JURNAL ILMU TANAH DAN LINGKUNGAN, OKTOBER 2000, h. 24-31 VOL. 3, No. 2
Journal of Soil Sciences and Environment, Oktober 2000, p. 24-31 ISSN 1410-7333

KARAKTERISASI BAKTERI PENDEGRADASI FENOL ASAL DANAU BUNTAL KALIMANTAN TENGAH

Characterization of Phenol Degrading Bacteria From Buntal Lake of Central Kalimantan

Nursaadah[1], Dwi Andreas Santosa[1,2*], dan Maggy T. Suhartono[3]

[1] Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Lingkungan PPLH IPB, Kampus IPB Darmaga, Bogor
[2] Jurusan Tanah, Faperta dan PP-Bioteknologi IPB, Kampus IPB Darmaga, Bogor
[3] Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia PP-Bioteknologi, Kampus IPB Darmaga, Bogor
*Author to correspondence, dsantosa@indo.net.id

ABSTRACT

Three bacterial isolates (ICBB 1168, ICBB 1169, ICBB 1170), being capable to utilizing phenol as sole carbon and energy source, were isolated from Buntal Lake of Central Kalimantan. Growth of all isolates were optimum at 37°C. Optimum pH for growth and phenol degradation of ICBB 1168, ICBB 1169, and ICBB 1170 were 7-8, 6, and 6-7, respectively. Among the isolates, ICBB 1170 showed best phenol degrading activity. ICBB 1170 able to degrade 16 mM phenol to 0.71 mM in 4 days. Phenol degradation ability of ICBB 1170 could be increased by adding 0.01-0.1% yeast extract. Addition of 0.05-0.1% glucose in medium inhibited phenol degradation by ICBB 1170. Cell-free extracts of ICBB 1170 had specific activity 2.92 U/mg. Degradation of benzoate by ICBB 1170 was studied. However, the ability to degrade phenol were higher than that of benzoate.

Key word: fenol, biodegradation

PENDAHULUAN

Fenol merupakan senyawa hidrokarbon aromatik yang sebagian besar terdapat dalam limbah industri, antara lain industri batu bara, kilang minyak, produksi plastik, sintesis kaprolaktam, sintesis resin, sintesis zat warna, desinfektan, dan obat-obatan (ATSDR, 1989; Suhartono, 1989). Penggunaan fenol dan turunannya dalam industri mengakibatkan tercemarnya lingkungan oleh senyawa beracun tersebut dan memberikan ancaman terhadap lingkungan. Senyawa fenol memberikan dampak gangguan kesehatan sejalan dengan peningkatan tingkatan dan lama pencemaran. Gangguan kesehatan yang timbul antara lain iritasi paru-paru, kejang otot, kehilangan koordinasi, luka pada hati, ginjal, jantung, menimbulkan kanker, melepuhkan dan membakar kulit, bahkan dapat menyebabkan kematian (ATSDR, 1989).

Senyawa fenol termasuk diantara pencemar air tanah terbesar. Badan Perlindungan Lingkungan Amerika Serikat (*EPA*) menetapkan ambang batas kandungan fenol dalam air sungai dan danau sebesar 0,3 mg/l (ATSDR, 1989; Bell *et al.*, 1999). Berkaitan dengan hal itu, perlakuan untuk menurunkan kandungan fenol dalam limbah sangat diperlukan sebelum limbah dimasukkan dalam perairan umum. Salah satu upaya untuk mengatasi pencemaran oleh fenol adalah dengan biodegradasi, yaitu menguraikan pencemar menjadi produk yang tidak berbahaya melalui reaksi enzimatik yang dilakukan oleh mikroba (Mitchell, 1992).

Salah satu lingkungan yang diperkirakan menyimpan sejumlah mikroba yang berpotensi mendegradasi fenol adalah Danau Buntal, yang termasuk dalam kawasan ekosistem air hitam di Kalimantan Tengah. Santosa *et al.* (1998) menyatakan bahwa ekosistem air hitam mengandung berbagai senyawa toksik seperti fenol, H_2S, dan logam berat (Mn, Zn, dan Pb) dengan kondisi air yang berwarna merah kehitaman, jernih, tidak berbau, berpH rendah, dan kaya akan bahan organik. Kandungan fenol dan senyawa turunannya yang tinggi mengisyaratkan adanya sejumlah mikroba yang mampu mendegradasi pencemar berupa senyawa berfenol ataupun senyawa-senyawa hidrokarbon lain, yang hingga saat ini merupakan pencemar lingkungan utama. Mikroba yang mampu hidup dalam lingkungan berfenol tinggi sangat menarik perhatian, karena dapat dipastikan mempunyai suatu mekanisme untuk menetralkan toksisitas atau mempunyai enzim-enzim yang tidak terdenaturasi oleh suasana fenol yang tinggi. Mikroba yang diisolasi dari lingkungan ini diharapkan memiliki genetik yang stabil karena telah mengalami proses adaptasi yang lama.

Penelitian yang dilakukan Djasmasari (2000), dari sampel tanah ekosistem air hitam diperoleh tiga isolat yaitu PB 138, BB 288, dan OM 343, masing-masing mampu mendegradasi fenol dengan kepekatan 16, 11, dan 10 mM. Pada isolasi sampel tanah Danau Buntal yang terletak di hulu Sungai Air Hitam Puning, diperoleh isolat yang mampu tumbuh pada medium Luria Bertani (LB) dengan konsentrasi fenol 2000 ppm (21,25 mM), namun tidak mampu tumbuh pada medium minimal dengan penambahan fenol (data tidak dipublikasikan). Hal ini diduga karena isolat tersebut tidak mampu menggunakan fenol sebagai sumber karbon dan energi bagi pertumbuhannya, tetapi hanya resisten terhadap fenol. Adanya data tersebut menyebabkan perlunya dilakukan isolasi dan karakterisasi terhadap mikroba yang mampu mendegradasi fenol dengan kepekatan yang tinggi pada sampel tanah Danau Buntal.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Kehutanan, Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Penelitian Bioteknologi Institut Pertanian Bogor, dan Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Lingkungan, Pusat Penelitian Lingkungan Hidup Institut Pertanian Bogor. Bahan yang digunakan adalah 4-aminoantipyrin, bovin serum albumin (BSA), bufer fosfat, fenol, glukosa, medium minimal cair g/l (K_2HPO_4 0,5; $MgSO_4.7H_2O$ 0,02; NH_4Cl 1; ekstrak khamir 0,2; dan *trace element* 1 ml), medium minimal agar (medium minimal + agar 20 g/l), natrium benzoate, NH_4OH, $K_3Fe(CN)_6$, reagen *coomassie blue* 0,01%, sampel tanah Danau Buntal.

Isolasi Mikroorganisme Pendegradasi Fenol

Satu ose tanah Danau Buntal dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi 10 ml medium minimal cair dengan kepekatan akhir fenol 20-24 mM sebagai sumber karbon. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan kecepatan ± 150 rpm selama 3 hari. Sebanyak 1 ml biakan dipindahkan ke dalam 10 ml medium minimal cair yang baru dan diinkubasi pada kondisi yang sama (tahap ini dilakukan tiga kali). Selanjutnya, 100 µl kultur disebar pada medium minimal agar dan dilakukan pemurnian terhadap koloni yang tumbuh.

Uji Kemampuan Mendegradasi Fenol

Semua isolat yang diperoleh ditumbuhkan dalam medium minimal cair yang mengandung fenol dengan kepekatan 1500 ppm (15,94 mM), pH 7, diinkubasi selama 45 jam pada suhu 37°C. Kepekatan fenol setelah inkubasi diukur dengan metode kolorimetrik (Greenberg *et al.*, 1992).

Penentuan Suhu dan pH Optimum Pertumbuhan

Suhu ideal yang diperlukan oleh mikroba untuk degradasi fenol secara optimal ditentukan dengan cara menumbuhkan isolat pada medium minimal cair dan medium minimal agar yang mengandung 10 mM fenol dan diinkubasi pada suhu 30°C, 37°C, dan 45°C. Penentuan pH optimum dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium yang sama pada berbagai pH, yaitu 4, 5, 6, 7 dan 8. Inkubasi dilakukan selama 45 jam. Pertumbuhan biomassa bakteri diukur mengukur rapat optis biakan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan kemampuan degradasi fenol dengan metode kolorimetri (Greenberg *et al.*, 1992).

Kemampuan Tumbuh dan Degradasi pada Berbagai Kepekatan Fenol

Kemampuan tumbuh dan degradasi pada berbagai kepekatan fenol dilakukan dengan menumbuhkan kultur pada medium minimal cair pada suhu dan pH optimumnya dalam berbagai konsentrasi fenol (10 mM – 22 mM), dan diinkubasi selama 45 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur rapat optis kultur tersebut dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm dan kemampuan degradasi fenol dengan metode kolorimetri (Greenberg *et al.*, 1992).

Kapasitas Degradasi Fenol dari Isolat Terpilih

Isolat bakteri yang telah diketahui kemampuan degradasi fenol serta kondisi abiotik untuk pertumbuhan optimal (pH dan suhu), ditumbuhkan dalam medium minimal cair yang mengandung fenol dengan kepekatan maksimal (dimana isolat bakteri masih bisa tumbuh) serta kecepatan pengocokan 150 rpm. Inokulasi dilakukan selama 4 kali berdasarkan pengukuran biomassa dan analisis fenol yang terdegradasi setiap 24 jam.

Isolat-isolat yang telah diketahui kemampuan mendegradasi fenol pada suhu dan pH optimal diuji lebih lanjut. Kurva pertumbuhan dibuat dengan mengukur rapat optis biakan pada panjang gelombang 600 nm dan kurva degradasi fenol dibuat dengan cara mengukur konsentrasi fenol dalam kultur secara kolorimetrik (Greenberg *et al.*, 1992). Pengukuran dilakukan setiap 24 jam.

Uji Aktivitas Enzim Fenol Hidroksilase

Persiapan ekstrak sel untuk analisis enzim fenol hidroksilase dilakukan dengan metode Kim and Oriel (1995). Aktivitas enzim fenol hidroksilase diukur dengan metode Gurujayelakshmi and Oriel (1989). Satu unit aktivitas enzim fenol hidroksilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang mengkonversi 1 µmol fenol per menit pada 37°C. Kepekatan protein dari enzim diukur dengan metode Coomassie Blue (Bradford, 1976) dengan menggunakan larutan bovin serum albumin (BSA) sebagai larutan standar.

Pengaruh Penambahan Glukosa dan Ekstrak Khamir terhadap Degradasi Fenol

Pengujian dilakukan dengan menumbuhkan isolat dalam meduim minaml cair pada kepekatan fenol 10 mM yang ditambahkan glukosa atau ekstrak khamir 0,01%, 0,02%, 0,05%, dan 0,1%. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Pengamatan dilakukan dengan mengukur rapat optis kultur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 60/100 x 3 = 1,8 dan kemampuan degradasi fenol dengan metode kolorimeter (Greeberg *et. al*, 1992).

Uji Potensi Degradasi Benzoat.

Isolat-isolat yang telah diketahui kemampuan degradasi terhadap fenol pada berbagai kondisi diujikan pertumbuhannya serta kemampuannya mendegradasi benzoat. Pembiakan dilakukan pada medium minimal cair yang mengandung 6 mM benzoat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil isolasi sampel tanah Danau Buntal, diperoleh 13 isolat yang mampu tumbuh pada medium minimal agar dengan penambahan fenol. Hasil pengujian kemampuan mendegradasi fenol menunjukkan hanya tiga isolat yang mampu mendegradasi fenol di atas 10 mM dalam waktu 45 jam, yaitu ICBB 1168, ICBB 1169, dan ICBB 1170. Pengujian selanjutnya dilakukan terhadap tiga isolat tersebut.

Pada pengujian kemampuan tumbuh dan mendegradasi fenol pada berbagai tingkatan pH didapatkan hasil bahwa isolat ICBB 1170 mempunyai pertumbuhan optimum dan kemampuan degradasi fenol mencapai hampir 100% pada kisaran pH 6 dan 7, sedangkan isolat ICBB 1168 mempunyai kondisi pH optimum pada kisaran pH 7 dan 8 dan isolat ICBB 1169 hanya pada pH 6. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut mampu tumbuh dan mendegradasi fenol pada pH rendah antara (4.0 - 5.0). Hal ini memungkinkan pemanfaatan ketiga isolat untuk digunakan dalam mengatasi limbah berfenol dalam lingkungan yang asam.

Hasil pengukuran pH pada akhir inkubasi terlihat adanya penurunan pH medium menjadi 3,2 – 3,9 (Tabel 1). Hal ini disebabkan fenol yang terdapat dalam medium telah terombak guna pertumbuhan isolat menjadi senyawa asam. Pada proses degradasi secara aerob, fenol dikonversi secara enzimatik oleh fenol hidroksilase menjadi katekol. Kemudian melalui beberapa tahap reaksi, katekol akan diubah menjadi piruvat dan asetaldehid (jalur *meta/extradiol*) atau menjadi suksinat dan asetil-Ko-Enzim A (jalur *ortho/intradiol*), yang pada akhirnya dapat memasuki siklus asam trikarboksilat (TCA) (Glick and Pasternak, 1994; Schlomann, 1994).

Tabel 1. Hasil penentuan pH optimum pertumbuhan dan degradasi fenol

Isolat	pH optimum	OD 600nm	pH akhir	Penurunan konsentrasi fenol (%)
ICBB 1168	7 - 8	1,182	3,9	100
ICBB 1169	6	1,082	3,2	98,88
ICBB 1170	6 - 7	1,426	3,3	100

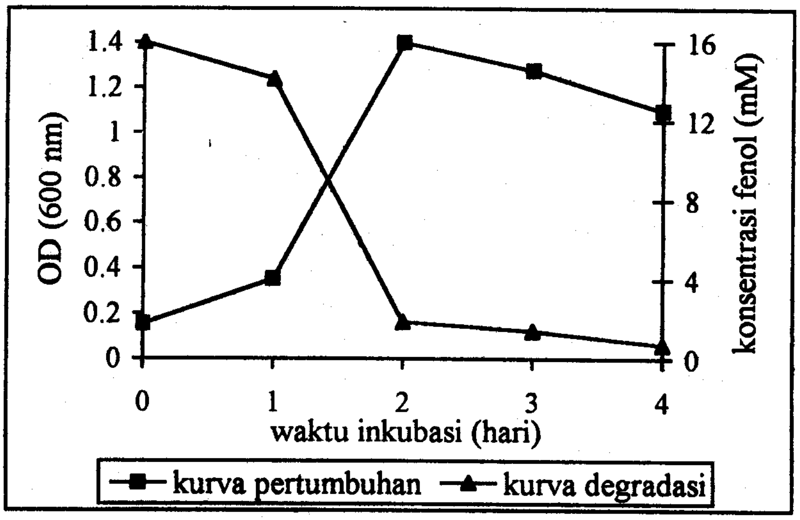
Hasil penentuan suhu optimum pertumbuhan yang dilakukan pada suhu 30°C, 37°C, dan 45°C, menunjukkan bahwa ketiga isolat mampu tumbuh dengan baik pada suhu 30°C dan 37°C. Dengan pertumbuhan optimum terlihat pada suhu 37°C, sedang pada suhu 45°C tidak terlihat adanya pertumbuhan.

Pengujian pada berbagai kepekatan fenol memperlihatkan bahwa isolat ICBB 1170 mempunyai kemampuan tumbuh dan mendegradasi fenol tertinggi . Pada kepekatan fenol 18 mM isolat ICBB 1170 mampu mendegradasi fenol sampai 93,5% dari total yang diberikan, sehingga fenol yang terombak sekitar 16,84 mM. Isolat ICBB 1168 dapat tumbuh dan mendegradasi fenol sebesar 80,5% dari kepekatan fenol dalam medium yang mengandung 18 mM fenol, sehingga yang terombak sekitar 14,49 mM. Isolat ICBB 1169 merupakan isolat yang paling rendah dalam kemampuan tumbuh dan degradasi fenolnya, dimana isolat ini hanya mampu mendegradasi 92,1% dari kepekatan 14 mM atau sebesar 12,89 mM.

Hasil pengamatan morfologi menunjukkan bahwa ketiga isolat merupakan bakteri Gram negatif dengan bentuk sel dan koloni bulat. Bakteri pendegradasi fenol terbaik yang pernah dilaporkan yaitu *Pseudomonas* sp strain CP4, mampu hidup pada kandungan fenol sebesar 1500 ppm (15,94 mM) (Babu *et al.*, 1995).

Uji kapasitas degradasi fenol dilakukan terhadap isolat terpilih yaitu ICBB 1170 dengan hasil seperti terlihat pada Gambar 1. Pengamatan selama 4 hari dengan pengambilan contoh setiap hari, menunjukkan bahwa penurunan tajam kepekatan fenol terjadi antara hari pertama dan kedua.

Aktivitas spesifik enzim fenol hidroksilase yang diisolasi di medium pertumbuhan isolat bakteri ICBB 1170 diperoleh sebesar 2,92 U/mg. Kukor dan Olsen (1990) telah melakukan pengujian enzim fenol hidroksilase bakteri Gram negatif *Pseudomonas pickettii* PKO1 yang ditumbuhkan pada kepekatan 5 mM. Enzim tersebut mempunyai aktivitas spesifik 0,2 U/mg.



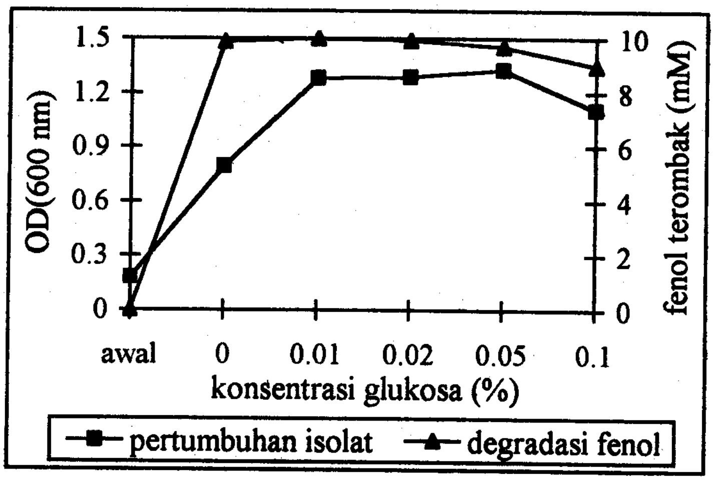
Gambar 1. Kurva pertumbuhan dan kurva degradasi fenol isolat ICBB 1170

Penambahan glukosa pada medium minimum yang mengandung fenol menunjukkan fenomena antagonis (Gambar 2). Bila kepekatan glukosa yang diberikan berkisar antara 0,01-0,02% glukosa tidak mempengaruhi proses degradasi fenol. Sedangkan penambahan 0,05-0,1% glukosa menyebabkan degradasi fenol menurun. Penurunan degradasi fenol diduga akibat adanya represi katabolit oleh glukosa terhadap pembentukan enzim yang diperlukan dalam proses degradasi fenol.

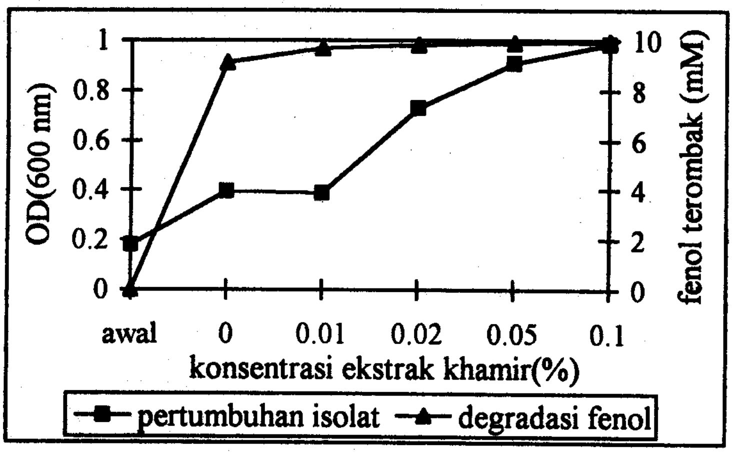
Mikroba yang mampu memanfatkan sumber karbon selain glukosa, biasanya menggunakan sistem jaringan cAMP-CAP. Bila ada glukosa enzim adenilat siklase menjadi tidak aktif, sehingga tidak mampu membentuk cAMP (3',5'-adenosin monofosfat siklik). Hal ini mengakibatkan CAP (protein pengaktif katabolit) tidak dapat terikat pada DNA, karena komplek cAMP-CAP tidak terbentuk. Pengikatan cAMP-CAP pada DNA penting untuk mengaktifkan proses transkripsi (Neidhardt *et al.*, 1990). Penelitian Zhou *et al.* (1989) menunjukkan bahwa isolat khamir mengalami penurunan kemampuan degradasi senyawa aromatik trinitrotoluen setelah penambahan glukosa 0,05-0,1% pada medium pertumbuhannya.

Penambahan ekstrak khamir ke dalam medium menunjukkan bahwa semakin tinggi kepekatan ekstrak khamir yang ditambahkan (0,01 sampai dengan 0,1%) pada medium minimal, akan semakin meningkatkan pertumbuhan isolat dan degradasi fenol (Gambar 3). Menurut Cowan (1975), ekstrak khamir merupakan bahan yang kaya asam amino dan vitamin B-komplek, sehingga dapat memacu pertumbuhan isolat. Hasil penelitian Zhou *et al.* (1989) menunjukkan bahwa semakin meningkatnya kepekatan ekstrak khamir dari 0 sampai 0.1%, ternyata meningkatkan kemampuan isolat khamir untuk mendegradasi senyawa aromatik trinitrotoluen. Kemampuan untuk tumbuh dalam medium minimal agar yang ditambah benzoat, memperlihatkan bahwa isolat ICBB 1170 mampu tumbuh dengan baik.

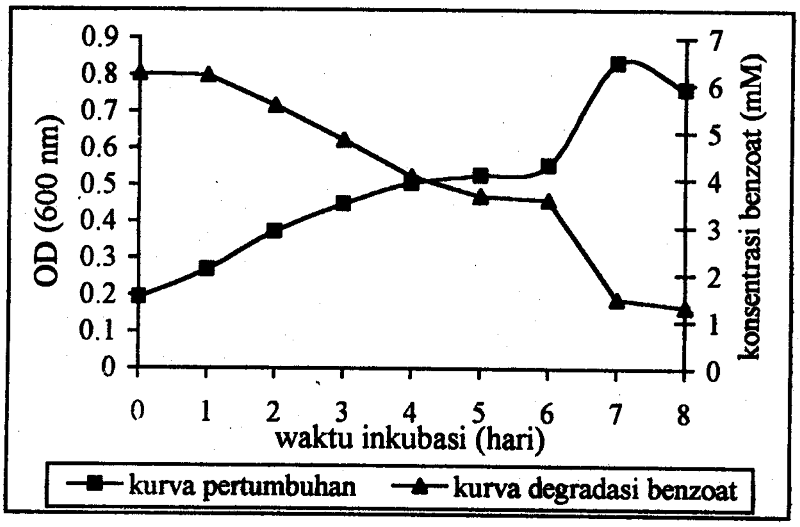
Hal ini menunjukkan bahwa isolat tersebut diduga mampu memanfaatkan benzoat yang diberikan sebagai sumber karbon. Kurva pertumbuhan diisolat ICBB 70 yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung benzoat dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 2. Pengaruh penambahan glukosa terhadap pertumbuhan isolat dan degradasi fenol isolat ICBB 1170



Gambar 3. Pengaruh penambahan ekstrak khamir terhadap pertumbuhan isolat dan degradasi fenol isolat ICBB 1170



Gambar 4. Kurva pertumbuhan dan kurva degradasi benzoat isolat ICBB 1170

Hasil yang diperoleh menunjukkan isolat ICBB 1170 membutuhkan waktu 8 hari untuk menurunkan konsentrasi benzoat dari 6 mM menjadi tinggal 1,31 mM. Beberapa penelitian melaporkan mengenai kemampuan satu mikroorganisme dalam mendegradasi beberapa senyawa aromatik (fenol, benzoat, benzene, dan turunannya), diantaranya *Pseudomonas* sp. strain JS150 (Haigler *et al.*, 1992), *Rhodococcus opacus* (Zaitsev *et al.*, 1995), dan *Candida* sp ICBB 1167 (belum dipublikasi).

Kemampuan isolat ICBB 1170 dalam mendegradasi benzoat, menunjukkan bahwa keduanya memiliki gen-gen yang menyandikan enzim pendegradasi benzoat. Menurut Altenschmidt *et al.* (1993), benzoat akan terdegradasi menjadi katekol (1,2-dihidroksibenzen), protokatekuat (3,4-dihidroksibenzoat), atau gentisat (2,5-dihidroksibenzoat).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terselenggara melalui dana yang sebagian diperoleh dari RUT V atas nama Dr. Dwi Andreas Santosa serta dari Indonesian Center for Biodiversity and Biotechnology (ICBB), http://www.icbb.org. Ucapan terimakasih disampaikan juga kepada Laboratorium Bioteknologi Kehutanan, Pusat Penelitian Bioteknologi IPB dan Laboratorium Mikrobiologi Lingkungan Pusat Penelitian

Lingkungan Hidup IPB. Seluruh isolat didepositkan dalam Koleksi Kultur Mikroorganisme ICBB.

DAFTAR PUSTAKA

Altenschmidt, U., B. Oswald, E. Steiner, H. Herrmann, and G. Fuchs. 1993. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. J. Bacteriol. 175:4851-4858.

ATSDR 1989. Toxicological profile for phenol. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). http://www.ecousa.net/toxics/phenol.html. December 1989.

Babu, K.S., P.V. Ajithkumar, and A.A.M. Kunhi. 1995. Mineralization of phenol and its derivates by *Pseudomonas* sp. strain CP4. World J. Microbiol. Biotechnol. 11:661-664.

Bell, J., E. Young, and S. Stephens. 1999. Phenol degradation pathway (Anaerobic) http.//www.labmed.umn.edu/umbbd'phe/phe-map.html. 9 September 1999

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal. Biochem. 72:244-254

Cowan, S.T. 1975. Manual for The Identification of Medical Bacteria. Cambridge Univercity Press. Australia.

Djasmasari, W. 2000. Isolasi dan karakterisasi bakteri perombak fenol dari ekosistem air hitam Kalimantan Tengah. Thesis. IPB.

Glick, B.R. and J.J. Pasternak. 1994. Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant DNA. ASM Press. Washington, D.C.

Greenberg, E.A., S.L. Clesceri, and A.D. Eaton. 1992. Standard Methods for Examination of Water and Waste Water. APHA. Washington.

Gurujeyalakshmi, G and P. Oriel. 1989. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. Appl. Environ. Microbiol. 55:500-502.

Haigler, B.E., C.A. Pettigrew, and J.C. Spain. 1992. Biodegradation of mixtures of subtituted benzenes by *Pseudomonas* sp. Strain JS150. J. Appl. Environ. Microbiol. 58:2237-2244

Kim, S.C. and P.J. Oriel. 1995. Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* BR219 phenol hydroxylase gene. Appl. Environ. Microbiol. 61:1252-1256.

Kukor, J.J. and R.H. Olsen. 1990. Molecular cloning, characterization, and regulation of a *Pseudomonas pickettii* PKO1 gene encoding phenol hydroxylase and expression of the gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c. J. Bacteriol. 172:4624-4630.

Mitchell, R. 1992. Enviromental Microbiology. John Wiley and Sons, Inc. New York.

Neidhardt, F.C., J.L. Ingraham, and M. Schaechter. 1990. Physiology of The Bacterial Cell: a Molecular Approach. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts.

Santosa, D.A., M.T. Suhartono, R. Saraswati, dan A. Suwanto. 1998. Ekosistem Air Hitam (*Black Water Ecosystem*): Biodiversitas makro dan mikro, isolasi DNA *in situ*, dan kloning shutgun gen penyandi ekstremozim. Laporan Riset Unggulan Terpadu V (1997-1998). Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi. Dewan Riset Nasional.

Schlomann, M. 1994. Evolution of chlorocatechol catabolic pathway. Biodegradation. 5:301-321.

Shoreit, A.A.M. and M.S.A. Shabeb. 1994. Utilization of aromatic compounds by phototrophic purple nonsulfur bacteria. Biodegradation. 5:71-76.

Suhartono, M.T. 1989. Enzim dan Bioteknologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. IPB.

Zaitsev, J.M., J.S. Uotila, I.V. Tsiko, A.G. Lobanok, and M.S. Salonen. 1995. Utilization of halogenated benzenes, phenol, and benzoat by *Rhodococcus opacus* GM-14. Appl. Environ. Microbiol. 61:4191-4201.

Zhou, P., P. Yin, and F.Y. Bai. 1989. Biodegradation of trinitrotoluen (TNT) by Yeasts and Yeast-like fungi. P. 695-701. Proc. of International Conf. on Asian Network on Microbial Researches. Yogyakarta.