

KARAKTERISASI BOKIMIA BIOSURFAKTAN YANG DIHASILKAN BAKTERI *ALTEROMONAS MACLEODII* Y 18228 SEBAGAI AGEN PENDEGRADASI SENYAWA HIDROKARBON

Ade Sumiardi

Departemen Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Universitas Banten Jaya

adesumiardi@unbaja.ac.id

Abstract: Microbiology surface active agents (biosurfactant) have recently been recognized as an important microbiology product with properties applicable in a number of industries and bioprocesses. Being capable of lowering surface and interfacial tension, biosurfactant are today thought to be efficient replace and possible enhancing of chemically synthesized surface active agents. Some of their advantages, such as absence of selective toxicity, biodegrade ability and their specification, made these microbiology products both attractive for specific industries and environmentally acceptable. In this study, characterization of biosurfactant produced by *Alteromonas macleodii* Y 18228 was conducted by evaluating the growth and analysis of chemical composition involve of carbohydrate analysis using *phenol sulfuric acid methods*, protein analysis using *bradford methods* and lipid analysis using *blight and dryer methods*. The result of this research showed that biosurfactant produced by *Alteromonas macleodii* Y 18228 was a complex glycolipid which consist of carbohydrate, protein and lipid.

Keywords : Characterization of biosurfactant, *Alteromonas macleodii* Y 18228, chemistry composition

Abstrak. Agen aktif penurun tegangan permukaan yang diproduksi secara biologi (biosurfaktan) dikenal sebagai produk mikrobiologi penting yang diaplikasikan di sejumlah industri dan bioproses. Keunggulan-keunggulan biosurfaktan adalah senyawa tidak bersifat toksik, dapat didegradasi secara biologi, merupakan produk untuk industri-industri tertentu, ramah terhadap lingkungan dan dapat berkelanjutan. Tujuan penelitian adalah mengkarakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 sebagai agen pendegradasi senyawa hidrokarbon. Dalam penelitian ini, karakterisasi produksi biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 dilakukan dengan mengevaluasi pola pertumbuhan dan analisis komposisi kimia meliputi analisis karbohidrat menggunakan metode *phenol sulfuric acid*, analisis protein menggunakan metode *bradford* dan analisis lipid menggunakan metode *blight and dryer*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 merupakan senyawa kompleks glikolipid terdiri dari karbohidrat, protein dan lipid.

Katakunci : Karakterisasi biosurfaktan, *Alteromonas macleodii* Y 18228, komposisi kimia

PENDAHULUAN

Biosurfaktan adalah metabolit sekunder yang dihasilkan mikroorganisme. Biosurfaktan adalah senyawa biologi ampifilik dihasilkan secara ekstraselular atau sebagai bagian dari membran sel mikroorganisme seperti bakteri, khamir, dan fungi berfilamen (Mata-Sandoval *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007). Biosurfaktan ditemukan di alam dalam berbagai macam struktur kimia meliputi glikolipid, lipopeptida dan lipoprotein, asam lemak, lemak netral, fosfolipid, lipid polimer dan lipid partikulat (Cameotra & Makkar, 2004). Substrat untuk menghasilkan biosurfaktan oleh mikroorganisme meliputi gula, minyak dan limbah (Rahman *et al.*, 2006).

Biosurfaktan yang dihasilkan mikroorganisme mampu meningkatkan emulsifikasi hidrokarbon, berperan dalam melarutkan kontaminan hidrokarbon dan meningkatkan ketersediaannya untuk proses biodegradasi. Oleh karena itu, biosurfaktan berperan penting dalam percepatan bioremediasi area terkontaminasi senyawa hidrokarbon (Rosenberg & Ron, 1999; Rahman *et al.*, 2002). Biosurfaktan juga dapat digunakan dalam meningkatkan atau mempercepat penghilangan hidrokarbon minyak bumi dan juga memiliki aplikasi potensi dalam proteksi lingkungan (Shulga *et al.*, 1999).

Secara umum, sintesis biosurfaktan dipengaruhi oleh tiga faktor yaitu induksi, represi dan pengaturan penambahan nitrogen. Induksi sintesis biosurfaktan dapat dicapai dengan penambahan rantai panjang asam lemak, hidrokarbon atau gliserol pada medium pertumbuhan. Penambahan D-glukosa, asam asetat atau asam trikarboksilat juga dapat meningkatkan produksi biosurfaktan. Pengaturan penambahan nitrogen juga berperan penting dalam sintesis biosurfaktan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesis biosurfaktan rhamnolipid dari *Pseudomonas aeruginosa* terjadi pada saat pembatasan nitrogen ketika memasuki fase stasioner pertumbuhan (Ramana & Karanth, 1989; Guerra-Santos *et al.*, 1994).

Arabic Liquid Crude Oil (ALCO) sebagai sumber karbon didegradasi oleh bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 sebagai sumber energi untuk pertumbuhan. Setelah menjadi fraksi karbon yang lebih sederhana, molekul karbon dimetabolisme di dalam sel bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 untuk pembentukan komponen-komponen sel. Molekul karbon ada yang digunakan untuk pembentukan biosurfaktan (Sumiardi *et al.*, 2012).

Biosurfaktan dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 pada fase stasioner. Pada fase stasioner terjadi produksi biosurfaktan secara maksimal. Bodour dan Maier (2005) melaporkan, biosurfaktan sebagai metabolit sekunder diproduksi mikroorganisme secara maksimal pada fase stasioner.

Karakterisasi biokimia biosurfaktan penting diteliti untuk mengetahui jenis biosurfaktan sehingga kompatibel dengan jenis polutan hidrokarbon yang bisa didegradasi. Oleh karena itu berdasarkan penjelasan yang dikemukakan muncul permasalahan penelitian yaitu bagaimana karakter biokimia biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228. Tujuan penelitian adalah untuk mengkarakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 hasil isolasi dari tanah terkontaminasi hidrokarbon di kawasan eksplorasi minyak Cepu Jawa Tengah. Hasil penelitian diharapkan mampu menjawab karakter biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 sehingga bisa dijadikan alternatif untuk aplikasi biosurfaktan pada skala lapangan.

BAHAN DAN METODE

Bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 merupakan hasil isolasi dan identifikasi dari kawasan terkontaminasi hidrokarbon di daerah Cepu, Jawa Tengah. Biakan disimpan di Laboratorium Bioproses Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI Cibinong Bogor Jawa Barat.

Penelitian diawali dengan menumbuhkan biakan pada media *nutrient agar* (NA) pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 kemudian ditumbuhkan pada media *nutrient broth* (NB) dengan ditambahkan *Arabic Liquid Crude Oil* (ALCO) sebagai sumber karbon pada suhu 37°C dan diinkubasi selama 72 jam. Selanjutnya sebagian digunakan untuk kepentingan penelitian (*work culture*), sebagian lagi disimpan sebagai *stock culture* (Jokuty *et al.*, 1995).

a. Ekstraksi Biosurfaktan

Ekstraksi biosurfaktan dilakukan dengan cara menuangkan masing-masing sebanyak 250 mL media NB yang sudah berisi bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 berumur 72 jam secara aseptik kedalam 5 Erlenmeyer steril ukuran 300 mL. Kepadatan sel masing-masing bakteri yang diinokulasikan sebanyak 10⁵ CFU/mL. Diinkubasi selama 120 jam pada suhu 37°C

selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 20 menit pada suhu 37°C untuk memisahkan supernatan dari larutan media. Setelah supernatan dipisahkan, dilakukan pengasaman menggunakan HCl 1N sampai pH 2.

Biosurfaktan diekstraksi dari supernatan menggunakan pelarut kloroform dan etanol dengan rasio 2:1. Lapisan bawah hasil ekstraksi merupakan biosurfaktan dipisahkan dari lapisan atas (pelarutnya) menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu < 40°C. Volume biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dicatat kemudian disimpan pada suhu -10°C sebelum dilakukan karakterisasi biosurfaktan (Samadi *et al.*, 2007).

b. Karakterisasi Biosurfaktan

Analisis Kandungan Karbohidrat

Keberadaan senyawa karbohidrat dalam molekul biosurfaktan diuji menggunakan modifikasi Metode Destruksi Fenol-Asam Sulfat (Dubois *et al.*, 1956). Sebanyak 0,5 mL supernatan diekstraksi dengan 0,5 mL larutan fenol 5% dan 2,5 mL asam sulfat 1N, kemudian diinkubasi selama 15 menit sebelum diukur absorbansinya pada 490 nm. Analisis kandungan karbohidrat menggunakan standar *D-Glucose* merk *Merck*.

Analisis Kandungan Protein

Keberadaan senyawa protein dalam molekul biosurfaktan diuji menggunakan modifikasi Metode Bradford (Bradford, 1976). Sebanyak 100 µl supernatan dicampur dengan 900 µl larutan Bradford kemudian diinkubasi selama 15 menit sebelum diukur absorbansinya pada 595 nm. Analisis kandungan protein menggunakan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Analisis Kandungan Lipid

Keberadaan senyawa lipid dalam molekul biosurfaktan diuji dengan modifikasi Metode Blight & Dryer (1995). Sebanyak 1 mL supernatan dicampur dengan 20 mL larutan kloroform kemudian dikocok selama 1 jam menggunakan *Vortex Mixer*. Kloroform dibuang dengan cara diuapkan dan kadar lemaknya diukur dengan timbangan analitik setelah dikeringkan dalam *hot plate* selama 24 jam pada suhu 50°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Biosurfaktan

Komponen penyusun biosurfaktan perlu dikarakterisasi dengan melakukan analisis karbohidrat, protein dan lipid. Struktur biosurfaktan umumnya terdiri dari gugus hidrofilik yang tersusun dari asam amino atau peptida, monosakarida, disakarida atau polisakarida dan gugus hidrofobik yang tersusun dari asam lemak jenuh atau asam lemak tak jenuh (Kim *et al.*, 2005).

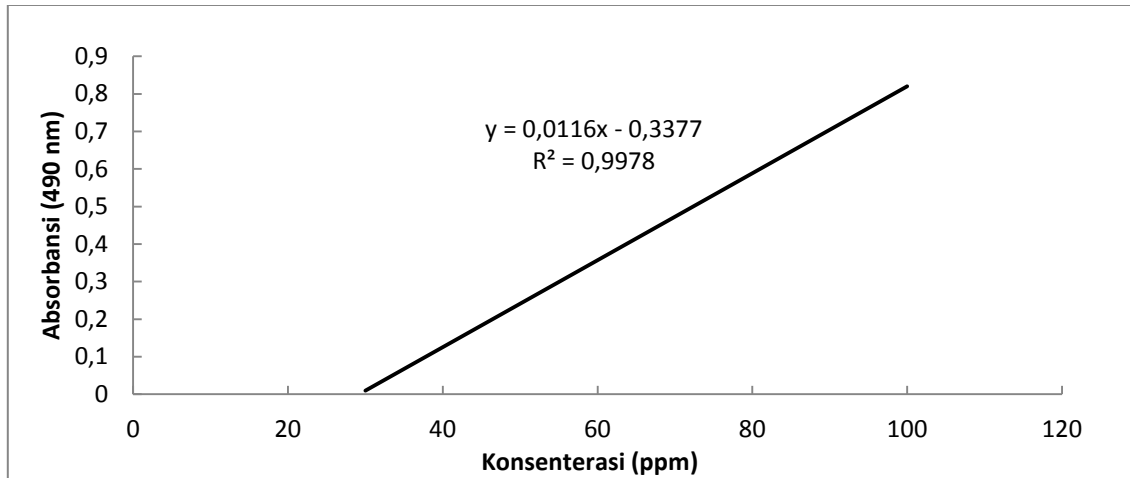
Hasil analisis menunjukkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 mengandung komponen karbohidrat, protein dan lipid.

Analisis Karbohidrat

Biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dikarakterisasi untuk kandungan karbohidrat (gula total) menggunakan metode Destruksi Fenol-Asam Sulfat (Dubois *et al.*, 1956). Analisis kandungan karbohidrat ini menunjukkan konsentrasi gula total pada biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228. Nilai absorbansi, kurva kalibrasi dan rerata kadar gula total (ppm) biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dapat dilihat pada Tabel 2, Gambar 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Standar gula total untuk analisis karbohidrat (Metode Fenol Asam Sulfat).

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
30	0,003
40	0,131
50	0,242
60	0,355
70	0,462
80	0,604
90	0,723
100	0,799



Gambar 2. Kurva kalibrasi standar untuk analisis karbohidrat (Metode Fenol Asam Sulfat).

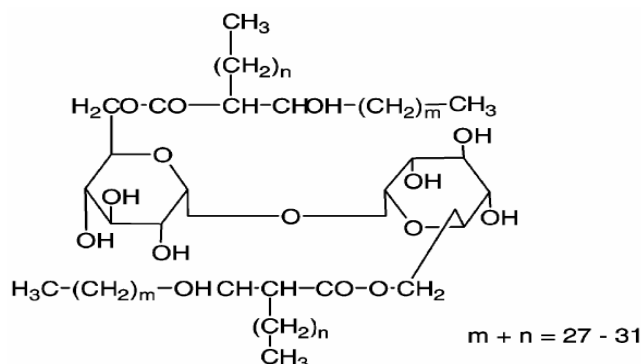
Tabel 3. Hasil analisis rerata kadar gula total (Metode Fenol Asam Sulfat).

Bakteri	Absorbansi	fp	Kadar Gula Total (ppm)
<i>Alteromonas macleodii</i> Y 18228	0,330	10	608,20
	0,322	10	608,15
	0,333	10	608,19
Rerata	0,332	10	608.18

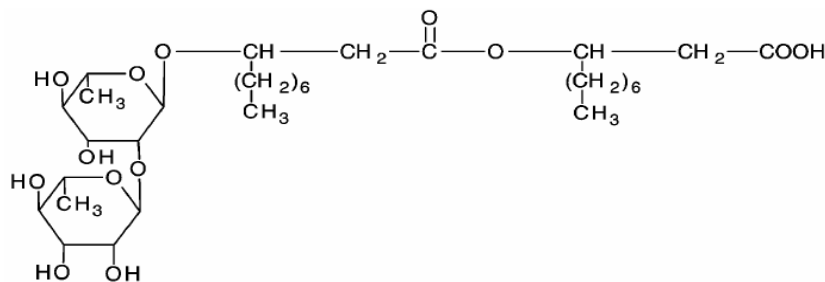
Hasil analisis menunjukkan bahwa *Alteromonas macleodii* Y 18228 memiliki kemampuan menghasilkan biosurfaktan yang mengandung karbohidrat (gula total). Biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 mengandung karbohidrat dengan konsentrasi bervariasi. Kandungan gula total pada biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Alteromonas macleodii* Y 18228 sebesar 608,18 ppm.. Nilai ini sebagaimana dilaporkan Sumiardi *et al.*, (2012) relatif lebih kecil jika dibandingkan dengan bakteri lain yang memiliki kemampuan sama dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon seperti bakteri *Salipiger bermudensis* (940.30 ppm) dan *Alteriethrobacter evoxidivorans* (680.00 ppm).

Karbohidrat ditemukan pada biosurfaktan karena merupakan komponen gugus hidrofilik biosurfaktan yang bersifat polar. Nitschke *et al.*, (2004) melaporkan bahwa gugus hidrofilik biosurfaktan mengandung karbohidrat, asam amino atau peptida siklik.

Kandungan karbohidrat pada biosurfaktan yang dikarakterisasi menunjukkan bahwa biosurfaktan tersebut termasuk kelompok biosurfaktan glikolipid. Muthusamy *et al.*, (2008) menyatakan bahwa biosurfaktan yang paling dikenal adalah kelompok biosurfaktan glikolipid yaitu kombinasi karbohidrat dengan asam alifatik rantai panjang atau asam hidroksialifatik yang dihubungkan oleh gugus eter atau gugus ester. Struktur biosurfaktan jenis glikolipid dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur biosurfaktan glikolipid jenis trehalolipid yang dihasilkan *Arthrobacter* sp. (Muthusamy *et al.*, 2008).



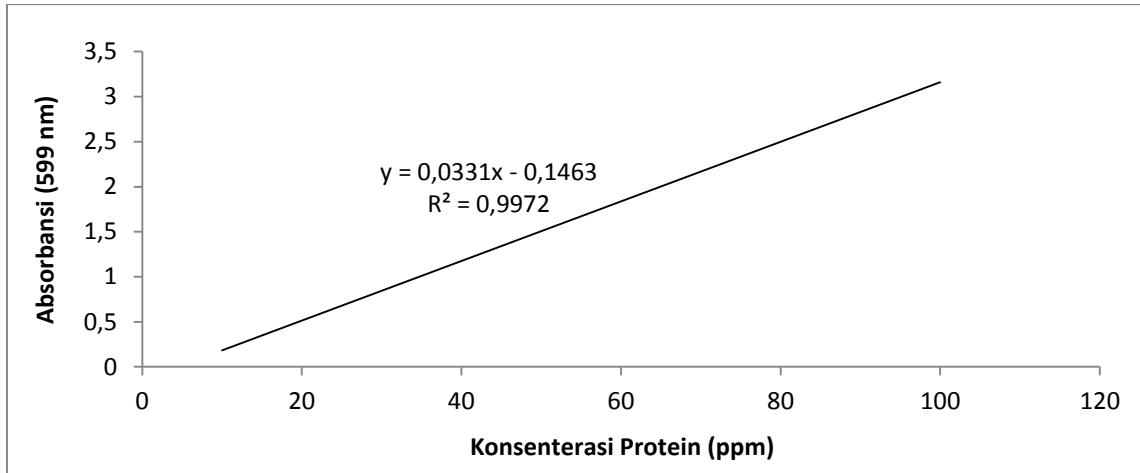
Gambar 4. Struktur rhamnolipid, jenis biosurfaktan glikolipid yang mengandung karbohidrat dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa* (Urum & Pekdemir, 2004).

Analisis Protein

Biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dikarakterisasi untuk kandungan protein menggunakan metode Bradford (Bradford, 1976). Standar *Bovine Saline Albumine* (BSA), kurva kalibrasi dan rerata protein (ppm) biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dapat dilihat pada Tabel 3, Gambar 5 dan Tabel 4.

Tabel 3. Standar *Bovine Saline Albumine* (BSA) untuk analisis protein (Metode Bradford).

Standar BSA (ppm)	Absorbansi
10	0.174
20	0.535
30	0.835



Gambar 5. Kurva kalibrasi standar untuk analisis protein (Metode Bradford).

Tabel 4. Hasil analisis rerata kadar protein (Metode Bradford).

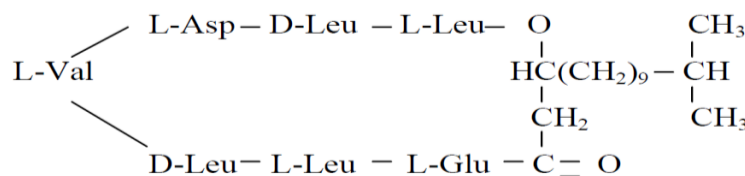
Bakteri	Absorbansi	fp	Kadar Protein (ppm)
<i>Alteromonas macleodii</i> Y 18228	0,568	1	21,59
	0,560	1	21,58
	0,570	1	21,54
Rerata	0,566	1	21,57

Hasil analisis menunjukkan bahwa bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 memiliki kemampuan untuk menghasilkan biosurfaktan yang mengandung protein. Biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 mengandung protein dengan konsentrasi bervariasi. Kandungan protein pada biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 sebesar 21,57 ppm. Nilai ini sebagaimana dilaporkan Sumiardi *et al.*, (2012) relatif lebih besar jika dibandingkan dengan bakteri lain yang memiliki kemampuan sama dalam

mendegradasi senyawa hidrokarbon seperti bakteri *Vibrio harveyi* (17,44 ppm) dan konsorsium bakteri (19,69 ppm).

Protein ditemukan pada biosurfaktan karena merupakan komponen salah satu gugus hidrofilik biosurfaktan yang bersifat polar. Rahman dan Gakpe (2008) melaporkan bahwa gugus hidrofilik biosurfaktan mengandung karbohidrat, asam amino, fosfat, peptida siklik, asam karboksilat atau alkohol.

Kandungan protein pada biosurfaktan yang dikarakterisasi menunjukkan bahwa biosurfaktan tersebut termasuk kelompok biosurfaktan yang mengandung protein. Rosenberg dan Ron (1999) melaporkan bahwa biosurfaktan yang mengandung protein adalah termasuk kelompok biosurfaktan lipopeptida yaitu kombinasi lipid dengan rantai polipeptida. Struktur biosurfaktan jenis lipopeptida dapat di lihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur surfaktin lipopeptida siklik yang dihasilkan *Bacillus subtilis* (Desai & Banat, 1997).

Analisis Lipid

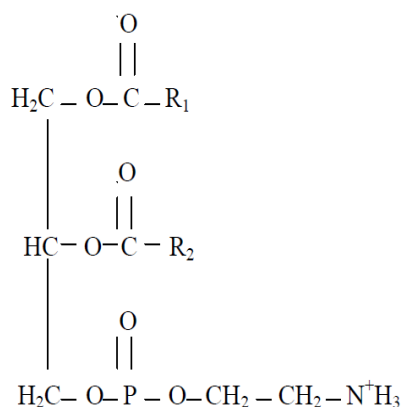
Biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dikarakterisasi untuk kandungan lipid menggunakan metode Blight dan Dryer (1995). Rerata lipid biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil analisis rerata kadar lemak (Metode Blight & Dryer).

Bakteri	Tabung + Lemak (gr)	Tabung Kosong (gr)	Lemak (gr)
	17,42	17,33	0,084
<i>Alteromonas macleodii</i> Y 18228	17,34	17,29	0,082
	17,40	17,28	0,072
Rerata	17,38	17,30	0,008

Hasil analisis menunjukkan bahwa bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 memiliki kemampuan untuk menghasilkan biosurfaktan yang mengandung lipid. Kandungan lipid pada biosurfaktan yang dihasilkan *Alteromonas macleodii* Y 18228 sebesar 0,080 g. Kosaric (2001), melaporkan bahwa kebanyakan biosurfaktan mengandung lipid kompleks dengan berat molekul tinggi dihasilkan mikroorganisme dalam kondisi aerob.

Lipid ditemukan pada biosurfaktan karena merupakan komponen gugus hidrofobik biosurfaktan yang bersifat nonpolar. Gugus hidrofobik biosurfaktan mengandung senyawa-senyawa lipid. Lang (2002), melaporkan bahwa gugus hidrofobik biosurfaktan umumnya mengandung asam lemak jenuh, asam lemak tidak jenuh, asam lemak hidroksilasi atau alkohol lemak. Struktur biosurfaktan jenis asam lemak dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur fosfatidil etanolamin, biosurfaktan yang dihasilkan *Acinetobacter* sp. Gugus R₁ dan R₂ adalah rantai hidrokarbon dari asam lemak (Desai & Banat, 1997).

Secara keseluruhan karakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Karakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dari tanah tercemar senyawa hidrokarbon dikawasan Cepu Jawa Tengah

Bakteri	OD (168 Jam)	KH (ppm)	Protein (ppm)	Lipid (gram)
<i>Alteromonas macleodii</i> Y 18228	2,006	608,18	21,57	0,080

KESIMPULAN

Karakterisasi biokimia biosurfaktan yang dihasilkan bakteri *Alteromonas macleodii* Y 18228 dari tanah tercemar senyawa hidrokarbon di kawasan Cepu Jawa Tengah dapat disimpulkan bahwa sifat dan karakter biokimia biosurfaktan ditentukan oleh kandungan karbohidrat dengan lipid dan kandungan protein dengan lipid sehingga biosurfaktan yang dihasilkan merupakan biosurfaktan jenis glikolipid dan lipopeptida. Kedua jenis biosurfaktan ini efektif untuk proses bioremediasi lahan tercemar senyawa hidrokarbon.

DAFTAR RUJUKAN

- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive for The Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing : The Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochem.* **72** : 248-254.
- Blight, E.G. & W.J. Dryer. 1995. A Rapid Method for the Total Lipid Extraction and Purification. *J. Biochem. Physiol.* **37** : 911-917.
- Bodour, A.A. & R.M. Maier. 2002. Biosurfactants: Types, Screening Methods, and Applications. In: *Encyclo. Environ. Microbial.* 1st ed. (Bitton G., ed.). John Wiley and Sons Inc. 750 - 770.
- Cameotra, S. & R. Makkar. 2004. Recent Applications of Biosurfactants as Biological and Immunological Molecules. *Current Opinion in Microbiol.* **7** : 262-266.
- Chen, S.Y., Y.H. Wei & J.S. Chang. 2007. Repeated pH-stat Fed-batch Fermentation for Rhamnolipid Production with Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76** : 67-74.
- Desai, J.D., & I.M. Banat. 1997. Microbial Production of Surfactant and Their Commercial Potential. *Microbiol. Mol. Biol.* **61** : 47-64.

- Dubois, M. 1956. Colorimetric Method For Determination of Sugar and Related Substances. **28** : 350-356.
- Jokuty P. Fingas., M.F. Whiticar & S. Fieidhouse. 1995. A Study of Viscosity and Interfacial Tensions of Oils and Emulsions. *Environ. Canada, Ottawa*. 50.
- Kosaric, N. 2001. Biosurfactants and Their Application for Soil Bioremediation. *Food Technol. Biotechnol.* **39** : 295-304.
- Lang, S. 2002. Biological Amphiphiles (Microbial Biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Inter. Sci.* **7** : 12–20.
- Mata-Sandoval, J.C., J. Kams & A. Torrents. 2000. Effect of Nutritional and Environmental Conditions on the Production and Composition of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. *Microbiol. Res.* **155** : 1-8.
- Muthusamy, K., S. Gopalakrishnan, T.K. Ravi & P. Sivachidambaram. 2008. Biosurfactants : Properties, Commercial Production and Application : Review Article. *Curr. Sci.* **94**:6.
- Kim, S.J., D.H. Choi, D.S. Sim & Y.S. Oh. 2005. Evaluation of Bioremediation Effectiveness on Crude Oil-Contaminated Sand. *Chemosphere.* **6** : 845–852.
- Nitschke, M., C. Ferraz, & G.M. Pastore, 2004. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. *Braz. J. Microbiol.*, **35**, 1-2, 81–85
- Rahman, K.S.M., I.M. Banat, T.J. Rahman, T. Thayumanavan & P. Lakshmanaperumalsamy. 2002. Bioremediation of Gasoline Contaminated Soil by Bacterial Consortium Amended with Poultry Litter, Coir Pith and Rhamnolipid Biosurfactant. *Biores. Technol.* **81** : 25-32.
- Rosenberg, E. & E.Z. Ron. 1999. High and Low-Molecular-Mass Microbial Surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52** : 154-162.
- Samadi, S., N. Abadian, A. Akhavan, M.R. Fazeli, A. Tahzibi & H. Jamalifar. 2007. Biosurfactant Production by the Strain Isolated from Contaminated Soil. *J. Biol. Sci.* **7** : 1266-1269.
- Shulga, A., E. Karpenko, R. Vildanova-Martshishin, A. Turovsky & M. Soltys. 1999. Biosurfactant

Enhanced Remediation of Oil-
Contaminated Environments.

Adsorp. Sci. Technol. **18** : 171-176.

Sumiardi, A., W. Mangunwardoyo, S.
Hudiyono, D. Susilaningsih., 2012.
Biosurfactant Characterization of
Bacterial Consortium from Soil
Contaminated Hydrocarbon in Cepu
Area, Central Java, Indonesia. *Int. J.
of Sci. & Res. Pub.*, 2 :7.

Urum, K., & T. Pekdemir, 2004. Evaluation
of Biosurfactants for Crude Oil
Contaminated Soil Washing.
Chemosphere, 57, 9, 1139–1150