

IDENTIFIKASI DAN UJI POTENSI BAKTERI LIPOLITIK DARI LIMBAH SBE (*SPENT BLEACHING EARTH*) SEBAGAI AGEN BIOREMEDIASI

Fitralia Elyza¹, Nuni Gofar², Munawar³

¹ Jurusan Biologi Lingkungan, Program Studi Pengelolaan Lingkungan, Pascasarjana, Universitas Sriwijaya, email: fitraliae@gmail.com

² Jurusan Ilmu Tanah, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya

³ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

Limbah minyak kelapa sawit yang terbanyak adalah SBE (Spent Bleaching Earth), limbah ini mengandung residu minyak tinggi yang dapat mencemari lingkungan, 30% residu minyak pada limbah SBE dapat digunakan bakteri untuk pertumbuhannya, sehingga adanya bakteri mampu menjadi agen bioremediasi pencemaran SBE. Penelitian dilakukan untuk mendapatkan bakteri lipolitik sebagai agen potensial bioremediasi pada limbah SBE. Metode pengambilan sampel limbah SBE secara random sampling. Sampel tanah diambil secara acak dari beberapa titik area limbah SBE. Bakteri diisolasi dari sampel limbah SBE, kemudian dilakukan tahapan yaitu : pemurnian, seleksi, uji potensi, bakteri berpotensi mereduksi lipid dikarakterisasi dan diidentifikasi genusnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Aktivitas enzim lipase yang tinggi menandakan bahwa bakteri lipolitik bekerja optimal merombak zat pencemar. Bakteri yang memiliki potensi sebagai agen bioremediasi terdiri dari genus Citrobacter (B1), Enterobacter (B2) dan Acinetobacter (B3).

Kata Kunci : Bakteri, lipid, lipolitik, Spent Bleaching Earth.

ABSTRACT

The most palm oil waste is SBE (Spent Bleaching Earth), this waste had many reduced lipid that got pollution for environments, Bacteria can use lipid from SBE as much as 30% for growed. So that consist of bacteria in SBE as a potensial agent for remediation. This study aims to obtain lipolytic bacteria as a potensial agent of bioremediation. The method of sampling soil were taken at random from SBE waste, Bacteria were isolated from the SBE waste, then they were selected into steps : performed purification, selection, potential test, then characterized and identified it's genus of potential bacteria. The results showed that the highest activity enzyme of lipolytic indicated that the lipolytic bacteria worked optimal for reduce polution. Bacteria had potential as a bioremediation agent consisting of genus Citrobacter (B1), Enterobacter (B2) and Acinetobacter (B3).

Keywords : Bacteria, lipid, lipolytic, Spent Bleaching Earth.

1. PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) merupakan komoditas utama perkebunan di Indonesia. Dimana dalam industri banyak dimanfaatkan untuk pembuatan minyak goreng karena menghasilkan minyak nabati. Produksi minyak goreng semakin besar seiring dengan permintaan pasar yang meningkat terhadap penggunaan minyak goreng. Permintaan minyak goreng akhir-akhir ini membawa dampak terhadap besarnya produksi minyak kelapa sawit yang akan diolah menjadi minyak goreng,

oleh karena itu limbah hasil produksi yang dihasilkan mengalami peningkatan dan tingkat pencemaran lingkunganpun bertambah.

Proses produksi minyak kelapa sawit ini terdiri dari beberapa tahapan, salah satu tahapan produksi minyak kelapa sawit adalah proses penjernihan. Proses ini diperlukan untuk penghilangan kandungan logam, zat warna karoten, kelembaban, bahan tak larut atau zat-zat yang bersifat koloid seperti resin, gum, protein, dan fosfotida dalam CPO dari minyak sawit kasar sehingga minyak

menjadi lebih jernih. Proses penjernihan CPO menggunakan *bleaching earth*, *bleaching earth* yang telah digunakan merupakan limbah yang perlu dilakukan pengolahan sebelum dibuang ke lingkungan. Aulia (2013) menambahkan bahwa *bleaching earth* adalah absorben yang merubah warna coklat menjadi kekuningan, serta limbah terbesar dari pengolahan CPO.

Semakin banyak produksi minyak kelapa sawit yang digunakan maka limbah hasil penjernihan berupa SBE/*Spent Bleaching Earth* yang dihasilkan juga banyak. Menurut Wahyudi (2000), apabila merujuk pada Peraturan Pemerintah No.18 Tahun 1999 dalam daftar limbah spesifik, kode limbah d-233, jenis industri pengolahan lemak hewan/nabati dan derivatnya, maka SBE dapat dikategorikan sebagai B3. Limbah B3 merupakan limbah hasil kegiatan yang mengandung bahan berbahaya beracun.

Residu minyak pada SBE akan mengendap di permukaan dan menyebabkan kerusakan lingkungan. Limbah minyak kelapa sawit mempunyai kandungan minyak dengan berat jenisnya lebih kecil dari air maka minyak tersebut akan membentuk lapisan tipis mengakibatkan terbatasnya oksigen masuk dalam air. Oleh karena itu, diperlukan penanganan terhadap residu minyak yang terdapat dalam limbah SBE.

Salah satu metode yang ramah lingkungan adalah bioremediasi menggunakan mikroorganisme. Mikroorganisme termasuk bakteri sebagian besar mampu memanfaatkan minyak/lemak sebagai sumber karbon dan energinya, bakteri yang mempunyai kemampuan tersebut sering dikenal sebagai bakteri lipolitik. Sifat lipolitik bakteri tersebut berpotensi sebagai agen bioremediasi (Suastuti, 2010).

Tahap awal yang harus dilakukan untuk mendapatkan bakteri lipolitik ialah mengisolasi bakteri indigen lahan tercemar. Agar pengolahan limbah SBE yang banyak mengandung lemak berlangsung secara efektif maka yang perlu dilakukan adalah mencari mikroorganisme yang memiliki potensi dalam mendegradasi lipid.

Tujuan dari penelitian ini adalah

mendapatkan bakteri lipolitik dan mengkaji potensinya sebagai agen bioremediasi pada limbah SBE. Sedangkan manfaat penelitian ini dapat digunakan untuk mereduksi lipid pada limbah SBE.

2. METODE PENELITIAN

Alat-alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah aluminium foil, autoclaf, bunsen, cawan petri, *cool box*, *colony counter*, *drygel sky*, erlenmayer, gelas beker, gelas ukur 7 ml, hot plate, inkubator, jarum ose, kamera digital, kapas, kertas saring, kertas label, lemari pendingin, *magnetic stirrer*, paper disk, pipet mikron, pipet serologis, rak tabung reaksi, *rotary shaker*, tabung reaksi, timbangan analitik dan vortex.

Bahan-bahan yang diperlukan yaitu alkohol 70 %, aquades steril, CPO (*Crude Palm Oil*), glukosa, laktosa, larutan H₂O₂ 3%, reagen *methyl red*, reagen *Voges-Proskauer*, *Barrit's A* dan *Barrit's B*, sukrosa; bahan untuk pewarnaan Gram dan Endospora, limbah SBE minyak kelapa sawit yang berasal dari areal PT. Wilmar Sumatera Selatan, medium gelatin, medium *Bromothymol Blue Agar*, Medium Mineral, medium *Nutrient Agar (NA)* dan *Nutrient Broth (NB)*, Medium *Strach agar*, Medium SCA (*Simmons's Citrate Agar*), Medium Semi Solid, Medium TSIA, Medium *Urea Test Broth*.

Pengambilan Sampel

Sampel diambil di PT SAP Wilmar Group Mariana, Sumatera Selatan dengan menggunakan metode *random sampling*. Pengambilan sampel terletak pada limbah SBE. Ditentukan 4 titik sampling yang mewakili dan dari titik sampling tersebut diambil 250 gram. Kemudian sampel limbah SBE dimasukan ke dalam wadah yang steril. Untuk menjaga kondisi sampel tidak berubah maka sampel yang dibungkus wadah dimasukan ke dalam *cool box*.

Pengayaan (enrichment)

Masing-masing sampel SBE sebanyak 5 gr, dimasukan ke dalam Erlenmayer yang berisi 45 mL medium *Nutrient Broth*, selanjutnya diagitasi dengan *rotary shaker* kecepatan 150 rpm

selama 7 hari atau sampai menunjukkan pertumbuhan yang dicirikan medium mengeluarkan busa. Perubahan ini diamati setiap hari (Munawar, 1999).

Isolasi

Masing-masing sampel dalam medium Nutrient Broth yang berubah menjadi keruh diencerkan mulai pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-7} dengan cara menghomogenkan 1 mL sampel dalam medium Broth cair dengan 9 mL larutan garam fisiologis. Kemudian dari setiap pengenceran diambil 1 mL ditumbuhkan dalam medium NA dengan metode *pour plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam atau menunjukkan koloni yang tumbuh. Kemudian diamati setiap koloni bakteri yang tumbuh dengan ciri berbeda. Metode ini merupakan modifikasi dari Gofar (2012).

Pemurnian

Koloni dengan ciri berbeda (seperti warna, bentuk koloni, dan permukaan koloni) masing-masing dimurnikan dengan cara di-*streak* ke medium NA padat dalam cawan petri, lalu diinkubasi selama 2 x 24 jam. Teknik ini dilakukan secara berulang sampai diperoleh koloni yang diindikasikan murni. Jika belum memperoleh koloni yang murni, dilakukan kembali (ulangi), hingga mendapat koloni yang murni. Koloni murni adalah koloni yang berasal dari satu sel saja. Untuk koloni yang diduga murni, dilakukan pewarnaan gram untuk memastikan bahwa koloni tersebut adalah memang murni dan hanya terdiri dari satu bakteri saja. Koloni murni yang didapat diinokulasikan pada medium agar miring untuk mendapat isolat murni (Gofar, 2012).

Seleksi

Isolat yang telah didapat dari hasil pemurnian diseleksi berdasarkan kemampuan mengeluarkan enzim lipase dengan menurunkan pH medium ditunjukkan dengan zona kuning di sekitar *paper disk* yang telah diberi suspensi bakteri. Seleksi dimulai dengan menggunakan medium *Bromothymol Blue Agar* sebanyak 13 mL disterilisasi dan

ditetesi CPO steril sebanyak 10 tetes kemudian dihomogenkan. Medium yang homogen kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Kemudian *paper disk* steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri 10 mL dan diletakan di bagian tengah dari medium *Bromothymol Blue Agar*. Diinkubasi selama 24 jam diamati zona kuning di sekitar bakteri dan dihitung kemampuan lipolitiknya dengan rumus :

$$\% \text{lipolitik} = \frac{\text{zona kuning} - \text{koloni}}{\text{koloni}} \times 100\%$$

Uji Potensi Isolat Bakteri Terpilih Sebagai Agen Bioremediasi

Ketiga bakteri hasil seleksi yang mempunyai indeks lipolitik tertinggi dilihat potensinya sebagai agen bioremediasi dengan cara melihat peningkatan pertumbuhan populasi bakteri dan residu minyak. Pengujian potensi ini dilakukan pada erlenmayer yang berisi mineral medium sebanyak 50 mL, CPO 15 mL (30%) dan kultur tunggal isolat bakteri dengan kepadatan 10^6 sel/mL. Kultur diinkubasi dengan cara dikocok secara manual menggunakan tangan setiap 8 jam sekali pada suhu kamar selama 8 hari. Selanjutnya dilakukan perhitungan populasi dan residu minyak setelah satu minggu pengujian (Munawar *et al*, 2011).

Karakterisasi dan Identifikasi

Isolat bakteri yang telah dilakukan pengujian kemampuan dalam mendegradasi lipid selanjutnya dikarakterisasi untuk mempermudah identifikasi. Karakterisasi dilakukan terhadap morfologi koloni pada berbagai bentuk media agar (miring, tegak, lempeng), morfologi sel (sifat gram bakteri dan pewarnaan endospora), pengujian biokimiawi (kebutuhan akan oksigen, fermentasi gula, hidrolisa pati, hidrolisa gelatin, uji indol, uji metil merah, uji vogos-preskuer, uji sitrat, uji H_2S , uji hidrolisa urea, uji katalase, dan uji motilitas). Berdasarkan karakter dari masing-masing isolat bakteri yang mampu mendegradasi lipid diidentifikasi dengan menggunakan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th edition* (Bunchan & Gibons, 1974) dan *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9th edition* (Holt *et al*, 1994).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian

Berdasarkan sampel yang telah diambil dari beberapa titik sampel kemudian dihomogenkan didapatkan hasil isolasi dan pemurnian yang sebelumnya didahului dengan tahap pengayaan. Tahapan pengayaan bertujuan untuk memberikan kesempatan pada jenis bakteri yang jumlah dan populasinya sedikit di alam, sehingga pada saat isolasi jenis ini dapat kesempatan hidup lebih banyak. Pengayaan dilakukan pada medium mineral yang menunjukkan bahwa kultur telah tumbuh pada medium mineral yaitu dengan adanya gelembung yang menunjukkan adanya aktivitas bakteri. Menurut Sariadji (2013), medium pengayaan terus berkembang memperbanyak diri dengan cara membelah pada kondisi nutrisi makanan yang melimpah serta lingkungan yang cocok.

Dari proses pengayaan ini, kemudian sampel diisolasi ke dalam medium NA (*Nutrient Agar*) sehingga didapatkan 12 isolat bakteri dari setiap pengenceran. Hasil isolasi diambil dari pengenceran yaitu 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil Isolasi Bakteri Lipid di Limbah SBE dengan metode *pour plate*

Tingkat pengenceran	Jumlah koloni bakteri	Kode isolat
10^{-4}	3	B1(4), B2(4), B3(4)
10^{-5}	3	B1(5), B2(5), B3(5)
10^{-6}	3	B1(6), B2(6), B3(6)
10^{-7}	3	B1(7), B2(7), B3(7)

Hasil Seleksi Bakteri Lipolitik

Kemampuan menghasilkan enzim lipase oleh bakteri lipid juga diindikasikan dengan perubahan warna medium *Bromothymol Blue Agar*, menjadi warna kuning di sekitar bagian kertas cakram yang telah diberi suspensi bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri mampu mengeluarkan enzim lipase untuk menghidrolisis medium yang mengandung CPO. Menurut Darmayasa

(2008), untuk mendapatkan bakteri dengan kemampuan lebih cepat dalam menghidrolisis minyak pada media perlu ditambahkan bahan pencemar (lemak atau minyak) untuk membantu pertumbuhan mikroba sehingga jumlahnya cukup untuk mendegradasi lemak. Besarnya zona kuning yang terbentuk mengindikasikan bahwa bakteri mempunyai kemampuan tinggi dalam mendegradasi minyak, bakteri yang memiliki lipolitik tinggi yaitu B1(7), B2(6) dan B3(5) hasil lipolitik disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Hasil bakteri yang terseleksi dan indeks lipolitik bakteri

Kode isolat	Diameter rata-rata (cm)	Indeks lipolitik (cm)
B1(5)	$1,6 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,8$
B1(6)	$1,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,1$
B1(7)	$3,6 \pm 0,6$	$4,4 \pm 3,0$
B2(6)	$8,2 \pm 0,6$	$12,2 \pm 9,0$
B2(7)	$1,6 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,8$
B3(5)	$4,6 \pm 0,7$	$5,2 \pm 3,3$
B3(7)	$1,7 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,8$

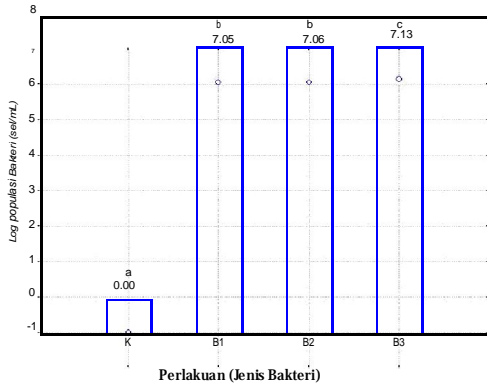
Diameter zona kuning yang luas dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan tinggi, sedangkan diameter zona kuning yang rendah dapat mengindikasikan bahwa enzim lipase yang dikeluarkan rendah. Menurut Oktavia *et al.*, (2012) bahwa turunnya kadar lemak disebabkan oleh lemak yang terhidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Asam lemak bebas ini akan mudah mengalami kerusakan sehingga mengakibatkan kadar lemak menurun. Hal ini disebabkan karena asam yang terbentuk dapat memecah komponen lemak yang kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana sehingga menyebabkan kandungan lemak menurun.

HASIL UJI POTENSI ISOLAT BAKTERI LIPOLITIK

Hasil Jumlah Populasi Bakteri

Berdasarkan hasil Analisis Varian (ANOVA), faktor jenis bakteri menunjukkan pengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah sel bakteri akhir uji potensi, dengan $p < 0,05$ pada faktor jenis bakteri. Hasil uji lanjut DNMRT rata-rata jumlah sel bakteri akhir pada faktor jenis

bakteri disajikan pada Gambar 1.

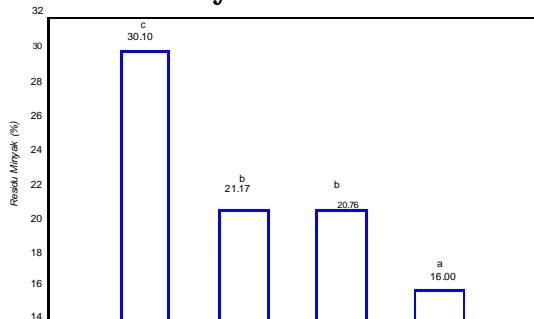


Keterangan : Angka-angka yang diikuti huruf kecil yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut DNMRT 0.05

Gambar 1. Jumlah sel bakteri akhir uji potensi pada faktor jenis bakteri

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa isolat bakteri lipolitik pada akhir uji potensi yang memiliki jumlah sel bakteri akhir yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat yang lain dan kontrol. Jumlah sel bakteri akhir B1 dan B2 menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata, dan memiliki jumlah sel bakteri akhir yang rendah dibandingkan dengan isolat B3. Hal ini diduga bahwa kemampuan bakteri dalam menggunakan CPO sebagai sumber karbon berbeda-beda pada setiap isolat bakteri, sehingga pertumbuhan populasi bakteri berbeda. Menurut Aditiawati (2003), laju pertumbuhan bakteri tergantung dengan kondisi substratnya. Apabila kondisi substratnya sesuai, maka laju pertumbuhannya akan dominan, sebaliknya apabila kondisi substrat tidak sesuai maka laju pertumbuhannya akan lambat.

Hasil Residu Minyak



K B1 B2 B3
Perlakuan (Jenis Bakteri)

Keterangan : Angka-Angka yang diikuti huruf kecil yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut DNMRT 0,05

Gambar 2. Persentase penurunan lipid pada faktor jenis bakteri

Berdasarkan Analisis Varian (ANOVA), untuk faktor jenis bakteri memberikan pengaruh nyata terhadap persentase residu minyak, dengan $p = 0,000000$ ($p < 0,05$) untuk perlakuan jenis bakteri. Hal ini berarti persentase penurunan minyak berbeda-beda pada setiap jenis bakteri. Menurut Nugroho (2006), bahwa berbagai macam jenis bakteri mempunyai mekanisme kerja yang signifikan dalam menggunakan substrat, sehingga bakteri hanya bisa mendegradasi senyawa hidrokarbon spesifik dalam kisaran yang terbatas. Hasil uji selanjutnya DNMRT persentase penurunan minyak pada faktor jenis bakteri disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2 di atas, dapat diketahui bahwa semua jenis isolat bakteri lipolitik memiliki kemampuan dalam menurunkan minyak dan berbeda nyata terhadap kontrol. Isolat B3 memiliki kemampuan yang paling besar dalam menurunkan minyak (16%) dibandingkan dengan kedua isolat lainnya yaitu B1 sebanyak (21%) dan B2 sebanyak (20%). Adanya penurunan kadar minyak dikarenakan aktivitas bakteri lipolitik dalam memanfaatkan CPO yang terdapat pada medium sebagai sumber energinya. Menurut Ohimain *et al* (2013), adanya mikroba lipolitik yang ditemukan pada CPO mengindikasikan terjadinya perombakan lipid menjadi asam lemak dan gliserol.

Adanya enzim lipase merupakan hal penting bagi bakteri dalam melakukan biodegradasi lahan tercemar minyak. Enzim lipase digunakan bakteri agar dapat kontak langsung dengan substrat yang mengandung lipid, minyak inilah yang akan digunakan bagi bakteri sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya. Adanya enzim lipase sendiri tergantung dari berbagai faktor, dimana faktor inilah yang menentukan keberadaane enzim lipase untuk bekerja.

B1 dan B2 memiliki persentase

penurunan yang tidak berbeda nyata yaitu 21% dan 20%. Hal ini menunjukkan bahwa kedua bakteri ini memiliki kemampuan mengeluarkan enzim sedikit dalam mendegradasi minyak, hal ini dikarenakan berbagai faktor yang dapat mempengaruhi kerja bakteri. Menurut Syaiful *et al.*, (2009), aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, temperature, dan pH, kecepatan reaksi enzim dipengaruhi kerja enzim, semakin banyak konsentrasi enzim, maka reaksi akan lebih cepat, sehingga semakin banyak substrat digunakan.

Persentase penurunan minyak menunjukkan adanya penguraian substrat yang dalam hal ini merupakan CPO, oleh isolat bakteri lipolitik dengan bantuan enzim lipase melalui jalur metabolismenya, sehingga konsentrasi minyak menurun seiring dengan terjadinya penguraian substrat. Notodarmojo (2005) mengatakan bahwa langkah pertama dalam proses biodegradasi oleh metabolisme bakteri adalah substrat masuk ke dalam membrane sel melalui mekanisme difusi. Makromolekul akan tertahan di dinding sel, dan sebagai degradasi oleh eksoenzim yang dikeluarkan melalui dinding sel. Selanjutnya terjadi reaksi didalam sitoplasma sel menguraikan senyawa organik.

Identifikasi Bakteri Lipolitik

Identifikasi bakteri dilakukan setelah diperoleh data hasil karakterisasi morfologi dan karakterisasi fisiologi, maka dapat diketahui bahwa isolat yang diperoleh sebanyak 3 isolat, dikelompokkan kedalam 3 genus yang berbeda yaitu genus *Citrobacter* dengan kode isolat B1, *Enterobacter* dengan kode isolat B2 dan *Acinetobacter* dengan kode isolat B3.

Ketiga isolat ini memiliki morfologi sel yang sama yaitu bentuk basil, gram negatif dengan kebutuhan oksigen anaerob fakultatif. Serta uji fisiologi katalase positif dan dapat memfermentasi gula. Menurut Ohimain (2013), bahwa *Enterobacter* adalah genus yang ditemukan 33% berada pada CPO hasil produksi.

4. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Aktivitas enzim lipase yang tinggi menandakan bahwa bakteri bekerja optimal merombak zat pencemar.
2. Bakteri yang memiliki potensi sebagai agen bioremediasi terdiri dari genus *Citrobacter*, *Enterobacter*, dan *Acinetobacter*.

5. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai faktor lingkungan yang berperan dalam proses bioremediasi limbah SBE (*Spent Bleaching Earth*).

DAFTAR PUSTAKA

- Aditiawati, P. Pikoli, M.R. dan Indriani, D. 2011. Isolasi bertahap bakteri pendegradasi minyak bumi dari sumur bangko. *Proceeding Simposium Nasional IATMI*. 2-5 Oktober di Yogyakarta.
- Arsyad, S. dan Rustiadi, E. 2008. *Penyelamatan Tanah, Air dan Lingkungan*. Penerbit Yayasan Obor Indonesia. Bogor: xviii + 288 hlm.
- Aulia, B. Sahan, Y. Zahrina, I. 2013. Regenerasi Spent Bleaching Earth (SBE) dan Aplikasinya Pada Adsorpsi Ion Cu (II). *Karya Ilmiah Fakultas Teknik*. Universitas Riau. Riau. 1-6 hlm.
- Buchanan, R.E. & N.E. Gibbons (CoE). 1974. *Bergey Manual of determinative bacteriology*. 8th Ed. S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin & R.Y. Stanier (Eds) Baltimore.
- Darmayasa, I.B.G. 2008. Isolasi, Identifikasi dan uji Kemampuan Bakteri Pengurai Minyak Solar dari Perairan Pelabuhan Benoa Bali. Tesis Ilmu Biologi dan Lingkungan. Universitas Udayana. Bali.
- Gofar, N. 2012. Aplikasi Isolat Bakteri Hidrokarbonolastik Asal Rhizosfer Mangrove Pada tanah Tercemar Minyak Bumi. *Jurnal Lahan Sub*

- Optimal* Vol 1 (2) : 123 -129 hlm.
- Holt, JG. Krieg, NR. Scoath, PHA. Staley, JT. Williams, ST. 1994. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology 9th Edition* E Waverly Company. USA. 787 hlm.
- Munawar. 1999. Isolasi dan Uji Kemampuan isolat Bakteri Rhizosfer dari Hutan Bakau di Cilacap dalam Mendegradasi residu minyak bumi. *Tesis* Program Pascasarjana Institut Teknologi Bandung. Tidak dipublikasikan.
- Munawar, Aditiawati, P. Astuti, D.I. 2011. Biodegradasi fraksi asfalten oleh bakteri yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak bumi di propinsi Sumatera Selatan. *Prosiding Seminar Nasional AVoER* Di Palembang. 26-27 Oktober 2011.
- Notodarmojo, S. 2005. Pencemaran Tanah dan Air Tanah. Penerbit ITB. Bandung. VIII + 488 hlm.
- Nugroho, A. 2006. Bioremediasi Hidrokarbon Minyak Bumi. *Jurnal Makara Teknologi* Vol. 10 (2). Universitas Trisakti. Jakarta.
- Ohimain, E.I, Izah, S.E. and Fawari, A.D. 2013. Quality Assessment of Crude Palm Oil Produced by Semi-Mechanized Processor in Bayelsa State Nigeria. *Journal Of Agriculture and Food Sciences*. 1(11): 171-181 hlm.
- Oktavia, A.D. Mangunwidjaja, D. dan Wibowo, S. 2012. Pengelolaan Limbah Cair Perikanan Menggunakan Konsorsium Mikroba Indigenous Proteolitik dan Lipolitik. *Jurnal Agrotek* 6(2): 65-71.
- Sariadji. 2013. Evaluasi Medium Pengayaan *Vibrio cholerae* Untuk Diagnosis Kolera Menggunakan Immunochromatographic Strip Test. *Bul. Penelit.* 41 (1). 11 – 17 hlm.
- Suastuti, N. G. A. M. Dwi Adhi. 2009. Kadar Air dan Bilangan Asam dari Minyak Kelapa yang dibuat Dengan Cara Tradisional dan Fermentasi. *Jurnal kimia*. Vol. 3 (2) Jimbrana : 69-74 hlm.
- Syaiful. Amalia, S dan Zulkarnain, A. 2009. Hidrolisa Minyak Jagung (Corn Oil) Secara Enzimatik, Penentuan Kondisi Operasi Optimum, Permodelan Matematik dan Penentuan Konstanta Kapasitas. *Jurnal Teknik Kimia* 3 (16): 21-31.
- Wahyudi M Y. 2000. Studi Penggunaan Kembali *Bleaching Earth* Bekas sebagai Adsorben dalam Proses Refining CPO. *Tesis Magister*. Program Studi Teknik Lingkungan. Institut Teknologi Bandung. Bandung.