

STUDI PERBANDINGAN BIOSURFAKTAN *Pseudomonas aeruginosa* IA7d DAN SURFAKTAN SINTETIK Tween-80 DALAM BIODEGRADASI SOLAR OLEH MIKROBA PERAIRAN PELABUHAN TANJUNG PERAK SURABAYA

Ni'matuzahroh*, Arif Yachya*, dan Mulyadi Tanjung**

* Laboratorium Biologi Lingkungan, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Airlangga

** Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga

ABSTRACT

This research aimed to know the influence of addition crude product *Pseudomonas aeruginosa* IA7d biosurfactant from substrate hexadecane and diesel fuel in supporting activity of diesel fuel biodegradation and both potent to replace synthetic surfactant for hydrocarbon remediation. Biodegradation test was done by experimental in laboratory scale by Tween-80 as synthetic surfactant comparator. Growth culture was from seawater of Tanjung Perak Harbor Surabaya include various microbe types in its. 2% (w/v) of diesel fuel and three surfactants test (0.70% w/v crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant from hexadecane substrate; 60.69% w/v crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant from diesel fuel substrate; and 0.10% w/v synthetic surfactant Tween-80) at uniform surface tension of surfactant solution (54.03 mN/m) were added into 30 ml seawater sample. Cultures were incubated at room temperature (30 °C) during 14 days with shaking (90 rpm). Result of biodegradation test showed the third addition of surfactants test had an effect on acceleration of diesel fuel biodegradation activity that proved at the increased of microbial count (bacterium, yeast, and mould) and decreased of diesel fuel concentration was shown by chromatograms area of diesel fuel. Highest degradation was successively reached by culture got crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant from diesel fuel substrate (88.034%), crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant from hexadecane substrate (80.908%), synthetic surfactant Tween-80 (54.732%), and control that was without addition surfactant test (0.132%). Base on number of microbial count, percentage of decreasing chromatogram peaks of diesel fuel from each surfactant test, and price substrate produce (diesel fuel and hexadecane) among both crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant, known that the crude product *P. aeruginosa* IA7d biosurfactant from diesel fuel substrate had highest ability acceleration to biodegradation activity on diesel fuel and had a potency to replace synthetic surfactant for remediation hydrocarbon application in environment.

Key words: biodegradation, crude product of biosurfactant, diesel fuel, microbe, *Pseudomonas aeruginosa* IA7d, synthetic surfactant, Tanjung Perak Harbor Surabaya, Tween-80

PENGANTAR

Pengendalian pencemaran limbah petroleum di lingkungan selama ini banyak menggunakan surfaktan sintetis. Penggunaan surfaktan sintetis secara luas dan berkepanjangan akan membebani lingkungan karena derivatnya dapat membentuk polutan baru. Saat ini, ketertarikan terhadap biosurfaktan (surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme) semakin meningkat karena biosurfaktan dapat digunakan dalam memacu biodegradasi minyak (Santos *et al.*, 1984), serta mempunyai toksisitas rendah dan *biodegradable* (Matsudah *et al.*, 2001). Hasil eksplorasi bakteri penghasil biosurfaktan dari Perairan Kali Donan Cilacap, Jawa Tengah berhasil mendapatkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* IA7d yang dapat menghasilkan biosurfaktan pada substrat heksadekana dan solar. Produk biosurfaktan dari substrat yang berbeda tersebut memiliki karakteristik yang berbeda (Ni'matuzahroh *et al.*, 2003). Kedua jenis biosurfaktan

tersebut diduga memiliki kemampuan yang berbeda dalam mengakselerasi aktivitas biodegradasi hidrokarbon karena aktivitas biosurfaktan bergantung pada substrat yang digunakan dalam pertumbuhan atau produksi biosurfaktan (Vipulanandan, 1996).

Dalam penelitian ini, efektivitas kedua produk biosurfaktan dalam meningkatkan biodegradasi hidrokarbon diungkap dengan membandingkan pengaruh penambahan biosurfaktan terhadap aktivitas biodegradasi hidrokarbon dan respons pertumbuhan mikroba (bakteri, khamir atau yeast, dan kapang) akibat penambahan biosurfaktan. Surfaktan sintetis pembanding yang digunakan adalah Tween-80, karena telah diketahui pada konsentrasi di bawah, sama, dan di atas nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC)-nya mempunyai efek peningkatan dan penghambatan aktivitas degradasi hidrokarbon oleh mikroba indigenus.

Solar digunakan sebagai hidrokarbon uji karena selain merupakan salah satu jenis hidrokarbon pencemar di lingkungan, informasi mengenai biodegradasi solar

secara aerobik juga masih belum lengkap dibandingkan dengan senyawa hidrokarbon lainnya (benzena, toluena, etil benzena, dan xylene) (Di Lecce *et al.*, 1997). Pengaruh penambahan biosurfaktan terhadap biodegradasi solar akan dapat menambah informasi kajian biodegradasi solar. Sampel air laut dari perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya dengan berbagai jenis mikroorganisme di dalamnya digunakan sebagai media pertumbuhan dan sumber mikroba pendegradasinya dengan tujuan di samping untuk mengungkap potensi mikroba indigenus di perairan dalam upaya purifikasi juga untuk mengungkap prospek aplikasi biosurfaktan tersebut dalam upaya bioremediasi pencemaran hidrokarbon di lingkungan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bakteri *P. aeruginosa* IA7d (koleksi Laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Airlangga Surabaya); minyak solar yang diperoleh dari salah satu SPBU PERTAMINA; heksadekana (Merck); *Nutrien Agar* (Merck); *Potato Dextrose Agar* (Merck); *Nutrien Broth* (Merck); garam mineral; kloramfenikol; griseofulvin, etil asetat (Merck); n-heksana (Merck); n-heksadekana (Merck); dan sampel air laut perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya.

Cara Kerja

Cara kerja terdiri atas beberapa tahapan sebagai berikut.

Produksi dan isolasi biosurfaktan

Suspensi bakteri *P. aeruginosa* IA7d dengan nilai *optical density* (OD 610 nm) = 0,5 diinokulasikan sebanyak 2% (v/v) ke dalam medium air laut sintesis (modifikasi Pruthi dan Cameotra (1997) yang tersusun dari: NaCl (10 g), KH_2PO_4 (2 g), K_2HPO_4 (5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,604 mg), CaCl_2 (0,01 g), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,001 g), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g), $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,005 g), H_3BO_3 (0,001 g), Na_2MoO_4 (0,001 g) per liter air destilasi. 2% (w/v) heksadekana dan solar ditambahkan secara terpisah ke dalam kultur sebagai sumber karbon. Kultur bakteri diinkubasi pada shaker inkubator dengan agitasi 90 rpm, suhu 30 °C selama 30 hari. Biosurfaktan dihasilkan oleh bakteri secara ekstraseluler. Supernatan yang mengandung biosurfaktan dipisahkan dari sel bakteri dengan cara sentrifugasi kultur dengan kecepatan 6000 rpm selama 25 menit. Masing-masing supernatan dari kultur yang berbeda diekstraksi menggunakan etil asetat (perbandingan 1:1), dievaporasi dan diliofilisasi sehingga

diperoleh produk kasar biosurfaktan *P. aeruginosa* IA7d dari substrat heksadekana (biosurfaktan tipe 1) dan substrat solar (biosurfaktan tipe 2) yang akan digunakan dalam tahap uji selanjutnya.

Uji biodegradasi

Perlakuan yang diberikan dalam tahapan uji biodegradasi adalah sebagai berikut. BHS_h14 (30 ml sampel air laut yang tidak disterilisasi ditambah dengan 0,70% w/v biosurfaktan tipe 1 dan 2% w/v solar); BSS_h14 (30 ml sampel air laut yang tidak disterilisasi ditambah dengan 60,69% w/v biosurfaktan tipe 2 dan 2% w/v solar); Tw80S_h14 (30 ml sampel air laut yang tidak disterilisasi ditambah 0,10% w/v surfaktan sintetik *Tween-80* dan 2% w/v solar); ALS_h14 (30 ml sampel air laut yang tidak disterilisasi ditambah dengan 2% w/v solar sebagai kontrol untuk mengetahui pengaruh penambahan surfaktan uji; ALS auto_h14 (30 ml sampel air laut yang disterilisasi dengan autoklaf ditambah dengan 2% w/v solar) sebagai kontrol untuk mengetahui terjadi-tidaknya aktivitas biodegradasi solar. Konsentrasi biosurfaktan tipe 1, 2, dan surfaktan *Tween-80* yang ditambahkan ke dalam kultur uji biodegradasi dibuat seragam yaitu mencapai nilai tegangan permukaan sebesar 54,03 mN/m. Masing-masing kultur uji diinkubasi selama 14 hari dalam *shaker incubator* (90 rpm, 30 °C). Setelah 14 hari inkubasi, populasi mikroba (bakteri, yeast, dan kapang) dideteksi dengan penghitungan TPC (*Total Plate Count*) menggunakan metode *pour plate*. Sedangkan hidrokarbon yang terdegradasi diukur dengan mengekstrak hidrokarbon dari kultur uji dengan pelarut n-heksana (perbandingan 1 : 2). Kadar heksadekana dan solar residu dianalisis dengan kromatografi gas (GC-Hawlett Packard 5890 seri II kolom HP-5 detektor FID). Data jumlah koloni hasil penghitungan dianalisis secara statistik dengan uji ANOVA satu arah menggunakan program statistik SPSS versi 10.0, dilanjutkan uji BNT menggunakan uji Duncan dengan taraf signifikansi 5% untuk membandingkan rata-rata jumlah mikroba pada masing-masing perlakuan. Data persentase penurunan luas area kromatogram peak-peak utama solar residu setelah diinjek di kromatografi gas dianalisis secara deskriptif.

HASIL

Hasil uji ANOVA satu arah dari jumlah rata-rata koloni bakteri, yeast, dan kapang menunjukkan probabilitas lebih kecil dari 5%. Hal ini berarti jumlah rata-rata koloni bakteri, yeast, dan kapang pada hari ke-0 (h0) dan kedelapan kelompok perlakuan uji biodegradasi hari ke-14 (h14) berbeda nyata. Sedangkan untuk mengetahui kelompok mana saja yang berbeda dan mana saja yang tidak berbeda,

Tabel 1. Jumlah koloni bakteri, yeast, dan kapang masing-masing kultur perlakuan uji biodegradasi pada hari ke-0 (h0) dan ke-14 (h14) inkubasi

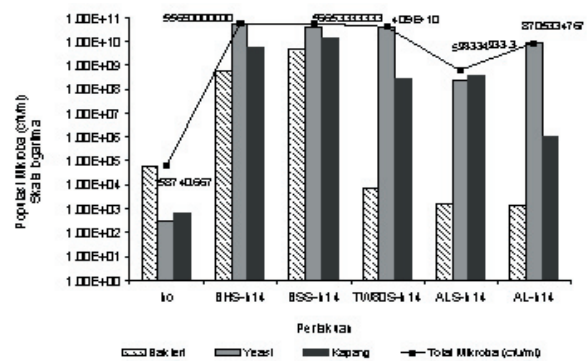
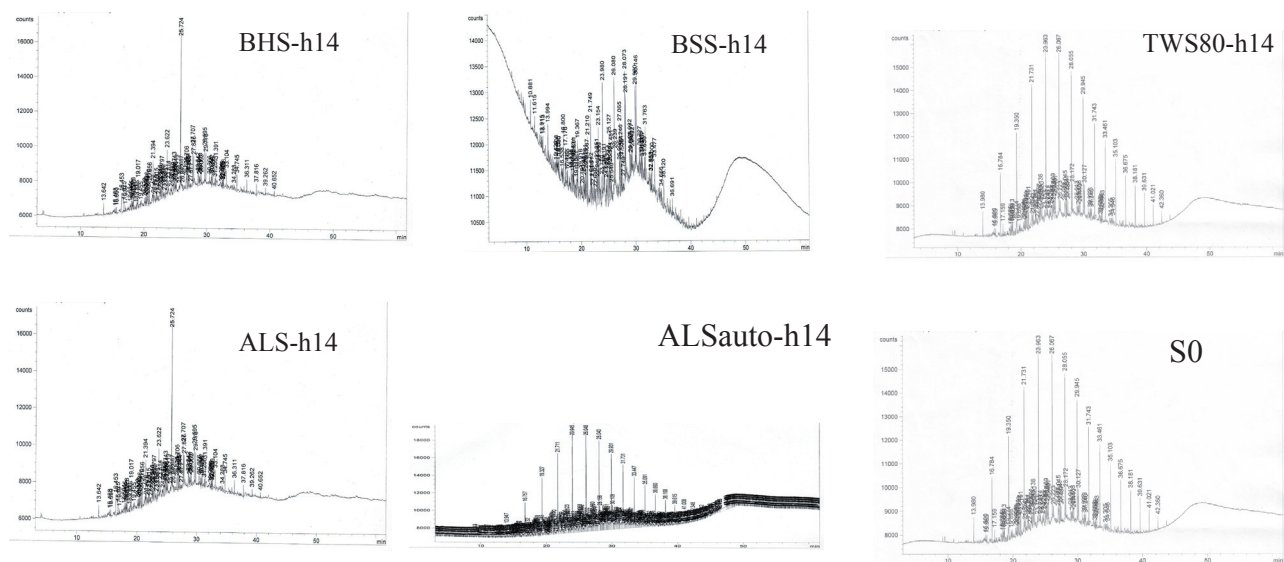
Waktu inkubasi	Perlakuan	Jumlah rata-rata koloni mikroba			Total koloni mikroba
		Bakteri	Yeast	Kapang	
Hari ke-0	H0	$5,78 \cdot 10^4$ b	$2,9 \cdot 10^2$ a	$6,17 \cdot 10^2$ a	$5,87 \cdot 10^4$
	BHS-h14	$5,67 \cdot 10^8$ c	$5,01 \cdot 10^{10}$ c	$5,04 \cdot 10^9$ d	$5,57 \cdot 10^{10}$
	BSS-h14	$4,67 \cdot 10^9$ d	$3,92 \cdot 10^{10}$ c	$1,28 \cdot 10^{10}$ d	$5,67 \cdot 10^{10}$
Hari ke-14	TW80S-h14	$6,40 \cdot 10^3$ a	$4,06 \cdot 10^{10}$ bc	$2,74 \cdot 10^8$ c	$4,09 \cdot 10^{10}$
	ALS-h14	$1,61 \cdot 10^3$ a	$2,48 \cdot 10^8$ b	$3,35 \cdot 10^7$ c	$5,98 \cdot 10^8$
	AL-h14	$1,43 \cdot 10^3$ a	$8,70 \cdot 10^9$ bc	$1,00 \cdot 10^6$ b	$8,71 \cdot 10^9$

Keterangan:

Jumlah rata-rata koloni mikroba yang diikuti superskrip berbeda dalam satu kolom, berbeda nyata pada taraf signifikansi 5%.

h0: Sampel air laut perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya pada hari ke-0.

maka dilakukan uji perbandingan menggunakan uji Duncan dengan taraf signifikansi 5%. Hasil uji Duncan jumlah total bakteri, yeast, dan kapang pada perlakuan hari ke-0 (h0) dan kedelapan perlakuan hari ke-14 (h14) uji biodegradasi ditampilkan pada Tabel 1 dan divisualisasikan ke dalam bentuk grafik pada Gambar 1.

**Gambar 1.** Grafik Jumlah koloni bakteri, yeast, dan kapang masing-masing kultur perlakuan uji biodegradasi pada hari ke-0 (h0) dan ke-14 (h14) inkubasi.**Gambar 2.** Profil kromatogram hasil analisis GC uji biodegradasi hari ke-14 perlakuan: BHS_h14, BSS_h14, TW80S_h14, ALS_h14, dan ALSauto_h14 serta S0 (2% w/v solar dalam 50 ml n-heksana) sebagai standar profil kromatogram solar.

Tabel 2. Persentase luas area kromatogram peak-peak utama solar yang terdegradasi pada beberapa perlakuan selama 14 hasil inkubasi hasil analisis dengan GC

Perlakuan	Peak terdegradasi (%)
BHS_h14	80.908
BSS_h14	88.034
TW 80S_h14	54.732
ALS_h14	0.132
ALSauto_h14	0*

Keterangan: * nilai luas area kromatogram peak-peak utama solar yang dijadikan pembanding luas area kromatogram peak-peak utama solar yang terdegradasi pada perlakuan BHS_h14, BSS_h14, TW80S_h14, dan ALS_h14.

PEMBAHASAN

Hasil penghitungan jumlah total mikroba mengindikasikan bahwa penambahan ketiga surfaktan uji berpengaruh terhadap biodegradasi solar. Pengaruh tersebut ditunjukkan dengan meningkat dan berbedanya populasi mikroba (bakteri, yeast, dan kapang) perlakuan BHS_h14; BSS_h14; TW80S_h14 dibanding kontrol (ALS_h14) (Tabel 1) setelah 14 hari inkubasi. Respons atau pengaruh yang diberikan terhadap proses degradasi diketahui dengan jelas melalui hasil analisis GC pada masing-masing perlakuan. Hasil analisis GC kelima perlakuan menunjukkan penambahan ketiga surfaktan uji menghasilkan respons berupa peningkatan aktivitas degradasi solar. Respons tersebut dapat diamati dari profil kromatogram solar kelima perlakuan (Gambar 2) dan nilai persentase kromatogram peak-peak utama solar yang terdegradasi (hasil analisis GC) perlakuan BHS_h14; BSS_h14; TW80S_h14 dibanding kontrol (ALS_h14) (Tabel 2). Pemilihan kromatogram peak-peak utama solar dalam analisis biodegradasi solar bertujuan untuk mempermudah analisis solar, mengingat kompleksnya kandungan senyawa hidrokarbon dalam solar (Marchal *et al.* 2003).

Kemampuan biosurfaktan tipe 1 dan 2 dalam mengakselerasi aktivitas biodegradasi solar dibanding surfaktan sintetik *Tween-80* dapat disebabkan oleh beberapa hal berikut ini. (1) Rendahnya toksisitas kedua produk kasar biosurfaktan bakteri *P. aeruginosa* IA7d dibanding surfaktan sintetik *Tween-80*. Contoh, hasil penelitian Poremba *et al.* (1991) yang menunjukkan toksisitas *rhamnolipid* murni sepuluh kali lebih rendah dari surfaktan nonionik Corexit (LC 50 = 5 ppm). (2) Tingginya kesesuaian kedua produk kasar biosurfaktan bakteri *P. aeruginosa* IA7d dibanding surfaktan sintetik *Tween-80*, terutama pada bakteri sebagai mikroorganisme pendegradasi utama hidrokarbon di lingkungan. Hal tersebut ditunjang oleh

data kelimpahan bakteri Gram negatif *P. aeruginosa* yang tinggi di perairan pelabuhan Tanjung Perak Surabaya (Ni'matuzahroh, 2002) dan hasil penghitungan mikroba pada hari terakhir inkubasi (hari ke-14). Kesesuaian yang tinggi tersebut dapat disebabkan oleh adanya hubungan yang spesifik antara kedua produk kasar biosurfaktan bakteri *P. aeruginosa* IA7d dengan bakteri penghasilnya (spesies *P. aeruginosa*). Adanya hubungan yang spesifik ini dilaporkan dalam penelitian Noordman dan Janssen (2002), bahwa biodegradasi heksadekana oleh bakteri *P. aeruginosa* UG2 hanya terakselerasi dengan penambahan biosurfaktannya (*rhamnolipid*) sendiri. Hubungan tersebut tidak diketahui untuk bakteri yang lain beserta biosurfaktan yang dihasilkannya. Itoh dan Suzuki (1972) dan Nakahara *et al.* (1981) juga melaporkan pada biodegradasi heksadekana oleh organisme penghasil biosurfaktan *rhamnolipid*, stimulasi terbesar dalam biodegradasi disebabkan oleh penambahan *rhamnolipid* dibanding biosurfaktan atau surfaktan sintetik lainnya; (3) Tingginya konsentrasi surfaktan sintetik *Tween-80* yang ditambahkan untuk mencapai kondisi tegangan permukaan yang seragam (54,03 mN/m), yaitu sebesar 0,10% (w/v). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi di atas nilai *Critical Micelle Concentration* (CMC) surfaktan sintetik *Tween-80* (0,002% w/v). Menurut Guerin dan Jones (1988), penggunaan surfaktan sintetik *Tween-80* pada konsentrasi 0,10 g/L atau 0,01% (w/v) pada suatu uji biodegradasi akan menghasilkan efek stimulasi pertumbuhan dan biodegradasi hidrokarbon yang nyata. Tingginya konsentrasi surfaktan sintetik *Tween* (0,10% w/v) yang digunakan dalam penelitian ini mengakibatkan rendahnya kesesuaian surfaktan sintetik *Tween-80* terhadap bakteri, yeast, dan kapang yang diduga disebabkan menyatunya komponen surfaktan (*Tween-80*) ke dalam material lipid sel, sehingga terjadi penghambatan dalam mengakselerasi aktivitas biodegradasi seperti yang dijelaskan oleh Lupton dan Marshall (1979) terutama pada bakteri Gram positif yang juga mendominasi mikroba perairan Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya.

Tingginya nilai persentase penurunan luas area kromatogram peak-peak utama solar yang terbiodegradasi pada kultur yang mendapat perlakuan penambahan biosurfaktan tipe 1 (BSS_h14) dibandingkan kultur yang mendapat perlakuan penambahan biosurfaktan tipe 2 (BHS_h14) dapat disebabkan oleh: perbedaan *bioavailability* (keadaan siap digunakan) di antara keduanya terhadap mikroba pendegradasi dan lebih besarnya konsentrasi produk kasar biosurfaktan tipe 1 yang ditambahkan untuk mencapai nilai keseragaman tegangan permukaan larutan surfaktan uji (54,03 mN/m) dan konsentrasi tersebut adalah nilai CMC-nya.

Perbedaan *bioavailability* dan nilai konsentrasi yang ditambahkan di antara keduanya pada akhirnya memengaruhi kinerja keduanya dalam mendukung aktivitas biodegradasi solar. Menurut Vipulanandan (1996 – *last update*), kinerja biosurfaktan tergantung pada substrat organik yang digunakan dalam produksi, sehingga secara tidak langsung kesesuaian biosurfaktan dipengaruhi oleh substrat yang digunakan. Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian Falatko dan Novak (1992), bahwa produk biosurfaktan yang dihasilkan dari substrat gabungan glukosa dan minyak sayur yang diketahui memiliki efektivitas yang sama dalam melarutkan senyawa komponen bensin (toluena, m-xylene, trimetilbenzena, dan naftalena) dengan produk biosurfaktan yang dihasilkan dari substrat bensin. Akan tetapi produk biosurfaktan yang dihasilkan dari substrat gabungan glukosa dan minyak sayur dilaporkan menghambat aktivitas biodegradasi senyawa yang sama dalam uji kelarutan menggunakan mikroba pendegradasi bensin. Sedangkan pada produk biosurfaktan dari substrat bensin dilaporkan tidak terjadi penghambatan aktivitas biodegradasi.

Berdasarkan hasil penelitian Falatko dan Novak (1992), mengindikasikan bahwa biosurfaktan tipe 2 (produk kasar biosurfaktan bakteri *P. aeruginosa* IA7d yang dihasilkan dari substrat solar) mempunyai kesesuaian yang tinggi dibanding biosurfaktan tipe 1 (produk kasar biosurfaktan bakteri *P. aeruginosa* IA7d yang dihasilkan dari substrat heksadekana) dalam menunjang aktivitas biodegradasi solar, sehingga nilai persentase penurunan luas area kromatogram peak-peak utama solar pada perlakuan yang ditambah dengan biosurfaktan tipe 2 (BSS_h14) lebih tinggi dibanding perlakuan yang ditambah biosurfaktan tipe 1 (BHS_h14). Mekanisme di balik terjadinya peningkatan atau penghambatan surfaktan terhadap mikroorganisme pendegradasi senyawa organik menurut Rouse *et al.* (1994) masih belum jelas dan pada umumnya menurut Kosaric *et al.* (1987) kehadiran biosurfaktan diketahui berhubungan dengan emulsifikasi substrat hidrofob (tidak larut air) sehingga meningkatkan kontak sel mikroba dengan substrat. Tetapi peningkatan aktivitas biodegradasi juga bergantung pada jenis bakteri pendegradasi Rouse *et al.* (1994).

Informasi lain yang dapat diperoleh dari Gambar 2 selain nilai persentase kromatogram peak-peak utama solar yang terdegradasi adalah adanya kecenderungan mikroba untuk mendegradasi lebih dahulu polutan hidrokarbon asal sampel air laut perairan Pelabuhan Tanjung Perak dibanding komponen hidrokarbon solar uji. Keberadaan profil kromatogram polutan hidrokarbon asal sampel

air laut (P) dapat diketahui dengan membandingkan profil kromatogram standar solar (SO) dengan profil kromatogram perlakuan ALS auto_h14. Sedangkan adanya kecenderungan tersebut, diketahui dengan mengamati dan membandingkan profil kromatogram perlakuan BHS_h14, BSS_h14, TW80S_h14, dan ALS_h14 dengan ALS auto_h14. Kecenderungan tersebut disebabkan mudahnya pengaksesan polutan hidrokarbon asal sampel air laut ke dalam sel, karena sudah dalam bentuk terlarut terlebih lagi dengan adanya kehadiran ketiga surfaktan uji, karena menurut Angelova dan Schmauder (1999) rendahnya kelarutan beberapa senyawa hidrofobik dapat membatasi kecepatan biodegradasi di lingkungan perairan atau tanah.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian surfaktan dapat memberikan pengaruh yang berbeda pada degradasi solar oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* IA7D. Biosurfaktan *Pseudomonas aeruginosa* IA7d dapat lebih meningkatkan biodegradasi solar dibandingkan surfaktan *Tween 80*. Kesesuaian biosurfaktan dengan mikroorganisme pendegradasi serta konsentrasi biosurfaktan menentukan tingginya degradasi solar oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* IA7d.

KEPUSTAKAAN

- Angelova B dan Schmauder HP, 1999. "Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems", *Journal. Biotechnol.* no. 67, pp. 3–32.
- Di Lecce C, Accarino M, Bolognese F, Galli E, dan Barbieri P, 1997. Isolation and metabolic characterization of a *Pseudomonas stutzeri* mutant able to grow on three isomers of xylene. *Microbiol.* 63: 3279–3281.
- Guerin WF dan Jones GE, 1988. "Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp.," *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 937.
- Haferburg D, Hommel R, Claus R, dan Kleber H, 1986. "Extracellular microbial lipids as biosurfactants", *adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 33: 53.
- Falatko MD dan Novak TJ, 1992. "Effect of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons", *Water Environment Research*, 64(2): 163–169.
- Itoh S dan Suzuki T, 1972. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin utilizing ability. *Agri. Biol. Chem.* 36: 2233–2235.
- Kosaric N, 1987. *Biotechnology and surfactant industry in Biosurfactant and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lupton FS dan Marshall KC, 1979. "Effectiveness of surfactants in the microbial degradation of oil". *Geomicrobiol. Journal*, 1: 235.

- Matsudah H, Liyama T, Miura O, dan Higuchi Y, 2001. "R & D on Technology for Production and Use of Highly Active Microorganism Surfactant for Treatment of Oil Pollution", *Petroleum Energy Centre*, 2001. M3. 1.6.
- Marchal R, Penet S, Solano-Serena FS, dan Vandecasteele JP, 2003. Gasoline and Diesel oil Biodegradation, *Oil & Gas Science and Technology Rev. IFP*, 58(4): 441–448.
- Nakahara T, Hisatsuka K, dan Minoda Y, 1981. Effect of hydrocarbon emulsification on growth and respiration of microorganisms in hydrocarbon media. *Journal. Fermentation. Technol.* 59: 415–318.
- Noordman WH dan Janssen DB, 2002. Rhamnolipid stimulates uptake of Hydrophobic Compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 68(9): 4502–4508.
- Poremba K, Gunkel W, Lang S, dan Wagner FZ, 1991). *Naturforsch.* 36: 210–216.
- Pruthy V dan Chameotra SS, 1997. Rapid Identification of Biosurfactant Producing Bacterial Strain Using a Cell Surface Hydrophobic Technique. *Biotechnology Technique.* 11(9): 671–674.
- Rouse JD, Sabatini DA, Suflita JM, dan Harewell JH. (1994). Influence of Surfactants on Microbial Degradation of Organic Compounds. *Critical Review in Environmental Science and Technology*, 24(4): 325–370.
- Santos GL, Kappeli O, dan Fietchter A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant producing in continuous culture with glucose carbon source, *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2): 301–305.
- Vipulanandan C, (1996–last update). Pollution Prevention by Bioconversion of Industrial Waste Materials to Biosurfactants". (*Environmental Institute of Houston University of Houston-Clear Lake*). Tersedia dalam: <http://www.eih.uh.edu/> (Akses: 2003, Mei 11).