

**PENINGKATAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI  
BAKTERI *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN SUBSTRAT  
LIMBAH CAIR MINYAK KELAPA SAWIT**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**AULIA SITI PRADINA**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRAK

### PENINGKATAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH CAIR MINYAK KELAPA SAWIT

Oleh

AULIA SITI PRADINA

Biosurfaktan merupakan salah satu produk bioteknologi yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan dapat diproduksi menggunakan berbagai substrat. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi optimum penambahan substrat limbah cair minyak kelapa sawit (POME) dalam memproduksi biosurfaktan serta menentukan kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dalam menghasilkan biosurfaktan. Metode yang dilakukan meliputi penentuan kurva pertumbuhan bakteri, optimasi produksi biosurfaktan meliputi optimasi waktu menggunakan limbah POME dengan konsentrasi 10%, 20% dan 30%, optimasi pH dan kadar salinitas serta uji biosurfaktan meliputi indeks emulsifikasi ( $IE_{24}$ ), *oil spreading*, dan *drop collapse*, ekstraksi dengan metode presipitasi asam serta karakterisasi biosurfaktan menggunakan KLT dan FT-IR. Hasil penelitian menunjukkan bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 menghasilkan biosurfaktan di akhir fase stasioner pada jam ke-108. Produksi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dilakukan pada kondisi optimum pada waktu optimum 108 jam, dengan penambahan 20% limbah POME, pH 9, dan kadar salin 0,3% dengan nilai indeks emulsifikasi sebesar 63,33%, *oil spreading* 5 cm dan hasil uji *drop collapse* positif. Produksi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 menghasilkan biosurfaktan sebanyak 0,1552 g/L berwarna coklat muda. Analisis FT-IR menunjukkan adanya serapan khas lipopeptida pada daerah  $3272\text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan adanya gugus peptida (ikatan N-H) dan diperkuat dengan adanya bercak berwarna merah muda yang tampak samar dari hasil analisis KLT yang mengindikasikan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan merupakan golongan surfaktin. Berdasarkan hasil analisis keseluruhan diduga bahwa biosurfaktan yang diperoleh merupakan jenis lipopeptida golongan surfaktin.

**Kata kunci:** biosurfaktan, limbah POME, *Bacillus cereus*, lipopeptida

## ABSTRACT

### ENHANCEMENT PRODUCTION OF LIPOPEPTIDE BIOSURFACTANT FROM *Bacillus cereus* ALP E1 BACTERIA USING PALM OIL LIQUID WASTE AS SUBSTRATE

By

AULIA SITI PRADINA

Biosurfactants are one of the biotechnology products produced by microorganisms and can be produced using various substrates. The purpose of this study was to obtain the optimum concentration of palm oil liquid waste substrate addition and to determine the optimum conditions for the growth of biosurfactants. The method used include determination of bacterial growth curve, optimization of biosurfactant production time using palm oil liquid waste with a concentration of 10%, 20% and 30%, optimization of pH and salinity concentration and biosurfactants test with emulsification test (IE<sub>24</sub>), *oil spreading*, and *drop collapse*, extraction by acid precipitation method and biosurfactant characterization using TLC and FT-IR. The results showed that *Bacillus cereus* ALP E1 isolates produced biosurfactants at the end of the stationary phase at 108 hours. Biosurfactant production from *Bacillus cereus* ALP E1 was carried out under optimum conditions including optimum time at 108 hours, with the addition of 20% POME waste, pH 9, and 0.3% saline content with an emulsification index value of 63.33%, 5 cm oil spreading and positive drop collapse test results. The production of biosurfactant from the bacterium *Bacillus cereus* ALP E1 produced 0.1552 g/L of light brown biosurfactant. FT-IR analysis showed a typical lipopeptide uptake in the 3272 cm<sup>-1</sup> area which indicated the presence of a peptide group (N-H bond) and was strengthened by the presence of pink spots that appeared faintly from the results of TLC analysis which indicated that the biosurfactant produced was a type of lipopeptide group. Based on the results of the overall analysis, it can be concluded that the biosurfactant obtained is a type of lipopeptide group surfactin.

**Keywords:** Biosurfactants, POME waste, *Bacillus cereus*, lipopeptide

**PENINGKATAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI  
BAKTERI *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN SUBSTRAT  
LIMBAH CAIR MINYAK KELAPA SAWIT**

**Oleh**

**AULIA SITI PRADINA**

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada**

**Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

Judul Skripsi : **PENINGKATAN PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN SUBSTRAT LIMBAH CAIR MINYAK KELAPA SAWIT**

Nama Mahasiswa : **Aulia Siti Pradina**

No. Pokok Mahasiswa : 1817011068

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**Dr. Nurhasanah, M.Si.**  
NIP 19741211 199802 2 001

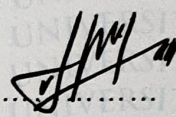
**Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.**  
NIP 19740705 200003 1 001


**2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA**

**Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.**  
NIP 19740611 200003 1 002

## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

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

Sekretaris : **Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.** 

Penguji  
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Rudy TM Situmeang, M.Sc.** 

### 2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



  
**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **31 Mei 2023**

**SURAT PERNYATAAN  
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Aulia Siti Pradina  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011068  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Peningkatan Produksi Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri *Bacillus Cereus* ALP E1 Menggunakan Substrat Limbah Cair Minyak Kelapa Sawit”** adalah benar karya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 31 Mei 2023

Yang Menyatakan,



Aulia Siti Pradina

NPM1817011068

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Aulia Siti Pradina yang akrab disapa dengan Aulia. Penulis lahir pada tanggal 06 Mei 2000, yang merupakan anak pertama dari pasangan Bapak Agustanto Basmar dan Ibu Ninien Mardaningsih. Penulis mengawali Pendidikan formal di TK Nurul Islam Lampung Barat pada tahun 2005-2006.

Kemudian penulis melanjutkan Pendidikan di Sekolah Dasar (SD) Negeri 1 Way Mengaku pada Tahun 2006-2012. Tahun 2012-2015 penulis melanjutkan Pendidikan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Liwa dan melanjutkan ke Sekolah Menengah Atas (SMA) Al-Kautsar Bandar Lampung pada tahun 2015-2018. Kemudian pada tahun 2018 penulis diterima melalui jalur SBMPTN pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Penulis melaksanakan Karya Wisata Ilmiah ke-29 di Desa Tanjung Tirto, Kecamatan Way Bungur, Kabupaten Lampung Timur pada bulan Desember tahun 2018 serta menjadi Panitia Karya Wisata Ilmiah ke-30 di Desa Tambah Dadi, Kecamatan Purbolinggo, Kabupaten Lampung Timur pada tahun 2019. Pada Bulan Januari tahun 2021, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 Hari di Kelurahan Way Mengaku, Kecamatan Balik Bukit, Kabupaten Lampung Barat. Penulis telah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di UPTD Laboratorium Lingkungan Hidup Provinsi Lampung dengan judul “Analisis Kadar Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) Dalam Air Bersih Secara Spektrofotometri Uv-Vis Berdasarkan Acuan SNI 06-6989.9-2004”. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi anggota Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) sebagai anggota Biro Kesekretariatan pada Tahun 2019 dan 2020 serta menjadi anggota pengurus



Ikatan Himpunan Mahasiswa Kimia Indonesia Wilayah 1. Selain itu, penulis juga dipercaya untuk menjadi asisten praktikum Biokimia pada tahun 2021-2022, serta menjadi asisten praktikum Kimia Analisis pada tahun 2022. Kemudian penulis juga telah melaksanakan penelitian di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

## **MOTTO**

*Maka sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan*

***(Q.S. Al-Insyirah ayat 5)***

*Jika kamu berbuat baik, (berarti) kamu berbuat baik untuk dirimu sendiri*

***(Q.S. Al-Isra ayat 7)***

*You can't always be strong, but you can always be brave*

***Johnny Suh***

## PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

### **Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT**

Karena rahmat dan hidayah-Nya kupersembahkan karya ini sebagai wujud baktiku kepada:

Diriku

**Aulia Siti Pradina**

Kedua Orang Tuaku:

**Bapak Agustanto Basmar dan Ibu Ninien Mardaningsih**

Saudara-saudaraku:

**Ayu Monika, Faqih Ahmad Hamami, Hafizni Novitri Syawal, dan Zahir Aqillah Gusnin**

Rasa hormat saya kepada:

**Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., Bapak Dr. Eng. Satripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T., dan Bapak Prof. Rudy T.M. Situmeang, M.Sc., Ph.D.**

Terima kasih atas ilmu, nasihat dan kesabarannya selama ini.

**Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia**

Atas Dedikasi serta ilmu yang telah diberikan kepada saya selama menempuh Pendidikan

Serta,

Almamater Tercinta

**Universitas Lampung**

## SANWACANA

Puji syukur kehadiran Allah *Subhanahu wa Ta'ala* atas berkat rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan judul **“Peningkatan Produksi Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 Menggunakan Substrat Limbah Cair Minyak Kelapa Sawit”** sebagai syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains di Universitas Lampung.

Pelaksanaan penelitian dan pengerjaan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, doa, serta dukungan dari keluarga, sahabat, teman, serta dosen pembimbing dan penguji. Pada kesempatan ini penulis juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua tercinta yakni Bapak Agustanto Basmar dan Ibu Ninien Mardaningsih untuk segala doa, dukungan, biaya dan kasih sayang untuk penulis sehingga dapat menyelesaikan studinya.
2. Saudara- saudara terkasih penulis yaitu Ayu Monika, Faqih Ahmad Hamami, Hafizni Novitri Syawal, dan Zahir Aqillah Gusnin serta keluarga besar penulis yang telah memberikan dukungan, doa, motivasi sehingga penulis mampu menyelesaikan masa studinya.
3. Kepada Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku pembimbing utama yang telah banyak membantu, membimbing, memberikan saran, nasihat, dan semangat serta seluruh kebaikannya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono. M.T., sebagai pembimbing kedua penulis atas seluruh masukannya dalam skripsi penulis.

5. Bapak Prof. Dr. Rudy TM Situmeang, M. Sc., Ph.D., selaku Dosen penguji atas segala kritik dan sarannya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik.
6. Bapak Prof. Suharso, Ph.D., sebagai pembimbing akademik penulis yang senantiasa membantu penulis sejak menjadi mahasiswa baru hingga lulus.
7. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia yang telah mendidik, membimbing, dan memberikan ilmunya kepada penulis selama masa perkuliahan dengan tulus dan penuh kesabaran. Serta Staf Administrasi Jurusan Kimia untuk segala bantuan dan kebaikan yang telah diberikan.
8. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S. Si., M. Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
10. Afifa Nabilla Mutiq, Alfi Nurul Izzah, dan Dinara Salsabilla sebagai teman terdekat penulis selama kuliah atas bantuan, doa, motivasi, waktunya untuk mendengarkan cerita atau keluhan penulis serta selalu ada selama masa perkuliahan. Terima kasih karena telah bersedia untuk menjadi teman yang luar biasa untuk penulis. Semoga setiap langkah kalian diberikan rahmat oleh Allah SWT.
11. Teman teman Tim Biosurfaktan: Vezhia Sheiscatamya, Salsabila yang selalu setia membantu dan menemani penulis dalam penelitian hingga selesainya skripsi ini.
12. Kepada teman-teman seperjuangan di Laboratorium Biokimia: Eka Candra, Dwi Noviani, Lupia Widya, Lily Nur, Vezhia Sheiscatamya, Salsabila, Salsabilla Bethari, Nur Mayana Putri, Aprilia Fransiska, Ridho Fajriansyah, Risna Milenia, Raifar Gunawan, Aan Saputra, dan teman teman yang lain atas bantuan dan doanya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dengan baik.
13. Anggota Laboratorium Biokimia: Mba Della, Virginia Nuh Reza Amanda, Ayu Ranja Saputri, Neng Wiwit, Astin Vidyasani, Alinil Masruroh, Verinda Indah Sari, Partini, Hilda, Adiya, Rara, Marsella, Nabila, Kak Hendri Ropingi, Mba Putri Kuswedari, Mba Hanisa Damayana, Mba Ela, serta

anggota laboratorium lainnya yang telah memberikan semangat, dan dukungannya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dengan baik.

14. Nurhasanah's *Research Group*: Mba Meitri Ayu Ningrum, S.Si., Mba Melly Yusnidar, S.Si., Mba Ria Mela Rosi, S.Si., Mba Wiwin Indrianti, S.Si., Mba Siwi Meutia Sadewi, S.Si., Mba Qonita, Kak Aiga, Mba Mba Putri Kuswedari, Mba Hanisa Damayana, Nur Mayana Putri, S.Si., Vezhia Sheiscatamya, Salsabila, Astin Vidyasani, Verinda Indah Sari, Putpita, Cindi Pebrianti, dan Yori Pratiwi, atas doa, dukungan, serta motivasinya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan baik.
15. Teman teman Peneliti Lab: Andika WS Sinaga, Virginia Nuh Reza Amanda, Ayu Ranja Saputri, Neng Wiwit Liawati, Kania Nur Aisyah, Rizky Hadi Wijaya, Sahrul Gunawan, Andi Irawan, Vezhia Sheiscatamya, Salsabila, Salsabilla Bethari, M. Ridho Fajriansyah, Antin Sri Prihatin, Eni Asro Dzulhijjah, Kak Hendri Ropingi, Kak Arif, Havier, serta teman teman Pejuang Lab lainnya yang telah bersedia bekerja sama dan menyemangati penulis sehingga dapat menyelesaikan penelitian.
16. Sahabat *The Real Big Family*: Ajeng Melinda Wati, Chyntia Edysyafira, Indika Kharisma Putri, Nadila Nur Febrianti Utami, dan Rima Febrisa, sebagai sahabat terdekat penulis sejak masa sekolah, yang telah memberikan semangat doa bagi penulis. Terima kasih karena telah mendukung dan bersedia untuk menjadi sahabat penulis selama ini.
17. Teman teman Angkatan 2018 atas doa, semangat, dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi dengan baik.
18. Kakak-kakak Angkatan 2015, 2016, 2017, dan adik adik Angkatan 2019, dan 2020 yang telah memberikan masukkan dan doanya kepada penulis.
19. Teman teman KKN penulis: Maulana, Bernika Vina, dan Usratun Hasanah atas dukungan, doa, dan motivasinya kepada penulis.
20. Tante Yosi serta keluarga yang selayaknya keluarga kandung penulis, terima kasih untuk dukungan, doa, dan semangat yang terus menerus diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik.

21. Seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, semoga seluruh kebaikan yang diberikan akan dibalas berlimpah oleh Allah SWT.
22. *Last but not least* kepada diri sendiri yang selama ini terus berjuang dan bertahan hingga dapat menyelesaikan skripsi dengan baik dan mampu berdiri sampai di titik ini. Terima kasih karena sudah bertahan sejauh ini.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang mendukung penulis hingga selesainya skripsi ini. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rezeki kepada Bapak, Ibu, serta rekan rekan semua. Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi setiap pembaca.

Bandar Lampung, Mei 2023

Penulis

Aulia Siti Pradina

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1. Biosurfaktan .....	5
2.2. Klasifikasi Biosurfaktan.....	7
2.2.1. Glikolipida .....	10
2.2.2. Biosurfaktan polimer .....	11
2.2.3. Lipopeptida dan Lipoprotein .....	11
2.3. Aplikasi Biosurfaktan .....	15
2.3.1. Aplikasi Biosurfaktan dalam Industri Makanan .....	15
2.3.2. Aplikasi Biosurfaktan dalam Industri Kosmetik .....	16
2.3.3. Aplikasi Biosurfaktan dalam <i>Microbial Enhanced Oil Recovery</i> (MEOR).....	16



2.3.4. Aplikasi Biosurfaktan dalam Pertanian .....	16
2.3.5. Aplikasi Biosurfaktan dalam Medis .....	17
2.4. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan .....	17
2.4.1. Substrat pertumbuhan .....	17
2.4.2. Usia Kultur .....	19
2.4.3. Faktor Lingkungan .....	19
2.5. Limbah Kelapa Sawit .....	20
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
3.1. Waktu dan Tempat .....	22
3.2. Alat-Alat yang Digunakan .....	22
3.3. Bahan-bahan yang Digunakan .....	22
3.4. Metode Penelitian .....	23
3.4.1. Pembuatan Media .....	23
3.4.2. Peremajaan Isolat <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	24
3.4.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan .....	24
3.4.4. Uji Biosurfaktan .....	25
3.4.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan .....	26
3.4.6. Ekstraksi Biosurfaktan .....	28
3.4.7. Karakterisasi Biosurfaktan .....	28
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1. Isolat <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	31
4.2. Kurva Pertumbuhan Isolat <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	32
4.3. Kondisi Optimum Produksi Biosurfaktan dengan Penambahan POME 34	
4.3.1. Waktu Optimum .....	34
4.3.2. pH Optimum .....	37
4.3.3. Kadar Salinitas Optimum .....	39

4.4. Biosurfaktan Isolat Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	41
4.5. Ekstrak Kasar Biosurfaktan.....	44
4.6. Analisa Biosurfaktan dari Isolat <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	45
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>50</b>
5.1. Simpulan .....	50
5.2. Saran .....	50
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>51</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>62</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Klasifikasi biosurfaktan dan mikroba penghasilnya (Sekhon <i>et al.</i> , 2012).....	8
2. Komposisi limbah cair minyak kelapa sawit (Opurum <i>et al.</i> , 2017) .....	21
3. Kadar salinitas optimum produksi biosurfaktan dari beberapa penelitian .....	41
4. Hasil pengujian biosurfaktan tahap produksi yang dihasilkan oleh bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1.....	42
5. Data spektrum FT-IR biosurfaktan lipopeptida dari beberapa referensi.....	48
6. Data absorbansi kurva pertumbuhan bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	63
7. Data Uji Indeks Emulsifikasi (%IE24) .....	63
8. Data absorbansi bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 dengan penambahan substrat POME 10% .....	64
9. Data absorbansi bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 dengan penambahan substrat POME 20% .....	64
10. Data absorbansi bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 dengan penambahan substrat POME 30% .....	65
11. Optimasi pH Optimum Produksi Biosurfaktan dengan <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM) .....	67

<b>12. Optimasi Kadar Salinitas Optimum Produksi Biosurfaktan dengan <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM).....</b>	<b>67</b>
--	-----------

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur surfaktan secara umum (Campos <i>et al.</i> , 2013).....	5
2. Struktur Kimia beberapa biosurfaktan yang umum (a) Mannosylerythritol lipid (b) Surfaktin (c) Trehalose Lipid (d) Rhamnolipid (e) Fosfolipid (f) Emulsan (Fakhrudin, 2012) .....	10
3. Struktur dari Beberapa Biosurfaktan Lipopeptida: a) surfaktin b) Iturin c) Fengycin dan d) Lichenysin (Carolin <i>et al.</i> , 2021). .....	12
4. Spektrum FT-IR biosurfaktan lipopeptida dari bakteri <i>Nestrenkonina sp.</i> (Kiran <i>et al.</i> , 2017). .....	13
5. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP D1 (Citra, 2021) .....	14
6. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP 1 (Yusnidar, 2021).....	15
7. Diagram alir penelitian.....	30
8. Isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	32
9. Kurva pertumbuhan isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1.....	33
10. Kurva optimasi waktu produksi biosurfaktan dengan penambahan limbah POME: (a) 10% POME, (b) 20% POME, dan (c) 30% POME.....	35
11. pH optimum produksi biosurfaktan dari isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	38
12. Kadar salinitas optimum produksi biosurfaktan dari isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 .....	40

13. Hasil KLT biosurfaktan, (a) di bawah sinar UV 254 nm, (b) penampak bercak ninhidrin pada biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 ..... 44
14. Spektrum FT-IR biosurfaktan: (a) spektrum dari bakteri *Virgibacillus salarius* (Elazazzy *et al.*, 2015), (b) spektrum dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 .. 46
15. Hasil KLT ekstrak biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1, (a) di bawah sinar UV 254 nm, (b) penampak bercak ninhidrin, (c) perbandingan dengan hasil KLT surfaktin dari bakteri *Bacillus subtilis* SNW3 (Umar *et al.*, 2021). ..... 49
16. Hasil uji emulsifikasi, *oil spreading*, dan *drop collapse* pada waktu optimum 108jam ..... 67
17. Hasil uji emulsifikasi, *oil spreading* dan *drop collapse* pada pH optimum 9 ..... 68
18. Hasil uji emulsifikasi, *oil spreading*, dan *drop collapse* pada kadar salinitas optimum 0,3% ..... 68
19. Ekstrak biosurfaktan setelah dilakukan presipitasi asam selama 24 jam ..... 69
20. Biosurfaktan kering setelah proses *freeze drying* ..... 69

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Industri yang berbasis pertanian atau yang dikenal sebagai agroindustri menghasilkan limbah dalam jumlah yang besar setiap tahunnya. Apabila limbah ini dibiarkan di lingkungan tanpa prosedur pengolahan yang tepat, maka limbah tersebut akan menyebabkan pencemaran lingkungan dan memiliki efek yang berbahaya bagi kesehatan manusia dan makhluk hidup lainnya. Limbah agroindustri sebagian besar belum diolah dan dimanfaatkan dengan baik. Oleh sebab itu diperlukan berbagai cara untuk mengoptimalkan pemanfaatan limbah agroindustri tersebut.

Salah satu cara memanfaatkan limbah agroindustri adalah penggunaannya sebagai media pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Limbah agroindustri sebagian besar masih mengandung komponen organik yang melimpah dan berpotensi sebagai substrat untuk pertumbuhan mikroorganisme. Limbah agroindustri yang berasal dari sisa tanaman, lemak hewan, residu pengolahan kopi, industri pengolahan buah dan makanan, serta industri pengolahan minyak, mengandung karbohidrat dan lipid dalam jumlah yang tinggi sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon yang kaya untuk pertumbuhan mikroba (Banat *et al.*, 2014). Oleh karena itu, limbah agroindustri dapat dimanfaatkan dalam berbagai produk bioteknologi salah satunya yaitu untuk memproduksi biosurfaktan.

Biosurfaktan adalah senyawa yang diproduksi oleh tumbuhan dan hewan, tetapi sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme, seperti bakteri, ragi, dan jamur.

Biosurfaktan merupakan kombinasi beberapa biomolekul (protein, karbohidrat, dan lipid) yang mampu mengurangi tegangan permukaan untuk bertindak sebagai pengemulsi (Henkel *et al.*, 2012). Semua biosurfaktan bersifat amfipatik dan terdiri dari bagian polar dan nonpolar. Biosurfaktan banyak digunakan karena berperan penting dalam emulsifikasi. Biosurfaktan memiliki keunggulan dibandingkan dengan surfaktan kimia dalam beberapa sifat seperti ramah lingkungan, toksisitas rendah, stabilitas termal, dan stabilitas pH, dan toleransi terhadap kadar salin (Varjani dan Upasani, 2017).

Biosurfaktan memiliki potensi besar karena keunggulannya dibandingkan surfaktan sintesis serta berperan penting dalam proses emulsifikasi sehingga banyak digunakan dalam berbagai sektor industri seperti pada sektor lingkungan (Ashraf *et al.*, 2017), industri makanan, pertanian (Sachdev dan Cameotra, 2013), produk biomedis dan nanoteknologi. Meskipun mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan dengan surfaktan kimia, biosurfaktan belum banyak digunakan sebab mahalnya harga substrat serta proses produksi yang kurang efisien (Kiran *et al.*, 2010). Hal tersebut dapat diminimalisir dengan penggunaan substrat yang banyak tersedia di alam sehingga dapat menekan biaya dalam proses produksinya (De Sousa *et al.*, 2011).

Untuk menekan biaya produksi serta mengembangkan proses yang lebih ekonomis, berbagai penelitian yang berfokus pada penggunaan substrat alternatif seperti limbah agroindustri, produk samping industri minyak, serta limbah yang kaya dengan polutan organik (Makkar *et al.*, 2011) telah banyak dilaporkan. Beberapa studi terkait pemanfaatan limbah agroindustri dalam produksi biosurfaktan telah dilaporkan, diantaranya penggunaan substrat *olive oil mill effluent* (OOME) sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan jenis surfaktin dari bakteri *Bacillus subtilis* dan biosurfaktan rhamnolipida dari *Pseudomonas aeruginosa* (Ramírez *et al.*, 2015), pemanfaatan limbah minyak goreng untuk memproduksi biosurfaktan lipopeptida dari jamur *Mucor circinelloides* (Hasanizadeh *et al.* 2017). Beberapa isolat bakteri lipolitik lokal yaitu LKM D<sub>1</sub>, LKM B<sub>1</sub>, dan LKM C<sub>2</sub> juga telah dipelajari dan perolehan hasil produksi biosurfaktan dengan indeks emulsifikasi terbaik sebesar 45,71% dari



isolat LKM C<sub>2</sub> (Ningrum 2019) dengan penambahan minyak cair kelapa sawit 10% ke dalam media pertumbuhan. Pemanfaatan limbah agroindustri dalam produksi biosurfaktan sebagian besar terbukti dapat menghasilkan produk biosurfaktan yang lebih melimpah serta minim biaya. Hal ini memungkinkan berkurangnya biaya produksi biosurfaktan serta berguna dalam optimalisasi pengolahan limbah (Khopade *et al.*, 2012).

Studi pendahuluan yang telah dilakukan oleh Yusnidar (2021) dengan menggunakan isolat bakteri ALP E1 memperoleh ekstrak biosurfaktan sebesar 0,0703 g/L dengan indeks emulsi 78,5%, zona bening sebesar 4 cm, serta hasil positif dari uji *drop collapse*. Sumber karbon yang digunakan adalah minyak zaitun 10%, sedangkan sumber nitrogen yang digunakan adalah NH<sub>4</sub>Cl 0,26%. Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan, kondisi optimum untuk produksi biosurfaktan menggunakan isolat ini adalah pada pH 6, dan waktu 72 jam, serta kadar salinitas 0,5%. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa isolat bakteri ALP E1 yang diperoleh dari air laut Pelabuhan Panjang terbukti dapat memproduksi biosurfaktan yang diduga sebagai biosurfaktan lipopeptida. Namun substrat yang digunakan masih menggunakan substrat kimia (sintetik) dan membutuhkan biaya tinggi dalam produksinya. Sehingga pada penelitian ini digunakan substrat alternatif alami yaitu limbah cair minyak kelapa sawit.

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini dilakukan peningkatan produksi biosurfaktan dari isolat asal air laut Pelabuhan Panjang ALP E1 yang teridentifikasi sebagai bakteri *Bacillus cereus* dengan menggunakan substrat limbah cair minyak kelapa sawit. Peningkatan produksi biosurfaktan dilakukan dengan memvariasikan kondisi lingkungan pertumbuhan antara lain waktu, konsentrasi limbah cair minyak kelapa sawit, pH, dan kadar salinitas. Penggunaan limbah cair minyak kelapa sawit ini diharapkan dapat diperoleh kondisi optimum untuk memproduksi biosurfaktan lipopeptida dalam jumlah yang relatif lebih besar dari kondisi sebelumnya serta dapat memberikan hasil produk biosurfaktan yang lebih baik.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan konsentrasi optimum limbah cair minyak kelapa sawit untuk menghasilkan biosurfaktan lipopeptida dalam jumlah yang relatif lebih besar.
2. Mendapatkan kondisi optimum produksi biosurfaktan lipopeptida yang berasal dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dengan menggunakan limbah cair minyak kelapa sawit sebagai substrat pertumbuhan.
3. Mendapatkan konsentrasi biosurfaktan lipopeptida dalam jumlah yang relatif lebih besar dibandingkan kondisi sebelumnya.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

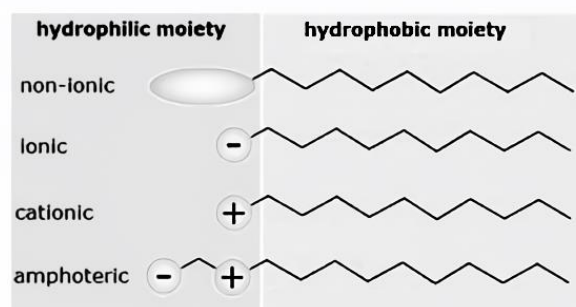
Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengoptimalkan pemanfaatan limbah cair minyak kelapa sawit sebagai substrat pertumbuhan mikroba untuk produksi biosurfaktan.
2. Memberikan informasi terkait kondisi optimum bakteri isolat lokal asal air laut Pelabuhan Panjang *Bacillus cereus* ALP E1 dalam produksi biosurfaktan dengan menggunakan limbah minyak cair kelapa sawit.
3. Hasil biosurfaktan yang diteliti dapat dikembangkan lebih lanjut dalam berbagai aplikasi di dunia industri dan bioteknologi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Biosurfaktan

Surfaktan merupakan molekul amfipatik yang terdiri dari bagian hidrofilik (polar) dan hidrofobik (nonpolar), yang membentuk partisi antara zat cair dengan tingkat polaritas dan ikatan hidrogen yang berbeda (Santos *et al.*, 2016). Surfaktan diketahui dapat menurunkan tegangan permukaan dan membentuk mikroemulsi sehingga menyebabkan senyawa hidrokarbon dapat larut dalam air. Struktur surfaktan secara umum dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Struktur surfaktan secara umum (Campos *et al.*, 2013)

Surfaktan kimia terbukti memiliki banyak manfaat, namun surfaktan juga memiliki dampak negatif karena tidak mudah terdegradasi serta bersifat toksik (de França *et al.*, 2015). Adanya permasalahan lingkungan yang berasal dari surfaktan kimia membuat para peneliti berfokus pada surfaktan yang ramah lingkungan yang dikenal sebagai biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan surfaktan yang diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, ragi dan jamur.

Sama halnya dengan surfaktan kimia, biosurfaktan terdiri dari bagian hidrofilik dan hidrofobik. Komponen hidrofobik yang membentuk biosurfaktan antara lain yaitu asam lemak jenuh atau tidak jenuh, dan asam lemak hidroksil, atau alkohol lemak. Komponen hidrofilik biosurfaktan dapat terdiri dari karbohidrat (mono, oligo, atau polisakarida), peptida, atau protein dengan gugus ester, hidroksil, fosfat, atau karboksil yang relatif sederhana (Sun *et al.*, 2019). Biosurfaktan dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu biosurfaktan dengan berat molekul rendah dan biosurfaktan dengan berat molekul tinggi.

Biosurfaktan menunjukkan sifat yang lebih baik dibandingkan dengan surfaktan sintetis. Beberapa sifat penting yang diamati dari biosurfaktan adalah sebagai berikut:

- a. Toksisitas rendah, biosurfaktan dapat digunakan dalam produk pembersih, makanan dan kosmetik, dan dalam bioremediasi, menentukan bahwa biosurfaktan memang memiliki toksisitas rendah atau tidak sama sekali adalah hal yang penting. Studi terbaru menunjukkan tidak adanya efek toksik dari biosurfaktan terhadap mikroorganisme. Selain itu biosurfaktan berpotensi dalam bioremediasi tanah dan air yang terkontaminasi (Sobrinho *et al.*, 2013).
- b. Biodegradabilitas tinggi, biosurfaktan dapat terdegradasi dalam air dan tanah, yang memungkinkan biosurfaktan dapat digunakan dalam proses bioremediasi.
- c. Toleransi terhadap variasi pH, salinitas, dan suhu, biosurfaktan dapat bekerja secara efisien meskipun di bawah suhu, pH, dan salinitas yang ekstrem (Roy, 2017).
- d. Penggunaan substrat terbarukan, penggunaan substrat yang lebih murah secara ekonomis menjadikan proses produksi biosurfaktan yang hemat biaya dalam industri (Banat *et al.*, 2014).
- e. Aplikasi yang luas, berbagai jenis biosurfaktan telah menunjukkan potensi untuk aplikasi dalam berbagai bidang, karena sifat pengemulsi, aktivitas antimikroba, antitumor, dan aktivitas antikorosi yang baik. Sifat-sifat ini menarik bagi industri makanan, tekstil, dan biomedis (Sanchez *et al.*, 2021).

Karena biosurfaktan berasal dari mikroorganisme, biosurfaktan dapat diproduksi dari substrat yang dapat terbarukan dan dimodifikasi secara struktural dengan

rekayasa genetika dan metode biokimia (Jahan *et al.*, 2020). Biosurfaktan dapat terakumulasi dalam fase antarmuka yang berbeda seperti cair/padat, cair/gas, ataupun cair/cair (minyak/air) sehingga dapat mengurangi tegangan permukaan antara kedua fase dan membentuk emulsi (Gürkök dan Özdal, 2021). Adanya sifat ini menyebabkan biosurfaktan memiliki aplikasi di berbagai sektor industri seperti farmasi, industri tekstil, pertanian, kosmetik, industri makanan, dan aplikasi lingkungan seperti remediasi tanah, degradasi hidrokarbon, dan pemulihan minyak (Ghasemi *et al.*, 2019).

## **2.2. Klasifikasi Biosurfaktan**

Berdasarkan jenis spesies mikroba penghasil biosurfaktan dan sifat struktur kimianya, biosurfaktan secara garis besar dapat dibagi menjadi empat kelompok: lipopeptida dan lipoprotein, glikolipida, fosfolipida, dan surfaktan polimer (Gudiña *et al.*, 2013). Rhamnolipida, trehalolipida, dan sophorolipida merupakan jenis glikolipida yang paling dikenal. Surfaktin, iturin, dan fengycin adalah jenis biosurfaktan lipopeptida yang paling dikenal (Mnif dan Ghribi, 2015).

Biosurfaktan dapat diproduksi oleh mikroorganisme berupa mikroorganisme prokariotik maupun eukariotik. Biosurfaktan dapat diproduksi di dalam sel (intraseluler) ataupun sebagai agen ekstraseluler. Sebagian besar biosurfaktan diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, jamur dan ragi melalui proses biotransformasi (Soo *et al.*, 2003). Adapun mikroorganisme penghasil biosurfaktan serta jenis biosurfaktan yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

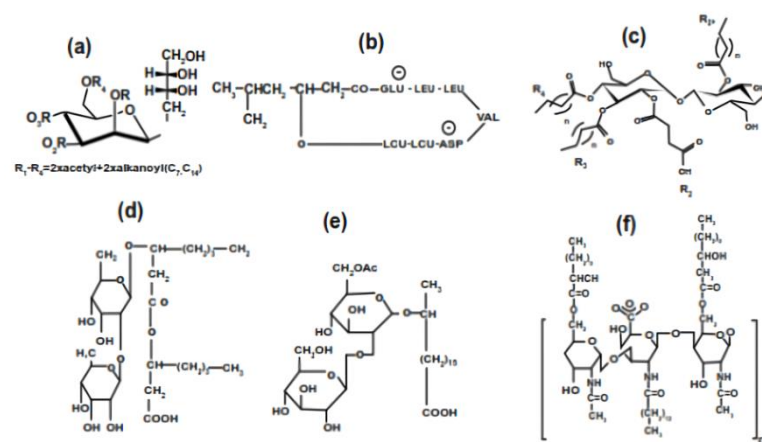
**Tabel 1.** Klasifikasi biosurfaktan dan mikroba penghasilnya (Sekhon *et al.*, 2012)

Jenis Biosurfaktan	Spesies Mikroba Penghasil Biosurfaktan
<b>Glikolipida</b>	
<i>Trehalose mycolates</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter paraffineu</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>
<i>Trehalose esters</i>	<i>Mycobacterium fortium</i> , <i>Micromonospora sp.</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. paraffinikum</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i>
<i>Trehalose mycolates of mono, di, trisaccharide</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Arthrobacter sp.</i>
<i>Rhamnolipids</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>
<i>Sophorolipids</i>	<i>Rorulopsis bombicola/ apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i> , <i>Candida so.</i>
<i>Rubiwetins R1 and RG1</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Diglycosyl diglycerides</i>	<i>LactoBacillus fermenti</i>
<i>Schizonellins A and B</i>	<i>Schizonella melanogramma</i>
<i>Ustilipids</i>	<i>Ustilago maydis</i> and <i>Geotrichum candidum</i>
<i>Amino acid lipids</i>	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Flocculosin</i>	<i>Pseudomonas flocculosa</i>
<b>Fosfolipida dan Asam Lemak</b>	
Fosfolipida dan Asam Lemak	<i>Micrococcus sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Micrococcus sp.</i> , <i>ThioBacillus thiooxidans</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , <i>Penicillium sp.</i>
<b>Lipopeptida dan Lipoprotein</b>	
<i>Gramicidin</i>	<i>Bacillus brevis</i>
<i>Peptide lipids</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Viscosin</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Lichenysin G</i>	<i>Bacillus licheniformis IM1307</i>
<i>Polymyxin E1</i>	<i>Bacillus polymyxa</i>
<i>Serrawettin</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Ornithine lipid</i>	<i>Pseudomonas rubescens</i> , <i>ThioBacillus thiooxidans</i>
<i>Cyclosporin A</i>	<i>Tolypocladium inflatum</i>
<i>Lysine lipid</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

<i>Surfactin, subtilisin, subsporin</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Cerilipin</i>	<i>Gluconobacter cerinus</i>
<i>Amphomycin</i>	<i>Streptomyces canus</i>
<i>Enduracidin A</i>	<i>Streptomyces fungicidius</i>
<i>Ornithine lipid</i>	<i>Pseudomonas sp., ThioBacillus sp., Agrobacterium sp., Gluconobacter sp.</i>
<i>Globomycin</i>	<i>Streptomyces globocaciencia</i>
<i>Chlamydocin</i>	<i>Diheterospora chlamydosporia</i>
<i>Arthrofactin</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Bacillomycin L</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Fengcyn</i>	<i>Bacillus thuringiensis CMB26</i>
<i>Mycobacillin</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Putisolvin I and II</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Iturin A</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Biosurfaktan Polimer</b>	
<i>Polysaccharide protein</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus strains</i>
<i>Liposan</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>Mannoprotein</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Heteropolysaccharide (biodispersan)</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus A2</i>
<i>Carbohydrate protein</i>	<i>Candida petrophillum, Endomycopsis lipolytica</i>
<i>Mannan-lipid complex</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Lipoheteropolysaccharide (Emulsan)</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus RAG-1, Arthrobacter calcoaceticus</i>
<i>Carbohydrate protein-lipid complex</i>	<i>Pseudomonas fluorescens, Debaryomyces polymorphus</i>
<i>Mannose/ erythrose lipid</i>	<i>Shizonella melanogramma, Ustilago maydis</i>
<i>Protein PA</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Alasan</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

Beberapa bakteri telah diteliti dan terbukti dapat memproduksi biosurfaktan, sebagai contoh yaitu *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Enterobacter*, *Serratia*, dan jamur seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium fujikuroi*, *Candida tropicalis*, *Pseudozyma*, dan *Xylaria regalis*. Strain *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri yang terbukti dapat memproduksi biosurfaktan secara efektif. Bakteri ini dikenal dalam memproduksi biosurfaktan khususnya jenis glikolipida dan lipopeptida yang

banyak digunakan dan dapat dimanfaatkan dalam proses bioremediasi dan dalam bidang biomedis yaitu sebagai antijamur, antibakteri, dan antivirus (Waghmode, *et al.*, 2020). *Pseudomonas aeruginosa* juga mulai dimanfaatkan dalam pembuatan nanopartikel dan mikroemulsi (Ohadi, *et al.*, 2020). Biosurfaktan polimer merupakan biopolimer dengan berat molekul tinggi yang terdiri dari lipoprotein, protein, polisakarida, lipopolisakarida, ataupun kombinasi molekul tersebut (Vijayakumar dan Saravanan, 2015). Struktur biosurfaktan yang umum dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Struktur Kimia beberapa biosurfaktan yang umum (a) *Mannosylerythritol lipid* (b) *Surfactin* (c) *Trehalose Lipid* (d) *Rhamnolipid* (e) *Fosfolipid* (f) *Emulsan* (Fakhrudin, 2012)

### 2.2.1. Glikolipida

Biosurfaktan glikolipida adalah biosurfaktan yang berasal dari gula yang terkait dengan gugus alkil linier atau bercabang dengan gugus ester (Otzen, 2017). Glikolipida merupakan salah satu jenis biosurfaktan dengan rantai panjang asam hidroksil alifatik atau asam alifatik yang terkait dengan ester atau eter. Biosurfaktan jenis glikolipida yang paling dikenal adalah sophorolipida, trehalolipida dan rhamnolipida (Vandana dan Singh, 2018). Rhamnolipida merupakan salah satu jenis biosurfaktan golongan glikolipida di mana satu atau dua molekul rhamnose dihubungkan dengan satu atau dua molekul asam hidroksil dekanat. Biosurfaktan jenis rhamnolipida diproduksi oleh *Pseudomonas*



*aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Burkholderia sp.* (Vandana dan Singh, 2018).

Sophorolipida merupakan salah satu biosurfaktan jenis glikolipida yang diproduksi oleh ragi dan terdiri dari sophorose karbohidrat dimer yang terkait dengan asam lemak hidroksil rantai panjang melalui ikatan glikosidik.

Sophorolipida diproduksi oleh *Torulopsis bombicola*, *T. apicola* (Vandana dan Singh, 2018). Biosurfaktan jenis trehalolipida terdiri dari disakarida trehalosa yang terhubung pada cincin benzena. Trehalolipida biasa ditemukan dalam bentuk campuran kompleks yang komposisinya bervariasi tergantung pada kondisi pertumbuhannya. Trehalolipida diproduksi oleh *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Williamsi*, dan *Tsukamurella sp* (Vandana dan Singh, 2018).

### 2.2.2. Biosurfaktan polimer

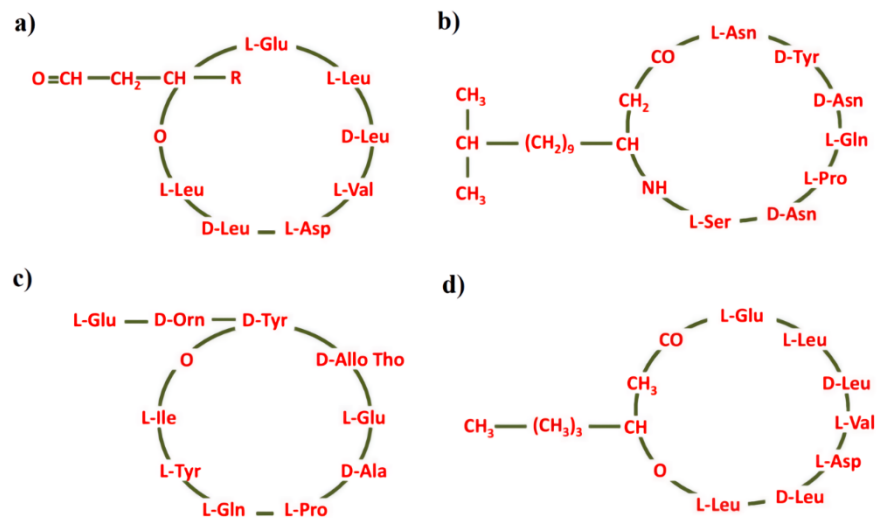
Beberapa jenis biosurfaktan polimer diantaranya sebagai berikut.

- a. Emulsi adalah agen pengemulsi yang kuat, mengemulsi hidrokarbon dalam air, bahkan dengan konsentrasi rendah dari 0,001 hingga 0,01%. Emulsi adalah bioemulsifier polianionik hetero polisakarida yang dihasilkan dari *Acinetobacter calcoaceticus*.
- b. Biodispersan- diproduksi oleh *Acinetobacter calcoaceticus*.
- c. Liposan- diproduksi oleh *Candida lipolyca*.
- d. Karbohidrat-lipida-protein yang diproduksi oleh *Pseudomonas fluorescens*.
- e. Mannan-lipida-protein, diproduksi oleh *Candida tropicalis* (Vandana dan Singh, 2018).

### 2.2.3. Lipopeptida dan Lipoprotein

Molekul lipopeptida terdiri dari dua bagian seperti ekor asil dan suatu oligopeptida linear pendek yang mengandung amida. Ekor hidrofobik terdiri dari rantai hidrokarbon, sedangkan kepala hidrofilik terdiri dari rantai peptida (Mondal *et al.*, 2017). Lipopeptida diklasifikasikan sebagai senyawa siklik atau linier dan terdiri dari asam lemak yang digabungkan dengan residu peptida (Mnif dan Ghribi, 2015). Lipopeptida siklik banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang

seperti dalam industri, lingkungan, dan obat-obatan. Beberapa laporan menunjukkan bahwa biosurfaktan lipopeptida berpotensi sebagai agen antimikroba dan antitumor (Janek *et al.*, 2018). Surfaktin adalah biosurfaktan lipopeptida yang paling penting dalam kelompok biosurfaktan ini. Surfaktin diproduksi oleh bakteri *Bacillus subtilis*. Lipopeptida terdiri dari tujuh struktur cincin amino yang bergabung dengan rantai lemak tak jenuh. Struktur dari beberapa jenis biosurfaktan lipopeptida dapat dilihat seperti pada Gambar 3.



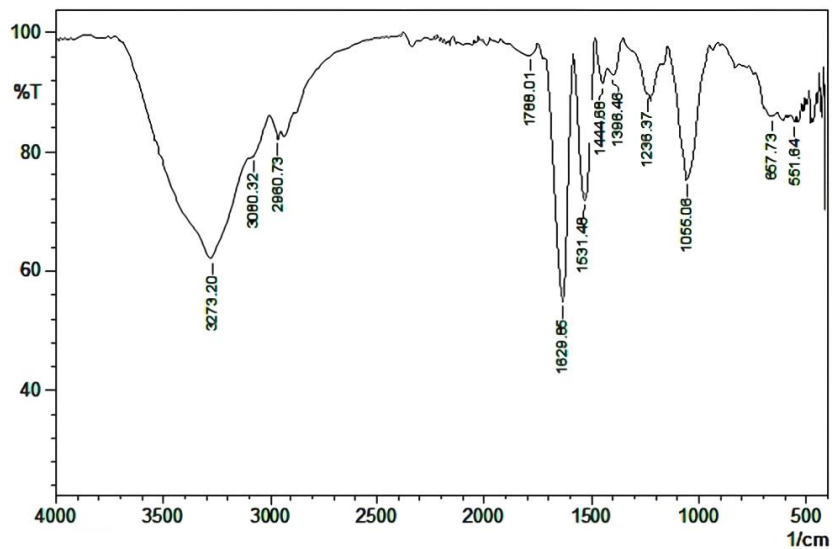
**Gambar 3.** Struktur dari Beberapa Biosurfaktan Lipopeptida: a) surfaktin b) Iturin c) Fengycin dan d) Lichenysin (Carolin *et al.*, 2021).

Beberapa jenis lipopeptida diantaranya adalah sebagai berikut.

1. Peptida-lipida- diproduksi oleh *Bacillus licheniformis*
2. Viscosin - diproduksi oleh *Pseudomonas fluorescens*.
3. Serrawettin- diproduksi oleh *Serratia marcescens*.
4. Subtilisin- diproduksi oleh *Bacillus subtilis*.
5. Gramicidin- diproduksi oleh *Bacillus brevis*.
6. Polymyxin- diproduksi oleh *Bacillus polymyxa* (Vandana dan Singh, 2018)
7. Fengycin diproduksi oleh *Bacillus mojavensis*
8. Iturin diproduksi oleh *Bacillus amyloliquefaciens* dan *Aspergillus carbonarius* (Jiang *et al.*, 2020).
9. Lichenysin diproduksi oleh *Bacillus licheniformis*.

### a. Analisis FT-IR Biosurfaktan Lipopeptida

Beberapa penelitian telah terbukti menghasilkan biosurfaktan lipopeptida berdasarkan hasil analisis seperti analisis FT-IR dan KLT. Penelitian yang dilakukan oleh Kiran *et al.*, (2017) diperoleh spektrum FT-IR dengan puncak karakteristik antara lain pada  $3000-3200\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya ikatan N-H. Ikatan pada  $1630\text{ cm}^{-1}$  sesuai dengan keberadaan gugus C=O. Kemudian pada  $1531\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya amida yang kuat. Ikatan pada  $1444\text{ cm}^{-1}$  dan  $1396\text{ cm}^{-1}$  masing-masing mewakili ikatan  $-\text{CH}_3$  dan C-H. Puncak pada  $1055\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya serapan -C-O. Spektrum IR yang terbentuk merupakan jenis biosurfaktan lipopeptida yang ditunjukkan pada Gambar 4.

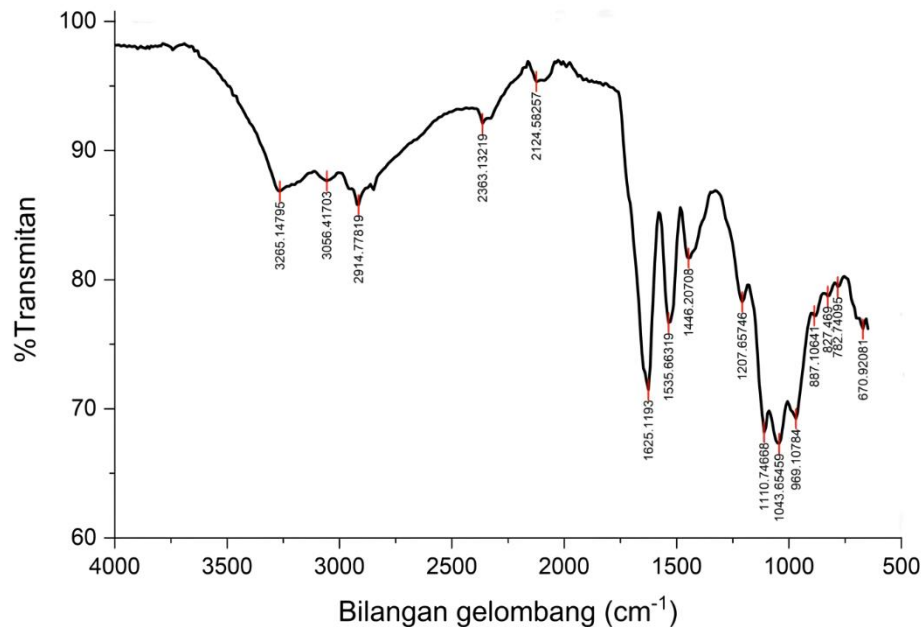


**Gambar 4.** Spektrum FT-IR biosurfaktan lipopeptida dari bakteri *Nestrenkonionia sp.* (Kiran *et al.*, 2017).

Citra (2021) memproduksi biosurfaktan lipopeptida dari isolat bakteri ALP D1 asal air laut Pelabuhan Panjang dari hasil karakterisasi dengan FT-IR.

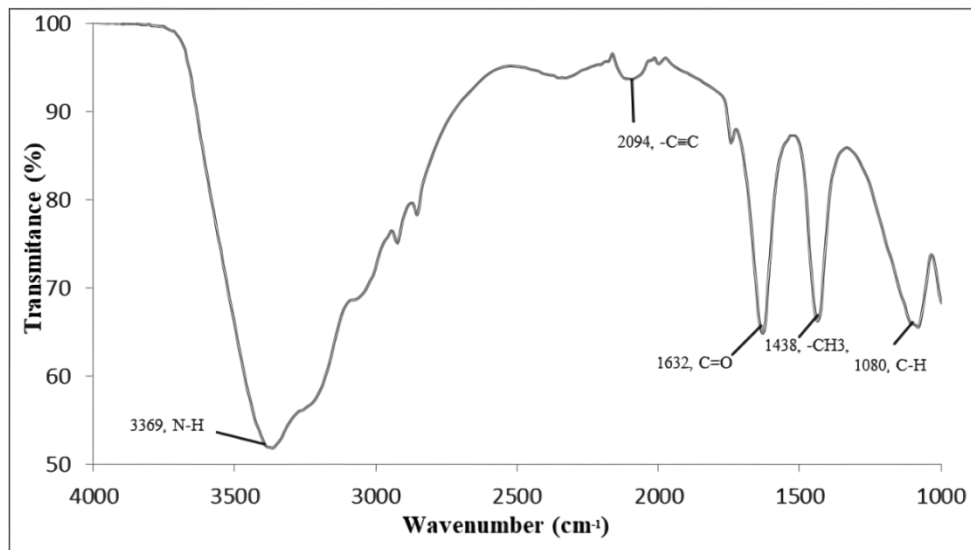
Berdasarkan hasil karakterisasi FT-IR, pada pita serapan  $3265\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi peregangan N-H yang berasal dari gugus peptida. Spektrum pada serapan  $2914\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya peregangan rantai -C-H alifatik. Pita serapan pada  $1625\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya peregangan CO-N. Pada  $1535\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya deformasi ikatan N-H dan vibrasi peregangan C-N. Pada

pita serapan 1390 menunjukkan adanya rantai alifatik dari gugus -C-H dan pada serapan 1207  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya peregangan -C-O. Hasil FT-IR biosurfaktan lipopeptida dari isolat bakteri ALP D1 dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP D1 (Citra, 2021)

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yusnidar (2021), memperoleh biosurfaktan jenis lipopeptida dari hasil karakterisasi dengan FT-IR. Berdasarkan hasil analisis FT-IR, biosurfaktan yang diproduksi dari isolat bakteri ALP E1 asal air laut Pelabuhan Panjang menghasilkan spektrum pada rentang 4000-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Spektrum IR yang terbentuk yaitu pada puncak karakteristik 3369  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya ikatan N-H. Puncak spektrum pada 2094  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya intensitas  $\text{C}\equiv\text{C}$ . Sementara itu, spektrum pada bilangan gelombang 1632  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan keberadaan ikatan  $\text{C}=\text{O}$ . Pita serapan pada bilangan gelombang 1438  $\text{cm}^{-1}$  dan 1080  $\text{cm}^{-1}$  masing-masing mewakili  $-\text{CH}_3$  dan ikatan C-H. Spektrum FT-IR biosurfaktan yang dihasilkan oleh isolat ALP E1 dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP 1 (Yusnidar, 2021).

### 2.3. Aplikasi Biosurfaktan

Biosurfaktan menunjukkan berbagai sifat dan aplikasi yang berguna dan relevan dalam berbagai bidang. Biosurfaktan memiliki potensi untuk pengembangan proses bioteknologi yang signifikan (Santos *et al.*, 2016). Selain itu biosurfaktan juga dapat digunakan sebagai agen terapeutik karena sifat antibakteri, antijamur, dan antivirusnya (Gudiña *et al.*, 2013). Molekul-molekul ini bersifat ideal untuk diformulasikan dalam makanan dan kosmetik, dan potensi antimikroba dan antibiofilmnya dalam industri pengolahan makanan (Singh *et al.*, 2011).

#### 2.3.1. Aplikasi Biosurfaktan dalam Industri Makanan

Biosurfaktan berperan penting sebagai bahan formulasi makanan karena kemampuannya untuk menurunkan tegangan permukaan.. Biosurfaktan juga digunakan untuk mengontrol aglomerasi gumpalan lemak, memperbaiki tekstur, menstabilkan sistem aerasi dan umur simpan produk yang mengandung pati, memodifikasi sifat reologi adonan gandum dan meningkatkan konsistensi dan tekstur dari produk berbasis lemak (Krishnaswamy *et al.*, 2008).

### **2.3.2. Aplikasi Biosurfaktan dalam Industri Kosmetik**

Biosurfaktan digunakan dalam industri kosmetik untuk menggantikan surfaktan yang disintesis secara kimia karena memiliki sifat-sifat seperti *foaming*, daya pengikat air, emulsifikasi, sifat menyebar dan membasahi yang berpengaruh pada viskositas dan konsistensi produk. Biosurfaktan digunakan sebagai pengemulsi, agen pembusa, pembersih, pelarut, agen antimikroba, agen pembasah, mediator aksi enzim, produk kebersihan, anti serangga, produk bayi, pasta gigi, larutan lensa kontak, maskara, lipstik dan pembersih mulut (Gharaei, 2011).

### **2.3.3. Aplikasi Biosurfaktan dalam *Microbial Enhanced Oil Recovery* (MEOR)**

Biosurfaktan banyak digunakan dalam proses *oil recovery*. Perolehan minyak yang ditingkatkan oleh mikroba mencakup penggunaan mikroba dan eksploitasi proses metabolismenya untuk meningkatkan produksi minyak dari reservoir yang berproduksi secara marginal. Mikroba tertentu, seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* dan *Torulopsis bombicola* telah dilaporkan memanfaatkan hidrokarbon dan minyak mentah sebagai satu-satunya sumber karbon dan juga dapat digunakan untuk membersihkan tumpahan minyak (Das *et al.*, 2008).

### **2.3.4. Aplikasi Biosurfaktan dalam Pertanian**

Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki keunggulan lebih dibandingkan dengan surfaktan yang disintesis secara kimia di bidang pertanian. Biosurfaktan yang memiliki sifat antimikroba yang dapat digunakan secara luas di bidang pertanian untuk pengelolaan berbagai penyakit yang disebabkan oleh mikroba. Biosurfaktan juga dapat dimanfaatkan sebagai agen biodegradasi polutan untuk meningkatkan kualitas tanah. Beberapa bakteri yang menghasilkan biosurfaktan lipopeptida menunjukkan aktivitas insektisida terhadap lalat buah *Drosophila melanogaster* sehingga dapat digunakan sebagai biopestisida (Shekhar *et al.*, 2015). Munculnya populasi serangga resisten pestisida serta kenaikan harga pestisida kimia baru telah mendorong penggunaan biosurfaktan sebagai alat pengendalian vektor baru yang ramah lingkungan.

### **2.3.5. Aplikasi Biosurfaktan dalam Medis**

Beberapa biosurfaktan memiliki manfaat sebagai antibakteri, antijamur dan antivirus. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B. circulans* dari air laut memiliki antimikroba yang kuat terhadap patogen Gram negatif, patogen Gram positif dan strain mikroba semi patogen termasuk strain MDR. Biosurfaktan yang diproduksi oleh *Pseudomonas fluorescens* dan *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan sifat antimikroba terhadap beberapa isolat bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia (Vandana dan Singh, 2018)

## **2.4. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan**

### **2.4.1. Substrat pertumbuhan**

Produksi biosurfaktan dalam proses fermentasinya dipengaruhi juga oleh rasio sumber karbon dan nitrogen (Gurkok, 2021). Produksi biosurfaktan biasanya dinyatakan optimal pada fase stasioner pertumbuhan sel ketika sumber nitrogen mulai habis dalam media kultur (Nurfarahin *et al.*, 2018).

#### **a. Sumber Karbon**

Jenis dan jumlah sumber karbon dalam media kultur memegang peranan penting dalam produksi biosurfaktan (Gurkok, 2021). Menurut (Nurfarahin *et al.*, (2018), sumber karbon untuk produksi biosurfaktan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu karbohidrat seperti glukosa, sukrosa, fruktosa, mannitol, dan laktosa, hidrokarbon seperti n-heksadekana, dan n-heksana, oktadekana dan minyak nabati seperti minyak bunga matahari, minyak kedelai, dan minyak zaitun. Limbah minyak goreng, *molasse*, buah dan residu buah, produk pertanian yang kaya pati, limbah terbarukan dan murah untuk produksi biosurfaktan telah menemukan cakupan luas dalam beberapa tahun terakhir (Rodríguez *et al.*, 2019).

## **b. Sumber Nitrogen**

Jenis sumber nitrogen sangat mempengaruhi produksi biosurfaktan oleh mikroorganisme. Ada dua jenis sumber nitrogen, yaitu sumber nitrogen organik (pepton, ragi dan ekstrak daging, urea) dan sumber nitrogen anorganik (amonium sulfat, amonium nitrat, natrium nitrat, kalium nitrat, amonium klorida). Senyawa nitrogen organik dengan struktur kompleks lebih disukai karena tidak menyebabkan perubahan pH secara drastis. Penggunaan garam anorganik menyebabkan hidrolisis kation atau anion sehingga dapat mempengaruhi pH media kultur, sehingga mengurangi efisiensi fermentasi (Nurfarahin *et al.*, 2018) Nitrat, amonia dan asam amino merupakan sumber nitrogen yang disukai untuk *P. aeruginosa*. Terlepas dari sumber nitrogen tersebut, penggunaan bahan limbah sebagai pengganti sumber nitrogen komersial memungkinkan untuk mengurangi biaya produksi.

## **c. Mineral (Mikronutrisi)**

Pengaruh berbagai nutrisi terhadap produksi biosurfaktan merupakan faktor penting yang perlu diperhatikan. Jumlah fosfat, besi, mangan, kalsium, dan *trace element* dalam media sangat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi biosurfaktan. Tidak hanya logam, tetapi juga asam amino seperti asam aspartat, asparagine, asam glutamat, valin, dan lisin mempengaruhi hasil akhir biosurfaktan (Banat *et al.*, 2000)

Penambahan berbagai garam logam pada media fermentasi sangat mempengaruhi produksi biosurfaktan. Berbagai logam seperti magnesium, kalsium, besi sering digunakan untuk produksi biosurfaktan. Namun, persyaratan logam bervariasi tergantung pada mikroorganisme (Nurfarahin *et al.*, 2018).

Kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dan dipotassium hidrogen fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ditambahkan ke media produksi untuk mempertahankan pH yang diinginkan selama fermentasi dan mendorong pertumbuhan mikroba (Jardim *et al.*, 2010). Kalsium (biasanya  $\text{CaCl}_2$ ) bekerja sebagai mediator umum dalam mentransmisikan sinyal dari permukaan sel ke proses intraseluler



mikroorganisme. Baik ion kalium maupun kalsium berperan penting dalam menyeimbangkan tekanan osmotik dan mengendalikan potensial membran sel, yang dapat mencegah lisis sel di lingkungan (Nurfarahin *et al.*, 2018). Sebagian besar, 0,1 g/L ion  $\text{Ca}^{2+}$  diperlukan untuk produksi biosurfaktan dari *P. aeruginosa* (Liu *et al.*, 2019) dan 0,02 g/L ion  $\text{Ca}^{2+}$  diperlukan untuk produksi glikolipida dari *B. megaterium*. Pada proses produksi biosurfaktan, ion magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) biasanya disuplai dalam bentuk magnesium sulfat ( $\text{MgSO}_4$ ) dan kira-kira 50 kali lebih tinggi dari konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  yang digunakan dalam media produksi (Thavasi *et al.*, 2011).

#### **2.4.2. Usia Kultur**

Faktor lain yang mempengaruhi produksi biosurfaktan adalah usia kultur. Fase stasioner hingga fase kematian meningkatkan produksi biosurfaktan secara signifikan (Mulligan *and* Gibbs, 1993). Semakin tua umur kultur maka semakin banyak juga nutrisi yang digunakan oleh mikroorganisme, sehingga menyebabkan nutrisi dalam kultur *batch* semakin terbatas. Hal tersebut dapat mengakibatkan akumulasi produk sisa metabolisme yang menyebabkan perubahan pada metabolisme sel dan produksi biosurfaktan. Bertambahnya usia kultur dapat berhubungan pula dengan pembentukan mikroba permukaan sel yang hidrofobik untuk digunakan dalam emulsi minyak dalam udara (Budiarti, 2000).

#### **2.4.3. Faktor Lingkungan**

Faktor lingkungan sangat penting dalam hasil dan karakteristik dari biosurfaktan. Untuk memperoleh biosurfaktan dalam jumlah besar, bioproses perlu untuk dioptimalkan karena produk dapat dipengaruhi oleh perubahan suhu, pH, aerasi dan kecepatan agitasi. Sebagian besar produksi biosurfaktan dilaporkan dilakukan pada kisaran suhu 25-30°C (Desai *and* Banat, 1997). Pengaruh pH terhadap biosurfaktan memperoleh hasil bahwa produksi biosurfaktan terbaik terjadi pada rentang pH 7,0-8,0 (Zinjarde dan Pant, 2002). Aerasi dan agitasi merupakan faktor penting yang mempengaruhi produksi biosurfaktan karena keduanya memfasilitasi transfer oksigen dari fase gas ke fase air. Adamczak dan Bednarski (2000) mengamati

bahwa nilai produksi surfaktan terbaik (45,5g/l) diperoleh ketika laju aliran udara 1 vvm dan konsentrasi oksigen terlarut dipertahankan pada saturasi 50%.

Konsentrasi garam dari media tertentu juga memiliki efek yang sesuai pada produksi biosurfaktan karena aktivitas seluler mikroorganisme dipengaruhi oleh konsentrasi garam. Namun demikian, pengamatan sebaliknya diperhatikan untuk beberapa produk biosurfaktan yang tidak terpengaruh oleh konsentrasi hingga 10% (berat/volume) meskipun sedikit penurunan CMC terdeteksi.

## **2.5. Limbah Kelapa Sawit**

Limbah kelapa sawit merupakan sisa-sisa hasil tanaman kelapa sawit yang tidak termasuk dalam produk utama dari proses pengolahan kelapa sawit baik berupa limbah padat maupun limbah cair. Limbah industri kelapa sawit digolongkan dalam tiga jenis yaitu limbah padat, limbah cair, dan limbah gas (Mirnandaulia *et al.*, 2019).

Limbah cair minyak kelapa sawit atau yang lebih dikenal dengan *Palm Oil Mill Effluent* (POME) merupakan material kompleks dan mempunyai komposisi yang berbeda tergantung pada proses pengolahan Kelapa sawit menjadi *Crude Palm Oil* (CPO). Umumnya POME terdiri dari molekul organik dengan konsentrasi yang sangat tinggi seperti asam lemak bebas, protein, karbohidrat, senyawa nitrogen, dan lemak (termasuk triasilgliserol) dan mineral. POME adalah limbah kompleks yang tidak beracun tetapi dapat meningkatkan senyawa organik dan dapat menyebabkan pencemaran ekstrim. Karakteristik dari POME tergantung pada proses produksi dan bahan baku yang digunakan.

POME memiliki kandungan bahan organik yang tinggi dan kemungkinan POME mengandung beberapa nutrisi organik yang menguntungkan (Ani *et al.*, 2021). Nurul Adela *et al.*, (2014) melaporkan analisis energi dispersi X-ray (EDX) dari POME menunjukkan kandungan karbon, hidrogen, nitrogen, kalium, dan magnesium yang menunjukkan bahwa POME merupakan substrat yang kaya dan baik untuk pertumbuhan mikroba. Bhuyar *et.al.*, (2020) juga melaporkan bahwa POME mengandung beberapa nutrisi dan mineral penting dan dapat digunakan

sebagai media yang efektif untuk aplikasi berbasis mikroba. Adapun kandungan zat yang terdapat dalam limbah POME dapat dilihat seperti pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Komposisi limbah cair minyak kelapa sawit (Opurum *et al.*, 2017)

Komponen	Konsentrasi
Karbohidrat total	1.05
Protein	1.16
Minyak	12.00
Fosfat (P)	2.74
Kalsium (Ca)	117.0
Magnesium (Mg)	0.033
Tembaga (Cu)	0.16
Kalium (K)	23.03
Natrium (Na)	17.64
Besi (Fe)	1.71
Mangan (Mn)	0.88
Seng (Zn)	1.09

Pemanfaatan limbah cair pengolahan minyak kelapa sawit sangat potensial untuk digunakan dalam produksi biosurfaktan karena harganya yang rendah serta kaya akan kandungan lemak, gula, dan protein. Abas *et al.*, (2013) dalam penelitiannya menggunakan POME sebagai media fermentasi menghasilkan surfaktan dari *Bacillus subtilis* dengan konsentrasi POME terbaik pada 50% (v/v). Pada penelitian (Radzuan *et al.* (2017) menggunakan limbah pengolahan minyak kelapa sawit sebagai sumber karbon dihasilkan biosurfaktan rhamnolipida dari *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sebanyak 0,43g/L.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Desember 2022 di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Karakterisasi biosurfaktan menggunakan FT-IR, dan KLT dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung.

#### 3.2. Alat-Alat yang Digunakan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, labu erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, bunsen, pipet tetes, jarum ose, *freezer*, spatula, oven model T60 *Heraeus*, aluminium foil, *magnetic stirrer*, *autoclave* model S-90N, inkubator model *Precistern P'selecta*, *shaker incubator*, kompor, *hotplate-stirrer Stuart CB162*, mikropipet model *DragonLab*, *Laminar Air Flow (LAF) Curma* model 9005-FL, neraca analitik *Ainsworth AA160*, tabung sentrifugasi, *chamber*, plat kromatografi lapis tipis, sentrifuga model 225 *Fisher scientific*, indikator pH, *vortex* model *Grant Bio PV-1*, kertas saring *Whatman* no. 42, *freeze dryer* model *Scanvac Cool Safe Labogene*, *Fourier Transform Infrared (FT-IR) Agilen Technologies Carry 630*, dan spektrofotometer *UV-Vis Carry Win UV 32*.

#### 3.3. Bahan-bahan yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 yang telah digunakan pada penelitian sebelumnya oleh Yusnidar

(2021), limbah cair minyak kelapa sawit yang diperoleh dari PT *Indo Energy Solution* (IES), kapas kasa, *nutrient agar*, *nutrient broth*, *blood agar base*, akuades, benzena, kloroform, asam asetat, metanol, reagen ninhidrin, media MSM (*Mineral Salt Medium*) antara lain  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , *yeast extract*, dan glukosa.

### **3.4. Metode Penelitian**

#### **3.4.1. Pembuatan Media**

##### **3.4.1.1. Media *Nutrient Agar***

Media *Nutrient Agar* digunakan untuk meremajakan isolat bakteri ALP E1. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 1,4 g *Nutrient Agar* ke dalam 50 mL akuades. Kemudian media tersebut dipanaskan hingga larut seluruhnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan sumbat. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian media dalam tabung reaksi diletakkan dengan posisi miring.

##### **3.4.1.2. Media *Nutrient Broth***

Media *Nutrient Broth* adalah media yang digunakan untuk media inokulum atau media adaptasi bakteri. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 0,26 g *Nutrient Broth* dalam 20 mL akuades dan dipanaskan hingga larut seluruhnya. Selanjutnya media ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm, selama 15 menit. Kemudian media disimpan pada suhu ruang dan siap digunakan.

#### **3.4.1.3. Media Mineral Salt Medium (MSM)**

Media *Mineral Salt Medium (MSM)* adalah media selektif yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara menyiapkan terlebih dahulu bahan-bahan pembuatan media ini yaitu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 gram,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 gram,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,3 gram, NaCl 0,01 gram,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,001 gram,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,02 gram,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,001 gram,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,0002 gram, glukosa 0,03 gram dan *yeast extract* 0,003 gram. Selanjutnya media ini ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dihomogenkan menggunakan stirrer. Media kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , tekanan 1 atm, selama 15 menit. Selanjutnya media disimpan disimpan pada suhu ruang dan siap digunakan.

#### **3.4.2. Peremajaan Isolat *Bacillus cereus* ALP E1**

Peremajaan isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dilakukan guna menjaga nutrisi dari isolat bakteri yang akan digunakan sebagai stok kultur bakteri lokal *Bacillus cereus* ALP E1. Peremajaan isolat ini mengacu pada penelitian Citra (2021) dilakukan dalam media *Nutrient Agar* miring. Isolat bakteri lokal *Bacillus cereus* ALP E1 diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke permukaan media secara zig-zag dan diinkubasi selama 24-48 jam pada temperatur  $37^\circ\text{C}$ . Selanjutnya biakan hasil peremajaan ini dapat digunakan sebagai stok kultur dan disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur  $4^\circ\text{C}$ .

#### **3.4.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan**

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk mengetahui fase pertumbuhan dari bakteri penghasil biosurfaktan. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan cara 1 ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam 20 mL media cair NB, lalu diinkubasi pada *shaker incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Selanjutnya biakan dipindahkan sebanyak 1% dari media NB ke dalam media MSM. Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  dengan *shaker*

*incubator* pada kecepatan 110 rpm selama 120 jam. Pengukuran nilai OD (*optical density*) diukur setiap 12 jam sekali. Sebanyak 0,3 mL kultur serta 2,7 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada Panjang gelombang 600 nm.

#### **3.4.4. Uji Biosurfaktan**

Uji biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui kemampuan isolat bakteri ALP E1 yang digunakan untuk menghasilkan biosurfaktan. Uji biosurfaktan dilakukan dengan beberapa cara yaitu dengan uji hemolisis, uji emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse*.

##### **3.4.4.1. Uji Emulsifikasi**

Uji emulsifikasi adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui bakteri yang memiliki aktivitas biosurfaktan. Hasil positif dari uji ini adalah terbentuknya 3 fase setelah pengadukan dengan kecepatan tinggi. Uji ini dilakukan dengan cara kultur cair bakteri disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit hingga pelet dan supernatan terpisah. Supernatan yang diperoleh lalu diambil sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL benzena sebagai substrat non polar yang membentuk emulsi. Campuran selanjutnya divorteks dengan kecepatan tinggi selama 2 menit dan didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam dan dihitung indeks emulsinya (Pereira *et al.*, 2013). Indeks emulsifikasi (IE<sub>24%</sub>) dapat diukur menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Indeks Emulsifikasi (IE}_{24}\%) = \frac{\text{Tinggi lapisan teremulsi (cm)}}{\text{Tinggi total cairan (cm)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$

##### **3.4.4.2. Uji Oil spreading**

Uji *oil spreading* digunakan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dari bakteri yang diuji dengan mengamati kemampuan bakteri untuk menghilangkan lapisan minyak pada di permukaan air. Sebelum melakukan pengujian, kultur cair bakteri terlebih dahulu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit

hingga pelet dan supernatan terpisah. Selanjutnya uji dilakukan dengan memasukkan sebanyak 30 mL akuades ke dalam cawan petri pada permukaan datar dan ditambahkan 1 mL oli bekas. Kemudian supernatan kultur dimasukkan secara perlahan sebanyak 20  $\mu$ L pada tengah lapisan oli bekas. Uji positif dapat diamati apabila terdapat zona bening akibat lapisan oli bekas oleh biosurfaktan (Shah *et al.*, 2016).

#### **3.4.4.3. Uji *Drop collapse***

Uji *drop collapse* merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan senyawa. Sebelum melakukan pengujian, kultur cair bakteri terlebih dahulu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit hingga pelet dan supernatan terpisah. Uji ini dilakukan dengan cara meneteskan sebanyak 20 $\mu$ L oli bekas pada cawan petri dan didiamkan hingga 1 jam agar stabil. Kemudian supernatan diteteskan sebanyak 10 $\mu$ L di atas oli bekas. Hasil positif uji ini yaitu apabila tetesan supernatan di atas oli akan berbentuk datar jika mengandung biosurfaktan (Bodour dan Miller Maier, 1998).

#### **3.4.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan**

Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum untuk proses produksi biosurfaktan. Optimasi produksi yang dilakukan dalam penelitian ini mencakup optimasi waktu dan konsentrasi substrat, variasi pH, dan kadar salinitas media pertumbuhan bakteri.

##### **3.4.5.1. Optimasi waktu dan konsentrasi substrat**

Optimasi waktu produksi biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui waktu optimal untuk produksi biosurfaktan dengan menambahkan limbah cair minyak kelapa sawit sebagai substrat pada media. Optimasi waktu dilakukan dengan cara hasil biakan isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dari media NB dimasukkan sebanyak 1% ke dalam campuran media MSM dengan variasi penambahan limbah cair



kelapa sawit 10%, 20% dan 30%. Selanjutnya biakan bakteri diinkubasi pada temperatur 30°C dengan menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm pada rentang waktu 0-120 jam. Pengukuran nilai OD (*optical density*) dilakukan setiap 12 jam sekali. Sebanyak 0,3 mL kultur ditambah dengan 2,7 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 600 nm (Yakimov *et al.*, 1995).

#### **3.4.5.2. Optimasi pH**

Optimasi pH dilakukan untuk mengetahui pH optimal untuk produksi biosurfaktan. Optimasi pH dilakukan dengan cara hasil biakan isolat *Bacillus cereus* ALP E1 dari media NB dimasukkan sebanyak 1% ke dalam media MSM dengan limbah cair kelapa sawit pada konsentrasi yang optimal. Variasi pH yang digunakan yaitu 5, 6, dan 7 dengan penambahan NaOH 1 N dan HCl 1 N. Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada temperatur 30°C dengan menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm sesuai dengan waktu optimum produksinya. Setelah itu dilakukan uji emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Yakimov *et al.*, 1995).

#### **3.4.5.3. Optimasi Kadar Salinitas**

Optimasi kadar salinitas dilakukan untuk mengetahui kadar salinitas optimal untuk produksi biosurfaktan. Optimasi kadar salinitas dengan cara hasil biakan isolat *Bacillus cereus* ALP E1 dari media NB dimasukkan sebanyak 1% ke dalam media MSM dengan limbah cair kelapa sawit pada konsentrasi yang optimal. Kadar salinitas diatur dengan penambahan NaCl dengan variasi kadar 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1,0% (b/v). Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada temperatur 30°C dengan menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm sesuai dengan waktu optimum produksinya. Setelah itu dilakukan uji emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Suwansukho *et al.*, 2008)

### 3.4.6. Ekstraksi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan ekstrak biosurfaktan dari isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1. Waktu kultivasi, pH, dan kadar salinitas, yang digunakan untuk proses ekstraksi ini menggunakan kondisi optimum yang telah diperoleh dari proses optimasi. Ekstraksi biosurfaktan dapat dilakukan dengan metode presipitasi asam. Supernatan biosurfaktan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan bebas sel. Supernatan selanjutnya ditambahkan HCl 6 N hingga diperoleh pH 2 kemudian didiamkan pada temperatur 4°C selama 24 jam. Kemudian supernatan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 20 menit (Nitschke *et al.*, 2004). Pelet yang diperoleh dari hasil sentrifugasi kemudian dilakukan *freeze drying*. *Freeze drying* dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan biosurfaktan murni dari sisa minyak yang masih menempel pada pelet. Biosurfaktan selanjutnya digunakan pada tahap berikutnya.

Biosurfaktan yang diekstraksi menggunakan metode presipitasi asam yaitu dengan membuat pH supernatan bebas sel menjadi pH 2 dengan menambahkan HCl 6N.. Supernatan dibiarkan hingga mengendap selama semalam pada temperatur 4°C. Endapan kemudian dikumpulkan dengan cara disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya *crude* basah biosurfaktan dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga didapatkan biosurfaktan kering. Biosurfaktan kering yang diperoleh selanjutnya ditimbang (Nitschke dan Pastore, 2006; Mnif *et al.*, 2016).

### 3.4.7. Karakterisasi Biosurfaktan

Karakterisasi biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Karakterisasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi karakterisasi dengan kromatografi lapis tipis (KLT), dan *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR).

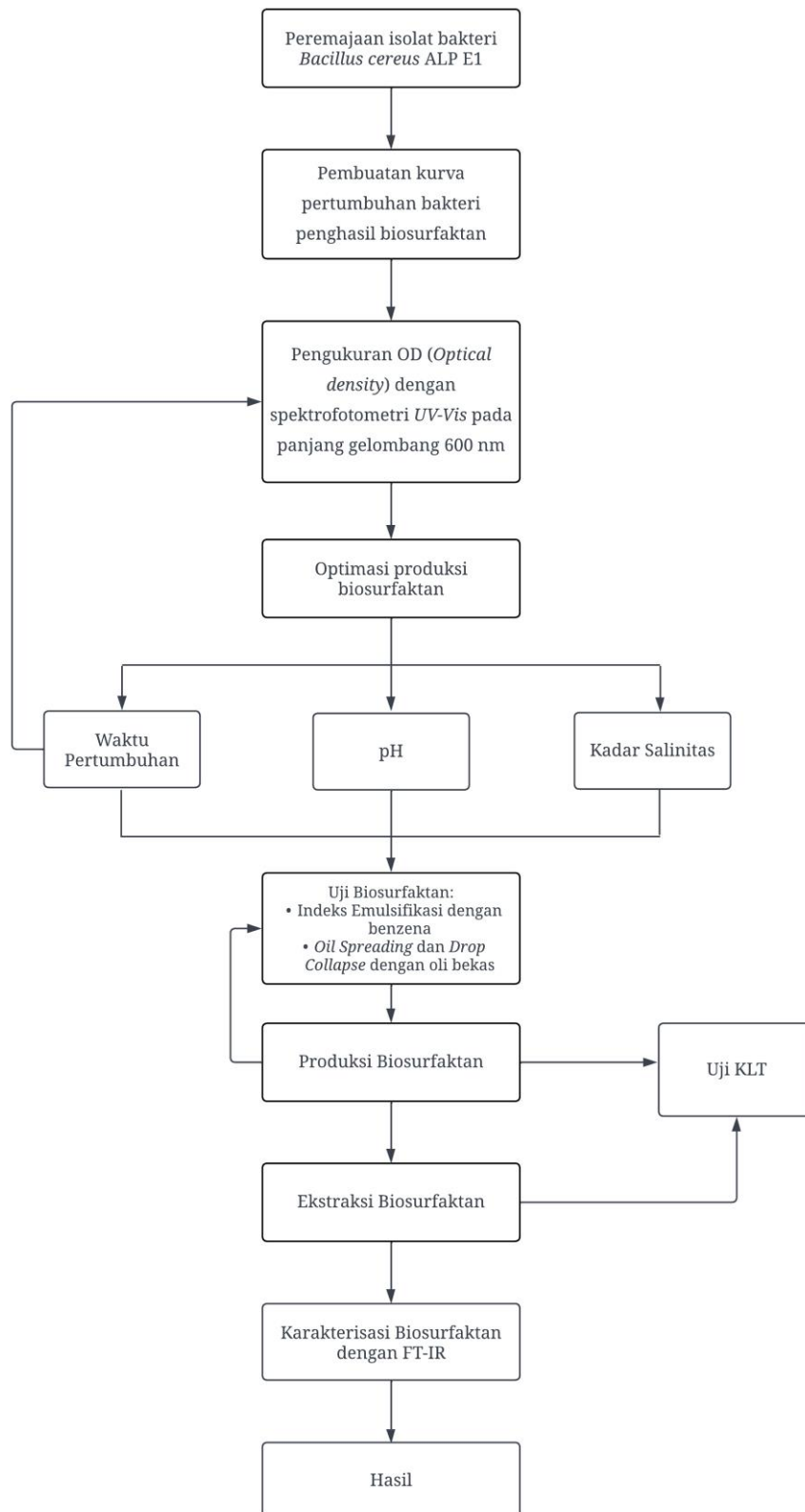
#### **3.4.7.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan pada tahap uji biosurfaktan setelah produksi dan setelah ekstraksi. Sebanyak 10 $\mu$ L ekstrak biosurfaktan diteteskan pada pelat KLT dengan ukuran 2x2 cm. Pelat dimasukkan ke dalam sistem pelarut yang terdiri dari kloroform: metanol: asam asetat (65:10:2, v/v/v) dalam chamber dan dilanjutkan dengan pengamatan di bawah sinar UV 254 nm. Untuk mendeteksi komponen protein atau asam amino dalam fraksi yang dipisahkan ditentukan dengan meneteskan pelat KLT dengan larutan ninhidrin (George dan Jayachandran, 2009; Tahzibi *et al.*, 2004). Uji positif menunjukkan adanya bercak berwarna merah muda setelah penambahan reagen ninhidrin.

#### **3.4.7.2. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)**

Karakterisasi biosurfaktan menggunakan FTIR dilakukan agar mengetahui gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam molekul biosurfaktan. Karakterisasi dengan cara produk kasar biosurfaktan dicampurkan dengan KBr murni. Setelah itu campuran dimasukkan ke dalam cetakan pelet dan ditekan dengan *press* hidrolik. Selanjutnya sampel dikeluarkan dan dianalisis dengan menggunakan FTIR (Pavan dan Andrew, 2021). Spektrum IR yang terbentuk dapat dijadikan sebagai acuan untuk menentukan jenis biosurfaktan.

Adapun bagan alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Diagram alir penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Penambahan substrat limbah cair kelapa sawit dapat menghasilkan biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 secara optimum pada konsentrasi 20%.
2. Isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 mampu memproduksi biosurfaktan dengan kondisi optimum yaitu pada waktu inkubasi 108 jam, pH 9, dan kadar salin 0,3% dengan indeks emulsifikasi ( $IE_{24}$ ) sebesar 63,33%, uji *oil spreading* membentuk zona bening sebesar 5 cm, serta uji *drop collapse* menunjukkan hasil positif.
3. Hasil produksi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 yaitu diperoleh ekstrak kering berwarna coklat muda sebanyak 0,1552 g/L dan berdasarkan hasil analisis FTIR dan KLT biosurfaktan yang diperoleh termasuk dalam golongan lipopeptide jenis surfaktin.

### 5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan optimasi kondisi produksi biosurfaktan dengan menggunakan substrat pertumbuhan limbah agroindustri lainnya yang melibatkan parameter variasi kadar salin, sumber nitrogen, parameter agitasi dan aerasi serta menguji aktivitas antimikroba dan analisis instrumentasi lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abas, M. R., Jalil, A., Kader, A., Sahaid K., M., Hamid, A. A., Hafez, M., and Isa, M. 2013. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as Fermentation Media. *International Conference on Food and Agricultural Sciences*. Vol.55: 87-93.
- Adamczak, M., and Bednarski, W. 2000. Influence of Medium Composition and Aeration on the Synthesis of Biosurfactants Produced by *Candida antarctica*. *Biotechnology Letters*. Vol. 22: 313-316.
- Adu, F. A., and Hunter, C. H. 2021. Screening and Identification of Lipopeptide Biosurfactants Produced by Two Aerobic Endospore-Forming Bacteria Isolated from Mfabeni Peatland, South Africa. *Current Microbiology*. Vol.78 (7): 2615-2622.
- Amilia, A., Tyas, M. N., Juliani, A., and Yulianto, A. 2013. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Yang Terdapat di Dalam Deposit Lilin Pada Pipa Transmisi Minyak Mentah. *Khazanah: Jurnal Mahasiswa UII*, Vol. 2: 49-61.
- Ani, K. A., Agu, C. M., and Menkiti, M. C. 2021. Preliminary Investigation and Neural Network Modeling of Palm Oil Mill Effluent as A Potential Bio-Stimulating Organic Co-Substrate in Hydrocarbon Degradation. *Environmental Challenges*. Vol. 5: 2-12.
- Ashraf, M. A., Hussain, I., Rasheed, R., Iqbal, M., Riaz, M., and Arif, M. S. 2017. Advances in Microbe-Assisted Reclamation of Heavy Metal Contaminated Soils Over the Last Decade: A Review. *Journal of Environmental Management*, Vol. 198: 132-143.

- Ayangbenro, A. S., dan Babalola, O. O. 2020. Genomic Analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and Its Heavy Metal Removal from Polluted Soil. *Scientific Reports*, Vol. 10 (1): 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. 2000. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 53 (5): 495-508.
- Banat, I., Satpute, S., Cameotra, S., Patil, R., and Nyayanit, N. 2014. Cost Effective Technologies and Renewable Substrates for Biosurfactants' Production. *Frontiers in Microbiology*. Vol.5 (697): 1-18.
- Bhuyar, P., Yusoff, M.M., Ab.Rhim, M.H., Sundararaju, S., Maniam, G.P., and Govidan, N., 2020. Effect of Plant Hormones on The Production of Biomass and Lipid Extraction for Biodiesel Production from *Microalgae Chlorella sp.* *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* Vol. 9: 671-674.
- Bodour, A. A., and Miller-Maier, R. M. 1998. Application of A Modified Drop-Collapse Technique for Surfactant Quantitation and Screening of Biosurfactant-Producing Microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 32 (3): 273-280.
- Budiarti, R. S. 2000. *Optimasi Konsentrasi Crude Oil dan Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Sumur Bangko*. Institut Teknologi Bandung. Bandung. Hal: 1-5.
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., and Banat, I. M. 2013. Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries. *Biotechnology Progress*. Vol 29 (5): 1097-1108.
- Carolin C., F., Kumar P., S., Chitra, B., Fetcia J., C., and Ramamurthy, R. 2021. Stimulation of *Bacillus sp.* by Lipopeptide Biosurfactant for the Degradation of Aromatic Amine 4-Chloroaniline. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 415: 2-10.
- Citra, S. 2021. *Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Air Laut Pelabuhan Panjang Menggunakan Sumber Karbon Minyak Bumi*. *Skripsi*. Universitas Lampung. Lampung. Hal. 23-30.

- Darwesh, O. M., Mahmoud, M. S., Barakat, K. M., Abuellil, A., and Ahmad, M. E. 2021. Improving the Bioremediation Technology of Contaminated Wastewater Using Biosurfactants Produced by Novel *Bacillus* Isolates. *Heliyon*. Vol.7 (12): 2-12.
- Das, P., Mukherjee, S., and Sen, R. 2008. Antimicrobial Potential of A Lipopeptide Biosurfactant Derived from A Marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol. 104. (6): 1675-1684.
- de França, Í. W. L., Lima, A. P., Lemos, J. A. M., Lemos, C. G. F., Melo, V. M. M., de Sant'ana, H. B., and Gonçalves, L. R. B. 2015. Production of A Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 Aiming Bioremediation of Impacted Soils. *Catalysis Today*. Vol. 255: 10-15.
- De Sousa, J. R., da Costa Correia, J. A., de Almeida, J. G. L., Rodrigues, S., Pessoa, O. D. L., Melo, V. M. M., and Gonçalves, L. R. B. 2011. Evaluation of a Co-Product of Biodiesel Production as Carbon Source in the Production of 32 Biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. *Process Biochemistry*, 46 (9): 1831-1839.
- Desai, J.D., and Banat, I.M. 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol. 61: 47- 64.
- Elazzazy, A. M., Abdelmoneim, T. S., and Almaghrabi, O. A. 2015. Isolation and Characterization of Biosurfactant Production Under Extreme Environmental Conditions by Alkali-Halo-Thermophilic Bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 22 (4): 466-475.
- Fakhrudin, M. 2012. Biosurfactant: Production and Application Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. Vol. 3 (124): 1-5.
- George, S., and Jayachandran, K. 2009. Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings as Sole Carbon Source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 158 (3): 694-705.
- Gharaei, F. E. 2011. Biosurfactants in Pharmaceutical Industry: A Mini – Review. *American Journal of Drug Discovering and Development*. Vol.1: 58-69.



- Ghasemi, A., Moosavi-Nasab, M., Setoodeh, P., Mesbahi, G., and Yousefi, G. 2019. Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 Grown on Different Carbon Sources: Strain Screening Followed by Product Characterization. *Scientific Reports*. Vol. 9 (5287): 1-12.
- Gosalam, S., Tahir, A., dan Silviana, J. L. 2008. Uji Kemampuan Bakteri dari Perairan dalam Mendegradasi Senyawa Minyak Solar. *J. Torani*. Vol. 18 (2): 171-178.
- Gudiña, E. J., Rangarajan, V., Sen, R., and Rodrigues, L. R. 2013. Potential Therapeutic Applications of Biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol. 34 (12): 667-675.
- Gurkok, S. 2021. *Important Parameters Necessary in the Bioreactor for the Mass Production of Biosurfactants*. dalam Inamuddin, C. O. Adetunji, & A. M. Asiri. 2020. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. Hal. 347-365. Elsevier.
- Gürkök, S., and Özdal, M. 2021. Microbial Biosurfactants: Properties, Types, and Production. *Anatolian Journal of Biology*. Vol. 2: 7-12.
- Hasanizadeh, P., Moghimi, H., and Hamed, J. 2017. Biosurfactant Production by *Mucor circinelloides* on Waste Frying Oil and Possible Uses in Crude Oil Remediation. *Water Science and Technology*. Vol. 76 (7): 1706-1714.
- Henkel, M., Müller, M. M., Kügler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syldatk, C., and Hausmann, R. 2012. Rhamnolipids as Biosurfactants from Renewable Resources: Concepts for Next-Generation Rhamnolipid Production. *Process Biochemistry*. Vol. 47(8): 1207-1219.
- Himeoka, Y. and Kaneko, K. 2016. Theory for Transition Between Log and Stationary Phases: Universal Laws for Lag Time. *J. Biol Phys*. 1-17.
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., and Alexandridis, P. 2020. Biosurfactants, Natural Alternatives to Synthetic Surfactants: Physicochemical Properties and Applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. Vol. 275: 2-71.

- Jardim P., G., Mara Prioli Ciapina, E., de Barros Gomes, E., and Pereira Junior, N. 2010. Biosurfactant Production by *Rhodococcus Erythropolis* and Its Application to Oil Removal. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 41. Page: 685-693.
- Jiang, C., Li, Z., Shi, Y., Guo, D., Pang, B., Chen, X., Shao, D., Liu, Y., and Shi, J., 2020. *Bacillus subtilis* inhibits *Aspergillus carbonarius* by Producing Iturin A, Which Disturbs the Transport, Energy Metabolism, and Osmotic Pressure of Fungal Cells as Revealed by Transcriptomics Analysis. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 330: 2-11.
- Joshi S.J., Al-Wahaibi Y.M., Al-Bahry S.N., Elshafie A.E, Al- Bemani A.S., Al-Bahri., A and Al-Mandhari M.S. 2016. Production, Characterization and Application of *Bacillus licheniformis* W16 Biosurfactant in Enhancing Oil Recovery. *Front. Microbiol.* Vol. 7: 1-14.
- Kendall, P. 1963. Use of the Ninhydrin Reaction for Quantitative Estimation of Amino Groups in Insoluble Specimens. *Nature*. Vol. 197: 1305–1306.
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., and Kokare, C. 2012. Production and stability Studies of the Biosurfactant Isolated from Marine *Nocardiosis sp.* B4. *Desalination*. Vol. 285: 198-204.
- Kiran, G. S., Thomas, T. A., and Selvin, J. 2010. Production of A New Glycolipid Biosurfactant from Marine *Nocardiosis lucentensis* MSA04 in Solid-State Cultivation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Vol. 78 (1): 8-16.
- Kiran G.S., Priyadharsini S, Sajayan A, Priyadharsini G.B., Poulouse N. and Selvin J. 2017 Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia sp.* and Its Application in Food Industry. *Front. Microbiol.* Vol.8:1138
- Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in Industry. *J. Pure and applied Chemistry*. Vol. 64: 1731-1737.
- Krishnaswamy M, Subbuchettiar G, Ravi TK, and Panchaksharam S 2008 Biosurfactants Properties, Commercial Production and Application. *Current Science*. Vol. 94: 736-747.

- Liu, R., Shimanovich, U., Dong, W., Zhou, J., Xue, R., Liu, S., Xu, N., Xin, F., Zhang, W., and Jiang, M. 2019. High Di-rhamnolipid Production Using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, Separation of Mono/Di-rhamnolipids, and Evaluation of Their Properties. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol 7: 2-7.
- Maier, R. M. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis and Potential Application. *J. Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 54: 625-633.
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., and Banat, I. M. 2011. Advances in Utilization of Renewable Substrates for Biosurfactant Production. *AMB Express*. Vol. 1. (1): 2-19.
- Mirnandaulia, M., Racmiadji, Irwan., dan Exadius, Gira. 2019. Pemanfaatan Palm Oil Mill Effluent (POME) Sebagai Alternatif Energi Terbarukan di Salah Satu Perusahaan Kelapa Sawit Sumatera Utara. *Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*. Vol. 2 (1): 25-29.
- Mnif, I., and Ghribi, D. 2015. Review Lipopeptides Biosurfactants: Mean classes and New Insights for Industrial, Biomedical, and Environmental Applications. *Peptide Science*. Vol. 104 (3): 129-147.
- Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., and Ghribi, D. 2016. Purification and Identification of *Bacillus subtilis* SPB1 Lipopeptide Biosurfactant Exhibiting Antifungal Activity Against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 23 (7): 1-10.
- Mondal, M.H., Sarkar, A., Maiti, T.K., and Saha, B., 2017. Microbial Assisted (*Pseudomonas sp.*) Production of Novel Biosurfactant Rhamnolipids and Its Characterization by Different Spectral Studies. *J. Mol. Liq*. Vol. 242: 873-878.
- Moya Ramírez, I., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Jurado Alameda, E., García Román, M., and Banat, I. M. 2015. Rhamnolipid and Surfactin Production from Olive Oil Mill Waste as Sole Carbon Source. *Bioresource Technology*. Vol. 198: 231-236.

- Mulligan, C. N. and Gibbs, B. F. 1993. *Factors Influencing the Economics of Biosurfactant*, in Kosaric, N: *Biosurfactant Production, Properties and Applications*. Marcel Dekker. New York. Hal: 371-380.
- Ningrum, M. A. 2019. *Optimasi Produksi Biosurfaktan dengan Menggunakan Media Limbah Cair Kelapa Sawit dari Bakteri Lipolitik Isolat Lokal Terpilih*. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung. Hal: 35-50.
- Nitschke, M., Ferraz, C., and Pastore, G. M. 2004. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 35 (1): 81-85.
- Nitschke, M., and Pastore, G. 2006. Production and Properties of A Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown On Cassava Wastewater. *Bioresource Technology*, Vol. 97: 336-341.
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., and Phang, L. Y. 2018. Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production, An Overview. *Molecules*. Vol. 23 (5): 2-26.
- N. Adela, B., Muzzammil, N., Lok, S.K., and Choo, Y.M., 2014. Characteristics of Palm Oil Mill Effluent (POME) in an Anaerobic Biogas Digester. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* Vol. 16: 225-231.
- Ohadi, M., Shahravan, A., Dehghannoudeh, N., Eslaminejad, T., Banat, I.M. and Dehghannoudeh, G. 2020. Potential Use of Microbial Surfactant in Microemulsion Drug Delivery System: A Systematic Review. *Drug Design Development and Therapy*. Vol.14: 541-550.
- Opurum C., C., Nwaneri, C., Nwanyanwu, C. E., B, and Iac, M. 2017. Biosurfactant Production by *Pseudomonas* Species using Pre-treated Palm Oil Mill Effluent as Fermentation Medium Waste management View project Microbial quality control View project. *Futo Journal Series (FUTOJNLS)*. Vol. 2: 149-160.
- Otzen, D. E. 2017. Biosurfactants and Surfactants Interacting with Membranes and Proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Vol. 1859 (4): 639-649.

- Pavan, M. V., and Andrew, R. B. 2021. *IR Spectroscopy: Chemistry LibreTexts*. Hal. 177-178. Rice University. Texas. Hal: 371-380.
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., and Rodrigues, L. R. 2013. Optimization and Characterization of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Isolates Towards Microbial Enhanced Oil Recovery Applications. *Fuel*. Vol. 111: 259-68.
- Priyani, N., Munir, E., dan Ridha, N. 2011. Optimasi Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan Variasi Sumber Karbon dan Nitrogen Medium. Universitas Sumatera Utara. Medan. Hal-26-27.
- Radzuan, M. N., Banat, I. M., and Winterburn, J. 2017. Production and Characterization of Rhamnolipid Using Palm Oil Agricultural Refinery Waste. *Bioresource Technology*. Vol. 225: 99-105.
- Riyanto, C. L. R., Sumardi, S., Farisi, S., Ekowati, C. N., dan Arifiyanto, A. 2021. Aktivitas Biosurfaktan *Serratia Marcescens* strain MBC1 dalam Mengemulsikan Solar dengan Variasi pH dan Media. *Jurnal Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, Vol. 8 (3): 114-122.
- Rodríguez López, L., Rincón-Fontán, M., Vecino, X., Moldes, A., and Cruz Freire, J. M. 2019. Biodegradability Study of the Biosurfactant Contained in a Crude Extract from Corn Steep Water. *Journal of Surfactants and Detergents*. Vol. 23: 2-12.
- Roy, A. 2017. A Review on the Biosurfactants: Properties, Types and its Applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*. Vol. 8 (1): 2-5.
- Sachdev, D. P., and Cameotra, S. S. 2013. Biosurfactants in Agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 97 (3): 1005-1016.
- Saikia, R., Deka, R., Deka, S., and Sarma, H. 2011. Optimization of Environmental Factors for Improved Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* RS29 on Glycerol. *J. Basic Microbiol*. Vol. 51:1-12.

- Sanches, M. A., Luzeiro, I. G., Alves Cortez, A. C., Simplício De Souza, É., Albuquerque, P. M., Chopra, H. K., and Braga De Souza, J. V. 2021. Production of Biosurfactants by *Ascomycetes*. *International Journal of Microbiology*. Vol. 2021: 2-9.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., and Sarubbo, L. A. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 17 (3): 2-31.
- Sekhon, K. K., Khanna, S., and Cameotra, S. S. 2012. Biosurfactant Production and Potential Correlation with Esterase Activity. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. Vol. 3 (133): 2-10.
- Sena, H. H., Sanches, M. A., Rocha, D. F. S., Segundo, W. O. P. F., de Souza, É. S., and de Souza, J. V. B. 2018. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2018: 1-8.
- Shah, N., Nikam, R., Gaikwad, S., Sapre, V., dan Kaur, J. 2016. Biosurfactant: Types, Detection Methods, Importance and Applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, Vol. 3 (1): 1-6.
- Sharma, P., Sangwan, S., and Kaur, H. 2019. Process Parameters for Biosurfactant Production Using Yeast *Meyerozyma guilliermondii* YK32. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 191 (9): 3-13.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., and Balasubramanian, T. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Vol. 45. (14): 1522-1554.
- Singh, B., Sahu, R., and Sharma, D. 2011. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genet Eng Biotechnol*, Vol. 29: 1-39.
- Sobrinho, H., Luna, J., Rufino, R., Porto, A., and Sarubbo, L. 2013. Assessment of Toxicity of a Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 Cultivated with Industrial Residues in A Bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 16: 2-12.

- Soo, L., Basri, M., Saleh, A. B., and Kamaruddin, K. 2003. Optimization of The Enzyme Catalyzed Synthesis of Amino Acid Based Surfactants from Palm Oil Fractions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 95: 361-368.
- Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., Qiu, G., and Li, F. 2019. A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 Isolated from Cooking Wastewater and its Application for Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Bioresource Technology*. Vol. 281. 421-428.
- Suryatmana, P., Kardena, E., Ratnaningsih, E., dan Wijnuprpto. 2006. Karakteristik Biosurfaktan dari *Azotobacter chroococcum*. *J. Micro Ind.* Vol. 2(1): 30-34.
- Suwansukho, P., Rukachisirikul, V., Kawai, F., and H-Kittikun, A. 2008. Production and Applications of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* Vol. 30. 87-93.
- Tahzibi, A., Kamal, F., and Mazaheri Assadi, M. 2004. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iranian Biomedical Journal*. Vol. 8 (1): 25-31.
- Thavasi, R., Subramanyam, V R M, Jayalakshmi, N. S., Balasubramanian, • T, and Banat, I. M. 2011. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. *Indian Journal of Microbiology*. Vol. 51. 30-36.
- Umar, A., Zafar, A., Wali H., Siddique, M.P., Malik, Z.A., and Ahmed, S. 2021. Surfactin-Like Biosurfactant Production and Optimization by *Bacillus Subtilis* SNW3: Product Characterization and Its Influences on Seed Development and Plant Growth. *Research Square*. Vol. 1: 1-18.
- Vandana, P., and Singh, D. 2018. Review on Biosurfactant Production and its Application. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Vol. 08: 4228-4241.
- Varjani, S. J., and Upasani, V. N. 2017. Critical Review on Biosurfactant Analysis, Purification and Characterization Using Rhamnolipid As A Model Biosurfactant. *Bioresource Technology*. Vol. 232: 389-397.

- Vijayakumar, S., and Saravanan, V. 2015. Biosurfactants: Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*. Vol.10 (5): 181-192.
- Waghmode, S., Swami, S., Sarkar, D., Suryavanshi, M., Roachlani, S., Choudhari, P., and Satpute, S. 2020. Exploring the Pharmacological Potentials of Biosurfactant Derived from *Planococcus maritimus* SAMP MCC 3013. *Current Microbiology*. Vol. 77 (3): 452-459.
- Willumsen, P. A., and Karlson, U. 2008. Screening of Bacteria Isolated From PAH Contaminated Soils for Production of Biosurfactant and Bioemulsifiers. *Journal of Biodegradation*. Vol. 7: 415-423.
- Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V., and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61: 1706-1713.
- 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. Hal: 31-36.
- Zinjarde SS, Pant A. 2002. Emulsifier from a Tropical Marine Yeast *Yarrowia Lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol*. Vol. 42: 67-73.