

**BIODEGRADASI SENYAWA-SENYAWA HIDROKARBON
DALAM MINYAK BUMI OLEH ISOLAT-ISOLAT
Pseudomonas spp. DARI LINGKUNGAN TERCEMAR
(Biodegradation of Hydrocarbon Compounds of Petroleum
by *Pseudomonas* spp. Isolates from Polluted Environment).**

Erni Martani dan Jutono *)

Ringkasan

Tiga isolat *Pseudomonas* spp. diteliti kemampuannya dalam menguraikan fraksi-fraksi hidrokarbon yang terdapat dalam 3 produk minyak bumi, yaitu solar, kerosin dan bensin. Ketiga isolat *Pseudomonas* spp. diperoleh dari air laut daerah pengapalan minyak di Cilacap, suatu daerah yang mengalami pencemaran minyak secara khronis. Susunan fraksi hidrokarbon, sebelum dan sesudah masa inkubasi (masing-masing isolat *Pseudomonas* spp.) dalam medium cair Bushnell-Hass yang mengandung solar, kerosin dan bensin (secara terpisah) sebagai satu-satunya sumber karbon, ditetapkan dengan metode khromatografi kolom. Inkubasi dilakukan secara aerob di atas shaker. Ada tiga fraksi yang dapat dipisahkan yaitu fraksi hidrokarbon parafin, aromatik dan asphaltik.

Selama proses biodegradasi berlangsung telah diamati pula pembebasan CO₂ dan penggunaan O₂. Jumlah CO₂ yang terbentuk ditetapkan dengan metode titrasi Winkler, sedang penggunaan O₂ diukur dengan mengukur BOD nya.

Peningkatan jumlah sel *Pseudomonas* spp. dalam masing-masing kultur diamati setiap dua hari sekali selama masa inkubasi. Jumlah sel ditetapkan dengan sentrifugasi kultur dan kadar sel selanjutnya ditetapkan dengan diukur "optical density" nya pada panjang gelombang 680 nm.

Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ada perbedaan pola biodegradasi fraksi-fraksi hidrokarbon yang terdapat dalam ketiga produk minyak bumi yang diteliti (oleh masing-masing isolat *Pseudomonas* spp.) Proses-proses non biologis juga berpengaruh terhadap berkurangnya jumlah hidrokarbon yang berada dalam medium (lingkungan).

Penggunaan O₂ yang berasal dari lingkungan dan pembebasan CO₂ ke lingkungan (medium) yang mengandung minyak bumi oleh isolat-isolat *Pseudomonas* spp. menjelaskan pula hal-hal yang tidak menguntungkan bagi pertumbuhan dan perkembangan akar tanaman pada lingkungan tercemar.

Abstract

Three *Pseudomonas* spp. isolates were examined for their ability to degrade hydrocarbon fractions of 3 petroleum products, i.e. diesel oil, kerosene and gasoline. The three *Pseudomonas* spp. isolates were obtained from sea water in oil shipping region in Cilacap. It is a chronic oil polluted environment.

Each *Pseudomonas* spp. isolates were cultivated aerobically in Bushnell-Hass medium which contains diesel oil, kerosene or gasoline as the sole Carbon source. Composition of hydrocarbon fractions before and after incubation of the culture were detected by column chromatography method. Three fractions could be separated, i.e. paraffinic, aromatic and asphaltic hydrocarbon fractions.

The CO₂ production and O₂ uptake during the biodegradation process were examined. The total CO₂ production was determined by Winkler titration method, and O₂ uptake was measured with BOD.

Petroleum addition could enhance the cell number of each *Pseudomonas* spp. isolates, which were examined every 2 days during incubation period of 14 days. The cell number was measured by centrifugation of the culture and

*) Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

the optical density was then measured at 680 nm.

From this investigation it could be concluded that there were differences in the pattern of the biodegradation of hydrocarbon fractions of the three petroleum product by each *Pseudomonas* spp. isolates. Nonbiological processes play also an important role in the degradation of hydrocarbon of the petroleum products.

The O₂ uptake from the environment and the CO₂ release to their environment by *Pseudomonas* spp. isolates could also explain the negative effects on the growth and development of root crops in polluted environment.

Pendahuluan

Pertumbuhan dan perkembangan tanaman sangat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan dan keharmonisan di daerah risosfernya, misalnya kandungan O₂ dan CO₂ serta ketersediaan unsur hara (1). Raymond et al (1976) dalam penelitiannya membuktikan bahwa penurunan kadar O₂ dan peningkatan CO₂ di daerah risosfer akan menimbulkan gangguan terhadap pertumbuhan tanaman (14). Di dalam perombakan hidrokarbon akan terjadi pembebasan CO₂ (yang merupakan hasil akhirnya), dan sebagian besar dari proses biodegradasinya memerlukan O₂ (10, 18).

Minyak bumi terdiri dari berbagai senyawa, dan penyusun utamanya adalah senyawa hidrokarbon. Kepada minyak mentah maupun beberapa jenis destilatnya (minyak bumi) sering ditambahkan logam-logam berat tertentu seperti Zn, Pb, Sn, dan Hg yang berfungsi sebagai biosida (6, 12, 14).

Penelitian yang telah dilakukan oleh para peneliti terdahulu membuktikan bahwa bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki kemampuan besar dalam merombak hidrokarbon minyak bumi. Bakteri-bakteri ini menggunakan hidrokarbon sebagai sumber energi dan sumber karbonnya (4, 6, 7, 16, 18). Beberapa jenis *Pseudomonas* yang aktif dalam perombakan hidrokarbon adalah : *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. halocrenae*, *P. pyocaneae*, *P. oleovarans* dan *P. stutzeri*. Bakteri-bakteri tersebut dapat ditemukan dalam tanah, air tawar, air laut, di udara, di sampah maupun di lingkungan tercemar lainnya (5). Berdasar hal-hal di atas peneliti menentukan untuk menggunakan bakteri *Pseudomonas* sebagai subyek dalam penelitian perombakan beberapa jenis minyak bumi.

Perombakan minyak bumi oleh *Pseudomonas* sp. dipengaruhi oleh beberapa faktor. Di samping faktor lingkungan, sifat fisik dan kimiawi hidrokarbon penyusun minyak bumi juga berpengaruh, yaitu panjang dan bentuk rantai hidrokarbon dan ada tidaknya zat penghambat di dalamnya (4, 12, 13). Maka tiap jenis minyak bumi mempunyai kemungkinan untuk mengalami pola perombakan yang berbeda.

Bahan dan Cara Analisis

Kultur *Pseudomonas* spp. : Kultur *Pseudomonas* spp. yang diteliti diperoleh dari isolasi dan seleksi strain *Pseudomonas* yang hidup dalam air laut yang telah tercemar minyak secara menahun (kronik), yaitu di daerah pengapalan minyak Cilacap, Jawa Tengah. Isolasi dan seleksi strain *Pseudomonas* ini dilakukan dengan "enrichment culture technique".

Penyediaan dan sterilisasi minyak bumi : Minyak bumi yang digunakan adalah solar, kerosin dan bensin yang diperoleh di pasaran bebas. Tiap jenis minyak bumi disterilkan dengan cara filtrasi menggunakan Seitz Filter (4).

Penentuan perombakan minyak bumi : Tingkat perombakan minyak bumi ditentukan berdasarkan perubahan susunan fraksi hidro karbonnya. Minyak bumi dipisahkan menjadi 3 fraksi hidrokarbon ialah fraksi hidrokarbon parafin, aromatik dan aspartik dengan khromatografi kolom dan dengan "elluent" heksana, benzena dan metil alkohol (4). Diameter kolom 2 cm. diisi dengan silica gel 60 (70 - 230 mesh, volum 60 ml.). Penentuan susunan fraksi hidrokarbon dilakukan sebelum dan sesudah masa inkubasi.

Mineralisasi minyak bumi : Mineralisasi minyak bumi ditentukan dengan mengukur gas CO_2 yang dibebaskan sebagai hasil akhir perombakan hidrokarbon minyak bumi secara sempurna (4, 18). Gas CO_2 yang dibebaskan ditangkap dengan larutan NaOH dan jumlah gas CO_2 tersebut diukur dengan menggunakan metode titrasi Winkler (2,8), setiap 2 hari sekali selama masa inkubasi 14 hari.

Penggunaan Oksigen : Kebutuhan O_2 selama proses perombakan minyak bumi ditetapkan berdasarkan Biological Oxygen Demand (BOD) setiap 2 Hari sekali (2, 10).

Pertumbuhan *Pseudomonas spp.* : Kultur ditumbuhkan dalam medium dasar Bushnell-Hass yang mengandung 1% (v/v) minyak bumi solar, kerosin atau bensin (secara terpisah) sebagai satu-satunya sumber karbon. Pertumbuhan ini berlangsung secara aerob di atas penggojok (shaker). Pengamatan dilakukan setiap 2 hari. Masa sel dipisahkan dari medium dengan metode sentrifugasi dan kemudian jumlah massa sel tersebut ditera dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm (4).

Susunan medium Bushnell-Hass tiap liter adalah sebagai berikut : $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,2 g; Ca Cl_2 0,02 g; KH_2PO_4 1,0 g; K_2HPO_4 1,0 g; $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ 1,0 g; FeCl_3 60% 2 tetes; pH diatur 7 - 7,2 (16).

Pseudomonas spp. ditumbuhkan di dalam labu Erlenmeyer volum 250 ml. dan volum kultur 100 ml. dengan ulangan sebanyak 3 buah.

Hasil dan Pembahasan

a. Isolat-isolat *Pseudomonas spp.*

Dari isolasi menggunakan "enrichment culture technique" solar, kerosin maupun bensin diperoleh 13 isolat *Pseudomonas*. Genus *Pseudomonas* tersebut dicirikan sebagai berikut : berbentuk batang dengan ukuran 0,5-0,8 x 1,0 - 2,0 nm, bersifat gram negatif; flagela lópotrik atau monotrik; sifat pertumbuhan aerob; mampu mengoksidasi glukosa tetapi inaktif dalam oksidasi laktosa; tidak membentuk indol dalam medium hidrolisat kasein; kebanyakan koloninya membentuk pigmen yang dapat menyebar ("diffusible pigment") berwarna kehijauan, kebiruan, kuning atau kemerahan (5).

Tiga belas isolat *Pseudomonas* tersebut di atas diuji kemampuannya dalam merombak hidrokarbon minyak bumi, kemudian dipilih tiga isolat unggul yaitu : isolat dengan kode SA₂, KA₆ dan BE₁.

b. Pertumbuhan *Pseudomonas* dalam substrat hidrokarbon.

Minyak bumi solar, bensin maupun kerosin yang ditambahkan ke dalam medium sebagai satu-satunya sumber karbon dapat meningkatkan jumlah sel *Pseudomonas*. Dalam grafik 1 ditunjukkan peningkatan jumlah sel isolat *Pseudomonas* dalam medium Bushnell-Hass yang mengandung minyak bumi. Dari grafik tersebut tampak bahwa peningkatan jumlah sel dalam medium solar dan kerosin lebih tinggi daripada dalam medium bensin. Dari ini dapat disimpulkan bahwa hidrokarbon penyusun solar dan kerosin lebih mudah digunakan sebagai substrat pertumbuhan *Pseudomonas* daripada bensin.

Hasil penelitian Raymond et al (1976) membuktikan adanya logam-logam Zn, B, Ni, Pb, Sn dan Fe di dalam 5 contoh minyak bumi; yang beberapa di antaranya dapat mempengaruhi pertumbuhan mikrobia (14). Analog dengan hasil penelitian tersebut dapat diduga bahwa dalam minyak bumi yang dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi ini terdapat logam-logam ataupun khemikalia tertentu yang ditambahkan dengan maksud untuk melindungi minyak bumi dari kerusakan yang disebabkan oleh aktifitas mikrobia (3).

c. Perubahan susunan fraksi hidrokarbon selama perombakan minyak bumi.

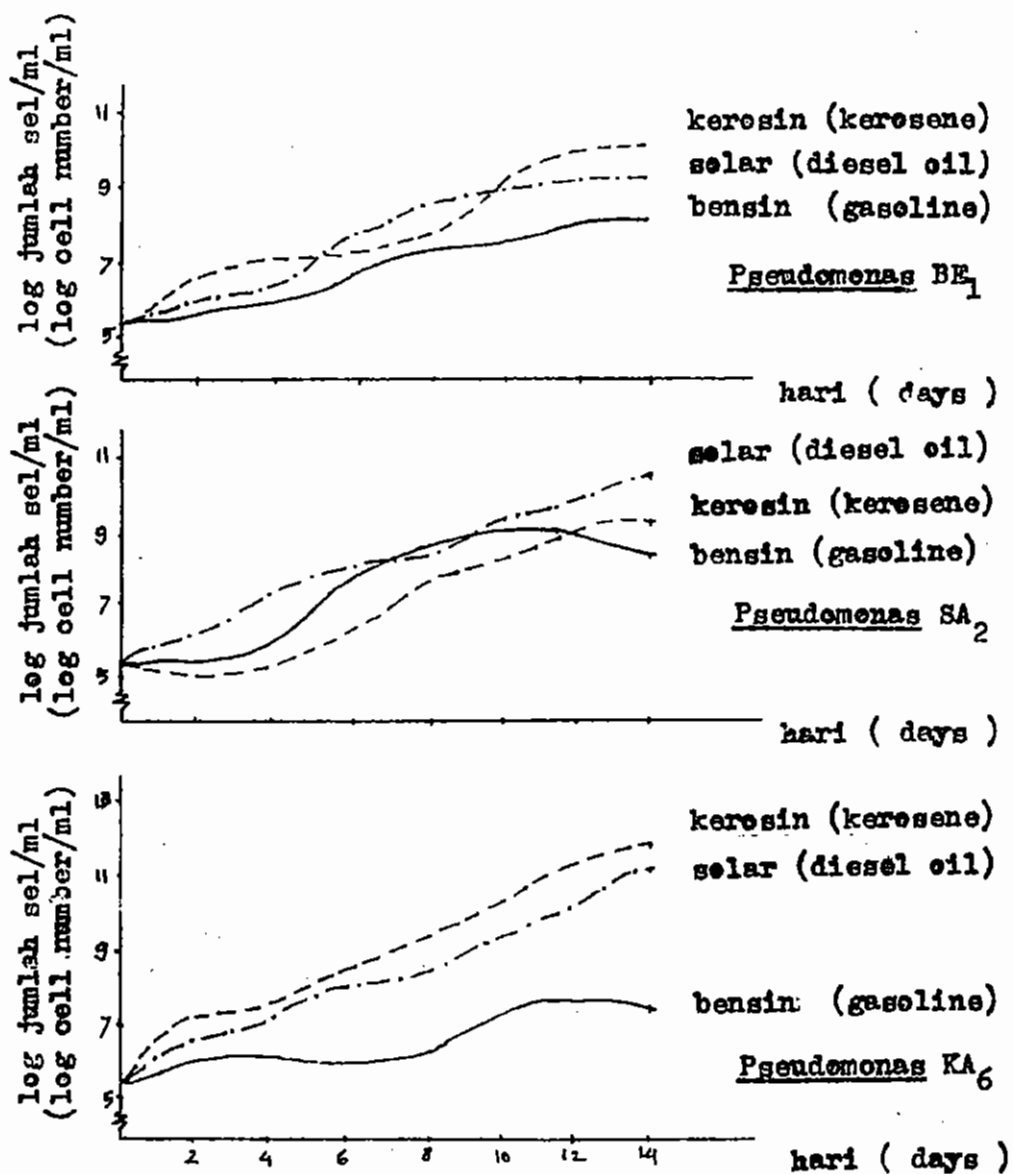
Pada grafik 2, 3, dan 4 dapat dilihat bahwa perombakan hidrokarbon tidak hanya dilakukan oleh mikrobia, tetapi juga terurai oleh proses nonbiologis. Misalnya oleh pengaruh suhu (penguapan) ataupun oleh karena ada bahan kimia tertentu dalam minyak bumi yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi-reduksi minyak bumi (antara lain Fe) (6, 14).

Perombakan minyak bumi oleh *Pseudomonas* spp. dipengaruhi oleh macam maupun perbandingan jumlah/berat fraksi hidrokarbon penyusun minyak bumi. Dalam minyak bumi solar *Pseudomonas* lebih mudah merombak fraksi aromatik daripada fraksi parafin maupun aspaltik. Tetapi di dalam kerosin, proses perombakan nonbiologis terhadap fraksi aspaltik lebih besar daripada fraksi lainnya. Sedang dalam minyak bumi bensin, isolat *Pseudomonas* tidak menunjukkan perbedaan yang menyolok dalam merombak ketiga jenis fraksi hidrokarbon.

Pada umumnya hidrokarbon fraksi aromatik secara nisbi tidak stabil terhadap reaksi-reaksi kimia (reaksi nonbiologis) dibandingkan dengan fraksi parafin dan naftena (15). Tetapi secara mikrobiologis, senyawa-senyawa alifatik, hidrokarbon tak jenuh, dan hidrokarbon berantai panjang & bercabang lebih tersedia untuk dirombak daripada senyawa-senyawa aromatik, hidrokarbon jenuh maupun hidrokarbon dengan rantai pendek serta berantai lurus (17).

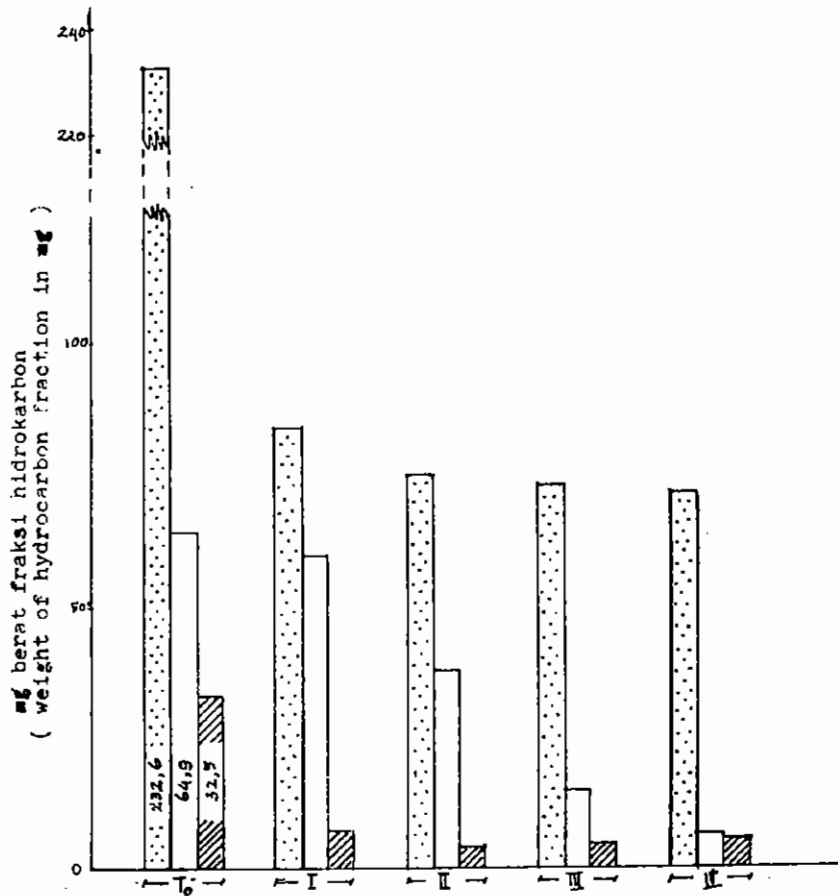
Pada grafik 4 dapat ditunjukkan bahwa tanpa pengaruh aktifitas mikrobia, bensin mengalami pengurangan jumlah terbesar selama masa inkubasi dibandingkan dengan solar dan kerosin. Hal ini disebabkan karena bensin bersifat sangat mudah menguap.

Setiap jenis isolat *Pseudomonas* spp. memiliki kemampuan yang berlainan dalam perombakan hidrokarbon minyak bumi. Dari beberapa kriteria yang diamati, secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa isolat *Pseudomonas* KA₆ mempunyai kemampuan tertinggi dalam merombak hidrokarbon minyak bumi solar, kerosin maupun bensin.






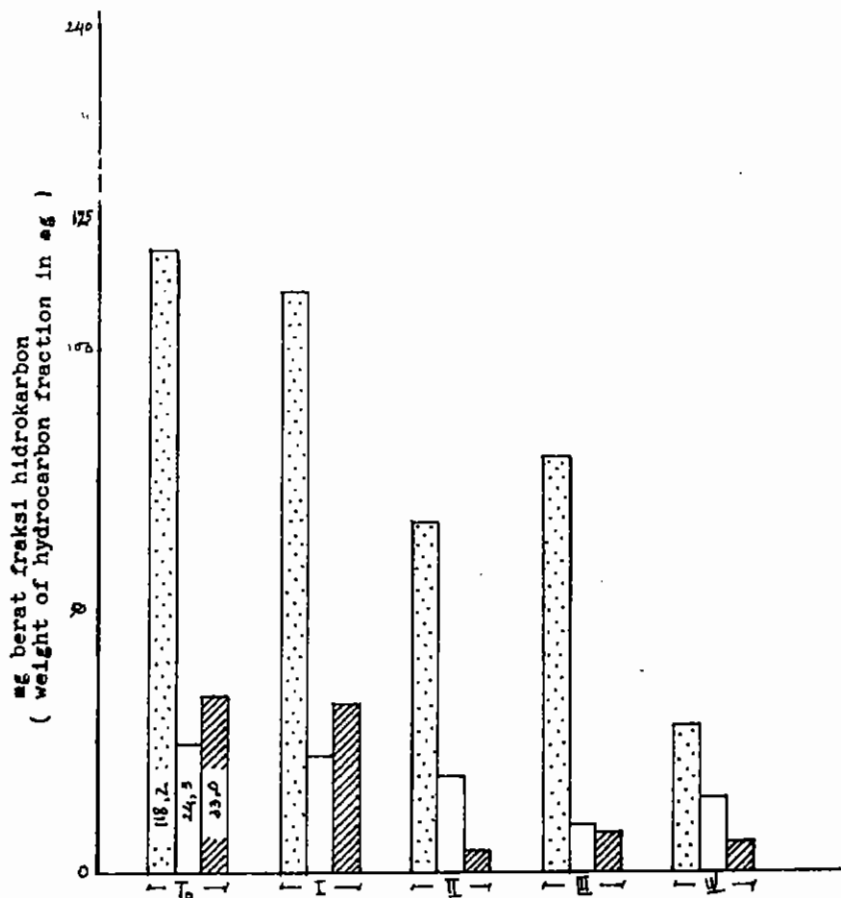
Grafik 1 : Pertumbuhan isolat-isolat *Pseudomonas* dalam solar, kerosin dan bensin selama 14 hari.

(Growth of *Pseudomonas* isolates in diesel oil, kerosene and gasoline during 14 days).






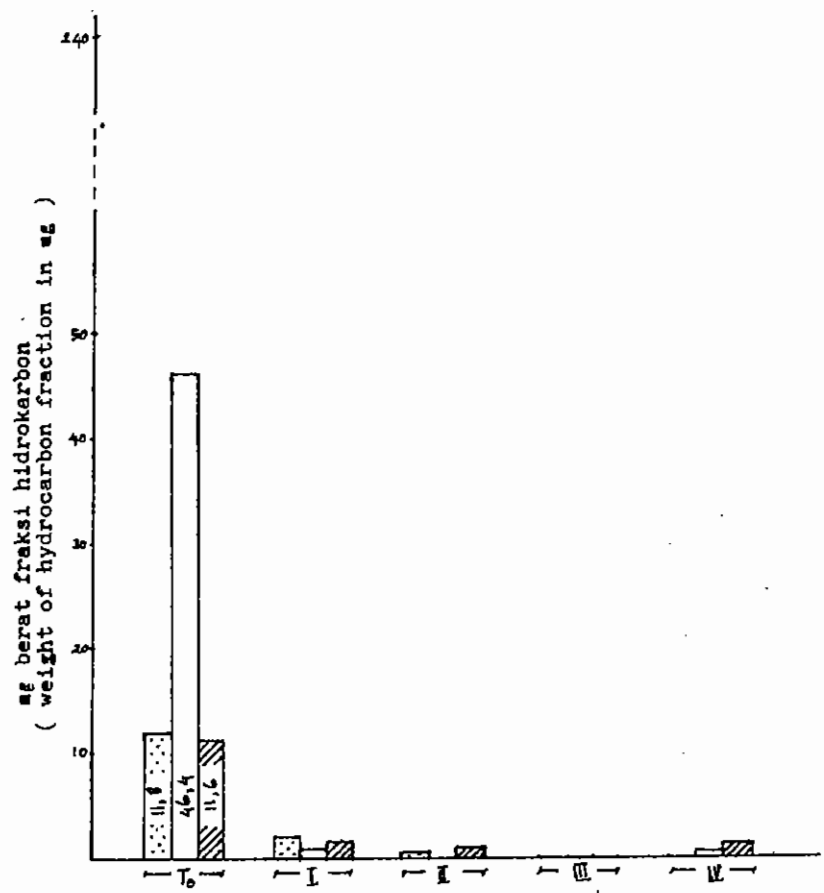
Grafik 2 : Sisa biodegradasi dan peruraian nonbiologis SOLAR setelah 14 hari. (Diesel oil residue produced by biodegradation and nonbiological dissociation after 14 days).

- Keterangan** :
- T₀ = fraksi hidrokarbon sebelum inokulasi (hydrocarbon fraction before inoculation).
 - I = sisa peruraian nonbiologis (nonbiological dissociation residue).
 - II = sisa biodegradasi oleh isolat BE₁ (biodegradation residue produced by BE₁ isolate).
 - III = sisa biodegradasi oleh isolat SA₂ (biodegradation residue produced by SA₂ isolate).
 - IV = sisa biodegradasi oleh isolat KA₆ (biodegradation residue produced by KA₆ isolate).
-  = fraksi hidrokarbon parafin (paraffinic hydr. fraction).
 -  = fraksi hidrokarbon aromatik (aromatic hydr. fraction).
 -  = fraksi hidrokarbon asfaltik (asphaltic hydr. fraction).



Grafik 3. Sisa biodegradasi dan peruraian non biologis KEROSENE setelah 14 hari (Kerosene residue produced by biodegradation and nonbiological dissociation after 14 days).

- Keterangan :**
- T₀ = fraksi hidrokarbon sebelum inokulasi (hydrocarbon fraction before inoculation).
 - I = sisa peruraian nonbiologis (nonbiological dissociation residue).
 - II = sisa biodegradasi oleh isolat BE₁ (biodegradation residue produced by BE₁ isolate).
 - III = sisa biodegradasi oleh isolat SA₂ (biodegradation residue produced by SA₂ isolate).
 - IV = sisa biodegradasi oleh isolat KA₆ (biodegradation residue produced by KA₆ isolate).
-  = fraksi hidrokarbon parafin (paraffinic hydr. fraction).
 -  = fraksi hidrokarbon aromatik (aromatic hydr. fraction).
 -  = fraksi hidrokarbon asfaltik (asphaltic hydr. fraction).



Grafik 4 : Sisa biodegradasi dan peruraian nonbiologis BENSIN setelah 14 hari (Gasoline residue produced by biodegradation and nonbiological dissociation after 14 days).

- Keterangan :**
- T₀ = fraksi hidrokarbon sebelum inokulasi (hydrocarbon fraction before inoculation).
 - I = sisa peruraian nonbiologis (nonbiological dissociation residue).
 - II = sisa biodegradasi oleh isolat BE₁ (biodegradation residue produced by BE₁ isolate).
 - III = sisa biodegradasi oleh isolat SA₂ (biodegradation residue produced by SA₂ isolate)
 - IV = sisa biodegradasi oleh isolat KA₆ (biodegradation residue produced by KA₆ isolate).
- = fraksi hidrokarbon parafin (paraffine hydr. fraction).
 - = fraksi hidrokarbon aromatik (aromatic hydr. fraction).
 - = fraksi hidrokarbon aspaltik (asphaltic hydr. fraction).

d. Penggunaan O₂ dan pembebasan CO₂

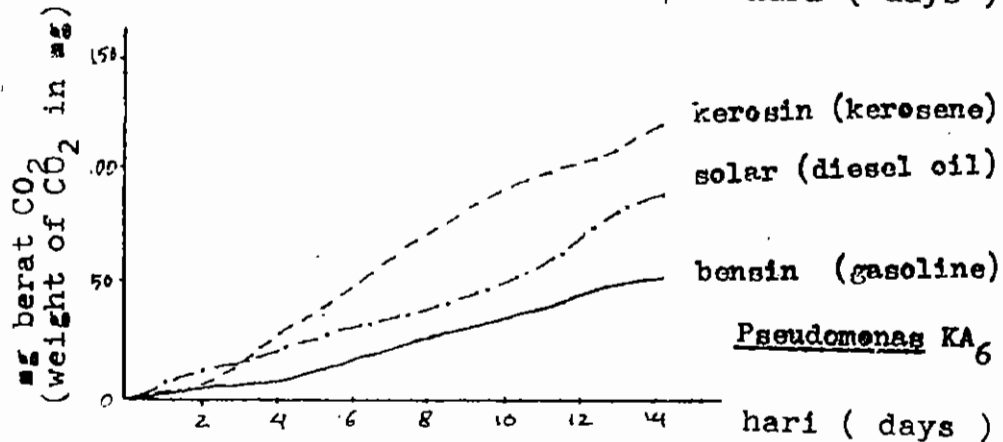
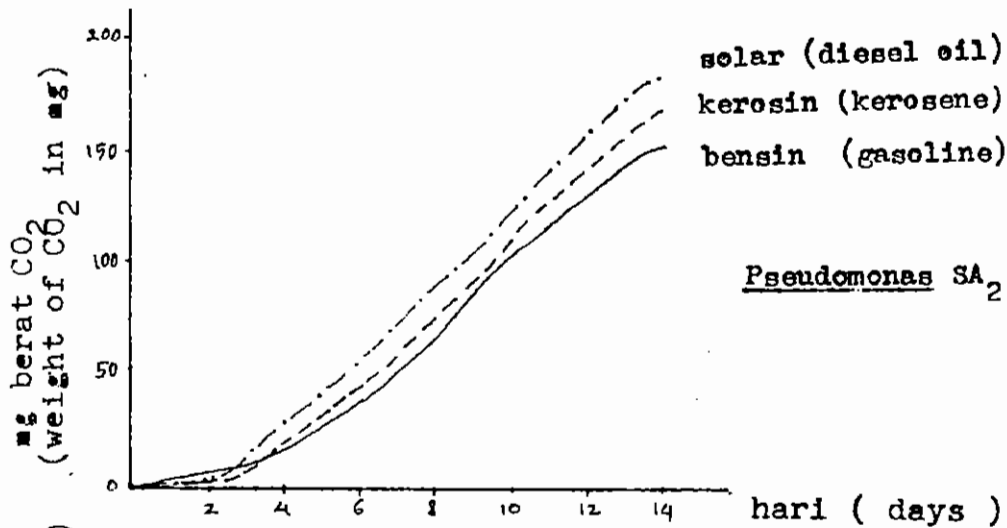
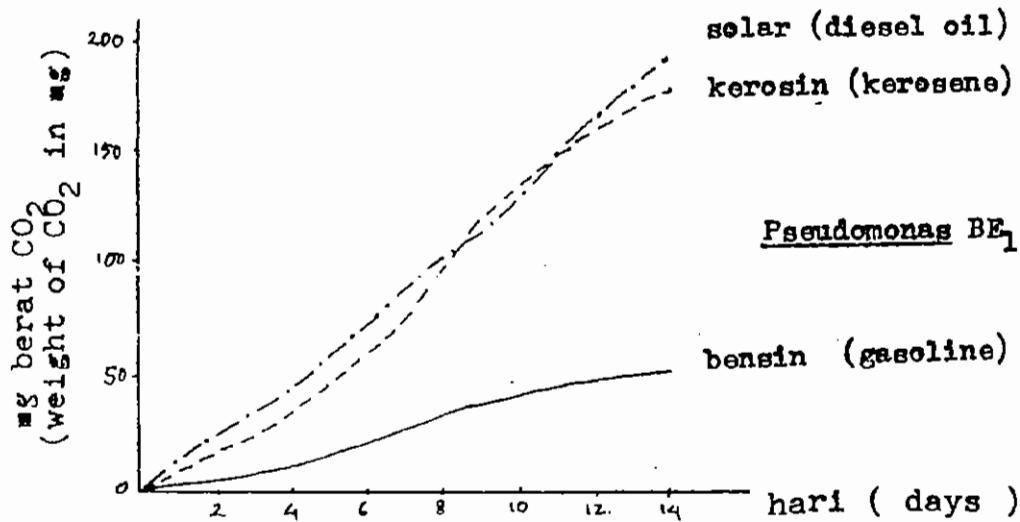
Penggunaan O₂ oleh isolat-isolat *Pseudomonas* dalam biodegradasi hidrokarbon minyak bumi ditunjukkan dalam Daftar 1. Di dalam daftar ini dapat dilihat bahwa tiap isolat *Pseudomonas* memerlukan jumlah O₂ yang berbeda untuk merombak hidrokarbon dari jenis minyak bumi, masing-masing.

Daftar 1. Penggunaan O₂ dalam perombakan solar, kerosin dan bensin oleh isolat *Pseudomonas* spp.

(The oxygen uptake by *Pseudomonas* spp. isolates in diesel oil, kerosene and gasoline biodegradation).

(days)	Penggunaan Oksigen (Oxygen uptake) mg/l.								
	Isolat BE ₁ (BE ₁ isolate)			Isolat SA ₂ (SA ₂ isolate)			Isolat KA ₆ (KA ₆ isolate)		
	solar/ (diesel oil)	Kerosin/ kerosene	bensin gasoline)	solar/ (diesel oil)	kerosin/ kerosene	bensin gasoline)	solar/ (diesel oil)	kerosin/ kerosene	bensin gasoline)
2	1,96	0,76	0,44	0,56	0,96	0,16	2,44	0,64	0,92
4	2,48	1,52	0,92	1,16	0,68	0,32	1,04	1,84	1,82
6	2,24	1,32	1,04	0,84	1,08	0,40	0,60	1,60	1,44
8	2,44	1,64	1,08	1,40	1,12	1,36	0,88	1,93	2,84
10	1,72	1,32	1,00	0,80	0,95	0,40	0,72	1,68	2,72
12	1,32	1,40	1,20	0,72	1,04	0,76	0,68	1,48	2,84
14	0,96	0,92	1,40	0,44	1,08	0,80	0,84	1,00	3,12

Tiap jenis hidrokarbon minyak bumi dapat dirombak oleh mikrobia menjadi bentuk CO₂ dalam jumlah yang berbeda satu dengan yang lain, dan juga dengan beberapa jenis senyawa antara ("intermediate product") misalnya decalin, olefin, benzaldehyde, ethyl benzene dan meta & para cresol (6). Data perombakan minyak bumi dapat dilihat pada grafik 5. Kerosin secara nisbi lebih mudah dirombak sampai ke bentuk CO₂ daripada kedua jenis minyak bumi yang lainnya. Isolat *Pseudomonas* berbeda kemampuannya dalam merombak hidrokarbon minyak bumi menjadi bentuk gas CO₂. Perombakan minyak bumi tidak selalu diakhiri dengan pembebasan CO₂ dan hal ini tergantung pada jenis hidrokarbon substratnya (6, 17).



Grafik V : Pembebasan CO₂ dari biodegradasi solar, kerosin dan bensin oleh isolat-isolat *Pseudomonas* spp.

(Release of CO₂ from diesel oil, kerosene and gasoline biodegradation by *Pseudomonas* spp. isolates).

Dari penelitian ini beberapa kesimpulan dapat ditarik mengenai pola pemecahan tiga produk minyak bumi yang banyak digunakan sebagai bahan bakar.

Karena *Pseudomonas* spp. terdapat dan dapat hidup hampir di segala jenis lingkungan (5), dapat dengan mudah beradaptasi dan dengan cepat berkembang biak di lingkungan yang baru serta terbukti mampu merombak hidrokarbon minyak bumi (secara aerob), maka dapat disimpulkan pentingnya aerasi dan upaya-upaya fisik (misalnya drainase dan pencangkulan serta usaha-usaha lain yang dapat meningkatkan suhu atau memperluas permukaan kontak molekul-molekul hidrokarbon dengan atmosfer) untuk mempercepat pengurangan pengaruh negatif polutan minyak bumi terhadap lingkungannya.

Telah terbukti dalam penelitian ini bahwa pencemaran dan perombakan minyak bumi dapat mempengaruhi dan mengubah keadaan lingkungan yang aerob menjadi anaerob, yaitu dengan penggunaan O_2 dan pembebasan CO_2 ke lingkungan sekitarnya. Khususnya di daerah risosfer, keadaan anaerob disertai dengan bertambahnya kandungan gas CO_2 akan menyebabkan pengurangan ketersediaan unsur hara tertentu dan penghambatan perpanjangan akar tanaman (1). Raymond et al. (1976) dalam penelitiannya membuktikan bahwa pencemaran minyak bumi akan menyebabkan tanaman turnip dan kacang-kacangan tidak dapat tumbuh atau mengalami pertumbuhan yang tidak normal (kerdil) serta daunnya berwarna kekuningan (15).

Ucapan Terima Kasih

Diucapkan terima kasih kepada pimpinan laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM beserta staf yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Alexander, M. (1977). *Introduction to soil microbiology*. John Wiley & Sons. New York. 467 pp.
2. Anonymous (1971). *Standard methods for examination of water and waste water*. American Public Health Association, Inc. Washington, DC.
3. Anonymous (1978). Kontaminasi dan deteriorasi pada minyak bumi in *Laporan Penelitian Pendahuluan Mikrobiologi Minyak Bumi*. Proyek Laboratorium Protein Sel Tunggal Cepu. Pusat Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi "Lemigas". Cepu.
4. Atlas, RM. (1975). Effect of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Appl. Microbiol.* 30 : 396 - 403.
5. Breed, RS, et al. (1957). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. The Williams and Wilkin's. Baltimore. 1064 pp.
6. Davis, JB. (1967). *Petroleum microbiology*. Elsevier. Amsterdam. 604 pp.
7. Dibble, JT and Bartha. (1976). Effect of iron on the biodegradation of petroleum in sea water. *Appl. Environ. Microbiology.* 31 : 544 — 550.

8. Fred, EB and SA. Waksman. (1928). *Laboratory manual of general microbiology*. Mc. Graw-Hill New York.
9. Gill, CO and KH. Tan. (1979). Effect of Carbon Dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 : 237 - 240.
10. Haines, JR and Alexander. (1974). Microbial degradation of high molecular weight alkanes. *Appl. Microbiol.* 28 : 1084 - 1085.
11. Herbes, SE and RL. Schwall. (1978). Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbon in pristane and petroleum contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 36 : 306 - 316.
12. Horowitz, A and RM. Atlas. (1977). Response of microorganisms to an accidental gasoline spillage in arctic freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 1232 - 1258.
13. Jutono. (1975). *Mikrobiologi minyak bumi*. Departemen Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM. Yogyakarta.
14. Mulkins-Phillips, GJ and JE. Steward. (1974). Effect of environmental parameters on bacterial degradation of crude oil and hydrocarbon. *Appl. Microbiol.* 28 : 915 - 922.
15. Raymond, RL, et al. (1976). Oil Degradation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 522 — 545.
16. Russel, WL. (1960). *Principles of petroleum geology*. Mc Graw-Hill. New York.
17. Sharpley, JM. (1966). *Elementary of petroleum microbiology*. Mc Graw-Hill Hudson. 256 pp.
18. Walker, JD and RL Callwell. (1974) Microbial petroleum degradation : Used of mixed hydrocarbon substrates. *Appl. Microbiol.* 27 : 1053 — 1060.
19. Walker, JD and RL Callwell. (1976). Measuring the potential activity of hydrocarbon degrading bacteria. *Appl. Microbiol.* 31 : 189 - 197.