

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/297758831>

Pengayaan-Bertingkat Dibenzothiophene pada Sampel Tanah Pertambangan Batubara untuk Mengisolasi Bakteri Desulfurisasi

Conference Paper · May 2013

DOI: 10.13140/RG.2.1.1871.2729

CITATION

1

READS

327

4 authors, including:



Megga Ratnasari Pikoli

Syarif Hidayatullah State Islamic University Jakarta

30 PUBLICATIONS 36 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Puji Astuti

Syarif Hidayatullah State Islamic University Jakarta

2 PUBLICATIONS 1 CITATION

[SEE PROFILE](#)



Nur Amaliah Solihat

Syarif Hidayatullah State Islamic University Jakarta

3 PUBLICATIONS 12 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Biodesulfurization [View project](#)

Pengayaan-Bertingkat Dibenzothiophene pada Sampel Tanah Pertambangan Batubara untuk Mengisolasi Bakteri Desulfurisasi

Megga Ratnasari Pikoli ^{*1}, Puji Astuti ², Faridah Ahmad ² dan Nur Amaliah Solihat ²

¹Prodi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
**meggapikoli@yahoo.com*

²Lab. Biologi Pusat Laboratorium Terpadu (PLT) UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

Abstrak. Upaya untuk memperoleh isolat bakteri yang mampu mendesulfurisasi sulfur organik dalam batubara telah dilakukan. Metode yang ditampilkan dalam penelitian ini adalah pengayaan bertingkat, yaitu sampel tanah pertambangan diberi penambahan dibenzothiophene (DBT) kemudian diperkaya lebih lanjut dalam 4 kali transfer ke dalam medium cair yang mengandung DBT. Hasil penelitian menunjukkan terdapat isolat-isolat yang khas diperoleh dari metode pengayaan-bertingkat dibandingkan dengan pengayaan satu-tahap. Hasil verifikasi berdasarkan pengamatan pertumbuhan, produksi sulfat, dan penurunan konsentrasi DBT pada tiga isolat terpilih menunjukkan mereka dapat tumbuh menggunakan DBT sebagai satu-satunya sumber sulfur. Salah satu isolat yang unggul mampu mendesulfurisasi hingga 76,10% dari 1 millimolar DBT. Hal ini membuktikan metode pengayaan bertingkat menggunakan DBT dapat digunakan untuk mengeksplorasi bakteri desulfurisasi sulfur organik.

Kata kunci : Batubara, Dibenzothiophene, Desulfurisasi, Bakteri

PENDAHULUAN

Bahan bakar fosil seperti batubara mengandung bahan campuran sulfur organik dan anorganik. Pembakaran bahan tersebut mengarah kepada pelepasan sulfur oksida (SO_x) yang berperan terhadap hujan asam dan polusi udara [1]. BIODESULFURISASI merupakan metode untuk mengurangi sulfur dengan menggunakan mikroorganisme. Metode ini sangat menjanjikan karena bekerja pada suhu dan tekanan ambient dan menunjukkan metabolisme yang spesifik [2].

Dibenzothiophene (DBT) merupakan senyawa sulfur organik yang khas dalam bahan bakar fosil sehingga telah dipilih sebagai senyawa model untuk penanganan sulfur batubara [3, 4]. Selain itu, DBT mendominasi, yaitu 70% dari komponen sulfur dalam bahan bakar fosil [5].

Berdasarkan hal itu, DBT berpotensi digunakan sebagai faktor pengaya dalam memperoleh bakteri desulfurisasi sulfur organik dalam batubara.

Dalam rangka memperoleh isolat lokal pengguna sulfur organik dalam batubara, pada penelitian ini, isolasi dilakukan menggunakan pengayaan DBT melalui dua tahap. Pengayaan-bertingkat ini dilakukan pada sampel tanah dari pertambangan batubara yang didahului dengan pemberian DBT secara langsung, tanpa penambahan medium. Pada tahap selanjutnya, pada sampel tanah yang telah diperkaya dilakukan penambahan DBT yang kemudian kultur dipelihara dalam medium cair. Cara ini diharapkan dapat menjangkau secara spesifik bakteri desulfurisasi pengguna DBT sebagai sumber sulfur.

METODE PENELITIAN

SAMPEL DAN MEDIUM

Sampel tanah diperoleh dari bekas galian batubara subbituminus dari pertambangan Muara Tigo Besar Utara, Sumatera Selatan. Medium yang digunakan adalah Minimal Salt Medium (MSM). Dalam volume 1 liter MSM terdiri atas 2 g gliserol; 4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 4 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 2 g NH_4Cl ; 0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,001 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; dan 0,001 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [6]. Medium MSM diberi tambahan batubara bubuk sebanyak 10% (b/v) yang berukuran ≤ 200 mesh. Kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 1,5 atm selama 15 menit. DBT disiapkan secara terpisah dari medium basal. DBT dilarutkan dalam etanol hingga 10 mM. Untuk membuat medium MSM+DBT, MSM steril diberi 0,1 mM DBT (0,1% w/v) sebagai sumber sulfur [7]. Pemantauan pertumbuhan sel *viable* dilakukan dengan medium *Trypticase Soy Agar* (TSA, Oxoid).

PENGAYAAN BERTINGKAT

Sampel tanah sebanyak 100 g yang telah dihaluskan (100 mesh) dimasukkan ke dalam beaker glass dan ditambahkan 0,1 mM DBT dan diinkubasi pada suhu ruang selama 28 hari. Kelembaban sampel tanah dijaga selama proses pengayaan berlangsung dengan menambahkan beberapa tetes aquades steril. Sampel tanah diambil pada hari ke-0, 7, 14, 21, dan 28 untuk keperluan isolasi dan penghitungan jumlah bakteri total dan bakteri desulfurisasi.

Lima gram sampel tanah yang telah diperkaya pada tahap pertama dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 95 ml MSM+DBT. Kultur diinkubasi pada rotary shaker dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur ruang selama 3 hari. Selanjutnya 10% (v/v) kultur ini diinokulasikan ke dalam medium baru dan diinkubasi kembali. Hal ini dilakukan sampai tiga kali transfer, untuk

memperkaya jumlah bakteri [8]. Sebagai pembandingan, isolasi juga dilakukan dari sampel tanpa pengayaan lanjutan, melainkan pengayaan satu tahap, yaitu diisolasi hanya dari tanah yang diperkaya DBT, tanpa pengayaan lanjutan dalam medium cair.

ISOLASI BAKTERI

Pada kultur akhir pengayaan, dilakukan pengenceran berseri dengan cara sebanyak 1 ml sampel diambil kemudian diencerkan dalam 9 ml NaCl 0,85% lalu dari tiap pengenceran, suspensi diambil 0,1 ml dan ditanam pada plate agar TSA dengan teknik sebar. Kemudian tiap plate agar diinkubasi pada temperatur ruang selama 48 jam. Koloni yang tumbuh dihitung jumlahnya dan dicatat morfologinya. Kemurnian isolat dicek dengan pewarnaan Gram. Koloni murni yang ditumbuhkan dalam medium TSA miring dan disimpan pada suhu 4°C sebagai kultur stok.

PENGUJIAN DESULFURISASI

Isolat-isolat yang diperoleh diuji kemampuannya dalam melakukan desulfurisasi DBT selama pertumbuhannya. Pengujian meliputi 4 tahap, yaitu pengujian tahap-1 dengan mengamati pertumbuhan kualitatif pada medium MSM+DBT+Batubara agar, pengujian tahap-2 melalui pengukuran konsentrasi sel, pH dan produksi sulfat dalam bentuk kurva, pengujian tahap-3 mengenai kemampuan desulfurisasi DBT melalui pengurangan konsentrasi DBT, dan pengujian tahap-4 mengenai kemampuan isolat dalam melakukan desulfurisasi DBT (divariasikan meningkat) dengan keberadaan batubara. Pertumbuhan diamati dari kultur dalam medium MSM-DBT yang diinkubasi pada suhu ruang dengan agitasi 120 rpm. Pencuplikan dilakukan pada jam ke-0, 4, 8, 16, 24, 48, dan 64 untuk pengukuran enumerasi sel, pH dan produksi sulfat. Supernatan kultur diberi perlakuan

AKTIVITAS

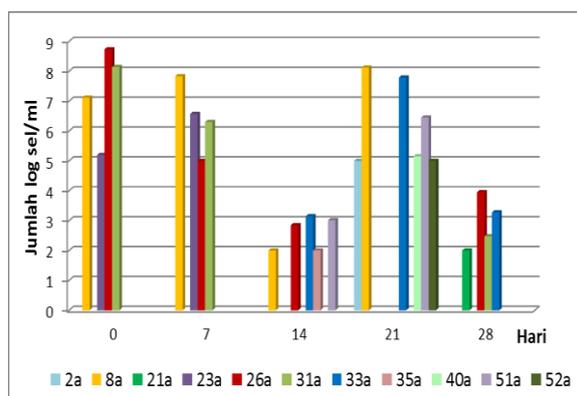
pengasaman, kemudian diukur absorbansi pada $\lambda=460$ nm untuk mengetahui produksi sulfat, dan pada $\lambda=328$ nm untuk mengetahui konsentrasi DBT.

Selanjutnya isolat diuji kemampuannya dalam medium dengan konsentrasi DBT yang bervariasi. Medium yang digunakan diberi penambahan batubara sebanyak 10% (b/v) dan penambahan DBT yang divariasikan menjadi 0,1, 0,25, 0,5, dan 1 mM. Parameter yang diukur adalah pengurangan DBT pada waktu-waktu di sekitar puncak pertumbuhan isolat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

JUMLAH DAN FREKUENSI ISOLAT

Hasil pengamatan morfologi koloni dan sel menunjukkan diperoleh 11 macam isolat dari metode pengayaan-bertingkat, yang muncul dengan jumlah berbeda-beda selama waktu sampling (Gambar 1). Sebagai pembanding, metode tanpa pengayaan-lanjutan telah menjangkit 16 macam isolat. Hal ini menunjukkan bahwa metode pengayaan-bertingkat menciptakan kompetisi di antara bakteri-bakteri dalam sampel, sehingga yang berhasil ditumbuhkan tidak seluruhnya merupakan isolat yang sama dengan metode pengayaan satu tahap.



Gambar 1. Jumlah sel isolat bakteri hasil pengayaan-bertingkat selama waktu sampling

Isolasi dengan metode pengayaan-bertingkat menumbuhkan beberapa isolat bakteri yang sama dengan bakteri yang diperoleh dengan metode pengayaan satu tahap, yaitu isolat 2a, 8a, 21a, 26a, 31a, 33a, dan 35a (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut memiliki kemampuan untuk memanfaatkan medium yang diperkaya dengan batubara dan DBT, sedangkan isolat yang tidak muncul pada metode pengayaan-bertingkat tidak dapat memanfaatkan medium tersebut sehingga tidak dapat tumbuh di dalamnya. Pengayaan akan menyeleksi bakteri-bakteri r-strategist yang mampu tumbuh dengan cepat [9]. Hal ini menunjukkan bahwa pengayaan dengan DBT dapat mengaktivasi bakteri-bakteri yang semula tidak dominan. Medium yang digunakan dalam pengayaan berisi konsentrasi sulfur organik yang lebih banyak daripada di lingkungan alamnya (tanah), sehingga memperkaya populasi minoritas yang mampu tumbuh dengan cepat [10]. Diduga bakteri yang muncul pada metode pengayaan-bertingkat telah memperoleh kondisi pertumbuhan yang sesuai dengan sumber nutrisi dan pengocokan dalam waktu yang lama, sehingga dapat tumbuh dominan dalam medium dan mudah untuk diisolasi. Sementara itu, bakteri yang tidak muncul, populasinya kalah dari bakteri yang dominan di dalam medium karena tidak mampu memanfaatkan medium dengan baik.

Beberapa isolat pada metode pengayaan-bertingkat tidak terisolasi pada metode pengayaan-satu tahap, yaitu isolat-isolat 23a, 40a, 51a dan 52a. Hal ini berarti metode pengayaan-bertingkat dapat menumbuhkan isolat-isolat yang tidak diperoleh dengan metode lain. Metode pengayaan-bertingkat didahului dengan kultivasi secara berturut-turut dari sampel tanah yang diambil dari wadah pengayaan DBT. Kultivasi akan mengadaptasi dan menggiatkan pertumbuhan bakteri-bakteri yang sulit ditumbuhkan dengan cara pengayaan biasa. Metode

pengayaan memungkinkan giatnya berkembangbiakan mikroorganisme target sehingga dapat terisolasi dan dengan pengayaan selektif dapat menekan pertumbuhan mikroorganisme saingan yang tidak diinginkan [11].

Tabel 1. Perbandingan Frekuensi Kemunculan Isolat dari Empat Kali Isolasi

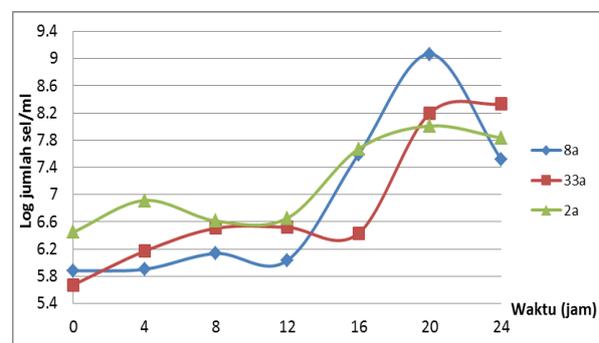
No	Kode Isolat	Pertumbuhan	Frekuensi Kemunculan	
			PB	PST
1	1a	-	2	-
2	2a	++++	2	1
3	8a	++++	2	4
4	9a	+	2	-
5	10a	-	2	-
6	21a	-	2	1
7	23a	-	-	2
8	26a	-	1	4
9	31a	+	1	1
10	33a	++++	2	3
11	34a	++++	1	-
12	35a	-	1	1
13	36a	+	1	-
14	40a	+++	-	1
15	41a	-	1	-
16	44a	+++	2	-
17	45a	++++	1	-
18	48a	+++	1	-
19	51a	+	-	2
20	52a	++++	-	1

Keterangan : PB = Pengayaan bertingkat; PST = Pengayaan satu tahap; -= 0 koloni ; + = 10-50 koloni; ++ = 51-100 koloni; +++ = 101-200 koloni; ++++ = lebih dari 200 koloni.

HASIL PENGUJIAN

Hasil pengujian tahap-1 menunjukkan dari 20 isolat terdapat 13 isolat yang mampu tumbuh pada medium MSM+DBT+Batubara agar (Tabel 1). Berdasarkan hasil pengujian pada medium MSM+DBT+Batubara agar serta frekuensi kemunculan isolat selama diisolasi, isolat-isolat 2a, 8a, dan 33a diduga memiliki potensi yang baik dalam biodesulfurisasi sulfur organik sehingga dipilih untuk diuji pada tahap selanjutnya.

Pola pertumbuhan ketiga isolat menunjukkan fase adaptasi yang cukup panjang, yaitu isolat-isolat 2a dan 8a hingga jam ke-12, bahkan isolat 33a hingga jam ke-16. Hal ini ditandai dengan tidak terjadinya peningkatan jumlah sel yang signifikan selama fase tersebut. Selama fase adaptasi dari pertumbuhan, bakteri aktif tapi tidak berkembang biak. Diduga pada fase adaptasi ini, bakteri melakukan sintesis enzim-enzim yang sesuai dengan media yang digunakan terutama DBT yang merupakan satu-satunya sumber sulfur di dalam medium. Hal inilah yang diduga menyebabkan waktu adaptasi berlangsung cukup lama. Produksi enzim pendegradasi DBT memungkinkan bakteri dapat menggunakan semua sumber nutrisi yang ada di dalam medium termasuk sulfur yang berasal dari DBT. Hal ini dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri hingga mencapai fase eksponensial.



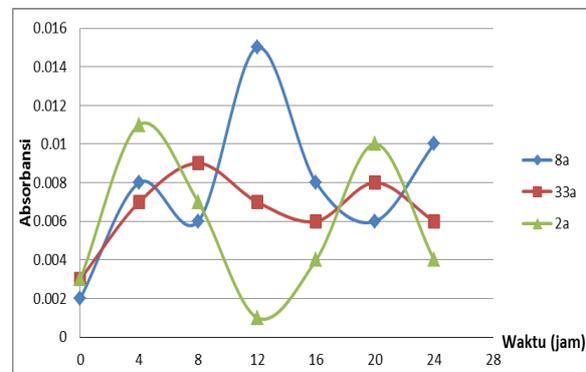
Gambar 2. Pertumbuhan isolat-isolat terpilih pada medium cair MSM+DBT (suhu ruang dan agitasi 120 rpm)

Pada Gambar 2 juga dapat dilihat bahwa isolat 8a memiliki tingkat pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat 2a dan 33a meskipun tidak signifikan. Isolat 8a mencapai konsentrasi sel tertinggi pada jam ke-20 dengan konsentrasi mencapai 10^9 sel/ml. Berdasarkan hal tersebut diduga bahwa isolat 8a dapat mendegradasi DBT lebih baik dibandingkan dengan dua isolat lain. Isolat 8a juga terisolasi dari metode pengayaan satu-tahap, dengan frekuensi kemunculan lebih rendah [12]; sedangkan pada metode pengayaan-bertingkat, isolat ini tumbuh pada semua waktu isolasi.

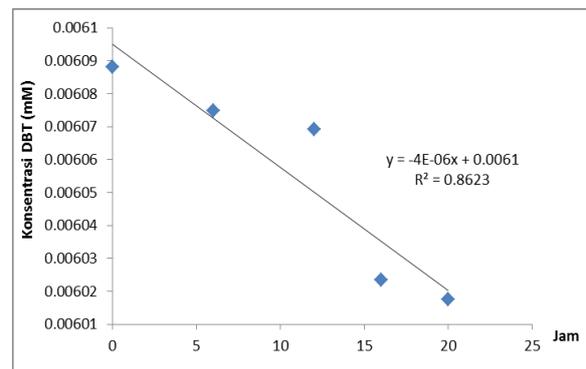
Kehadiran sulfat dalam medium dapat mengindikasikan bahwa bakteri dalam medium tersebut dapat mendegradasi DBT melalui jalur 4S. Telah diketahui dari jalur 4S, DBT didegradasi oleh bakteri menjadi 2HBP dan sulfat yang dapat teroksidasi menjadi sulfat [13]. Nilai absorbansi dari produksi sulfat oleh ketiga isolat menunjukkan hasil yang berbeda-beda dan berfluktuasi, yaitu berkisar 0,001 – 0,015 (Gambar 3). Fluktuasi produksi sulfat beriringan dengan pertumbuhan sel. Produksi sulfat yang meningkat menunjukkan meningkatnya sel mendegradasi DBT menjadi sulfat. Namun produksi sulfat yang meningkat akan diiringi penurunan pertumbuhan sel karena sel tidak dapat menahan pengaruh asam yang berlebihan. Bahan-bahan organik yang dilepaskan dari lisis sel akan memberikan efek buffering dan meningkatkan pH medium. Sel-sel yang tersisa akan bereproduksi dan mendegradasi DBT sehingga produksi sulfat kembali meningkat. Demikian seterusnya sampai akhir masa inkubasi.

Berbeda dari isolat-isolat 2a dan 33a, isolat 8a dapat memproduksi sulfat pada jumlah populasi yang rendah, dan absorbansi produksi sulfat mengalami penurunan ketika populasinya meningkat. Hal ini menunjukkan

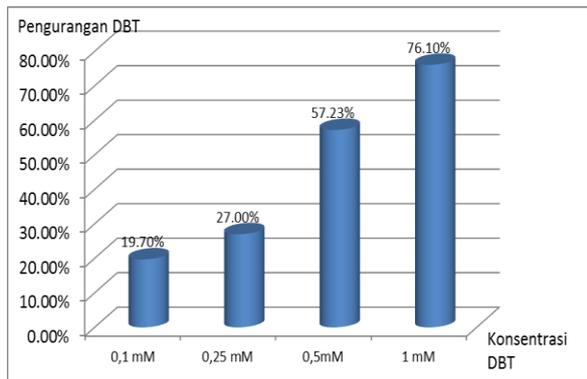
bahwa isolat 8a dapat mendegradasi DBT meskipun pada populasi yang rendah, sedangkan penurunan kadar sulfat yang terjadi belum dapat diketahui pasti penyebabnya, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hasil degradasi DBT serta reaksi yang terjadi di dalam medium. Berdasarkan hubungan antara produksi sulfat dan pertumbuhannya, berbeda dengan isolat 2a dan 33a, isolat 8a menunjukkan bahwa sel-selnya dapat bertahan pada kadar sulfat yang tinggi sehingga tidak mengalami penurunan jumlah sel pada saat kadar sulfat meningkat.



Gambar 3. Nilai absorbansi produksi sulfat isolat-isolat terpilih pada medium MSM+DBT (suhu ruang dan agitasi 120 rpm)



Gambar 4. Pengurangan konsentrasi DBT isolat 8a pada medium MSM+DBT (suhu ruang dan agitasi 120 rpm)



Gambar 5. Pengurangan konsentrasi DBT isolat 8a pada medium MSM+Batubara+DBT (suhu ruang dan agitasi 120 rpm)

Tingginya tingkat pertumbuhan dan nilai absorbansi sulfat yang ditunjukkan oleh isolat 8a, mengindikasikan bahwa isolat tersebut memiliki potensi dalam biodesulfurisasi sulfur organik. Oleh karena itu, isolat 8a diuji lebih lanjut kemampuannya mengurangi DBT. Pada Gambar 4 tampak bahwa terdapat korelasi antara penurunan konsentrasi DBT dengan penambahan waktu, meskipun persentase penurunan hanya 1,12% sampai jam ke-20.

Penelitian dilanjutkan dengan pengujian pengurangan DBT dalam medium yang mengandung batubara, dengan penambahan DBT yang divariasikan (Gambar 5). DBT yang digunakan divariasikan dalam konsentrasi yang meningkat dibandingkan dengan sebelumnya (0,1 mM). Pengamatan pengurangan DBT dilakukan setelah inkubasi 20 jam, berdasarkan puncak pertumbuhan yang dapat dilihat pada Gambar 2.

Konsentrasi DBT 0,1 mM yang digunakan pada pengujian tahap-4 ini sama dengan yang digunakan pada pengujian tahap-3, namun pada pengujian tahap-3 tidak ditambahkan batubara, sedangkan pada percobaan ini ditambahkan batubara. Penambahan batubara terbukti menambah nutrisi bagi pertumbuhan isolat sehingga isolat dapat mendegradasi DBT lebih banyak,

yaitu dari 1,2% dalam medium tanpa batubara menjadi 19,7% dalam medium dengan batubara, keduanya dengan konsentrasi DBT yang sama (0,1 mM). Batubara menyediakan nutrisi bagi bakteri sebagai sumber karbon; bahkan bakteri-bakteri tertentu menggunakan batubara sebagai satu-satunya sumber karbon [14].

Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa penggunaan DBT yang ditampilkan dalam bentuk pengurangan DBT mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi DBT yang ditambahkan, dengan konsentrasi batubara yang sama. Hasil analisis korelasi menunjukkan adanya korelasi positif antara persentase penggunaan DBT dan konsentrasi DBT dalam medium, dengan $R^2 = 0,9557$. Pengurangan DBT paling tinggi teramati pada penggunaan DBT 1 mM, yaitu sebesar 76,1%. Hal ini menunjukkan bahwa isolat 8a berpotensi untuk digunakan dalam mengurangi sulfur dalam batubara. Sebagai kesimpulan, metode pengayaan-bertingkat dapat digunakan untuk meningkatkan pertumbuhan bakteri-bakteri yang berkemampuan tinggi dalam desulfurisasi sulfur organik, sehingga mudah diisolasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Lembaga Penelitian UIN Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah memberi dukungan dana bagi penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- (1) Tanaka, H., M. Boulinguez and M. Vrinat (1996). Hydrodesulfurization of Thiophene, Dibenzothiophene and Gasoil on Various CO-MO/TIO₂-AL₂O₃ Catalysis. *Catalysis Today*. 29: 209-213.
- (2) Ohshiro, T. and I. Yoshikazu (1999). Microbial Desulfurization of Organic

- Sulfur Compounds in Petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(1): 1-9.
- (3) Oda, S. and H. Ohta (2002). Biodesulfurization of Dibenzothiophene with *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 and Its Mutant in an Interface Bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 94:474-477.
- (4) Gonsalvesh, L., Marinov, S. P., Stefanova, M., Yurum, Y., Dumanli, A.G., Dinler-Doganay, G., Kolankaya, N., Sam, M., Carleer, R., Reggers, G., Thijssen, E., and Yperman, J. (2008). Biodesulfurized Subbituminous Coal by Different Fungi and Bacteria Studied by Reductive Pyrolysis. Part 1: Initial Coal. *Fuel.* 87:2533-2543.
- (5) Mohebbali, G., A. S. Ball, B. Rasekh, and A. Kaytash (2007). Biodesulfurization Potential of A Newly Isolated Bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A. *Enzyme and Microbial Technology.* 40:578-584.
- (6) Gallagher, J. R., E. S. Olson, and D. C. Stanley. (1993). Microbial Desulfurization of Dibenzothiophene: A Sulfur Specific Pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, 107:31-36.
- (7) Maghsoudi, S. A., Kheirolomoom, M. Vossoughi, E. Tanaka, and S. Katoh (2000). Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by Newly Isolated *Corynebacterium* sp. Strain P32C1. *Biochemical Engineering Journal.* 5:11-16.
- (8) Kirimura, K., T. Furuya, Y. Nishii, K. K. Ishii, and S. Usami (2001). Biodesulfurization of Dibenzothiophene and Its Derivatives through the Selective Cleavage of Carbon-Sulfur Bonds by a Moderately Thermophilic Bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B. *Journal Of Bioscience And Bioengineering.* 91:262-266.
- (9) Hayes and Lovley (2002). Specific 16S rDNA Sequences Associated with Naphthalene Degradation under Sulfate-Reducing Conditions in Harbor Sediments. *Microb. Ecol.* 43: 134-145.
- (10) Watanabe, K. and N. Hamamura (2003). Molecular and Physiological Approaches to Understand the Ecology of Pollutant Degradation. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 289-295.
- (11) Downes, F.P. and K. Ito (2001). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington.
- (12) Pikoli, M. R., F. Ahmad, P. Astuti, N. A. Solihat dan I. Sugoro (2012). Isolasi Bakteri dari Tanah Bekas Galian Batubara dan Seleksinya sebagai Pelaku Desulfurisasi Dibenzothiophene (DBT). *Biodjati* 1(1): 6-10. ISSN 2302-8483.
- (13) Oldfield, C., O. Poogrebinsky, and J. Simmonds (1997). Elucidation of the Metabolic Pathway for Dibenzothiophene Desulfurization by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 (ATCC53968). *Microbiology* 143:2961-2973.
- (14) Hofrichter, M. and R. M. Fakoussa (2001). Microbial Degradation and Modification of Coal. In Steinbuchel, A. and M. Hofrichter. *Biopolymers.* Wiley-VCH.