna
Satu	S1Al <sub>1</sub>	+	1,7	32	β	Bening
	S1Al <sub>2</sub>	+	2,3	100	β	Bening
	S1Al <sub>4</sub>	-	-	37,5	-	-
Dua	S2Al <sub>1</sub>	+	1,3	17,5	β	Bening
	S2Al <sub>2</sub>	+	1,2	100	β	Bening
	S2Al <sub>3</sub>	+	1	5	β	Bening
Tiga	S3Al <sub>3</sub>	-	-	7,5	-	-
	S3Al <sub>4</sub>	+	1,1	10	β	Bening

Uji penentuan bakteri penghasil biosurfaktan berikutnya adalah uji emulsifikasi. Uji ini lebih spesifik dan akurat untuk menentukan bakteri penghasil biosurfaktan, walaupun prosesnya butuh waktu lebih lama dibandingkan uji hemolisis. Hasil fermentasi yang dilakukan menggunakan incubator shekker pada suhu kamar dan kecepatan agitasi 200 rpm selama tiga kali 24 jam, selanjutnya masing-masing larutan kulturanya dilakukan uji emulsifikasi sesuai prosedur. Hasil uji emulsifikasi dapat dilihat pada Tabel 2..

### Pembahasan

#### Jumlah Isolat Bakteri

Jumlah isolate bakteri yang diperoleh dari sampel air di PT. BSP Riau adalah sebanyak delapan isolate, tiga isolate ditemukan dari Stasiun I, tiga isolate pada Stasiun II dan dua isolate pada Stasiun III. Jumlah isolate yang ditemukan tersebut lebih sedikit dibandingkan dengan hasil penelitian Agustiani (2004) sebanyak 23 isolat bakteri. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh faktor lingkungan fisika khususnya suhu. Agustiani (2004) mengkulturkan bakteri pada suhu 50<sup>o</sup>C selama masa inkubasi dimana suhu tersebut merupakan suhu yang sesuai atau sama dengan kondisi lingkungan sample yang diambilnya pada sumur minyak bumi di Rumbai Riau. Sedangkan pada penelitian ini suhu lingkungan sample berkisar antara 29<sup>o</sup>C - 30<sup>o</sup>C, sementara suhu inkubasi isolasi bakteri

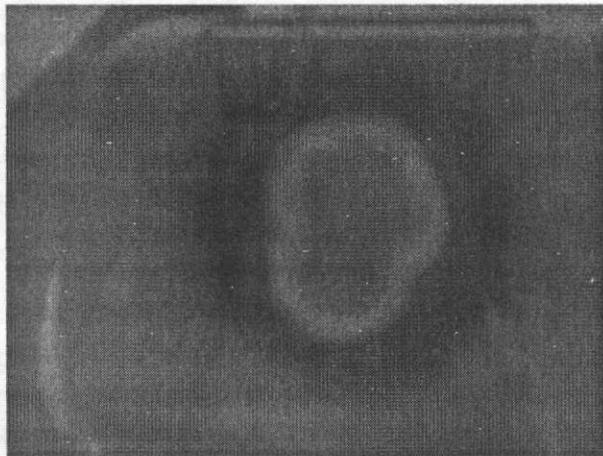
dilakukan pada suhu kamar berkisar antara 25 – 27 °C, berbeda dengan suhu lingkungan yang sebenarnya.

Faktor keterbatasan peralatan laboratorium merupakan pembatas, dimana incubator shaker yang digunakan tidak mempunyai pengaturan suhu, sehingga suhu inkubasi dilakukan pada suhu kamar. Faktor inilah yang diduga penyebab tidak optimalnya pertumbuhan dan jumlah bakteri yang diperoleh.

### Seleksi Isolat Bakteri Penghasil Biosurfaktan

#### Uji Hemolisis

Hasil uji hemolisis diperoleh enam isolate yang positif, artinya keenam isolate tersebut diduga sebagai isolate/ bakteri yang berpotensi penghasil biosurfaktan, yaitu S1A<sub>1</sub>, S1A<sub>2</sub>, S2A<sub>1</sub>, S2A<sub>2</sub>, S2A<sub>3</sub>, dan S3A<sub>4</sub> masing-masing garis tengah zona bening yang terbentuk sebesar 1,7; 2,3; 1,3; 1,2; 1; dan 1,1 cm. Sementara dua isolate lainnya negative, artinya diduga kedua isolate tersebut tidak berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan yaitu S1A<sub>4</sub> dan S1A<sub>3</sub>. Semua zona bening yang terbentuk dikelompokkan dalam hemolisis beta, yaitu mampu menghemolisis seluruh sel darah merah yang ada pada media sehingga warna sekeliling koloni menjadi bening (Gambar 2.).



Gambar 5: Menunjukkan beta hemolisis, tampak sekeliling koloni berwarna bening. Gambar diambil dengan menggunakan camera digital 5 megapixel.

Walaupun hasil uji hemolisis positif untuk enam isolate sebagai penduga terhadap isolat penghasil biosurfaktan, akan tetapi perlu dilakukan uji lain sebagai penguat dalam penentuan bakteri penghasil biosurfaktan tersebut. Karena hasil kajian (Youssef, N.H. *et. al.* 2004) tentang perbandingan metode mendeteksi bakteri biosurfaktan menyimpulkan bahwa metode hemolisis menunjukkan korelasi yang sangat lemah terhadap metode penurunan tegangan permukaan. Oleh sebab itu metode ini tidak dapat dipercaya untuk mendeteksi bakteri penghasil biosurfaktan.

#### Uji Emulsifikasi

Berbeda dengan uji hemolisis, uji emulsifikasi justru memberikan hasil positif untuk semua isolate, dimana kedelapan isolate yang ditemukan dapat menghasilkan biosurfaktan dengan kemampuan atau jumlah produksi persentase yang berbeda-beda, sebagaimana yang terlihat pada Tabel 2. Banyaknya persentase emulsi stabil yang terbentuk mengindikasikan jumlah biosurfaktan

yang dihasilkan isolat tersebut semakin besar. Ditemukan dua isolate yang menghasilkan paling banyak yaitu isolat S1A<sub>2</sub> dan S2A<sub>2</sub> dengan Indeks Emulsifikasi (IE<sub>24</sub>) 100%, artinya semua hidrokarbon yang dimasukkan dalam media uji dapat diemulsikan secara sempurna. Sementara terdapat tiga Isolat yang merupakan penghasil emulsi paling rendah antara 5 % hingga 10 % yaitu S2A<sub>3</sub>, S3A<sub>3</sub>, dan S3A<sub>4</sub>, berarti biosurfaktan yang dihasilkannya juga rendah.

Bila dibandingkan kedua metode yaitu uji lisis dan uji emulsi, terdapat perbedaan yang sangat kontradiktif. Beberapa hasil kajian menjelaskan bahwa uji lisis dapat dijadikan sebagai penduga awal dalam menskrining isolat penghasil biosurfaktan, sebagaimana yang disebutkan oleh (Fatimah, 2007), (Tabatabaee, A. *et. al*, 2005), akan tetapi kenyataannya bahwa tidak semua hasil positif uji lisis merupakan isolat menghasilkan biosurfaktan, bahkan isolat yang negatif dengan uji lisis justru menghasilkan biosurfaktan dan lebih tinggi hasilnya dibandingkan isolat yang positif uji lisis. Oleh sebab itu uji lisis tidak bisa dijadikan sebagai uji penentuan isolat penghasil biosurfaktan sebagaimana juga diungkapkan dari hasil penelitian (Youssef, N.H. *et al*. 2004). Untuk mengetahui secara pasti berapa besar kadar biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri ini perlu dilakukan kajian lebih lanjut dengan ekstraksi biosurfaktan.

## KESIMPULAN

Hasil isolasi bakteri dari sampel air yang terkontaminasi minyak bumi di PT. BSP, Riau diperoleh sebanyak 8 isolat. Uji Indeks Emulsi (IE<sub>24</sub>) mendapatkan bahwa semua isolat yang diperoleh menghasilkan biosurfaktan dengan tingkat produksi yang berbeda-beda. Uji Indeks Emulsi (IE<sub>24</sub>) lebih akurat dibandingkan Uji lisis untuk mendeteksi atau menskrining isolat penghasil biosurfaktan dan ditemukan dua isolat yang paling berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan dengan aktivitas emulsifikasi sebesar 100% yaitu S1A<sub>2</sub> dan S2A<sub>2</sub>.

## SARAN

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut untuk menggali isolat-isolat penghasil biosurfaktan lainnya di Provinsi Riau mengingat masih sedikit koleksi isolate bakteri penghasil biosurfaktan. Untuk mengetahui secara pasti berapa besar kadar biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri ini perlu dilakukan kajian lebih lanjut dengan ekstraksi dan purifikasi biosurfaktan yang dihasilkan masing-masing isolat tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustiani, E.D., 2004. Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Sumur Minyak Bumi di Rumbai Riau (Abstrak). <http://www.itb.ac.id/library>. [Accessed Date 15 September 2007].
- Banat, I. M., 1995. Biosurfactants Production and Possible Uses in Microbial Enhanced Oil Recovery and Oil Pollution Remediation: A Review. *Bioresource Technology*. S1 pp 1-12.
- Bangkok Post, 1992., 5 July : 8. Chemical Dispersants may not Suit Chao Phya.
- Cooper, D. G., Macdonald, Duff, S. J. and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 42 (3): 408 - 412.
- Fatimah. 2007. Uji Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas* sp. pada Substrat yang Berbeda. *Berk. Penel. Hayati*: 12 (181-185).
- Feliatra. 2002. Implementasi dan Pengembangan Bioteknologi Kelautan Dalam Upaya Optimalisasi

Pemanfaatan Laut Indonesia. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau, 5 November 2002. Pekanbaru.

Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: Moving to Wards Industrial Application. Tib. Tech. Vol. 10. pp. 208-217.

Green, J. and Trett, M.W. 1989. The Fate and Effects of Oil in Freshwater. Elsevier Science Publisher LTD., New York

Jennings, E.M. and R.S. Tanner. 2000. Biosurfactant Producing Bacteria Found In Contaminated And Uncontaminated Soils. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research 299 University of Oklahoma

Kofli, N.T., Rahman, R.A., Hasbi, M., Kalil, S. 2000. Fermentation by *Bacillus macerans* Strain TS9-8 for Biosurfactant Production. Pure & Applied Chemical Journals. 1429-1437.

Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in Industry., Pure & Appl. Chem., Vol. 64. (11) : 1731 - 1737.

Kosaric, N. 1993. Biosurfactants : Production-Properties-Application. Mercel Dekker, Inc. New York.

Lin, S. C.et. al. 1994. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Application Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60, No. 1. pp. 31-38.

Murni, M.M.M. 1998. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria and Characterization of the Biosurfactant Produced by One of the Isolates. Ph.D. Thesis, Unoversiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Selangor

Surjadi, S. 2000. Otonomi Potensi Masa Depan Republik Indonesia. Centre For Polotical Studies. Penerbit Gramedia, Jakarta.

Tabatabaee A., Assadi M. M., Noohi A. A., Sajadian V. A, 2005, Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria From Oil Reservoirs, Iranian journal environmental health science eng. 2(1): 6-12

Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., McInerney, M.J., 2004.