



SELEKSI DAN IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER BAKTERI PENDEGRADASI INSEKTISIDA PIRETROID DARI TANAH

Salindri Prawitasari¹, Siti Nur Jannah^{1*}, dan Alina Akhdiya²

¹Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH, Tembalang, Semarang

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor,
Jawa Barat

*Penulis korespondensi: a2khdiyar@yahoo.co.uk

Abstrak

Akumulasi residu insektisida pada lahan pertanian berdampak negatif bagi lingkungan dan organisme di sekitarnya. Salah satu teknologi alternatif untuk merehabilitasi lahan pertanian yang tercemar adalah dengan teknologi bioremediasi. Bioremediasi adalah teknologi untuk memecah atau menguraikan zat pencemar menjadi bahan yang kurang beracun atau tidak beracun (karbondioksida dan air) dengan memanfaatkan organisme atau produk organisme. Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi dan mengidentifikasi secara molekuler bakteri pendegradasi insektisida piretroid sintetik asal sampel tanah Pangalengan. Seleksi terhadap sembilan isolat bakteri tanah asal Pangalengan menggunakan medium NMS cair yang mengandung 100 ppm piretroid menghasilkan dua isolat bakteri yang memiliki kemampuan terbaik dalam mendegradasi piretroid. Isolat S-9 merupakan isolat bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi residu piretroid paling tinggi dibandingkan dengan 8 isolat lainnya, yaitu sebesar 87,38%. Hasil degradasi insektisida tersebut dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber C, N, dan P untuk mendukung pertumbuhannya. Berdasarkan sekuens gen 16S rRNA, isolat S-9 menunjukkan kemiripan dengan Bosaenaeneae 16S ribosomal RNA gene (partial sequence) dengan similaritas 89%.

Kata kunci: bakteri, bioremediasi, degradasi, insektisida, piretroid

Abstract

Selection And Molecular Identification Of Pyrethroid Insecticide-Degradating Bacteria From Soil. *The accumulation of insecticide residue in farm field caused the negative impact to the environment and organisms which surround it. One of the latest technology to rehabilitate polluted farm field is bioremediation technology. Bioremediation is technology for degradation pollute to be unpolluted (carbon dioxide and water) using microorganisms or its product. The purpose of this research was to selecting and molecular identifying pyrethroid insecticide-degradation bacteria from the Pangalengan soil sample. Nine isolates of soil bacteria from Pangalengan was selected by liquid NMS contains 100 ppm pyrethroid, only 2 isolates that indicated the best ability to degrade pyrethroid. The best ability to degrade pyrethroid was the S-9 isolate, with the highest value 87,38%. Degradation pyrethroid's product utilized by the bacteria as C, N, and P source to support their growth. Based on 16S rRNA sequence gene, S-9 isolate represented its similarity with Bosaenaeneae 16S ribosomal RNA gene (partial sequence) with 89% similarity value.*

Kata kunci: bacteria, bioremediation, insecticide degradation, pyrethroi

PENDAHULUAN

Gangguan organisme pengganggu tumbuhan (OPT) merupakan kendala utama yang dihadapi petani hingga kini dalam budidaya tanaman pertanian strategis baik tanaman pangan ataupun hortikultura. Sampai saat ini pestisida kimia merupakan sarana pengendalian OPT yang paling banyak digunakan oleh petani di Indonesia (95,29%) karena dianggap efektif, mudah digunakan, dan secara ekonomi menguntungkan (Harsanti, dkk., 2013). Berdasarkan sifat kimianya, pestisida dibagi menjadi empat 4 golongan besar, yaitu organoklorin, organofosfat, karbamat, dan piretroid (Hudayya dan Jayanti, 2012). Pestisida yang dikaji pada penelitian ini merupakan golongan insektisida piretroid berbahan aktif sipermetrin. Sipermetrin ($C_{22}H_{19}C_{12}NO_3$) merupakan senyawa racun kontak dan perut yang penggunaannya sangat luas termasuk untuk insektisida (Susanti dan Boesri, 2012). Penggunaan pestisida secara bijaksana memang berguna dalam upaya membantu pengendalian OPT. Namun, penggunaan yang berlebihan akan menimbulkan permasalahan bagi kesehatan manusia dan ekosistem (Subowo, 2013), karena beberapa jenis pestisida residunya dapat bertahan hingga puluhan tahun (Wahyuni, 2014).

Pencemaran lahan pertanian oleh pestisida harus segera diatasi. Salah satu alternatif untuk merehabilitasi tanah yang tercemar adalah dengan teknik bioremediasi. Bioremediasi bertujuan untuk memecah atau mendegradasi zat pencemar menjadi bahan yang kurang beracun atau tidak beracun (karbondioksida dan air) dengan memanfaatkan aktivitas mikroba (Wahyuni, 2014). Sebagian bakteri dapat memanfaatkan pestisida, baik sebagai sumber C, N, dan P (Awad *et al.*, 2011) atau sebagai ko-metabolisme dengan substrat lain yang dapat mendukung pertumbuhan bakteri tersebut (Castillo, 2006).

Seleksi dan identifikasi bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi residu pestisida perlu dilakukan untuk memanfaatkan bakteri tersebut sebagai agen bioremediasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan seleksi *in-vitro* dan mengidentifikasi secara molekuler bakteri pendegradasi insektisida piretroid sintetik asal sampel tanah Pangalengan, Jawa Barat.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada 18 Juli 2016 hingga 18 Agustus 2016 di Laboratorium Biokimia Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor, Jawa Barat.

Alat dan Bahan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu erlenmeyer, autoklaf, *Laminar Air Flow Cabinet*, cawan petri, botol berukuran 100 mL, mikropipet, tip berbagai ukuran, *shaker*, *sentrifuge*, tangki elektroforesis, cetakan (*gel tray*), sisir (*comb*), mesin PCR, oven, bunsen, *vortex*, *microtube*, *tube* PCR, *microwave*, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, gelas ukur, dan ose. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 9 kultur isolat bakteri sampel tanah asal lahan pertanian di Pangalengan, Jawa Barat yang diremajakan pada cawan TSA (*Trypticase Soy Agar*) cawan petri, medium NMS (*Nitrate Mineral Salt*) cair, insektisida piretroid berbahan aktif sipermetrin, Presto™ *Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid), Diamond™ *Nucleic Acid Dye* (Promega, AS), agarosa, buffer Tris-Asetat EDTA (TAE) 1x, 100bp DNA ladder, PCR master mix (Bioneer, AccuPower Korea), primer 27f, primer 1492r, alkohol 70%, alkohol 96%, KOH 3%, dan akuades steril.

Pembuatan Medium NMS (*Nitrate Mineral Salt*)

Cair. Pembuatan medium NMS cair dilakukan dengan cara 50 mL akuades steril dimasukkan ke dalam botol berukuran 100 mL kemudian ditambahkan larutan-larutan stok mineral seperti *Phosphate Solution* sebanyak 1 mL; *Trace Element Solution* sebanyak 0,5 mL; *Cu Solution* sebanyak 0,5 mL; *Ferrous Sulphate Solution* sebanyak 0,5 mL; $MgSO_4$ sebanyak 0,5 mL; $CaCl_2$ sebanyak 0,5 mL; dan larutan NH_4Cl ditambah KNO_3 sebanyak 100 μ L. Setelah semua komposisi dimasukkan, botol ditutup menggunakan *aluminium foil* kemudian larutan dikocok perlahan agar tercampur rata.

Uji Kemampuan Isolat Bakteri dalam Menggunakan Sipermetrin sebagai Sumber Karbon Satu-satunya.

Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan satu lup bakteri ke dalam 5 mL medium NMS cair yang telah ditambahkan insektisida piretroid berbahan aktif sipermetrin dengan konsentrasi akhir 100 ppm. Botol ditutup menggunakan *aluminium foil*. Medium yang telah diinokulasi tersebut selanjutnya di-*vortex* supaya homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang sambil dikocok menggunakan *shaker* dengan

kecepatan 75 rpm selama 72 jam. Isolat-isolat yang menunjukkan pertumbuhan pada medium cair tersebut dipilih untuk pengujian selanjutnya.

Uji Aktivitas Degradasi Sipermetrin Isolat Bakteri Terpilih. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan satu lup bakteri ke dalam 50 mL medium NMS cair yang telah ditambahkan insektisida piretroid berbahan aktif sipermetrin dengan konsentrasi akhir 100 ppm. Botol ditutup menggunakan *aluminium foil*. Medium yang telah diinokulasi tersebut selanjutnya di-*vortex* kemudian diinkubasi sambil dikocok menggunakan *shaker* selama 96 jam pada suhu ruang. Kultur isolat bakteri kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dikirim ke Laboratorium Residu Bahan Agrokimia, Balai Penelitian Lingkungan Pertanian (Balangan), Sindangbarang, Bogor untuk diukur residu sipermetrinnya menggunakan perangkat *Gas Chromatography* (Varian Type 450, AS) yang dilengkapi dengan kolom VF1701 dan *Electrone Captured Detector*. Persentase sipermetrin yang terdegradasi dihitung dengan persamaan berikut:

$$\frac{\text{Persentase piretroid yang terdegradasi} = \text{konsentrasi awal} - \text{konsentrasi akhir}}{\text{konsentrasi awal}} \times 100\%$$

Identifikasi Isolat Bakteri Terpilih Secara Molekuler. Isolat bakteri yang memiliki kemampuan tinggi dalam mendegradasi residu insektisida dipilih untuk selanjutnya diidentifikasi berdasarkan sekuens DNA 16S rRNA-nya. Isolat bakteri yang terpilih diuji indikasi kelompok Gram-nya menggunakan KOH 3%. Sebanyak 1 lup kultur bakteri diambil, kemudian diletakkan di atas cawan petri dan dicampur dengan KOH 3% sebanyak 1 tetes. Apabila campuran menjadi lengket maka disimpulkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri Gram negatif, sedangkan apabila tidak lengket maka disimpulkan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri Gram positif. DNA genom isolat bakteri yang telah diuji menggunakan KOH 3% kemudian diekstraksi menggunakan *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid) dengan mengikuti protokol yang direkomendasikan oleh produsennya. DNA yang diperoleh kemudian digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi DNA 16S rRNA. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3') dan 1492r (5'-GGTTACCTTGCTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Komposisi reaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 1. Reaksi amplifikasi dilakukan pada kondisi: pre denaturasi (94°C, 5 menit), proses denaturasi (94°C, 1,5 menit), penempelan primer (55°C, 45 detik), proses pemanjangan (72°C, 1 menit), dan pemanjangan akhir (72°C, 2 menit). Proses amplifikasi mulai tahap denaturasi hingga pemanjangan dilakukan

sebanyak 30 siklus. Produk amplifikasi tersebut dielektroforesis pada gel agarosa 1% dengan menggunakan VC 100bp *DNA ladder* sebagai *marker*. Elektroforesis dilakukan selama 40 menit pada tegangan listrik 80 Volt dalam *buffer* TAE 1x. DNA dalam gel agarosa diwarnai menggunakan *Diamond™ Nucleic Acid Dye* (Promega, USA) sebelum divisualisasi menggunakan UV transiluminator. DNA yang telah diverifikasi dikirim ke perusahaan jasa sekuensing. Hasil sekuensing dianalisis kesejajarannya menggunakan Program *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) versi 6.0, kemudian disejajarkan dengan basis data sekuens DNA 16S rRNA yang terdapat di *GenBank* (NCBI) menggunakan BLAST-N sehingga diperoleh berbagai sekuens DNA 16S rRNA bakteri lain yang memiliki kemiripan terdekat (Tamura *et al.*, 2011).

Tabel 1. Komponen reaksi PCR untuk amplifikasi DNA 16S rRNA isolat terpilih

| Komponen Reaksi | S-9 |
|--------------------|----------|
| Primer 27f | 1,5 µL |
| Primer 1492r | 1,5 µL |
| DNA cetakan | 1 µL |
| ddH ₂ O | 16 µL |
| PCR mix | 1 tabung |

HASIL DAN PEMBAHASAN

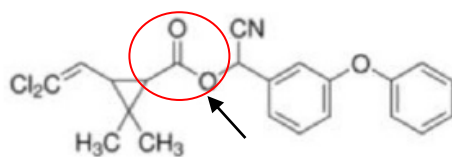
Uji Aktivitas Degradasi Sipermetrin Isolat Bakteri Terpilih

Uji kualitatif pertumbuhan pada medium NMS cair yang mengandung piretroid menghasilkan 9 isolat bakteri yang tumbuh dengan baik setelah diinkubasi selama 96 jam. Analisis residu piretroid yang dilakukan terhadap 9 kultur isolat tersebut menunjukkan kisaran residu piretroid 84,57% - 87,38% (Tabel 2). Isolat bakteri S-9 dan S-53 merupakan dua isolat yang memiliki kemampuan degradasi sipermetrin relatif tinggi dibandingkan dengan tujuh isolat lainnya yaitu masing-masing 87,38% dan 86,79%. Isolat bakteri S-24 memiliki kemampuan degradasi insektisida piretroid yang paling rendah apabila dibandingkan dengan delapan isolat yang lain, yaitu 84,57%. Kemampuan degradasi piretroid enam isolat lainnya (S-15, S-20, S-23, S-45, S-47, dan S-50) berkisar 84,88% - 85,49%.

Tabel 2. Kemampuan degradasi piretroid 9 isolat terpilih

| Kultur Isolat | Residu Piretroid (ppm) | Piretroid yang Didegradasi (%) |
|---------------|------------------------|--------------------------------|
| Kontrol | 12,769 | - |
| S-9 | 1,611 | 87,38% |
| S-15 | 1,913 | 85,02% |
| S-20 | 1,853 | 85,49% |
| S-23 | 1,860 | 85,43% |
| S-24 | 1,970 | 84,57% |
| S-45 | 1,854 | 85,48% |
| S-47 | 1,931 | 84,88% |
| S-50 | 1,872 | 85,34% |
| S-53 | 1,687 | 86,79% |

Penurunan konsentrasi piretroid dalam medium NMS cair dapat diasumsikan sebagai akibat dari metabolisme yang dilakukan oleh sel bakteri. Menurut Cycon and Seget (2016), beberapa mikroorganisme dapat mendegradasi piretroid dengan cara menjadikan piretroid sebagai sumber nutrisi berupa karbon atau melalui proses ko-metabolisme. Kecepatan proses biodegradasi pada medium cair dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk temperatur, pH, nutrisi, konsentrasi piretroid, jumlah inokulum, serta karakteristik dari masing-masing mikroorganisme. Mikroorganisme tertentu dapat mendegradasi piretroid melalui hidrolisis ikatan ester dengan bantuan karboksilesterase (carboxylic-ester hydrolase, EC 3.1.1.1) yang menghasilkan karboksilat dan alkohol. Karboksilesterase merupakan famili enzim yang mengkatalisis hidrolisis pestisida yang mengandung ester dalam jumlah besar, seperti karbamat, organofosfat, dan piretroid. Degradasi piretroid menghasilkan senyawa intermediet yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dipengaruhi oleh karakteristik biokimia strain yang digunakan, perbedaan waktu inkubasi, dan perbedaan stereoisomer piretroid.



Gambar 1. Struktur kimia Sipermetrin dan posisi ikatan ester (ditunjuk anak panah) yang menjadi target hidrolisis enzim karboksilesterase oleh mikroorganisme (Cycon and Seget, 2016).

Identifikasi Isolat Bakteri Terpilih Secara Molekuler

Isolat bakteri yang memiliki aktivitas tertinggi dalam mendegradasi sipermetrin diisolasi dengan menggunakan kit. Hasil analisis sekuens gen penyandi 16S rRNA pada *GenBank* menggunakan program BLAST-N menunjukkan bahwa isolat S-9

memiliki kemiripan 89% dengan sebagian sekuens DNA penyandi 16S ribosomal RNA *Bosea enae* (Tabel 3). Menurut De Meyer and Willems (2012), genus *Bosea* pertama kali dideskripsikan oleh Das *et al.* (1996) dan ketika pertama kali dideskripsikan berjumlah lima spesies. Deskripsi tersebut diperbaiki dan dikembangkan oleh La Scola *et al.* (2003) yang terdiri atas lima spesies yaitu *Bosea enae*, *Bosea massiliensis*, *Bosea minatitanensis*, *Bosea thiooxidans*, dan *Bosea vestrisii*. Kelima spesies tersebut diisolasi oleh La Scola *et al.* (2003), Ouattara *et al.* (2003), dan Das *et al.* (1996) dari air suplai rumah sakit, lumpur pencernaan anaerobik, dan tanah pertanian. Menurut Rani *et al.* (2008), *Bosea* termasuk ke dalam kelompok α -*Proteobacteria*. *Bosea* memiliki kemampuan untuk mendegradasi chlorophenol dan dichlorophenoxy acetic acid, thiophene-2-carboxylate metabolisme phenanthrene, dan substrat yang mengandung sulfur, polycyclic aromatic, dan xenobiotic. La Scola *et al.* (2003) berpendapat bahwa genus *Bosea* memiliki karakteristik yaitu Gram negatif, oksidase-positif, katalase-positif, berbentuk batang, termasuk ke dalam α -2 subgrup *Proteobacteria*. Semua genus *Bosea* bersifat motil, dapat tumbuh dengan baik pada BCYE agar dengan suhu 25°C hingga 37°C tetapi tidak dapat tumbuh atau tumbuh dengan tidak optimal pada Columbia agar dengan 5% darah domba. Koloni memiliki morfologi halus, berlendir, bulat, berwarna *cream*, urease-positif, α -hemolitik pada Columbia agar dengan 5% darah domba dan 0,2% *yeast extract*. Spesies pada genus *Bosea* memiliki MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yang tinggi terhadap *penicillin* dan *amoxicillin* dan MIC yang rendah terhadap *doxycycline*. Falcone-Dias *et al.* (2012) menambahkan bahwa *Bosea* yang diisolasi dari dua merk air mineral botol Portugis dan satu merk air mineral botol Perancis resisten terhadap lebih dari tujuh kelas antibiotik.

Menurut BacDive (2016), klasifikasi *Bosea enae* adalah sebagai berikut:

| | |
|---------|-----------------------|
| Domain | : Bacteria |
| Filum | : Proteobacteria |
| Kelas | : Alphaproteobacteria |
| Ordo | : Rhizobiales |
| Famili | : Bradyrhizobiaceae |
| Genus | : <i>Bosea</i> |
| Spesies | : <i>Bosea enae</i> |

Schlager *et al.* (2012) menyatakan bahwa spesies dengan persentase kemiripan identitas kurang dari 97% dengan database sekuens yang ada pada *GenBank* menunjukkan bahwa spesies tersebut adalah spesies baru (*novel species*), sedangkan jika persentase kemiripannya kurang dari 95% mengindikasikan adanya genus baru (*novel genera*). Berdasarkan batasan tersebut menunjukkan bahwa isolat S-9 diduga tergolong ke dalam genus baru (*novel genera*).

Tabel 3. Homologi sekuens gen 16S rRNA isolat bakteri pendegradasi piretroid dengan menggunakan program BLAST-N

| Kode Isolat | Sekuens DNA Bakteri Pembandingan pada Database GenBank | Identy / Query Cover (%) | E-value | Max score | No. Akses |
|-------------|--|--------------------------|---------|-----------|------------|
| S-9 | <i>Bosea eneae</i> 16S ribosomal RNA gene (partial sequence) | 89% / 95% | 0.0 | 1587 | DQ440825.1 |

KESIMPULAN

Seleksi bakteri menggunakan medium NMS cair yang mengandung 100 ppm piretroid menghasilkan 9 isolat bakteri pendegradasi piretroid. Isolat S-9 merupakan isolat bakteri yang memiliki kemampuan mendegradasi residu piretroid paling tinggi dibandingkan dengan 8 isolat lainnya, yaitu sebesar 87,38%. Berdasarkan sekuens DNA 16S rRNA-nya, isolat S-9 menunjukkan kemiripan dengan *Bosea eneae* 16S ribosomal RNA gene (partial sequence) dengan similaritas 89%

DAFTAR PUSTAKA

Awad, N.S., Sabit H.H., Abo-Aba S.E.M., and Bayoumi R.A. 2011. Isolation, Characterization, and Fingerprinting of Some Chlorpyrifos-degrading Bacterial Strains Isolated from Egyptian Pesticides-polluted Soils. *Afr J Microbiol Res* 5: 2855-2862.

BacDive. 2016. http://bacdive.dsmz.de/?site=search&rd=1788#section_1. Diakses pada Senin, 19 Desember 2016 pukul 22.00 WIB.

Castillo, M.A., Felis N., Arago P., Cuesta G., and Sabater C. 2006. Biodegradation of the Herbicide Diuron by *Streptomyces* Isolated from Soil. *Int Biodeteriorand Biodegradation* 58(3): 196-20.

Cycon, M. and Seget Z.P. 2016. Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Frontiers in Microbiology* 7: 1-26.

Das, S.K., Mishra A.K., Tindall B.J., Rainey F.A., and Stackebrandt E. 1996. Oxidation of Thiosulfate by a New Bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: Analysis of Phylogeny Based on

Chemotaxonomy and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Int J Syst Bacteriol* 46: 981-987.

De Meyer, S.E. and A. Willems. 2012. Multilocus Sequence Analysis of *Bosea* Species and Description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., Isolated from Legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2505-2510.

Falcone-Dias, M.F., I. Vaz-Moreira, and C.M. Manaia. 2012. Bottled Mineral Water As a Potential Source of Antibiotic Resistant Bacteria. *Water Res* 46(11): 3612-3622. (Abstract).

Harsanti, E.S., A.N. Ardiwinata, Mulyadi, dan A. Wihardjaka. 2013. Peranan Arang Aktif dalam Mitigasi Residu Pestisida pada Tanaman Komoditas Strategis. *Jurnal Sumberdaya Lahan* 7(2): 57-65.

Hudayya, A. dan H. Jayanti. 2012. *Pengelompokan Pestisida Berdasarkan Cara Kerjanya (Mode of Action)*. Yayasan Bina Tani Sejahtera. Bandung.

La Scola, B., I. Boyadjiev, G. Greub, A. Khamis, C. Martin, and D. Raoult. 2003. Amoeba-Resisting Bacteria and Ventilator-Associated Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases* 9(7): 815-821.

Ouattara, A.S., Assih E.A., Thierry S., Cayol J.-L., Labat M., Monroy O. and Macarie H. 2003. *Bosea minatitanensis* sp. nov., a Strictly Aerobic Bacterium Isolated from an Anaerobic Digester. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 1247-1251.

Rani, A., S. Porwal, R. Sharma, A. Kapley, H.J. Purohit, and V.C. Kalia. 2008. Assessment of Microbial Diversity in Effluent Treatment Plants by Culture Dependent and Culture Independent Approaches. *Bioresource Technology* 1-10.

Schlager, R., K.E. Simmon, and M.A. Fisher. 2012. A Systematic Approach for Discovering Novel, Clinically Relevant Bacteria. *Emerging Infectious Diseases* 18(3): 422-430.

Subowo, Y.B. 2013. Kemampuan Beberapa Jamur Tanah dalam Menguraikan Pestisida Deltametrin dan Senyawa Lignoselulosa. *Berita Biologi* 12(2): 231-238.

Susanti, L. dan H. Boesri. 2012. Insektisida Sipermethrin 100 G/L Terhadap Nyamuk dengan Metode Pengasapan. *KEMAS* 7(2): 156-163.

Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 8: 2731-2739.

Wahyuni. 2014. Efektivitas Pelapisan Urea dengan Arang Aktif yang Diperkaya Mikroba Indegenus Terhadap Penurunan Residu Heksaklorobenzen dan Endrin. *Tesis*. Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret. Surakarta.

Weisburg, W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol* 173(2): 697-703.