

## REVIEW PAPER

# TEKNIK ANALISA STRUKTUR DAN KOMPONEN BIOFILM PADA PENGOLAHAN AIR DAN AIR LIMBAH

Laily Noer Hamidah

Teknik Lingkungan, Universitas Nahdlatul Ulama' Sidoarjo  
E-mail: nh.laily@yahoo.com

### *Abstrak*

*Biofilm terbukti efektif digunakan dalam pengolahan air dan air limbah. Kandungan materi organik dalam air baku yang berbeda akan berpengaruh terhadap heterogenitas dari biofilm. Heterogenitas ini disebabkan oleh kemampuan yang berbeda dari mikroba penyusun biofilm dalam menguraikan materi organik dalam air baku. Analisa terhadap struktur dan komponen dapat dilakukan untuk mempelajari heterogenitas biofilm. Analisa ini tidak hanya mampu menggambarkan kuantitas tetapi juga kualitas dari biofilm. Tujuan dari kajian ini adalah untuk membandingkan berbagai teknik dalam menganalisa struktur dan komponen biofilm. Teknik analisa dapat dilakukan dengan analisa gambar, analisa kimia, biokimia serta analisa populasi. Metode yang sering digunakan adalah analisa gambar dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) untuk mengamati struktur dari biofilm. Analisa kimia menggunakan kolorimetri, dan analisa total protein dengan metode Lowry dan metode Bradford, serta analisa molekular dengan PCR yang digunakan untuk mengkarakterisasi komponen penyusun biofilm.*

**Kata kunci:** *analisa biofilm, struktur biofilm, komponen biofilm.*

### **Abstract**

Biofilm is proven to be effective to be used in water and wastewater treatment. Different raw water's organic compound contents will affect to the heterogeneity of the biofilm. This heterogeneity is caused by different abilities of the microbial biofilm constituent in decomposing organic compound in raw water. Analysis of structures and components can be done to study the heterogeneity of the biofilm. This analysis is not only able to describe the quantity but also the quality of the biofilm. The purpose of this review is to compare the various techniques in analyzing the structure and components of the biofilm. Analysis techniques can be performed with image analysis, chemical analysis, biochemical and population analysis. Method that commonly used is the image analysis by Scanning Electron Microscopy (SEM) to observe the structure of the biofilm. Chemical analysis using colorimetry, and analysis of total protein is using Lowry's method and Bradford's method, and molecular analysis by PCR that is used to characterize the components of biofilm's constituent.

**Keywords:** biofilm analysis, biofilm structures, biofilm components.

## 1 PENDAHULUAN

Kemampuan biofilm dalam pengolahan air minum (Lazarova dan Manem, 1999, Law, *et al.*, 2001, Bauer, *et al.*, 2011) dan air limbah (Muljadi, *et al.*, 2005, Setiawan, *et al.*, 2008) telah terbukti mampu menghilangkan berbagai senyawa organik, logam, serta bakteri *pathogen*. Kemampuan ini disebabkan adanya aktivitas bakteri dalam biofilm yang telah dibuktikan sejak tahun 1943 oleh ZoBell, dimana terjadi interaksi antara bakteri dengan permukaan padatan yang ditempelinya (Lazarova dan Manem, 1995, dan Dewanti dan Hariyadi, 1997), sehingga membentuk biofilm yang berperan dalam mendegradasi dan mendetoksifikasi senyawa pencemar (Suharjono, *et al.*, 2009).

Biofilm bakteri memiliki keuntungan dibandingkan dengan bakteri yang hidup secara bebas (*planktonik*) (Sanjaya, 2010). Beberapa keunggulannya adalah menghasilkan kepadatan populasi yang lebih tinggi, lebih efisien terhadap penggunaan nutrisi dan lebih tahan terhadap perubahan lingkungan (Lazarova dan Manem, 1995, Prakash, *et al.*, 2003, dan Suharjono, *et al.*, 2009). Sehingga menghasilkan aktivitas biodegradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan pertumbuhan tersuspensi (Prakash, *et al.*, 2003).

Umumnya biofilm bersifat heterogen (Lazarova dan Manem, 1995, dan Prakash, *et al.*, 2003), dimana terjadi suatu bentuk kerjasama (konsorsium) dari komunitas organisme yang dapat memanfaatkan senyawa pencemar sebagai sumber nutrisi sehingga menghasilkan lingkungan mikro yang sesuai di dalam lingkungan makro yang tidak sesuai (Karthikeyan, *et al.*, 2001). Dimana heterogenitas ini akan berpengaruh terhadap aktivitas biofilm dan dinamika mass transfer dalam biofilm tersebut (Yang, *et al.*, 2000).

Langkah awal dari pembentukan biofilm, berdampak pada struktur biofilm dewasa, misalnya kondisi lingkungan, jenis dan konsentrasi substrat (Lazarova dan Manem, 1995), keberadaan udara terbukti

mempengaruhi pembentukan biofilm dari *Candida albicans* (Kusumaningtyas, 2005). Konsentrasi DO yang berbeda akan berpengaruh terhadap struktur biofilm yang terbentuk pada permukaan membran (Jin, *et al.*, 2006).

Biofilm terdiri atas dua komponen utama yaitu sel dari mikroorganisme dan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) atau yang disebut sebagai matriks ekstraseluler (Lazarova dan Manem, 1995, Nugraha dan Utomo, 2010, dan Sanjaya, 2010), dan komponen lain berupa protein, asam nukleat, serta lipid (Lazarova dan Manem, 1995). Sebagai upaya dalam mempertahankan adhesi dengan permukaan, mikroorganisme mampu merubah komposisi dari EPS (PubMed Central, 2007). Sehingga EPS yang disintesis oleh sel mikroba berbeda-beda komposisi, sifat kimiawi dan fisiknya.

Telah banyak dilakukan penelitian dalam mengkarakterisasi biofilm tersebut baik dalam mempelajari heterogenitas dan ukuran biofilm, serta morfologi dari biomass melalui pengamatan terhadap struktur dan komponen penyusun biofilm (Beyenal, *et al.*, 2004). Tujuan dari kajian ini adalah untuk membandingkan berbagai teknik dalam menganalisa struktur dan komponen biofilm.

## 2. TEKNIK ANALISA STRUKTUR BIOFILM

Tujuan dari analisa struktur biofilm tidak hanya memberikan informasi mengenai kondisi fisik-kimia sel, tetapi juga morfologi sel (Lazarova dan Manem, 1995). Teknik yang dilakukan dengan analisa gambar melalui metode pewarnaan dari sel serta komponen tertentu, dan selanjutnya visualisasi melalui mikroskop *confocal* dan elektron.

### 2.1 Analisa dengan Menggunakan Pewarnaan (*Staining*)

Analisa dapat dilakukan dengan melakukan pewarnaan bagian atau komponen tertentu dari biofilm. Misalkan pewarnaan sel, enzim, vesikula, dan EPS.

EPS merupakan polisakarida yang dikeluarkan dari dalam sel (Dewanti dan Hariyadi, 1997), terdiri atas 50 – 90% total karbon organik dan merupakan bahan matriks utama penyusun biofilm (PubMed Central, 2007). EPS diketahui mampu mengikat logam, sehingga untuk analisisnya digunakan pewarna logam seperti *ruthenium red*, *glutaraldehyde*, *osmium tetroxide* dan *lysine* (Priester, *et al.*, 2007). Visualisasi EPS dapat dilakukan dengan ESEM (Priester, *et al.*, 2007) maupun CLSM (Yun, *et al.*, 2006).

## 2.2 Visualisasi dengan Mikroskop Confocal

Mikroskop konfokal merupakan suatu teknik pencitraan yang digunakan untuk menggambarkan spesimen yang memiliki ketebalan tertentu (Davidson, 2008). Kelebihan dari mikroskop ini dapat digunakan untuk pengamatan secara insitu dan tidak merusak struktur asli dari obyek penelitian (Bridier, *et al.*, 2010).

Analisa struktur dengan *Confocal Scanning Laser Microscopy* (CLSM) dapat digunakan untuk membandingkan struktur biofilm dalam 3 dimensi, memantau perkembangan biofilm, dan mengukur faktor lingkungan yang mempengaruhi struktur biofilm (Beyenal, *et al.*, 2004, dan Bridier, *et al.*, 2010). Selain itu, CLSM juga menghasilkan data numerik yang dapat diolah secara statistik untuk menentukan *biovolume*, ketebalan maksimum, *substratum coverage*, porositas, dan koefisien kekasaran dari biofilm. Parameter-parameter tersebut digunakan untuk membandingkan biofilm. Dimana suatu biofilm dikatakan tidak sama apabila memiliki perbedaan signifikan antar parameter yang diukur lebih dari 10% (Beyenal, *et al.*, 2004).

## 2.3 Visualisasi dengan Mikroskop Elektron

Visualisasi biofilm dengan menggunakan mikroskop elektron telah banyak diaplikasikan oleh para peneliti

dalam memahami struktur dari biofilm (Yang, *et al.*, 2000, Pratiwi, 2003, Kusumaningtyas, 2005, Ploux, *et al.*, 2007, Joubert dan Pillay, 2008, Setiawan, 2008, Tamyiz dan Hamidah, 2015). Kelebihan dari mikroskop elektron adalah dapat dilakukan pembesaran objek hingga 2 juta kali dengan menggunakan elektro statik dan elektro magnetik untuk mengontrol pencahayaan dan tampilan gambar (Krisno, 2011, dan Anonim, 2012). Mikroskop ini dibagi menjadi beberapa jenis diantaranya adalah:

### a. *Transmission Electron Microscopy* (TEM)

TEM adalah mikroskop elektron yang cara kerjanya mirip dengan cara kerja proyektor slide, di mana elektron ditembuskan ke dalam obyek pengamatan dan pengamat mengamati hasil tembusannya pada layar (Anonim, 2012). Kelemahan TEM yaitu obyek pengamatan harus dibuat setipis mungkin (>100 nanometer) (Krisno, 2011, dan Anonim, 2012). Proses yang dilakukan meliputi:

- 1) Fiksasi, untuk mematkan sel tanpa mengubah struktur sel dengan glutaraldehida atau osmium tetroksida;
- 2) Pembuatan sayatan yang dilapisi dengan monomer resin melalui proses pemanasan, kemudian dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan mikrotom;
- 3) Pewarnaan, untuk memperbesar kontras antara preparat dengan lingkungan sekitarnya dengan menggunakan logam berat seperti uranium dan timbal (Anonim, 2012).

### b. *Scanning Electron Microscope* (SEM).

SEM adalah mikroskop yang menggunakan elektron berenergi tinggi yang ditembakkan ke permukaan sampel dan menghasilkan berbagai sinyal (Anonim, 2012, dan Shalahudin, 2012). Digunakan untuk studi detail arsitektur permukaan sel, dan obyek diamati secara tiga dimensi (Anonim, 2012). Proses yang dilakukan meliputi: 1). Fiksasi; 2). Dehidrasi/*drying*, untuk menurunkan kadar air; dan 3).

Pewarnaan dengan menggunakan logam mulia seperti emas (Au) untuk mengubah konduktifitas dari sampel yang diamati akan diamati. Karena prinsip dasar dari SEM adalah gambar dibuat berdasarkan deteksi elektron baru (elektron sekunder) atau elektron pantul yang muncul dari permukaan sampel ketika permukaan sampel tersebut dipindai dengan sinar elektron, sehingga sampel harus dikondisikan konduktif (Priester, *et al.*, 2007, Tamyiz dan Hamidah, 2015).

#### c. Mikroskop Pemindai Lingkungan Elektron/*Environmental SEM* (ESEM)

ESEM merupakan pengembangan dari TEM dan SEM. Obyek pengamatan yang memerlukan perlakuan tambahan apabila digunakan dengan TEM atau SEM, dapat diatasi dengan ESEM. Kelebihan ESEM adalah dapat dilakukan pada obyek penelitian kering maupun basah, serta pada organisme dalam kondisi hidup (Anonim, 2012). Misalkan untuk pengamatan EPS dari biofilm yang lebih efektif dilakukan dengan preparat basah karena strukturnya yang rentan terhadap panas (Priester, *et al.*, 2007).

ESEM ini juga mampu menunjukkan heterogenitas dari biofilm pada lapisan *schmutzdecke* yang terbentuk pada *Slow Sand Filter* (SSF) tanpa proses fiksasi, dehidrasi dan pembekuan (Joubert, *et al.*, 2008).

### 3. TEKNIK ANALISA KOMPONEN BIOFILM

Komponen utama penyusun biofilm berupa sel bakteri dan matriks ekstraseluler. Komponen penyusun matriks ekstraseluler ini bervariasi sesuai dengan jenis mikroorganisme pembentuknya serta faktor lingkungan (Lazarova dan Manem, 1995). Beberapa penelitian sebelumnya membuktikan bahwa matriks ekstraseluler ini sebanyak 65% tersusun atas polisakarida (Horan dan Eccles, 1986 dalam Lazarova dan Manem, 1995). Selain itu beberapa matriks ini tersusun atas glukosida atau *glucophosphates* (Lazarova dan Manem,

1995). Untuk menentukan komponen-komponen tersebut berbagai metode analisa telah dikembangkan oleh beberapa peneliti, diantaranya adalah 1). Analisa kimia, 2). Analisa biokimia meliputi analisa enzim dan protein, dan 3). Analisa populasi.

Analisa kimia dapat dilakukan dengan metode kolorimetri yaitu analisa biofilm yang didasarkan dengan pewarnaan, kelemahan metode ini adalah pewarnaan dengan kristal violet (CV) tidak dapat dilakukan untuk menguji kematian sel, dikarenakan baik sel hidup maupun sel mati akan terwarnai oleh CV. Penggunaan kolorimetri ini juga dapat digunakan untuk menentukan kandungan total karbohidrat dalam biofilm dengan melibatkan pemanasan sampel dengan asam sulfat dan penambahan reagen antron (Dreywood, 1946 dalam Lazarova dan Manem, 1999).

Analisa protein dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu, metode N-Kjehdal, metode Lowry dan metode Bradford (Avella, *et al.*, 2010). Penggunaan metode Lowry dan Bradford memiliki kesamaan yaitu prosedur yang digunakan cukup sederhana, namun untuk metode Lowry terbukti memiliki hasil yang lebih presisi (Lazarova dan Manem, 1999). Hal ini dibuktikan oleh Avella, *et al.* (2010), yang melakukan analisa untuk mendapatkan asam humat yang tercampur dalam protein dipengolahan air limbah.

Analisa populasi dilakukan untuk melihat populasi dari mikroorganisme pembentuk biofilm. Analisa populasi dapat dilakukan dengan beberapa metode, diantaranya adalah:

#### a. Mikrobiologi klasik

Analisa dengan metode mikrobiologi klasik digunakan untuk identifikasi sel bakteri penyusun biofilm. Proses identifikasi sel dimulai dengan isolasi sel bakteri selanjutnya dilakukan analisa morfologi, pewarnaan gram dan tes biokimia sehingga didapatkan spesies bakteri penyusun biofilm. Kelemahan dari metode ini adalah memerlukan waktu yang lama dengan proses yang rumit (Waluyo, 2010).

b. Analisa asam lemak

Komunitas mikroba biofilm dapat dianalisa melalui analisa asam lemak fosfolipid (PLFAs). Metode ini mampu menggambarkan kompleksitas komunitas mikroba dan biomassa seperti halnya yang ditemukan pada di alam misalkan di tanah, sedimen, sistem air minum dan lain lain. Perbandingan tersebut didasarkan pada asumsi bahwa fosfolipid memiliki proporsi yang relatif konstan dari biomassa sel dan variasi asam lemak dapat dijadikan sebagai marker dalam menentukan suatu kelompok taksonomi tertentu. Hal ini dikarenakan suatu kelompok mikroorganisme yang berbeda memiliki komposisi PLFAs yang berbeda pula sehingga pola dari PLFAs dapat menggambarkan komposisi suatu komunitas mikroba (DaZhuang, *et al.*, 2009)

c. Analisa molekuler

Analisa molekuler digunakan untuk menganalisa komposisi komunitas mikroba penyusun biofilm (Macgregor, 1999). Analisa ini dapat dilakukan dengan analisa menggunakan PCR (*polymerase Chain Reaction*). Identifikasi bakteri dilakukan dengan membandingkan sekuen nukleotida DNA bakteri yang diperiksa dengan bank data genetik bakteri yang sudah diketahui (Wiguna *et al.*, 2011). Metode ini telah banyak digunakan oleh beberapa peneliti dikarenakan hasil analisa mampu menghasilkan spesies bakteri yang ingin diketahui. Berdasarkan penelitian sebelumnya, hasil analisa biofilm dalam pengolahan air minum dengan menggunakan PCR didapatkan jenis bakteri *thermophilic* (Tirola, *et al.*, 2003), bakteri pendegradasi *mycrocystin*, *Sphingopyxis wittflariensis* (Ho, *et al.*, 2007), bakteri pengoksidasi besi *Gallionella ferruginea* dan archaea pengoksidasi ammonia (De Vet, *et al.*, 2009), bakteri patogen *Helicobacter pylori* (Linke, *et al.*, 2010), bakteri dari genus *Bacillus*, *Acinetobacter* dan *Staphylococcus* (Hamidah, 2013).

#### 4. KESIMPULAN

Penggunaan biofilm dalam proses pengolahan air bersih dan air limbah

membutuhkan pengembangan metode yang tepat untuk mengkarakterisasi biomassa yang terkandung dalam komponen biofilm, sehingga mampu meningkatkan kemampuan biofilm dalam mengolah air baku. Kajian ini berisi informasi mengenai metode menganalisa struktur dan komponen biofilm. Analisa struktur dapat dilakukan dengan analisa gambar melalui pewarnaan selanjutnya dilakukan visualisasi dengan menggunakan mikroskop konfokal atau elektron. Sedangkan untuk analisa komponen biofilm dapat dilakukan dengan analisa kimia, biokimia, serta analisa populasi.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2012). *Mikroskop Elektron*. <http://id.wikipedia.org/w/index.php?title=Mikroskopelektron&oldid=535862>. 1. (18 Nopember 2015).
- Avella, A.C., Gorner, T., dan Donato, D. (2010). The Pitfalls Of Protein Quantification In Wastewater Treatment Studies. *Journal of Science of the Total Environment*, 408: 4906 – 4909.
- Bauer, R., Dizer, H., Graeber, I., Rosenwinkel, K.H., dan Pila, J.M. (2011). Removal of Bacterial Fecal Indicators, Coliphages and Enteric Adenoviruses from Waters with High Fecal Pollution by Slow Sand Filtration. *Journal of Water Research*, 45: 439 – 452.
- Beyenal, H., Donovan, C., Lewandowski, Z., dan Harkin, G. (2004). Three-Dimensional Biofilm Structure Quantification. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 395 – 413.
- Bridier, A., Brissonnet, B.D., Boubetra, A., Thomas, V., dan Briandet, R. (2010). The biofilm Architecture of Sixty Opportunistic Pathogens Deciphered Using A High Throughput CLSM Method. *Journal of Microbiological Methods*, 82: 64 – 70.
- Davidson, M.W. (2008). Laser Scanning Confocal Microscopy.

<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/index.html>. (14 Nopember 2015).

- Dazhuang, Y., Zhihui, B., Rowan, M., Likun, G., Shumei, R., dan Peiling, Y. (2009). Biofilm Structure And Its Influence On Clogging In Drip Irrigation Emitters Distributing Reclaimed Wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 21: 834 – 841.
- De Vet, W.W.J.M., Dinkla, I.J.T., Muyzer, G., Rietveld, L.C., dan van Loosdrecht, M.C.M. (2009). Molecular Characterization of Microbial Populations in Groundwater Sources and Sand Filters for Drinking Water Production. *Journal of Water Research*, 43: 182 – 194.
- Dewanti, R., dan Hariyadi. 1997. Pembentukan Biofilm Bakteri pada Permukaan Padat. *Ulasan Ilmiah, Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, 8(1): 1 – 7.
- Hamidah, L. N. (2013). Studi Komunitas Bakteri Pada Lapisan *Schmutzdecke* Dalam *Slow Sand Filter* Dengan Variasi Berbagai Media Tumbuh. *Thesis Magister Teknik Lingkungan*, ITS, Surabaya.
- Ho, L., Hoefel, D., Saint, C.P., dan Newcombe, G. (2007). Isolation and Identification of a Novel Microcystin-Degrading Bacterium from a Biological Sand Filter. *Journal of Water Research*, 41: 4685 – 4695.
- Jin, Y.L., Lee, W.N., Lee, C.H., Chang, I.S., Huang, X., dan Swaminathan, T. (2006). Effect of DO Concentration on Biofilm Structure and Membrane Filterability in Submerged Membrane Bioreactor. *Journal of Water Research*, 40: 2829 – 2836.
- Joubert, E.D., dan Pillay, B. (2008). Visualisation of the Microbial Colonisation of a Slow Sand Filter Using an Environmental Scanning Electron Microscope. *Journal of Biotechnology*, 11(2): 01 – 07.
- Karthikeyan, S., Korber, D.R., Wolfaardt, G.M., dan Caldwell, D.E. (2001). Adaptation of Bacterial Communities to Environmental Transitions from Labile to Refractory Substrates. *Journal of International Microbiology*, 4: 73 – 80.
- Krisno, A. (2011). *Studi Mikrobiologi yang Digunakan Sampai Sekarang*. [http://aguskrisno\\_blog.wordpress.com/2011/01/08/sejarah-perkembangan-mikrobiologi/](http://aguskrisno_blog.wordpress.com/2011/01/08/sejarah-perkembangan-mikrobiologi/). (18 Nopember 2015)
- Kusumaningtyas, E. (2005). Mekanisme Infeksi *C. albicans* pada Permukaan Sel. *Lokakarya Nasional Penyakit Zoonosis*.
- Law, S.P., Melvin, M.M.A., dan Lamb, A.J. (2001). Visualisation of The Establishment of A Heterotrophic Biofilm Within the *Schmutzdecke* of A Slow Sand Filter Using Scanning Electron Microscopy. *Journal of Biofilm*, 6(1): 1 – 17.
- Lazarova, V., dan Manem, J. (1995). Biofilm Characterization and Activity Analysis in Water and Wastewater Treatment. *Journal of Water Research*, 29(10): 2227 – 2245.
- Linke, S., Lenz, J., Gemein, S., Exner, M., dan Gebel, J. (2010). Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213: 176 – 182.
- MacGregor, B.J. 1999. Molecular Approaches to the Study of Aquatic Microbial Communities. *Journal of Biotechnology*, 10: 220 – 224.
- Muljadi, Agung, W., dan Triyoko, S. (2005). Penurunan Kadar BOD Limbah Cair secara Proses Biologi dengan Tipe *Rotating Biological Contactors* (RBCs). *Jurnal Ekuilibrium*, 4(2): 52 – 57.
- Nugraha, R., dan Utomo, C. (2010). Potensi Bakteri Pembentuk Biofilm dalam Mendegradasi Linier Alkil Benzen Sulfonat pada Berbagai Ukuran Batu. *Skripsi Program Sarjana Jurusan Biologi*, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang.

- Ploux, L., Beckendorff, S., Nardin, M., dan Neunlist, S. (2007). Quantitative and Morphological Analysis of Biofilm Formation on Self-Assembled Monolayers. *Journal of Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57: 174-181.
- Prakash, B.M., Veeregowda, G., dan Krisnappa. (2003). *Biofilm: A Survival Strategy of Bacteria (Review)*. *Journal of Current Science*, 85(9): 1299-1307.
- Pratiwi, H.R. (2003). Penampakan Biofilm Escherichia coli Enteropatogen Menggunakan Light Microscope dan Scanning Electron Microscope. *Skripsi Program Sarjana Jurusan Biologi, IPB, Bogor*.
- Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L, Mertes, L., dan Holden, P.A. (2007). Enhanced Visualization of Microbial Biofilms by Staining and Environmental Scanning Electron Microscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 68: 577 – 587.
- PubMed Central. (2007). Effect of Protein, Polysaccharide, and Oxygen Concentration Profiles on Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9): 72 – 83.
- Sanjaya, A.A. (2010). *Biofilm*. <http://alitadisanjaya.blogspot.com/>. (18 Nopember 2015).
- Setiawan, Y., Purwati, S., Soetopo, R.S., Kristaufan. (2008). Peningkatan Efektifitas Pengolahan Air Limbah Proses Pemutihan Pulp dengan Reaktor Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) dan Lumpur Aktif Termobilisasi. *Majalah Ilmiah, Berita Selulosa*, 43(2): 74 – 82.
- Shalahudin, I. (2012). *Mengenal Scanning Electron Microscope (SEM)*. <http://iqshalahuddin.wordpress.com/>. (18 Nopember 2015).
- Suharjo, Sutrisno, dan Ashari, A. (2009). Potensi Konsorsium Bakteri Pembentuk Biofilm dalam Mendegradasi *Linier Alkylbenzene Sulfonat*. *Makalah Seminar Nasional Biologi XX dan Kongres PBI XIV UIN Maliki, Malang*.
- Tamyiz, M., dan Hamidah, L. N. (2015). Diversity Of The Schmutzdecke Layers In Slow Sand Filter (SSF) And Its Influence On The Pollutants Removal Efficiency. *Proceeding International Conference and Workshop on Basic and Applied Sciences, UNAIR, SURABAYA*.
- Tirola, M.A., Suvilampi, J.E., Kulomaa, M.S., dan Rintala, J.A. (2003). Microbial Diversity in a Thermophilic Aerobic Biofilm Process: Analysis by Length Heterogeneity PCR (LH-PCR). *Journal of Water Research*, 37: 2259 – 2268.
- Waluyo, L. (2010). *Mikrobiologi Lingkungan*. Malang: UMM Press.
- Wiguna, A., Kamil, I. M., dan Suhandono, S. (2011). Identifikasi Bakteri Air Tanah dengan Metode Analisis Kultur, Amplifikasi PCR dan Kloning Gen 16S rRNA (Studi Kasus: TPA Cicabe – Kota Bandung). *Penelitian Masalah Lingkungan di Indonesia*, 125-136.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., dan Lewandowski, Z. (2000). Quantifying Biofilm Structure Using Image Analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 39: 109 – 119.
- Yun, M.A., Yeon, K.M., Park, J.S., Lee, C.H., Chun, J., dan Lim, D.J. (2006). Characterization of Biofilm Structure and Its Effect on Membrane Permeability in MBR for Dye Wastewater Treatment. *Journal of Water Research*, 40: 45 – 52.