PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI ISOLAT LOKAL BSPP-4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG DAN UJI POTENSI ANTIBAKTERI

(Skripsi)

Oleh

WIWIN INDRIANTI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG

2022

PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI ISOLAT LOKAL BSPP-4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG DAN UJI POTENSI ANTIBAKTERI

Oleh

Wiwin Indrianti

Skripsi

Sebagai salah satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022

ABSTRAK

PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI ISOLAT LOKAL BSPPP-4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG DAN UJI POTENSI ANTIBAKTERI

Oleh

WIWIN INDRIANTI

Biosurfaktan adalah produk metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba. Biosurfaktan banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang, salah satunya dalam bidang medis yang biasa digunakan sebagai antibakteri, antifungi, dan antivirus. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan biosurfaktan dari bakteri isolat lokal BSPP-4 asal sedimen perairan Pelabuhan Panjang, serta menguji potensinya sebagai antibakteri. Isolat lokal BSPP-4 diremajakan menggunakan nutrient agar. Metode uji yang dilakukan meliputi uji biosurfaktan (hemolisis, IE_{24}, *Oil Spread*=OS, dan *Drop Collapse*=DC), karakterisasi biokimia bakteri isolat BSPP-4, pembuatan kurva pertumbuhan, optimasi produksi biosurfaktan, produksi biosurfaktan, karakterisasi biosurfaktan menggunakan FT-IR, serta uji potensi biosurfaktan sebagai antibakteri. Hasil uji biosurfaktan diketahui bahwa isolat BSPP-4 memiliki aktivitas β-hemolisis, dengan nilai IE_{24} 33%, uji OS 2 mm, dan uji DC positif. Karakterisasi biokimia menunjukkan bahwa isolat BSPP-4 merupakan jenis bakteri Bacillus. Optimasi produksi menunjukkan kondisi optimum untuk produksi biosurfaktan pada waktu inkubasi 96 jam, sumber karbon gliserol 2%, sumber nitrogen $NaNO_3$ 0,3%, dan konsentrasi inokulum 7,5%. Produksi biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP-4 memilki ciri-ciri fisik biosurfaktan berwarna kuning tua sebanyak 0,9674 g/L. Hasil Analisis data FT-IR memperlihatkan adanya serapan dari gugus fungsi, seperti pada daerah 3272 cm^{-1} (N-H *Stretching*), 1535 cm^{-1} (deformasi ikatan N-H), 2937 cm^{-1} (C-H *stretching*), 1625 cm^{-1} (CO-N *stretching*), pada daerah 1103 cm^{-1} dan 1185 cm^{-1} (C-O *Stretching*), daerah 2937 cm^{-1}, dan 1625 cm^{-1} (rantai alifatik C-H) yang merupakan ciri-ciri surfaktan lipopeptida. Uji antibakteri ekstrak biosurfaktan menunjukkan adanya zona bening sebesar 1,72 cm pada bakteri Gram negatif *Escherichia coli*, sedangkan pada bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* sebesar 1,16 cm. Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa isolat BSPP-4 diduga menghasilkan biosurfaktan jenis lipopeptida dan memilliki kemampuan sebagai antibakteri.

Kata Kunci : Biosurfaktan, lipopeptida, antibakteri, FT-IR, Indeks Emulsi.

ABSTRACT

PRODUCTION OF BIOSURFACTANTS FROM LOCAL BSPP-4 BACTERIA ISOLATES OF SEDIMENTS IN PANJANG PORT WATERS AND TESTING POTENTIAL ANTIBACTERIALS

By

WIWIN INDRIANTI

Biosurfactants are secondary metabolite products from microbes. Biosurfactants are widely applied in various fields, one of which is in the medical field which is commonly used as antibacterial, antifungal, and antivirus. This study aims to obtain biosurfactants from local isolates of bacteria BSPP-4 from the sediments of Panjang Port waters, and to test their potential as antibacterial. Local isolates of BSPP-4 bacteria was maintenances in nutrient agar medium. The analysis include biosurfactant tests (hemolysis, IE_{24}, Oil Spread=OS, and Drop Collapse=DC), biochemical characterization of BSPP-4 isolate bacteria, growth curve creation, optimization of biosurfactant production, production of biosurfactant, characterization of biosurfactants using FT-IR, as well as testing the potential of biosurfactants as antibacterial. The biosurfactant test showed that the BSPP-4 isolate had β-hemolysis, with an IE_{24} value of 33%, 2 mm OS test, and a positive DC test. Biochemical characterization showed that BSPP-4 isolate was a type of *Bacillus* bacteria. The optimum conditions for biosurfactant production was at an incubation time of 96 hours, 2% glycerol carbon source, 0.3% $NaNO_3$ nitrogen source, and 7.5% inoculum concentration. The production of biosurfactant of bacterial isolate BSPP-4 has the physical characteristics of a dark yellow biosurfactant as much as 0.9674 g/L. The FT-IR analysis data showed that there was absorption from functional groups, such as in the area of 3272 cm^{-1} (NH Stretching), 1535 cm^{-1} (NH bond deformation), 2937 cm^{-1} (CH stretching), 1625 cm^{-1} (CO-N stretching), on the area 1103 cm^{-1} and 1185 cm^{-1} (CO Stretching), 2937 cm^{-1} area and 1625 cm^{-1} (CH aliphatic chain) which are characteristics of lipopeptide surfactants. Antibacterial test of biosurfactant extract showed a clear zone of 1.72 cm on Gram negative bacteria *Escherichia coli*, while in Gram positive bacteria *Staphylococcus aureus* of 1.16 cm. Based on the results of this study, it can be concluded that BSPP-4 isolate can produce lipopeptide biosurfactant and has the ability as an antibacterial.

Keywords: Biosurfactant, lipopeptide, antibacterial, FT-IR, Emulsification indeks

Judul Skripsi	:	**PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI ISOLAT LOKAL BSPP-4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG DAN UJI POTENSI ANTIBAKTERI**
Nama Mahasiswa	:	Wiwin Indrianti
Nomor Pokok Mahasiswa	:	1517011006
Jurusan / Program Studi	:	Kimia / S1
Fakultas	:	Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Pembimbing 1	Pembimbing 2
Dra. Aspita Laila, M.Si.	**Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**
NIP. 196009091988112001	NIP. 197412111998022001

2. Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Lampung

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dra. Aspita Laila, M.S.** .....

Sekretaris : **Dr. Nurhasanah, M.Si.** .....

Anggota : **Dr. Ni Luh Gede R.J., M.Si.** .....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi :**11 Februari 2022**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda angan di bawah ini:

Nama	: Wiwin Indrianti
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1517011006
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul **"Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang dan Uji Potensi Antibakteri"** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana semestinya.

Bandar Lampung, 20 April 2022

Yang Menyatakan

Wiwin Indrianti

NPM. 1517011006

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Wiwin Indrianti dilahirkan di Negara Bumi pada 30 Oktober 1997 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, putri dari bapak Suyanto dan Ibu Sulihati. Jenjang pendidikan diawali dari Taman Kanak-kanak di TK Raudhatul Athfal Al-Mukarromah (2004), Sekolah Dasar di SD Negeri Baru Raharja (2010), Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 02 Sungkai Utara (2013), dan Sekolah Menengah Atas di SMA Swasta Hang Tuah (2015).Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada tahun 2015 melalui jalur SNMPTN (Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung, penulis pernah mengikuti organisasi kemahasiswaan diantaranya yaitu KAMI (Kader Muda Himaki) FMIPA Unila periode 2015/2016, HIMAKI (Himpunan Mahasiswa Kimia) sebagai anggota bidang SOSMAS (Sosial Masyarakat) periode 2016/2017, UKM Bidang Seni pada periode 2016/2017, dan UKM Pramuka pada periode 2016/2017.

Penulis melakukan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2018 di UPTD Balai Pengujian dan Sertifikasi Mutu Barang Dinas Perindustrian Provinsi Lampung.Sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu kepada masyarakat, penulis telah

melaksanakan KKN (Kuliah Kerja Nyata) pada tahun 2019 di Desa Donomulyo, Kecamatan Way Tenong, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung.Sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan Skripsi yang berjudul **"Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang dan Uji Potensi Antibakteri".** Penulis dinyatakan lulus sebagai sarjana sains pada bulan Februari 2022.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Segala puji hanya milik Allah Subhanahu wa Ta'ala yang telah melimpahkan nikmat sehat sehingga atas Ridho-Nya karya ini dapat terselesaikan. Kupersembahkan karya sederhanaku ini sebagai wujudbukti dan tanggung jawab kepada:

"Keluarga Tercinta"
Ayahku Suyanto dan Ibuku Sulihati yang telah memberikan kasih sayang, dukungan, serta do'a terbaik sepanjang waktu yang mungkin takkan pernah terbalaskan dengan apapun dan sampai kapanpun, serta Adikku Lucky Aprianto yang selalu memberikan keceriaan dan semangat baru.

Kerabat, sahabat, serta teman-teman yang senantiasa mendukung dan mendoakan, menghibur serta memberikan saran terbaik untuk penulis.

Diri sendiri, terimakasih telah bertahan sejauh ini, selalu bekerja keras dan berusaha melakukan yang terbaik.

Rasa Hormat Saya Kepada:

Dra.Aspita Laila, M.S.
Terima kasih atas ilmu, nasihat, kritik dan saran serta telah sabar
dalam membimbing Penulis selama ini.

Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia atas dedikasi dan seluruh ilmu yang telah diberikan.

Alamamater Tercinta
Universitas Lampung

MOTTO

"Sesungguhnya kemenangan itu beriringan dengan kesabaran. Jalan keluar beriringan dengan kesukaran,dan sesudah kesulitan pasti akan datang kemudahan"(HR. Tirmidzi)

"Jika tersandung dan jatuh, hal yang terpenting adalah harus bangun kembali"(Min Yoongi)

"Hidup seperti air yang mampu menyesuaikan diri disetiap ruang dan kondisi"
(Penulis)

"Saat pikiran untuk menyerah keluar, pikirkanlah lagi alasan mengapa bertahan selama ini" (Hiro Mashima)

"Tak akan ada hasil jika tanpa pengorbanan"
(Killua Zoldyck)

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga Penulis dapat meyelesaikan skripsi yang berjudul **"Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang dan Uji Potensi Antibakteri"** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada program studi Kimia FMIPA Universitas Lampung. Sholawat teriring salam semoga Allah SWT sampaikan kepada baginda Nabi Muhammad SAW dan semoga kita mendapatkan syafa'at dari-Nya di yaumil akhir kelak, Aamiin.

Dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan, namun semua itu dapat dilalui berkat dukungan, bantuan, motivasi dan do'a dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Kepada orang tuaku, Bapak dan Mamak terimakasih atas semua cinta, kasih dan sayang serta semua pengorbanan yang telah kalian berikan kepada Penulis. Terimakasih atas segala do'a yang senantiasa dipanjatkan untuk Penulis, segala perhatian, motivasi dan dukungan yang luar biasa kepada Penulis sehingga Penulis bisa menyelesaikan pendidikan hingga menjadi Sarjana. Semoga Bapak dan Mamak selalu diberikan kesehatan dan selalu dalam lindungan Allah SWT.

2. Adek Mbak, Lucky Aprianto yang telah memberikan do'a, dukungan, serta keceriaan hingga saat ini Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

3. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku pembimbing 1 yang senantiasa membimbing dengan sabar, memberikan ilmu, motivasi, nasihat, kritik dan saran terbaik sehingga Penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini.

4. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan, ilmu, saran serta nasihat sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

5. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., selaku pembahas atas kehadirannya memberikan arahan, koreksi dan saran kepada Penulis.

6. Bapak Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S., selaku pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasihat yang bermanfaat kepada Penulis.

7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Terimakasih atas seluruh ilmu, pengalaman dan motivasi yang telah diberikan kepada Penulis.

8. Bapak Dr. Mulyono, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

9. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

10. Segenap staf administrasi dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

11. Kakek, Alm. Nenek, terimakasih untuk semua kasih sayang, do'a, serta dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Maaf, penulis belum sempat memberikan yang terbaik untuk Alm.Nenek.

12. *"Nurhasanah's Research Group"*, Ani Nurhayati, Silvana Citra, S.Si., Meitri Ayu Ningrum, S.Si., Vicky Dila Cahyani, S.Si., Putri Kuswendari, Yoanda Widiadita, Melly Yusnidar, S.Si., Qonita Nurul Husna, S.Si., dan Ria Mela Rosi, S.Si.

13. Teman, Kakak, dan Adik seperjuangan di Laboratorium Biokimia: Ani, Hani Chintia, Citra, Saso, Nurmalia, Hendri, Qonita, Melly, Ria, Sri, Putri, Kak Arif,

Mbak Shelta. Terimakasih atas segala bantuan kepada Penulis selama penelitian di Laboratorium Biokimia.

14. Bapak dan Ibu Kos. Terimakasih telah merawat Penulis disaat-saat kondisi kritis, sehingga Penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.

15. Rekan-rekan seperjuangan Kimia 2015 "Chem15try". Terimakasih atas suka duka dan kebersamaan selama kuliah, semoga Allah SWT memberikan kesuksesan untuk kita semua, Aamiin.

16. Partner Penelitian Ani Nurhayati, terimakasih telah mau berjuang bersama penulis, bertukar pedapat, saling berbagi semangat disaat-saat memasuki fase lelah, terimakasih untuk semuanya. Semoga Allah SWT memberikan kesuksesan dan kehidupan yang tenang untuk kita semua, Aamiin.

17. "Sawangan Group" Vina Eka munita, S.Si., Rita Fitriani, S.Si., Yarti Andayani, S.Si., Dias Anggraini. Terimakasih atas segala kebaikan dan selalu ada untuk Penulis dalam segala situasi, semoga kita tetap bersama *Till Jannah* Aamiin.

18. "Libra *Sign*" Hani Maryuli, S.Si. Terimakasih untuk semuanya, semoga kita semua dipertemukan lagi di syurga Allah, Aamiin.

19. Semua pihak yang telah membantu dan mendoakan Penulis dengan tulus dalam proses penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

20. MyShadow, terimakasih telah bersamaku meskipun kegelapan terkadang sementara memisahkan kita, tapi kita tetap mampu menguatkan satu sama lain.

21. Last but not least, terimakasih untuk diri ini. Terimakasih telah mampu bertahan sejauh ini, kedepannya harus lebih kuat lagi dan jangan pernah menyerah akan sesuatu yang diinginkan.

Atas segala kebaikan yang telah diberikan semoga Allah SWT membalasnya dengan pahala yang berlipat ganda, Aamiin. Penulis menyadari bahwa skripsi ini

masih terdapat kekurangan, namun Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi rekan-rekan khususnya mahasiswa kimia dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, 20 April 2022

Penulis

Wiwin Indrianti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI ..... **xvi**

DAFTAR TABEL ..... **xviii**

DAFTAR GAMBAR ..... **xix**

I. PENDAHULUAN **1**

1.1. Latar Belakang 1
1.2. Tujuan Penelitian 3
1.3. Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA **5**

2.1. Biosurfaktan 5
2.1.1 Aplikasi Biosurfaktan 7
2.1.2 Uji Biosurfaktan 8
2.1.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan 9
2.2. Bakteri 11
2.2.1 Klasifikasi Bakteri 12
2.2.2 Kurva Pertumbuhan 14
2.2.3 Antibakteri 16
2.3. *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR) 16

III. METODE PENELITIAN **21**

3.1. Waktu dan Tempat 21
3.2. Alat dan Bahan 21
3.3. Prosedur Penelitian 22
3.3.1. Tahap Persiapan 22
3.3.2. Uji Biosurfaktan 24
3.3.3. Karakterisasi Bakteri BSPP-4 Penghasil Biosurfaktan 25
3.3.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Penghasil Biosurfaktan 26
3.3.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan 27
3.3.6. Produksi dan Ekstraksi Biosurfaktan 28
3.3.7. Karakterisasi Biosurfaktan 29
3.3.8. Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar 29
3.3.9. Diagram Alir 30

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN **31**

4.1. Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Penghasil Biosurfaktan 31
4.2. Potensi Bakteri Isolat lokal BSPP-4 sebagai Penghasil Biosurfaktan 32

4.3. Karakteristik Biokimia Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang 37
4.3.1. Pewarnaan Gram 37
4.3.2. Uji Katalase 38
4.4. Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang 39
4.5. Kondisi Optimum Produksi Biosurfaktan 41
4.5.1. Sumber Karbon Optimum 41
4.5.2. Sumber Nitrogen Optimum 43
4.5.3. Konsentrasi Inokulum Optimum 45
4.6. Ekstrak Biosurfaktan dari Bakteri Isolat BSPP-4 47
4.7. Karakterisasi Biosurfaktan Menggunakan FT-IR 48
4.8. Uji Antibakteri 50

V. SIMPULAN DAN SARAN 52

5.1. Simpulan 52
5.2. Saran 52

DAFTAR PUSTAKA 53

LAMPIRAN 59

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Jenis Mikroba dan Biosurfaktan yang dihasilkan.....6
2. Uji Biokimia Bakteri Penghasil Biosurfaktan.....38
3. Absorpsi FT-IR terhadap Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 dan Biosurfaktan Lipopeptida lainnya.....49
4. Nilai Absorbansi Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat BSPP-4 pada Media MSM.....60
5. Nilai Uji Indeks Emulsifikasi (IE_{24})% Bakteri Isolat Lokal BSPP-4 pada Media MSM.....60
6. Penentuan Sumber Karbon Optimum untuk Produksi Biosurfaktan menggunakan Glukosa dan Gliserol.....61
7. Penentuan Sumber Nitrogen Optimum untuk Produksi Biosurfaktan menggunakan $NaNO_3$ dan Urea.....62
8. Penentuan Konsentrasi Inokulum Optimum untuk Produksi Biosurfaktan dengan Variasi Konsentrasi Inokulum 5%, 7,5%, dan 10%.....63
9. Konsentrasi Biosurfaktan dan Kontrol untuk Uji Antibakteri terhadap Bakteri Gram Positif (*Staphylococcus aureus*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*)……65

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Sel Bakteri *Bacillus Subtilis* (Wheelis, 2007).....13
2. Kurva Pertumbuhan (Pratiwi, 2008).....14
3. Skema Alat FT-IR, (1) Sumber Inframerah, (2) Pembagi Berkas, (3) Kaca Pemantul, (4) Sensor Inframerah, (5) Sampel, dan (6) Display (Anam *et al*., 2007).....18
4. Spektrum IR yang dihasilkan oleh Bakteri Isolat ALP D1 (Citra, 2021).....19
5. Spektrum IR Biosurfaktan yang dihasilkan oleh Bakteri Indigen Isolat ALPE1 (Yusnidar, 2021).....20
6. Hasil Peremajaan Bakteri Isolat BSPP-4.....32
7. Uji Hemolisis (A) Bakteri Isolat BSPP-4, (B) Kontrol Media.....33
8. Uji *Oil Spread* (A), Biosurfaktan dan (B) Kontrol media.....34
9. Uji Emulsifikasi (A) Kontrol Media (B) Biosurfaktan.....35
10. Uji *Drop Collapse* (Ket : S = Surfaktan ; K- = Kontrol Negatif).....36
11. Pewarnaa Gram Bakteri Isolat lokal BSPP-4.....37
12. Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat BSPP-4.....40
13. Sumber Karbon Optimum Bakteri Isolat BSPP-4.....42
14. Sumber Nitrogen Optimum Bakteri Isolat BSPP-4.....44
15. Konsentrasi Inokulum Optimum Bakteri Isolat BSPP-4.....46
16. Biosurfaktan Kering setelah di*frezee drying*.....48
17. Spektrum IR Biosurfaktan.....48
18. Uji Antibakteri (A) Bakteri *E. coli* (B) Bakteri *S. aerus* (Ket. : S = Surfaktan ; K+ = Kontrol Positif ; K- = Kontrol Negatif).....50
19. Ekstrak Kasar Biosurfaktan yang telah Dispresipitasi Asam hingga pH 2.....64
20. Ekstrak Biosurfaktan yang didapatkan setelah dilakukan Presipitasi Asam 24 jam pada Suhu 4ºC dan disentrifius.....64
21. Biosurfaktan Kering setelah di *freeze drying*.....65

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Biosurfaktan merupakan kelompok molekul yang memiliki sifat aktif permukaan. Sifat tersebut dikarenakan biosurfaktan memiliki molekul ampifatik yang terdiri dari gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dapat menurunkan tegangan permukaan pada ruang antara air dan minyak (Elazzazya *et al*., 2015). Biosurfaktan dapat disintesis secara ekstrakseluler oleh mikroba serta sumber lain seperti jamur dan kapang (Takahashi *et al*., 2011). Menurut El-Sheshtawy *and* Doheim (2014) biosurfaktan yang bersumber dari mikroba mempunyai beberapa keuntungan diantaranya mempunyai sifat fisik dan kimia yang stabil, mudah terurai, serta dapat stabil pada temperatur tinggi.

Mikroba yang memiliki potensi sebagai penghasil biosurfaktan dapat diperoleh dari hasil isolasi bakteri dari sampel tertentu seperti tanah atau perairan tercemar. Ellazzazya *et al*., (2015) melakukan isolasi bakteri potensi biosurfaktan dari sampel tanah yang tercemar minyak, hasil penelitian menunjukkan *Virgibacillus salarius* memiliki kemampuan memproduksi biosurfaktan ditunjukkan dengan penurunan tegangan permukaan dan aktivitas pengemulsi (masing-masing 30 mN/m dan 80%) dan Wibisana (2018) juga melakukan isolasi bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut yang tercemar minyak. Isolat ML4-10 yang diisolasi dari air laut yang tercemar minyak, pada uji biosurfaktan menunjukkan bahwa aktifitas emulsifikasi 54,1% dan *oil displacement* 0,8 cm, sedangkan pada uji *oil drop test* menunjukkan nilai yang positif, yang menunjukan Isolat ML4-10 memiliki kemampuan memproduksi biosurfaktan. Citra (2021) dalam penelitiannya juga melaporkan bahwa bakteri isolat ALP D1 yang berasal

dari air laut pelabuhan Panjang mampu menghasilkan biosurfaktan jenis *lipopeptida*.

Produksi biosurfaktan dari bakteri isolat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain substrat pertumbuhan, usia kultur, dan kondisi lingkungan (waktu, temperatur, pH, salinitas, dan agitasi) (Sahara *et al.*, 2011). Elemen makro (karbon, nitrogen, dan konsentrasi NaCl) juga memegang peranan penting dalam menunjang pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan (Ilori *et al*., 2005). Wibisana *et al.,* (2015) melaporkan bahwa produksi biosurfaktan oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dengan penambahan glukosa dan urea sebagai sumber karbon dan nitrogen, dapat meningkatkan perolehan surfaktan 2,4 kali dibandingkan dengan kondisi sebelum optimasi yaitu 0,51 g/L menjadi 1,25 g/L. Glukosa bermanfaat sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Rashendi *et al.,* (2005) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa gliserol merupakan substrat yang paling baik untuk produksi *Rhamnolipid* oleh strain *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 dibandingkan dengan substrat gasolin, paraffin *oil*, dan *whey*. Makkar *and* Cameotra (2002) menyebutkan bahwa urea, sodium nitrat ($NaNO_3$), dan potasium nitrat merupakan sumber nitrogen yang paling baik untuk pertumbuhan *Bacillus subtilis* dibandingkan dengan sumber nitrogen lain yang dicobakan (pepton, yeast ekstrak, beef ekstrak, tripton, ammonium nitrat, dan sodium sulfat).

Biosurfaktan banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang industri seperti kosmetik dan makanan, serta bidang lingkungan seperti bioremediasi dan dispersi tumpahan minyak dan penanganan limbah (Nitschke *and* Pastore, 2004), sedangkan dalam bidang medis dapat digunakan sebagai antibakteri, antifungi, dan antivirus (Rodrigues *et al*., 2006). Biosurfaktan sebagai antibakteri telah banyak dibuktikan dengan beberapa penelitian diantaranya Rodrigues *and* Teixeira, (2010) melaporkan *Lipopeptida* yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* dan *Bacillus licheniformis*, serta *Mannosylerythriol* lipids yang dihasilkan oleh Candida antartica dan Rhamnolipid yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa*, telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba.

Yusnidar (2021) dalam penelitiannya juga melaporkan bahwa *lipopeptida* yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP E1 yang merupakan *Bacillus* mampu memberikan zona hambat sebesar 10,08 mm terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus,* sedangkan terhadap bakteri Gram negatif Esc*herichia coli* memberikan zona hambat sebesar 8,08 mm.

Studi awal terhadap bakteri isolat lokal asal sedimen perairan pelabuhan Panjang Lampung, memiliki kemampuan menghasilkan biosurfaktan hal ini ditandai dengan terbentuknya emulsi pada bakteri isolat BSPP-4 sebesar 40%, namun belum diketahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan. Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP-4 dengan memvariasikan sumber karbon, dan sumber nitrogen, kemudian optimasi yang diperoleh digunakan pada tahap produksi. Biosurfaktan yang diperoleh dari bakteri isolat BSPP-4 dilakukan karakterisasi dan uji potensi sebagai antibakteri.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitan ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan kondisi optimum produksi biosurfaktan dari bakteri isolat lokal BSPP-4 asal sedimen perairan pelabuhan Panjang.
2. Mendapatkan biosurfaktan dari bakteri isolat lokal BSPP-4 asal sedimen perairan pelabuhan Panjang, dan mengetahui karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan.
3. Mengetahui potensi biosurfaktan dari bakteri isolat lokal BSPP-4 asal sedimen perairan pelabuhan Panjang sebagai antibakteri.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pembaca mengenai kemampuan bakteri isolat lokal BSPP-4 asal sedimen perairan pelabuhan Panjang Lampung dalam menghasilkan biosurfaktan, serta mengetahui potensi biosurfaktan yang dihasilkan dalam bidang kesehatan yaitu sebagai antibakteri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosurfaktan

Biosurfaktan merupakan salah satu produk bioteknologi yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Struktur biosurfaktan mengandung berbagai molekul yang bersifat aktif yang disintesis oleh mikroorganisme. Senyawa ini mempunyai sifat amphipatik yaitu memiliki komponen hidrofilik dan hidrofobik. Bagian hidrofilik merupakan molekul polar yang dapat berupa karbohidrat, asam amino, atau kelompok fosfat. Bagian hidrofobik pada umumnya karbon rantai panjang atau rantai hidrokarbon dari asam lemak. Senyawa amphipatik bisurfaktan inilah yang mampu mengikat molekul hidrokarbon, menurunkan tegangan permukaan pada ruang antara air dan minyak dan membentuk mikroemulsi sehingga membantu degradasi hidrokarbon (Maneerat *and* Phetrong, 2007).

Biosurfaktan memiliki keunggulan dibanding surfaktan sintetik yaitu biosurfaktan memiliki tingkat toksisitas yang lebih rendah, mudah terurai secara biologi, lebih efektif pada suhu, pH dan kadar garam yang berlebihan, serta lebih mudah disintesis. Sifat aktif permukaan yang dimiliki biosurfaktan berbeda dengan surfaktan sintetik (Lin Soo *et al*., 2003). Biosurfaktan mampu mengikat molekul hidrokarbon tidak larut air dan mampu menurunkan tegangan permukaan serta secara ekstraseluler menyebabkan emulsifikasi hidrokarbon sehingga mudah untuk didegradasi (Rau *et al*., 2005). Kemampuan setiap jenis biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan berbeda-beda, dikarenakan bergantung pada struktur molekulnya (Muthusamy *et al.*, 2008).

Ron *and* Rosenberg (2001) juga mengelompokkan biosurfaktan menjadi 2 kelompok berdasarkan berat molekulnya, yaitu :

1. Biosurfaktan dengan berat molekul (BM) rendah, yaitu glikolipid, seperti soforolipid, trehalosa lipida, fosfolipid, dan asam lemak, yang semuanya memiliki bagian hidrofilik dan hidrofobik, berfungsi dalam menurunkan tegangan permukaan dan antar muka.
2. Biosurfaktan dengan berat molekul (BM) tinggi, yaitu lipoprotein, lipopolisakarida dan polisakarida amphipatik, tidak memiliki bagian hidrofilik dan hidrofobik serta lebih efektif pada stabilitas minyak dalam emulsi air.

Beberapa jenis biosurfaktan dari berbagai mikroba dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis mikroba dan biosurfaktan yang dihasilkan

Jenis Biosurfaktan	Jenis Mikroba
Glikolipida	
Trehalosa Mykolat	*Arthrobacter Paraffineus ; Mycobacterium Phlei ; Rhodococus Crythropolis*
Trehalosa Ester	*Mycobacterium Fortitum ; Micromonospora sp. ; Mycobacterium Smegmatis ; Mycobacterium Paraffinicum*
Mono-, Di-, dan Ttrisakarida Mykolat	*Arthrobacter sp. ; Corynebacterium Diphtheriae ; Mycobacterium Smegmatis ; Pseudomonas sp.*
Rhamnolipida	*Pseudomonas aeruginosa ; Candida sp.*
Sophorolipida	*Torulopsis Petrophilum ; Torulopsis apicola ; Torulopsis bombicola*
Fosfolipida dan Asam Lemak	
Fosfolipida dan asam lemak	*Candida sp. ; Corynebacterium sp. ; Micrococus sp.*
Fosfolipida	*Acinetobacter sp. ; Aspergillus sp. ; Thiobacillus thioxidans*
LipopeptidadanLipoprotein	
Gramiciden	*Bacillus brevis*
Polimyxin	*Bacillus polymyka*
Ornithin-lipida	*Pseudomonas rubescens*
Ceripilin	*Gluconobacter cerinus*
	Agrobactrium tumefaciens ; Streptomyses

Lysin – lipida	*sioyaensis*
Surfaktin-subtilysin	*Bacillus subtilis*
Peptida lipida	*Bacillus licheniformis*
Viscosin	*Pseudomonas fluorescens*
Serrawettin	*Serratia marcescens*
Surfaktan Polimer	
Lipo hetero polisakarida	*Calcoaceticus RAG-1*
Hetero Polisakarida	*Calcoaceticus A2*
Polisakarida Protein	*Calcoaceticus strain ; Candida lipolytica*
Manno-protein	*Saccharomyces cerevisae*
Karbohidrat protein	*Candida petrophilum ; Endomycopsis lipolytica*
Manno-komplek lipida	*Candida tropicalis*
Mannosa/erythrosa – lipida	*Shizonella melanogramma ; Ustilago maydis*
Kompleks karbohidrat protein lipida	*Debaryomyces polymorphus ; Pseudomonas sp. ; Pseudomonas fluorescens*
BiosurfaktanPartikular	
Membran vesikula	*Acinetobacter sp.* H01-N
Fimbriae	*Acinetobacter calcoacificus*
Seluruh bagian sel	*Berbagai jenis mikroba*

(Muthusamy *et al.*, 2008).

2.1.1 Aplikasi Biosurfaktan

Aplikasi biosurfaktan meliputi berbagai bidang antara lain aplikasi potensial dibidang pertanian, kosmetik, farmasi, deterjen, produk perawatan diri, pengolahan makanan, tekstil, perlengkapan laundri, perawatan dan pengolahan logam, serta pengolahan kertas dan industri cat. Biosurfaktan sering digunakan dalam studi tentang teknologi *Enhanced Oil Recovery* (EOR) untuk meningkatkan perolehan minyak dan bioremediasi hidrokarbon (Kosaric, 2001). Biosurfaktan yang diproduksi oleh mikroba telah menjadi

produk bioteknologi penting yang diaplikasikan secara luas di bidang industri dan medis. Biosurfaktan digunakan sebagai agen pengemulsi dan agen pembasah dalam industri logam, kertas, tekstil maupun industri pertanian (Banat *et al*., 2010). Biosurfaktan berperan sebagai agen pengemulsi dan bahan tambahan dalam industri pangan. Biosurfaktan juga diaplikasikan sebagai detergen untuk industri minyak bumi, agen antimikroba untuk industri farmasi dan kesehatan serta sebagai agen pengemulsi yang dapat mempercepat proses degradasi dalam proses bioremediasi senyawa toksik di lingkungan (Singh, 2012).

2.1.2 Uji Biosurfaktan

Indeks emulsifikasi (IE_{24}%) merupakan aktifitas emulsifikasi yang terjadi pada hidrokarbon uji dan ditetapkan sebagai presentase tinggi lapisan emulsi (mm) dibagi dengan total tinggi dari cairan kolom (Kumar *et al*., 2008). Emulsifikasi minyak oleh biosurfaktan terjadi karena adanya ikatan antar gugus hidrofobik dari tetes minyak dengan gugus hidrofilik dari biosurfaktan dengan membentuk struktur misel yang berukuran mikron sehingga menyebabkan minyak terdispersi dalam larutan dan terjadi emulsifikasi antara minyak-biosurfaktan dan air. Kestabilan suatu emulsi dapat ditentukan oleh beberapa faktor, diantaranya adalah ukuran partikel dan distribusi, jenis emulsifier yang digunakan, rasio antara fasa terdispersi dan fasa pendispersi dan perbedaan tegangan antara tegangan dua fasa.

Aktivitas permukaan dan kemampuan emulsifikasi biosurfaktan tidak selalu berhubungan secara linier. Soforolipid merupakan contoh biosurfaktan yang memiliki kemampuan emulsifikasi yang lemah, walaupun dapat menurukan tegangan antarmuka dan tegangan permukaan. Indikasi awal adanya bosurfaktan yang disintesis oleh mikroba tertentu hanya dilakukan uji emulsifikasi (Walter *et al.*, 2010).

2.1.3 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan

Biosurfaktan sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme atau mikroba. Biosurfaktan yang ditemukan pada umumnya dihasilkan oleh bakteri dengan jenis yang bervariasi, sebagai contoh *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus thermophilus*, dan *Lactobacillus* (Fukuoka *et al.*, 2007). Faktor-faktor umum yang mempengaruhi komposisi dan terakumulasinya biosurfaktan di dalam suatu media pertumbuhan antara lain substrat pertumbuhan, umur kultur, dan kondisi lingkungan (pH dan salinitas, temperatur, agitasi dan ketersediaan oksigen).

1. Substrat Pertumbuhan

Pemilihan sumber karbon mempunyai peran penting terhadap hasil dan struktur biosurfakatan. Sumber karbon yang telah diketahui dapat digunakan untuk produksi biosurfaktan yaitu karbohidrat, hidrokarbon, dan minyak nabati. Mikroorganisme tertentu memproduksi biosurfaktan hanya pada subsrat dengan beberapa sumber karbon yang digabungkan atau terpisah. Jenis, kualitas dan kuantitas biosurfaktan yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh sifat sumber karbon. Sumber karbon yang berbeda, juga dapat mempengaruhi komposisi dan produksi biosurfaktan. *Arthrobacter* hanya memproduksi 75% biosurfaktan ekstraseluler ketika ditumbuhkan pada asetat atau etanol, namun dapat mencapai 100% biosurfaktan ekstraseluler ketika ditumbuhkan pada substrat hidrokarbon. Panjang rantai substrat hidrokarbon sering berakibat signifikan terhadap konsentrasi akhir fermentasi biosurfaktan (Horowitz *et al.,* 2005).

Sumber karbon seperti mannitol, gliserol, dan ethanol mampu digunakan oleh *Pseudomonas sp.* untuk memproduksi *rhamnolipid*, namun produksinya masih lebih rendah dari substrat tidak larut air seperti n-alkana dan *olive oil*. *Bravibacterium* mampu tumbuh pada sumber karbon glukosa, gliserol, molasse, gasolin, *canola oil*, dan limbah minyak, akan tetapi biosurfaktan tipe

glikolipid hanya dapat diproduksi pada substrat dengan sumber karbon glukosa, gliserol, dan *canola oil*. Penurunan tegangan permukaan yang terbaik didapat pada substrat gliserol (Samadi *et al*., 2007).

Crude gliserol oli bekas, dan *crude oil* merupakan sumber karbon yang dapat digunakan oleh *Lysinibacillus Sphaericus* dalam pertumbuhannya dan produksi biosurfaktan. Oli bekas dan crude oil mengandung senyawa yang heterogen, hal ini menyebabkan lambatnya pertumbuhan sel bakteri dan mempengaruhi biosurfaktan yang dihasilkan (Sandri, 2009). Gliserol mudah dimanfaatkan oleh bakteri karena bersifat larut air dan asam lemak bebas yang terkandung dapat merangsang pembentukan biosurfaktan dengan cepat (Bidlan *et al.*, 2007).

Nitrogen merupakan unsur lain yang dibutuhkan dalam medium pertumbuhan yang dibutuhkan mikroba untuk produksi biosurfaktan. Sumber nitrogen dalam medium juga memberikan hasil yang baik dalam produksi biosurfaktan. Sumber nitrogen juga berperan sebagai pengontrol pH dalam medium. Garam ammonium dan urea memberikan hasil yang lebih baik untuk produksi biosurfaktan oleh *A. Paraffineus*. Nitrat juga mendukung produksi biosurfaktan lebih banyak oleh *P. Aeroginosa*. Rodrigues, *et al*., (2006) menyebutkan bahwa ketersediaan nitrogen yang terbatas tidak hanya menyebabkan produksi biosurfaktan yang berlebih namun juga mengubah komposisi dan biosurfaktan yang dihasilkan. Makkar *and* Cameotra (2002) menyebutkan bahwa sodium nitrat, potasium nitrat, dan urea merupakan sumber nitrogen yang paling baik untuk pertumbuhan *Bacillus subtilis* dibandingkan dengan sumber nitrogen lain yang dicobakan (pepton, yeast ekstrak, beef ekstrak, tripton, ammonium nitrat, dan sodium sulfat).

2. Umur Kultur

Umur kultur merupakan faktor yang penting untuk memproduksi biosurfaktan dalam kultur *batch*. Semakin tua umur kultur, maka semakin banyak nutrisi yang digunakan oleh mikroorganisme, sehingga nutrien dalam medium kultur

batch semakin terbatas. Hal tersebut dapat mengakibatkan akumulasi produk sisa metabolisme yang menyebabkan perubahan pada metabolisme sel dan produksi biosurfaktan. Bertambahnya umur kultur dapat berhubungan pula dengan pembentukan permukaan sel mikroba yang hidrofobik untuk digunakan dalam emulsifikasi emulsi minyak dan air. Produksi biosurfaktan secara signifikan meningkat pada saat memasuki fase stasioner sampai fasa kematian bakteri (Budiarti, 2000).

3. Kondisi Lingkungan

Faktor-faktor lingkungan yang berpengaruh dalam produksi biosurfaktan adalah pH, salinitas, temperatur, agitasi, dan ketersediaan oksigen. Faktor-faktor tersebut disamping mempengaruhi hasil biosurfaktan juga mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas sel. Biodegradasi oleh bakteri sebagian besar terjadi pada pH netral. Kenaikan dan penurunan temperatur kemungkinan berperan dalam mengubah metabolisme mikroba. Penelitian yang dilakukan Sandri (2009) menyebutkan bahwa pertumbuhan *L. spaerichus* dan aktivitas emulsi yang baik diperoleh pada pH 6. Pembentukan biosurfaktan oleh sel juga dipengaruhi oleh salinitas serta kadar oksigen. Salinitas dapat berfungsi membantu keseimbangan konsentrasi mineral dalam sel. Al-Araji *et al.,* (2007) menyebutkan bahwa pengaruh salinitas terhadap produksi biosurfaktan tergantung pada efek aktivitas seluler. Salinitas yang terganggu,akan mempengaruhi pertumbuhan sel dalam produksi biosurfaktan. Kultur dengan kondisi oksigen terbatas, menyebabkan biosurfaktan yang terbentuk dapat menurunkan tegangan permukaan hingga 15 mencapai 30 mN/m dimana pada kondisi aerob penuh atau anaerob hanya mencapai 40 mN/m (Budiarti, 2000).

2.2. Bakteri

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Kelompok bakteri tertentu dikenal sebagai agen penyebab infeksi dan

penyakit, sedangkan kelompok lainnya dapat memberikan manfaat dibidang pangan, pengobatan, dan industri (Berg*et al*., 2002).

2.2.1 Klasifikasi Bakteri

Untuk memahami beberapa kelompok organisme diperlukan suatu klasifikasi, tes biokimia, dan pewarnaan gram, yang merupakan kriteria efektif sebagai klasifikasi. Hasil pewarnaan mencerminkan perbedaan dasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga dapat membagi bakteri menjadi 2 kelompok, yaitu bakteri Gram-positif dan bakteri Gram-negatif.

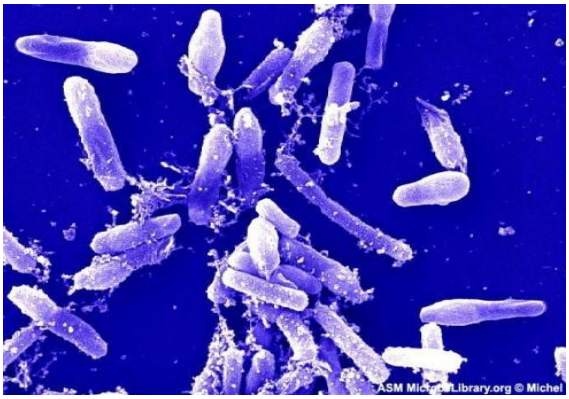
1. Bakter Gram Positif

Bakteri Gram positif merupakan jenis bakteri yang dapat mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna ungu jika diamati menggunakan mikroskop. Bakteri Gram positif memiliki cir-ciri dinding sel yang homogen dengan ketebalan 20-80 nanometer dan tersusun dari senyawa peptidoglikan. Bakteri Gram positif memiliki bentuk sel batang atau berbentuk filamen dan bulat, serta sistem reproduksi bakteri Gram positif melalui pembelahan secara biner. Alat geraknya berupa flagela nonmotil maka menggunakan petritrikus. Karakteristik yang membedakan bakteri Gram positif adalah komposisi dinding selnya. Bakteri gram positif memiliki beberapa lapisan peptidoglikan yang bergabung bersama membentuk struktur tebal dan kaku,sedangkan bakteri Gram negatif hanya memiliki lapisan tipis peptidoglikan (Wheelis, 2007).

B. subtilis merupakan salah satu contoh bakteri gram positif, berbentuk batang, dapat tumbuh pada kondisi aerob dan anaerob. *B. subtilis* memiliki spora yang tahan terhadap panas (suhu tinggi), mampu mendegradasi *xylan* dan karbohidrat. *B. subtilis* mempunyai sifat khusus yang dapat dijelaskan sebagai berikut :

1. Mampu tumbuh pada suhu lebih dari 50°C dan suhu kurang dari 5°C

2. Mampu bertahan terhadap pasteurisasi
3. Mampu tumbuh pada konsentrasi garam tinggi (>10%)
4. Mampu menghasilkan spora
5. Mempunyai daya proteolitik yang tinggi dibandingkan mikroba lainnya.



Gambar 1. Sel Bakteri Bacillus Subtilis (Wheelis, 2007).

2. Bakteri Gram Negatif

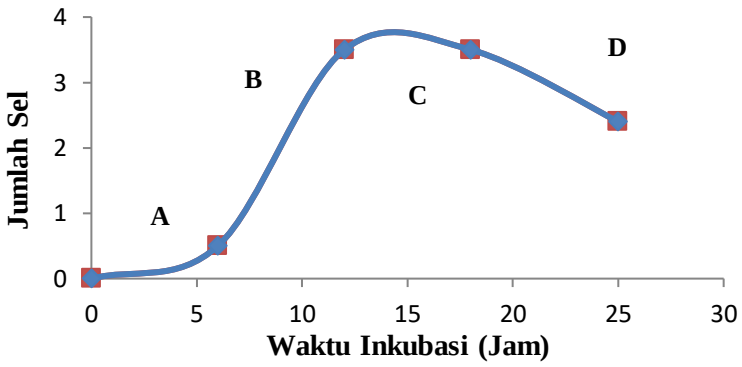
Bakteri Gram Negatif merupakan bakteri yang bagian dinding selnya dapat menyerap zat warna merah. Bakteri ini mempunyai lapisan peptidoglikan tipis yang terdapat pada ruang periplasmik, yaitu antara membran luar dengan membran plasma. Contoh dari bakteri Gram negatif diantaranya yaitu *Salmonella typhi, Rhizobium leguminosarum, azotobacter, Neisseria gororrhoeae, Pseudomonas aeruginosa, Helicobacter pylori* dan *Haemophilus influenza*. Bakteri Gram negatif memiliki sifat patogen sehingga lebih berbahaya jika dibandingkan bakteri Gram positif, hal ini dikarenakan membran luar di bagian dinding sel bisa melindungi bakteri tersebut sehingga dapat menghalangi masuknya zat antibiotik dan juga sistem dari pertahanan inang (Wheelis, 2007).

P.aeruginosa merupakan salah satu jenis bakteri gram negatif yang berbentuk batang halus atau lengkung, motil, berukuran sekitar 0,6 x 2 mm. Bakteri ini

dapat ditemukan soliter, berpasangan dan kadang-kadang membentuk rantai pendek. Bakteri ini merupakan bakteri motil karena mempunyai flagela monotrika (flagel tunggal pada kutub) dan memerlukan oksigen untuk motilitas. *P. aeruginosa* adalah aerob obligat yang tumbuh dengan mudah pada banyak jenis media pembiakan, *P. aeruginosa* kadang-kadang berbau manis seperti anggur atau seperti bau *corn taco* (Kayser *et al*., 2005).

2.2.2 Kurva Pertumbuhan

Pertumbuhan bakteri merupakan meningkatnya jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Proses pertumbuhan terjadi tergantung dari kemampuan sel dalam membentuk protoplasma baru dari *nutrient* yang tersedia di lingkungan, dan apabila faktor-faktor lingkungan telah sesuai, maka bakteri akan membelah diri. Bakteri yang mula-mula membelah dengan kecepatan lambat dan kemudian meningkat, dapat dihitung dan dibuat grafiknya dengan hubungan antara jumlah bakteri dan waktu yang terbentuk. Grafik yang dibuat pada kertas semilogaritma maka dapat digambarkan fase-fase bakteri seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan (Pratiwi, 2008).

Kurva pertumbuhan pada Gambar 2, terlihat adanya fasa-fasa pertumbuhan yang terbentuk. Berikut ini penjelasan mengenai fasa-fasa yang terjadi pada pertumbuhan bakteri:

1. Fasa Lag

Fasa Lag merupakan fasa dimana bakteri mulai menyesuaikan diri dengan lingkungan baru. Bermacam-macam enzim dan zat perantara dibentuk sehingga keadaannya memungkinkan terjadinya pertumbuhan lebih lanjut. Sel-selnya mulai membesar tetapi belum mulai membelah diri.

2. Fasa Eksponensial (Logaritma)

Fasa Eksponensial merupakan fasa dimana kecepatan pembelahan paling tinggi, waktu generasinya pendek dan konstan. Selama fasa ini metabolisme terjadi paling pesat, dan pada fasa ini kecepatan pertumbuhan sangat dipengaruhi oleh media tempat tumbuhnya seperti pH, kandungan nutrien, dan kodisi lingkungan termasuk suhu dan kelembaban udara.

3. Fasa Stasioner

Fasa Stasioner adalah fasa ketika jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati karena cadangan makanan sudah mulai menipis dan pada fasa ini bakteri akan menghasilkan metabolit sekunder sebagai pertahanan diri terhadap lingkungannya dan mikroorganisme lain.

4. Fasa Kematian

Fasa kematian adalah fasa yang menunjukkan bahwa jumlah sel yang mati lebih banyak dari pada yang hidup. Hal ini berhubungan dengan sumber nutrisi pada media mulai habis, sehingga populasi bakteri menurun (Hidayat dkk., 2006).

2.2.3 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme yang bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme. Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Antibakteri dalam bidang farmasi dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja secara bakteriostatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik (Jawetz *et al*., 2005).

Berbagai struktur kimia, seperti glikolipid, lipopeptida, kompleks polisakarida-protein, fosfolipid, asam lemak dan lipid netral, telah dikaitkan untuk biosurfaktan. Biosurfaktan tertentu dijelaskan potensinya sebagai senyawa aktif biologis dan penerapannya dalam bidang medis. Biosurfaktan seperti lipopeptida dapat bertindak sebagai antibiotik, antivirus dan agen antitumor, imunomodulator atau racun spesifik dan enzim penghambat (Ahimou *et al*., 2001).

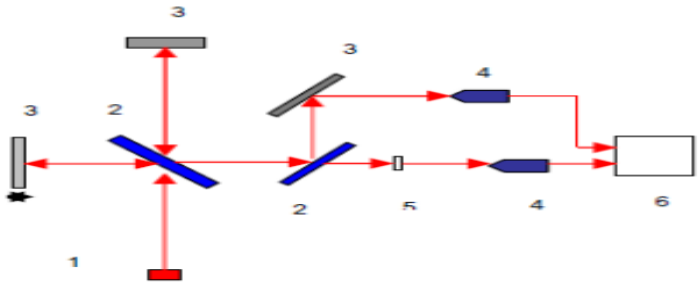
2.3. *Fourier Transform Infra Red* (FT-IR)

Fourier Transform Infra Red (FT-IR) merupakan teknik analisis untuk melihat gugus-gugus dalam sebuah molekul ataupun senyawa melalui vibrasi-vibrasi yang ditimbulkan oleh atom tersebut. Spektrum *Infra Red* (IR) untuk melihat gugus-gugus dalam sebuah molekul diperoleh dengan cara

menembakkan radiasi sinar infra merah ke sampel untuk menentukan fraksi apa yang terjadi saat melewatkan radiasi yang terabsorpsi dengan energi khusus. Energi yang terdapat pada beberapa puncak dalam sebuah spektrum absorpsi menunjukkan kecocokan terhadap frekuensi pada vibrasi dari sebagian molekul sampel (Ayyad, 2011).

Prinsip kerja FT-IR adalah energi inframerah diemisikan dari sumber dan berjalan melalui bagian optik dari spektrometer. Gelombang sinar kemudian berjalan melewati interferometer, kemudian sinar tersebut dipisahkan dan digabungkan lagi untuk menghasilkan suatu pola interferensi. Gelombang sinar ditransmisikan dan diukur oleh detektor. Detektor kemudian menghasilkan suatu interferogram yaitu suatu daerah yang menggambarkan pola interferensi *Analog Digital Converter* (ADC), kemudian mengubah pengukuran tersebut menjadi suatu formal digital yang digunakan oleh komputer. *Fast Fourier Transform* (FFT) mengubah interferogram menjadi suatu pita spektrum tunggal (*single-beam spectrum*) (Muyonga *et al*., 2004).

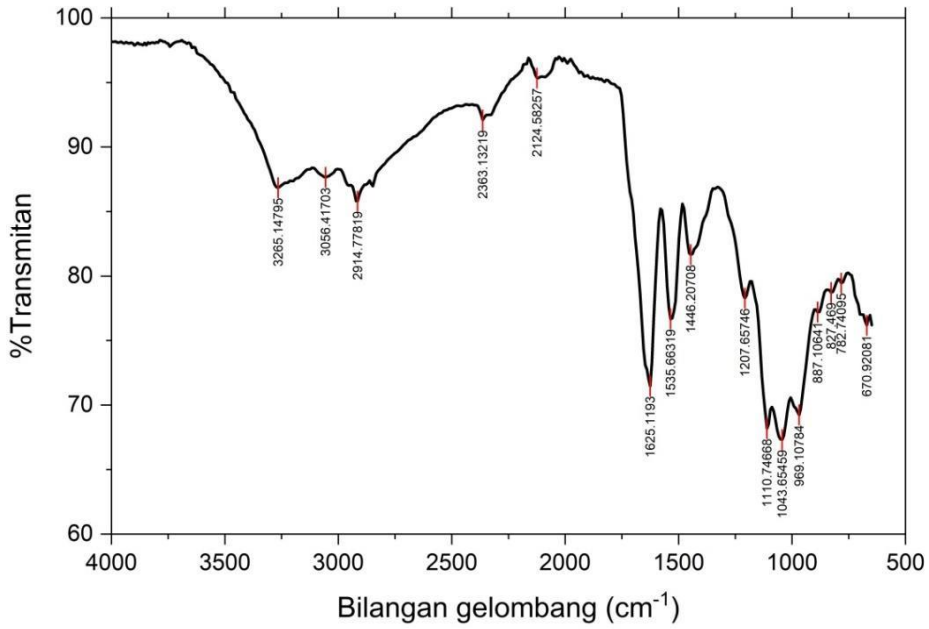
Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentrasmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, transmittan (%) dengan bilangan gelombang (cm^{-1}). Skema alat spektroskopi FT-IR secara sederhana ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Alat FT-IR, (1) Sumber Inframerah, (2) Pembagi Berkas, (3) Kaca Pemantul, (4) Sensor Inframerah, (5) Sampel, dan (6) Display (Anam *et al*., 2007)

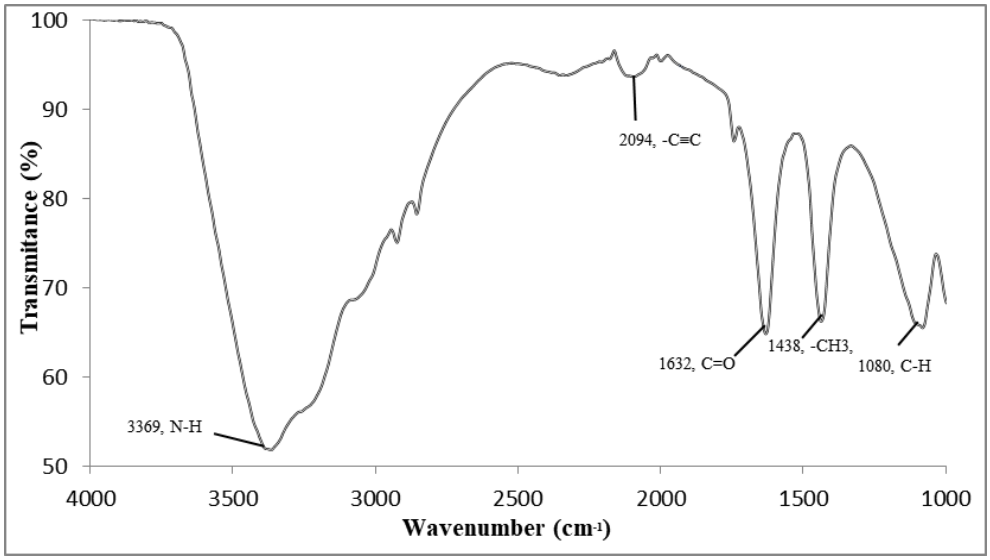
FT-IR dapat digunakan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam sampel uji, salah satunya adalah biosurfaktan. Gugus-gugus fungsi yang telah diperoleh akan mempermudah untuk mengetahui jenis biosurfaktan yang dianalisis. Biosurfaktan tertentu akan memiliki serapan FT-IR yang berbeda.

Penelitian Citra (2021) menyatakan bahwa bakteri isolat ALP D1 diduga dapat memproduksi senyawa biosurfaktan jenis lipopeptida, yang ditandai dengan terbentuknya spektrum pada bilangan gelombang 3265 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan NH *stretching*, CO *stretching* pada bilangan gelombang 1207 cm^{-1}, CO-N *stretching* pada bilangan gelombang 1625 cm^{-1}, dan membentuk CH alifatik pada bilangan gelombang 1625-1446 cm^{-1}. Spektrum IR yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum IR yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP D1 (Citra, 2021)

Yusnidar (2021) dalam penelitiannya juga melaporkan biosurfaktan yang diproduksi dari bakteri indigen isolat ALP E1 merupakan biosurfaktan jenis lipopepida, hal ini dikarenakan bakteri indigen isolat ALP E1menghasilkan spektrum pada rentang 4000-1000 cm^{-1}. Spektrum IR yang terbentuk yaitu pada puncak karakteristik 3369 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan N-H. Puncak spektrum pada 2094 cm^{-1} menunjukkan adanya intensitas C≡C. Spektrum pada bilangan gelombang 1632 cm^{-1} menunjukkan keberadaan C=O. Pita serapan pada bilangan gelombang 1438 cm^{-1} dan 1080 cm^{-1} masing-masing mewakili $–CH_3$ dan ikatan C-H. Spektrum IR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri indigen isolat ALP E1 dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektrum IR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri indigen isolat ALPE1 (Yusnidar, 2021)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2021 sampai dengan bulan Desember 2021 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Uji hemolisis dan identifikasi bakteri, dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Balai Veteriner Lampung.Karakterisasi Biosurfaktan menggunakan FT-IR dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu gelas ukur, cawan petri, labu takar, tabung reaksi, jarum ose, erlenmeyer, pipet tetes, mikropipet, sentrifuga, *laminar air flow*, oven, *incubator*, *shaker incubator*, *autoclave*, vortex, neraca analitik, gunting, penangas, kasa, kapas, *alumunium foil*, kertas cakram, plastik wrap, bunsen, kertas cakram, FT-IR dan spektrofotometer *UV-Vis.*

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri asal sedimen pelabuhan panjang (BSPP-4), NA (*Nutrient Agar*), NB (*Nutrient Broth*), BA (*Blood Agar*), MHA (*Mueller Hinton Agar*), aquades, ciprofloxacin, glukosa, gliserol, urea, sodium nitrat ($NaNO_3$), HCl 6M, kloroform, metanol, oli, pelumas, solar, darah kambing, dan media MSM yang terdiri dari (NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4.7H_2O$, $MnSO_4.H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$).

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

1. Media NA (*Nutrient Agar*)

Media *Nutrient Agar* digunakan untuk meremajakan dan menyimpan isolat bakteri. 2,8 gram *Nutrient Agar* dilarutkan ke dalam 100 mL aquades, lalu dipanaskan. Media yang telah larut seluruhnya kemudian dipanaskan dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media *Nutrient Agar* yang telah steril kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi. Media didinginkan sampai memadat didalam *Laminar Air Flow*, jika tidak terlihat adanya kontaminan/pengotor, maka media ini dapat digunakan (Hadioetomo, 1993).

2. Media NB (*Nutrient Broth*)

Media *Nutrient Broth* merupakan media yang digunakan sebagai media inokulum atau adaptasi bakteri. 1,3 gram *Nutrient Broth* dilarutkan ke dalam 100 mL aquades dalam erlenmeyer, dan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit (Francy *et al*., 1991).

3. Media BA (*Blood Agar*)

Media *Blood Agar* merupakan media untuk uji hemolisis, uji ini dilakukan untuk mengetahui isolat bakteri yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan. 2,8 gram *Blood Agar* dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian dihomogenkan menggunakan *stirrer magnetic*. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Media yang telah steril didinginkan hingga mencapai suhu 45-50°C. 5-7% (v/v) darah kambing ditambahkan kedalam media. Media dituang ke dalam cawan dan

ditunggu hingga padat. Penuangan tersebut dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (Jennings *and* Tanner, 2000).

4. Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Media *Mueller Hinton Agar* merupakan media untuk uji antibakteri. 3,8 gram *Mueller Hinton Agar* dilarutkan dalam 100 mL aquades, lalu dipanaskan. Media yang telah larut seluruhnya, kemudian dipanaskan dan disterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media *Mueller Hinton Agar* dituangkan ke dalam cawan petri yang telah sterilisasi. Penuangan tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow*, kemudian media didinginkan sampai memadat, dan jika tidak terlihat adanya kontaminan/pengotor, maka media dapat digunakan.

5. *Mineral Salt Medium* (MSM)

Mineral Salt Medium (MSM) merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan dan digunakan sebagai media produksi biosurfaktan. Komposisi MSM yang digunakan adalah NaCl 0,1 g/L, K_2HPO_4 5,0 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 3,0 g/L, $FeSO_4.7H_2O$ 0,01 g/L, $MnSO_4.H_2O$ 0,002 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g/L, $CaCl_2.2H_2O$ 0,01 g/L, lalu dilarutkan dalam aquades kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media disimpan dalam *Laminar Air Flow* dan siap untuk digunakan (Francy *et al*., 1991).

6. Peremajaan Isolat

Peremajaan berfungsi untuk menjaga nutrisi bakteri isolat yang digunakan sebagai stok kultur biakan. Peremajaan dilakukan pada media *nutrient agar* cawan dengan menginokulasikan 1 ose bakteri isolat BSPP-4 asal sedimen pelabuhan Panjang dengan metode gores zig-zag, dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Bakteri isolat hasil peremajaan siap digunakan

sebagai stok kultur dan disimpan di dalam lemari pendingin 4°C (Kalyani *et al*., 2014).

3.3.2. Uji Biosurfaktan

1. Uji Hemolisis

Uji hemolisis merupakan uji pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan biosurfaktan dengan mengamati aktivitas hemolisis bakteri menggunakan media agar darah (*Blood Agar*). Uji ini dilakukan dengan menggoreskan bakteri isolat pada media agar darah (*Blood Agar*) dan diinkubasi selama 48-72 jam pada suhu 37°C. Aktivitas hemolisis ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri dapat menjadi indikator terbentuknya biosurfaktan (Das *et al*., 2008).

2. Uji *Oil Spread*

Uji *oil spread* digunakan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dari bakteri yang diuji, dengan mengamati kemampuan bakteri dalam menghilangkan lapisan minyak pada permukaan air. Kultur cair bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Aquades dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL diikuti dengan penambahan solar hingga membentuk lapisan tipis pada permukaan aquades. Supernatan dari kultur bakteri kemudian ditambahkan sebanyak 1 tetes ke permukaan solar. Hasil positif ditandai dengan memisahnya minyak dan membentuk zona bening. Larutan aquades digunakan sebagai kontrol negatif (Morikawa *et al*., 2000).

3. Uji Emulsifikasi

Uji emulsifikasi digunakan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsikan zat cair yang berbeda kepolarannya. Kultur cair bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Supernatan bebas sel hasil fermentasi dicampur dengan pelumas di dalam tabung reaksi dengan perbandingan 1:1 (2 mL supernatan dicampur dengan 2 mL pelumas). Campuran di*vortex* selama 2 menit dan selanjutnya didiamkan 24 jam sehingga terbentuk emulsi yang stabil dan dihitung nilai emulsifikasinya (Pereira *et al.,* 2013).

$$IE_{24}\ (\%) = \frac{tinggi\ lapisan\ teremulsi\ (\text{cm})}{tinggi\ total\ larutan\ (\text{cm})}\ \text{X}\ 100\%$$

4. Uji *Drop Collapse*

Uji *drop collapse* merupakan uji cepat untuk mengetahui adanya aktivitas biosurfaktan dari bakteri yang diuji. Kultur cair bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Uji ini dilakukan dengan meneteskan 1 tetes oli ke dalam cawan petri, kemudian diamkan beberapa saat pada suhu ruang. Supernatan ditambahkan sebanyak 1 tetes ke permukaan tetesan oli. Bentuk tetesan pada pemukaan minyak diamati. Hasil dinyatakan positif apabila tetesan berubah menjadi datar atau melebar, sedangkan tetesan yang tetap berbentuk bulat dinyatakan negatif (Plaza *et al*., 2006).

3.3.3. Karakterisasi Bakteri BSPP-4 Penghasil Biosurfaktan

Identifikasi bakteri isolat BSPP-4 asal sedimen pelabuhan Panjang dilakukan dengan mengamati bentuk morfologi, uji pewarnaan gram, dan uji katalase

yang mengacu pada buku *identifikasi Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Sevent Edition.*

1. Pewarnaan Gram Bakteri

Uji pewarnaan Gram dilakukan dengan pengecatan Gram untuk dapat membedakan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Kultur bakteri diteteskan pada *object glass*. Senyawa *crystal violet* diteteskan pada preparat secara merata,dan didiamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan. Larutan *iodine* diteteskan pada preparat dan dikering anginkan, lalu dicuci dengan air mengalir. Alkohol 90% diberikan sebagai larutan pemucat, tetes demi tetes sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi, cuci *object glass* pada air mengalir dan dikering anginkan. Teteskan safranin selama 30 detik, cuci kembali dan dibiarkan kering di udara. Kemudian diamati dibawah mikroskop (Buchanan *and* Gibbons, 2003).

2. Uji Katalase

Uji katalase merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui bakteri aerob atau anaerob. Isolat bakteri yang digunakan telah diremajakan selama 24 jam. 1 ose isolat bakteri diletakkan pada kaca objek dan ditetesi dengan H_2O_2 3 % sebanyak 1-2 tetes. Hasil uji positif bila dihasilkan buih atau gelembung gas dan hasil negatif bila tidak dihasilkan buih atau gelembung (Buchanan *and* Gibbons, 2003).

3.3.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui fase pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam medium NB, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan shaker *incubator* berkecepatan 150 rpm. 2% inokulum dimasukkan ke media

MSM dan dishaker pada suhu ruang dengan kecepatan 150 rpm. Pengukuran nilai OD (*Optical Density*) dilakukan 12 jam sekali. 0,3 mL kultur dan 2,7 mL aquades dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan dilakukan menggunakan *Microsoft Office Excel* (Francy *et al*., 1991).

3.3.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan

1. Penentuan Sumber Karbon Terbaik

Sumber karbon terbaik dipilih berdasarkan kemampuan menunjang produksi biosurfaktan terbanyak yang dilihat dari penurunan tegangan permukaan media. Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:glukosa, dan gliserol. Optimasi dilakukan dengan cara menyiapkan 3 erlenmeyer 250 mL yang berisikan media MSM 100 mL dan 2 erlenmeyer lainnya media MSM yang ditambahkan dengan glukosa, dan gliserol 2% (Abouseoud dkk., 2008). 2% (v/v) inokulum dari media NB ditambahkan ke dalam masing-masing media MSM dierlenmeyer yang telah steril. Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada waktu optimumnya, suhu 30ºC dan kecepatan 150 rpm. Uji biosurfaktan dilakukan (uji indeks emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse*) untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan setelah dioptimasi (Nugroho, 2006).

2. Penentuan Sumber Nitrogen Terbaik

Metode yang digunakan untuk mengetahui sumber nitrogen terbaik sama halnya dengan penentuan sumber karbon terbaik. Sumber nitrogen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu $NaNO_3$, dan urea. Optimasi dilakukan dengan cara menyiapkan 3 erlenmeyer 250 mL yang berisikan media MSM beserta sumber karbon optimumnya 100 mL dan 2 erlenmeyer lainnya media

MSM beserta sumber karbon optimumnya yang ditambahkan dengan $NaNO_3$, dan urea 2% (Abouseoud dkk, 2008). 2% (v/v) inokulum dari media NB ditambahkan ke dalam masing-masing media MSM dierlenmeyer yang telah disteril. Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada waktu optimumnya, suhu 30ºC dan kecepatan 150 rpm. Uji biosurfaktan dilakukan (uji indeks emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse*) untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan setelah dioptimasi (Nugroho, 2006).

3. Penentuan Konsentrasi Inokulum Terbaik

Variasi jumlah inokulum dilakukan untuk mengetahui jumlah inokulum terbaik yang menunjang produksi biosurfaktan yang terbanyak. Optimasi dilakukan dengan cara menyiapkan 3 erlenmeyer 250 mL yang berisikan media MSM beserta sumber karbon dan sumber nitrogen optimumnya 100 mL. Inokulum dari media NB dimasukkan ke dalam media MSM yang telah steril dengan variasi 5%, 7,5%, dan 10% (v/v). Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker incubator* pada waktu optimumnya, suhu 30ºC dan kecepatan 150 rpm. Uji biosurfaktan dilakukan (uji indeks emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse*) untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan setelah dioptimasi (Nugroho, 2006).

3.3.6. Produksi dan Ekstraksi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan bertujuan untuk mendapatkan ekstrak biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP-4, yang menunjukkan hasil skrining terbaik. Sumber karbon, sumber nitrogen, dan konsentrasi inokulum media yang digunakan dalam proses produksi biosurfaktan menggunakan kondisi optimum yang telah diperoleh pada tahap optimasi media MSM. Produksi biosurfaktan dilakukan dengan menginokulasi bakteri isolat BSPP-4 ke dalam media NB dan di*shaker* selama 24 jam di dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 30ºC. Konsentrasi inokulum optimum (v/v) kultur 24 jam pada

media NB dipindahkan ke dalam 1000 L media MSM yang telah ditambah sumber karbon dan sumber nitrogen optimum. Media produksi kemudian di*shaker* menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm, suhu 30ºC hingga memasuki jam fase stasioner. Media disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dikumpulkan untuk proses ekstraksi biosurfaktan (Francy *et al*., 1991).

Biosurfaktan diekstraksi menggunakan metode presipitasi asam. Cara yang dilakukan yaitu membuat pH supernatan bebas sel menjadi pH 2 dengan menambahkan HCl 6 M. Supernatan tersebut dibiarkan mengendap selama 24 jam pada suhu 4ºC. Endapan tersebut kemudian dikumpulkan dengan mensentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Ekstrak biosurfaktan yang terbentuk dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* hingga diperoleh ekstrak biosurfaktan kering (Nitschke *and* Pastore, 2006; Mnif *et al*., 2016).

3.3.7. Karakterisasi Biosurfaktan

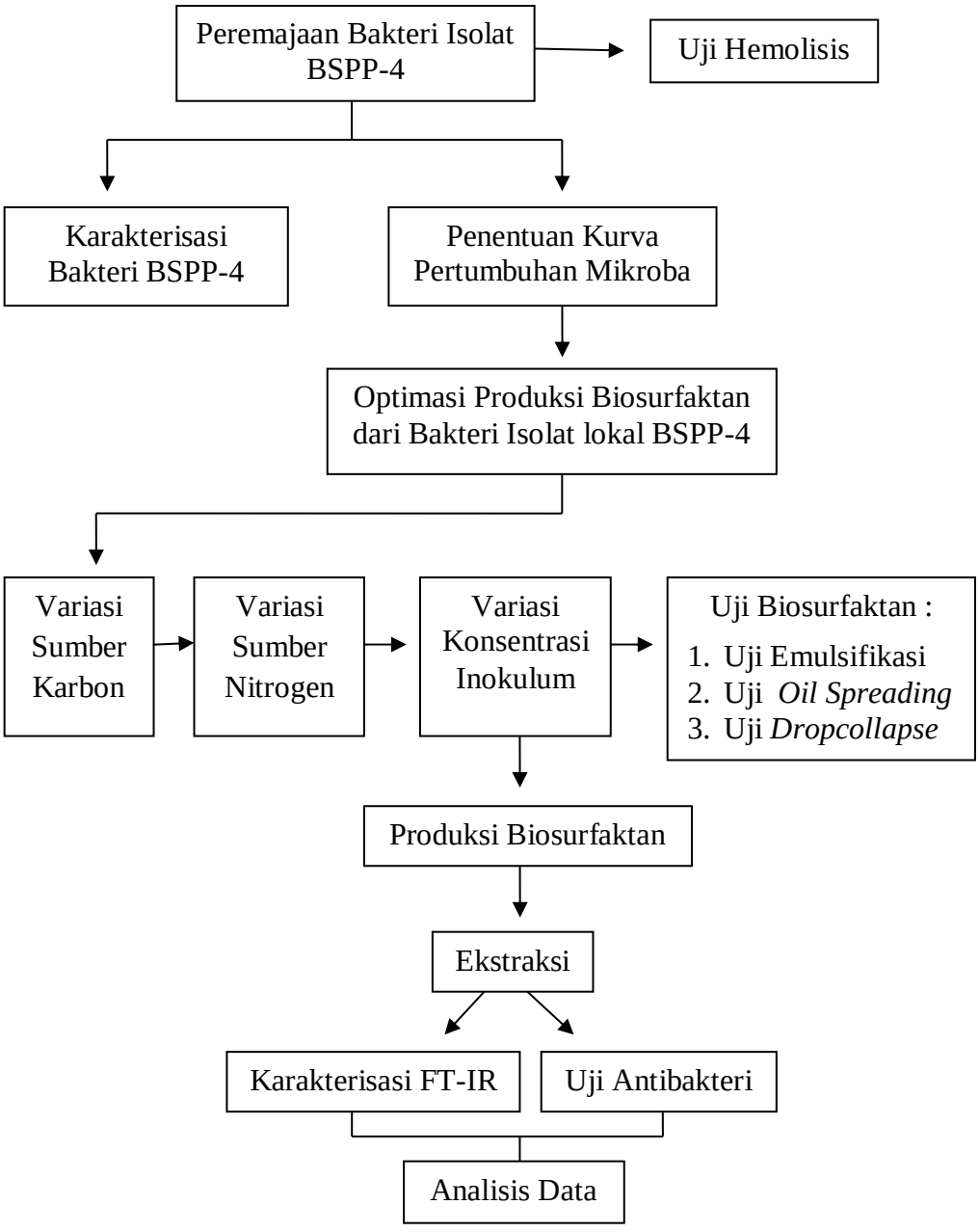
Ekstrak biosurfaktan yang diperoleh dari proses ekstraksi, selanjutnya dikarakterisasi menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR). Karakterisasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak biosurfaktan. Ekstrak biosurfaktan diambil sebanyak 1 mg dan ditambahkan 100 mg KBr, ekstrak biosurfaktan dikarakterisasi menggunakan FTIR dengan bilangan gelombang 4000 hingga 650 cm^{-1} (Rane, 2017).

3.3.8. Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap beberapa bakteri uji, baik bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) maupun bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*). Suspensi bakteri dinokulasikan ke dalam media MHA yang telah dibuat sebelumnya, dan diratakan diatas permukaan media

menggunakan *spreader*. Kertas cakram yang telah dicelupkan pada biosurfaktan diletakkan di atas lapisan agar. Kontrol positif menggunakan Ciprofloxacin, dan kontrol negatif menggunakan methanol yang diteteskan pada kertas cakram. Kultur diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, pembentukan zona hambat disekitar kertas cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong (Das *et al*., 2008).

3.3.9. Diagram Alir



V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh simpulan bahwa:

1. Kondisi optimum produksi biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP-4 yaitu menggunakan gliserol 2% sebagai sumber karbon, dan $NaNO_3$ 0,3% sebagai sumber nitrogen dengan konsentrasi inokulum sebanyak 7,5%, dan waktu pertumbuhan 96 jam.
2. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat BSPP-4 berwarna kuning, dengan berat 0,9674 g/L. Berdasarkan analisis FT-IR biosurfaktan diduga merupakan jenis *Lipopeptida.*
3. Biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri isolat BSPP-4 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji Gram positif (*Staphylococcus aereus)* dengan zona bening sebesar 1,16 cm, sedangkan terhadap bakteri uji Gram negatif (*Escherichia coli*) sebesar 1,72 cm.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini, terdapat beberapa saran untuk penelitian selanjutnya:

1. Melakukan optimasi produksi biosurfaktan dengan parameter lain (variasi konsentrasi sumber karbon nitrogen, pH, dan salinitas).
2. Melakukan analisis biosurfaktan menggunakan GC-MS dan KLT.
3. Melakukan variasi konsentrasi biosurfaktan menggunakan konsentrasi yang berbeda..

DAFTAR PUSTAKA

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. and Nabi, A. 2008. Evaluation of different Carbon and Nitrogen Sources in Production of Biosurfactant by *Pseudomonas flourescens*. *Desalination*. **223**(1-3), 143-151.

AL-Araji, L., Rahman, R. N., Basri, M. and Salleh, A. B. 2007. Microbial Surfactant. *J. Molecular Biol and Biotechn*. **15**(3):99-105.

Alvionita**,** M. dan Hertadi**,** R. 2021. Pengaruh Jenis Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Halofil. *Ind. J.Chem. Anal*. **4**(1):11-17.

Anam, C., Sirojudin. dan Firdausi, K. S. 2007. Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR. *Berkala Fisika.* **10**: 79-85.

Ahimou, F., Jacques, P. and Delue, M. 2001. Surfactin and Iturin Effects on *Bacillus Subtilis* Surface Hydrophobicity. *Enzyme Microb. Technol*. **27**: 749-54.

Ayangbenro, A. S. and Babalola, O. O. 2020. Genomic Analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its Heavy Metal Removal from Polluted Soil. *Scientific Reports*. **10**:19660.

Ayyad, O. D. 2011. Novel Strategies the Synthesis of Metal Nanoparticle and Nanostructure (*Tesis*). Universitas de Barcelona. Barcelona.

Banat, I. M., Franzeti, A., Bestetti, I., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J. and Marchant, R. 2010. Microbial Biosurfactants Production, Application and Future Potential. *J. Appl Microbiol and Biotechnol*. **87**(2):427-444.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. 2002. *Biochemistry 5th Edition*. W.H. Freeman Publishing. New York.

Bezza, F. A. and Chirwa, E. M. N. 2015. Production and Applications of Lipopeptide Biosurfactant for Bioremediation and Oil Recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*. **101**: 168-178.

Bidlan, R., Deepthi, N., Rastogi, N. K. and Manonmani, H. K. 2007. Optimised Production of Biosurfactant by *Serratia marcesce*ns DT-IP. *J. oF Mikrobiol*. **2**(10):705-716.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 2003. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Sevent Edition.* The William and Willkins Company Baltimore. USA.

Budiarti, R. S. 2000. Optimasi Konsentrasi Crude Oil dan Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik. (*Tesis*). Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Cameotra, S. S. and Singh, P. 2008. Bioremediation of Oil Sludge using Crude Biosurfactants, Int. *Biodeterioration & Biodegradation*. **62**: 274-280.

Cappucino, J. G. and Sherman, N. 1983. *Microbiology a Laboratory Manual, 4th Edition*. Menio Park, Addison-Wesley Publ. USA.

Citra, S. 2021. Produksi dan karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Air Laut Pelabuhan Panjang menggunakan Sumber Karbon Minyak Bumi. (*Skripsi*). Universitas Lampung. Lampung.

Das P, S., Mukherjee. and Sen, R. 2008. Antimicrobial Potential of a Lipopeptide Biosurfactant Derived from a Marine *Bacillus circulans*. *J. Appl Microbiol*. **104**:1675-1684.

Elazzazya, A. M., Abdelmoneim, T. S. and Almaghrabi, O. A. 2015. Isolation and Characterization of Biosurfactant Production Underextreme Environmental Conditions by Alkali-halo-thermophilicbacteria from Saudi Arabia. *J. of Biological Sciences*. **22**(4):466-475.

El-Sheshtawy, H. S. and Doheim, M. M. 2014. Selection of *Pseudomonasaeruginosa* for Biosurfactant Production and Studies of its Antimicrobial Activity. *J. of petroleum*. **23**:1-6.

Fathin, H. 2010. *Pengaruh Konsentrasi Crude Gliserol (Limbah Biodiesel) terhadap Pertumbuhan Lysinibacillus Spharicus Strain HytAP-B60 dan Indeks Emulsifikasi Biosurfaktan yang dihasilkan.* Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.

Francy, D. S., Thomas, R. L. and Ward, C. H. 1991. Emulsification of Hidrocarbons by Surface Bacteria. *J. Ind Microbiol*. **8**:237-246.

Fukuoka, T., Morita, T., Konish, M. Imura, T. and Kitamoto, D. 2007. Characterization of New Type of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants Produced from Soybean Oil by a *Basidiomycetous Yeast, Pseudozyma shanxiensis. J. Oleo Sci*. **8**:435-442.

Gautam, K. K. and Tyagi, F. K. 2006. Microbial Surfactant: A Review. *J. Oleo Sci*. **55**(4): 155-166.

Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Hidayat, N., Padaga, M. C. and Suhartini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Andi Offset. Yogyakarta.

Himeoka, Y. and kaneko, K. 2016. Theory for Transition between Log and Stasionary Phase. Universal Laws for LAG Time. *Biol Phys*. 1-17.

Horowitz, A., Gutnick, D. and Rosenberg, E. 2005. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Apllied Microbiology*. **30**(1):10-19.

Ilori, M. O., Amobi, C. J. and Odocha, A. C. 2005. Factors Affecting Biosurfactant Production by Oil Degrading *Aeromonas spp*. Isolated from a Tropical Environment. *J. Chemosphere.* 985-992.

Jawetz, E., Melnick, L. J. dan Adelberg, A. E. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi Ke-3*. Alih Bahasa: Huriwati Hartanto. Kedokteran ECG. Jakarta.

Jennings, E. M. and Tanner, R. S. 2000. Biosurfactant Producing Bacteria Found in Contaminated and Uncontaminated Soils. *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research.* University of Oklahoma.

Kalyani, A. L., Naga, S. T., Sangkar, G. G. and Prabhakar, T. 2014. Isolation and Antimicrobial Activity of Rhamnolipid Biosurfactant from Oil Contaminated Soil Sample using Humic Acid Salts Vitamin Agar. *J. of Research in Eng and Techn*. **3**:357-364.

Kanakdande, P. A. and Khobragade, N. C. 2019. Production of Biosurfactant from *Bacilus subtilis* (MF 582633) and its Evaluation for Antimicrobial, Antioxidant, Larvicidal and Antitermite Activities. Indian Journal of Chemical Technology. **26**:76-83.

Kayser, F. H., Bienz, K.A., Eckert, J. and Zinkernagel, R. M. 2005. *Medical Microbiologi*. Thieme Stuttgart. New York.

Kosaric, N. 2001. Biosurfactant and Their Applications for Soil Bioremediation. *J. Food Techn*. **39**(4):295-304.

Kumar, M., Leon, V., De Sisto Materano, A., Ilzins, O. A. and Luis, L. 2008. Biosurfactant Production and Hydrocarbon Degradation by Halotolerant and Thermotolerant *Pseudomonas sp. World Journal Microbiol Biotechnol.* **24**:1047-1057.

Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 2000. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environments: *Microbiological Reviews.* **54**(3):305-315.

Lin Soo, E., Basri, M. A., Salleh, B. and Kamaruddin, K. 2003. Optimization of the Enzyme-Catalyzed Synthesis of Amino Acid-Based Surfactants from Palm Oil Fractions. *J. of Bioscience and Bioengineering*. **95**:361-368.

Maier, R. M. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Application. *J. Appl Microbiol Biotechnol*. **54**:625-633.

Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. 2002. Effect Various Nutritional Supplements on Biosurfactan Production by a Strain of *Bacillus Subtilis* at 45°C. *J. of Surfactant and Detergen.* **5**(1):11-17.

Maneerat, S. and Phetrong, K. 2007. Isolation of Biosurfactant-Producing Marine Bacteria and Characteristics of Selected Biosurfactant. *J.Sci. Technol.* **29**(3):781-791.

Mnif, I., Grau-campistany, A. and Coronel-Leon, J. 2016. Purification and Identification of *Bacillus subtilis* SPB1 Lipopeptide Biosurfactant Exhibiting Antifungal Activity Againts *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environ Sci Pollut Res*. **23**:6690-6699.

Morikawa, M., Hirata, Y. and Imanaka, T. 2000. A Study on the Structure-Function Relationship of Lipopeptides Biosurfactants. *J. of Biochem.* **1488**:211-218.

Muthusamy, S., Kanagarajan, S. and Ponnusamy, S. 2008. Effeciency of RAPD and ISSR Marker System in Accessing Genetic Variation of Rice Bean (Vigna Umbellata) Landraces. *Electronic Journal of Biotechnology.* **11** (3):1-8.

Muyonga, J., Cole, C. G. and Duodu, K. 2004. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopic Study of Acid Soluble Collagen and Gelatin from Skins and Bones of Young and Adult Nile Perch (Lates Niloticus). *Food Chemistry.* **86**(3):325-332.

Ningrum, A. M. 2019. *Optimasi Produksi Biosurfaktan dengan Menggunakan Media Limbah Cair Kelapa Sawit dari Bakteri Lipolitik Isolat Lokal Terpilih*. Universitas Lampung. Lampung.

Nitschke, M., Ferraz, C. and Pastore, G. M. 2004. Selection of Microorganisme for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. *Brazilian Journal of Microbiology.* **35**:81-85.

Nugroho, A. 2006. Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Penggu,na Hidrokarbon dengan Penambahan Variasi Sumber Karbon. *Biodiversitas*. **7**(4):312-316

Pereia, J., Gudina, P. B., Cosra, E. J., Vitorino, R., Teixeira, R., Coutinho, J. A. and Rodrigues, L. R. 2013. Optimization and Characterization of

Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Isolates Towards Microbial Enhanced Oil Recovery Applications.*Fuel.* **111**:259-268

Plaza, G. A., Zjawioni, I. and Banat, I. M. 2006. Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated and Bioremediated Boils. *J. of Petroleum Sci and Eng.* **50**:71-77.

Rane, A. N., Baikar, V. V. and Deopurkar, R. L. 2017. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and its Application in Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. *Frontiers in Microbiologi.* **8**(492):1-12.

Rashedi, H., Assadi, M. M., Bonakdapour, B. and Jamshidi, E. 2005. Enviromental Importance of Rhamnolipid Production from Molasses as a Carbon Source. *Int J. Envir Sci Tech.* **2**(1):59-62.

Rau, U. L., Nguyen, A. and Lang, S. 2005. Downstream Processing of Mannosylerythritol Lipids Produced by Pseudozyma aphidis. *J. of Lipid Science Technology.* **107**:373-380.

Rodrigues, L., Banat, I. M., Texeira, J. and Oliviera, R. 2006. Biosurfactants: Potential Applications in Medicine. *J Antimicrob. Chemother.* **57:**609-618.

Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R. dan Van Der MeiH, C. 2006. Response Surface Optimization of The Medium Components For The Production of Biosurfactants By Probiotic Bacteria. *Process Biochemistry*. **41**:1-10.

Rondrigues, L. and Texeira, J. 2010. Biomedical and Therapeutic Applications of Biosurfactants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **6**:672.

Sahara, B. S., Sahu, S. K. and Sharma, D. 2011. An Overview on Biosurfactants. *J Genetic Engineering and Biotechnology*. **20**(2):29-32.

Saimmai, A., Rukadee, O., Sobhon, V. and Maneerat, S. 2012. Biosurfactant Production by *Bacilus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 Grown on Crude Glycerol Obtained from Biodiesel Production Plant as Carbon Source. **71**:396-406.

Samadi, N. N., Abadian, A., Akhavan, M. R., Fazeli, A., Tahzibi. and Jamalifar, H. 2007. Biosurfactant Production by The Strain Isolated Contaminated Soil. *J. Biol Sciench*. **7**(7):1266-1269.

Sandri, D. 2009. Bakteri Hidrokarbonolklastik Tanah Tercemar Penghasil Biosurfaktan: Skrining dan Identifikasi Bakteri, Optimasi Produksi dan Karakterisasi Produknya. (*Tesis*). Universitas Brawijaya. Malang.

Singh, V. 2012. Biosurfactant-Isolation, Production, Purification and Significance. *Int J. Sci Res Pub*. **2**(7):1-4.

Tabatabaee, A., Assadi, M. M., Noohi, A. A. and Sajadian, V. A. 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *J. Env. Health Sci*. **2**(1):6-12.

Takahashi, M., Morita, T., Wada, K., Fokuoka, T., Imura, T. and Kitamono, D. 2011. Production of Sophorolipid Glycolipid Biosurfactant from Augarcane Molasses using *Starmerella bombiicola* NBRC 10243. *J Oleo Sci*. **60**:267-273.

Walter, L. J., Aalhus, J. L., Robertson, W. M., MCAllister, T. A., Gibb, D. J., Dugan, M. E. R., Aldai, N. and McKinnon, J. J. 2010. Evaluation of Wheat or Corn Dried Distillers Grains with Solubles on Performance and Carcass Characteristics of Feedlot Steers. *J. Anim. Sci.* **90**(2):259-269.

Wheelis, M. L. 2007. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eukarya. *Proceding of the National Academy of Sciences.* USA. **87**, 4576.

Wibisana, A. 2018. Isolasi dan Skrining Mikroba Penghasil Biosurfaktan dari Air Laut Tercemar Minyak. *J. Ilmiah Teknik Kimia UNPAM*. **2**(2):11-18.

Wibisana, A., Sumaryono, W., Sudiro, T. M. and Sudarmono, R. P. 2015. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus amyloliquefaciens* MD4-12 using Response Surface Methodology. *Microbiologi Indonesia*. **9**(3):120-128.

Yataghene, A., Abouseoud, M., Maachi, R. dan Amrane, A.. 2008. Effect of the Carbon and Nitrogen Sources on Biosurfactant Production by *Pseudomonas fluorescens* Biosurfactant Characterization. *(www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/71Yataghene.pdf)* diakses pada 01 Oktober 2019.

Yusnidar**,** M. 2021. Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen ALP E1 Asal Air Laut Pelabuhan Panjang serta Uji Antibakteri dan Antijamur. (*Skripsi*). Universitas Lampung. Lampung.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M. and McInerney, M. J. 2004. Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisme. *Journal of Microbiological Methods*. **56**(3):339–347.