

**PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI INDIGEN
BSPP 4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG**

(Skripsi)

Oleh

VEZHIA SHEISCATAMYA



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

ABSTRAK

PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI INDIGEN BSPP 4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG

Oleh

VEZHIA SHEISCATAMYA

Biosurfaktan merupakan salah satu senyawa produk metabolit yang dapat disintesis secara ekstraselular oleh mikroba seperti bakteri atau jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan biosurfaktan lipopeptida dari bakteri indigen BSPP 4 asal sedimen perairan pelabuhan panjang dan menentukan identitas dari isolat lokal BSPP 4. Metode yang dilakukan meliputi identifikasi molekular isolat bakteri menggunakan metode 16S rRNA, optimasi produksi biosurfaktan yang meliputi variasi konsentrasi sumber karbon gliserol, sumber nitrogen natrium nitrat, pH, dan kadar salin, serta karakteristik biosurfaktan hasil produksi menggunakan KLT dan FTIR. Hasil analisa 16S rRNA menunjukkan bahwa bakteri indigen BSPP 4 memiliki skor identitas 100% dengan *Bacillus cereus* dan hasil analisa filogenetik menunjukkan bakteri ini termasuk ke dalam kelompok *Bacillus cereus* strain CURB8. Produksi biosurfaktan dilakukan pada kondisi optimum sumber karbon gliserol 3%, sumber nitrogen natrium nitrat 0,6%, pH 7, dan kadar salin 0,3% dengan nilai indeks emulsifikasi 75%, *oil spreading* 3 cm, dan uji *drop collapse* positif. Produksi biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP 4 menghasilkan sebanyak 0,1087 g/L yang berwarna kuning kecoklatan. Analisa KLT menunjukkan adanya bercak noda merah muda yang mengindikasikan adanya biosurfaktan lipopeptida dan diperkuat dari data hasil FTIR dengan munculnya serapan khas lipopeptida pada daerah 3280 cm^{-1} memiliki ikatan N-H yang menunjukkan karakteristik untuk peptida. Berdasarkan hasil analisa keseluruhan, dapat disimpulkan bahwa bakteri indigen BSPP 4 merupakan kelompok *Bacillus cereus* dan dapat menghasilkan biosurfaktan kelompok lipopeptida.

Kata kunci: 16S rRNA, biosurfaktan, sedimen perairan Pelabuhan Panjang, lipopeptida.

ABSTRACT

PRODUCTION OF LIPOPEPTIDE BIOSURFACTANT FROM BACTERIA INDIGENOUS BSPP 4 OF SEDIMENTS IN PANJANG PORT

By

VEZHIA SHEISCATAMYA

Biosurfactant is one of the metabolite product compounds that can be synthesized extracellularly by microbes such as bacteria or fungi. This study aims to obtain biosurfactant lipopeptides from indigenous bacteria BSPP 4 from the sediment waters of Panjang Port and determine the identity of the local isolate BSPP 4. The methods include molecular identification of bacterial isolates using the 16S rRNA method, optimization of biosurfactant production which includes variations in the concentration of glycerol carbon source, sodium nitrate nitrogen source, pH, and saline level, and characteristics of biosurfactants produced using KLT and FTIR. The results of 16S rRNA analysis showed that the indigenous bacteria of BSPP 4 had a 100% identity score with *Bacillus cereus* and the results of phylogenetic analysis showed that these bacteria belonged to the *Bacillus cereus* strain CURB8 group. Biosurfactant production was carried out under optimum conditions of 3% glycerol carbon source, 0.6% sodium nitrate nitrogen source, pH 7, and 0.3% saline level with emulsification index value 75%, oil spreading 3 cm, and positive drop collapse test. Biosurfactant production from bacterial isolate BSPP 4 produced as much as 0.1087 g/L which was brownish yellow in color. The KLT analysis showed the spot of pink stain indicating the lipopeptide biosurfactant and was strengthened by the FTIR data results with the appearance of typical lipopeptide absorption in the 3280 cm⁻¹ region which has N-H bonds that show characteristics for peptides. Based on the results of the whole analysis, it can be concluded that the indigenous bacteria BSPP 4 is a group of *Bacillus cereus* and can produce lipopeptide group biosurfactant.

Keywords: 16S rRNA, biosurfactant, sediment waters of Panjang Port, lipopeptide.

**PRODUKSI BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI INDIGEN
BSP4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN PELABUHAN PANJANG**

Oleh

VEZHIA SHEISCATAMYA

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 : **PRODUKSI BIOSURFAKTAN
LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI INDIGEN
BSPP 4 ASAL SEDIMEN PERAIRAN
PELABUHAN PANJANG**

Nama Mahasiswa : **Vezhia Sheiscatamya**

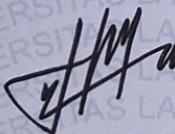
Nomor Pokok Mahasiswa : **1857011009**

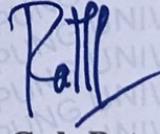
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

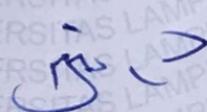


1. **Komisi Pembimbing**


Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP. 197412111998022001


Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.
NIP. 197707132009122002

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila**

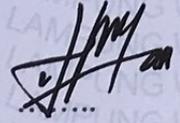

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji:

Ketua

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



Sekretaris

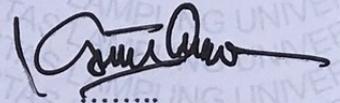
: **Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**



Penguji

Bukan Pembimbing

: **Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 26 Mei 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vezhia Sheiscatamya
Nomor Pokok Mahasiswa : 1857011009
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 26 Mei 2023

Yang Menyatakan



Vezhia Sheiscatamya

NPM1857011009

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Vezhia Sheiscatamya, lahir di Jakarta pada tanggal 11 November 2000. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara yang merupakan putri dari pasangan Bapak Fadril Anri dan Ibu Helmi.

Penulis menempuh pendidikan mulai dari Taman Kanak-kanak (TK) di TK Kuntum Mekar diselesaikan pada tahun 2007, Sekolah Dasar (SD) diselesaikan di SD Negeri Bambu Kuning pada tahun 2012, Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 12 Kota Bogor diselesaikan pada tahun 2015. Penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 8 Kota Bogor dan lulus pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung (Unila) melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri di wilayah Barat Indonesia (SMMPTN-Barat).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi. Organisasi yang diikuti yaitu Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) sebagai Kader Muda (KAMI) pada tahun 2018-2019 dan anggota Biro Kesekretariatan (Kestari) pada tahun 2019-2020. Penulis pernah mengikuti kegiatan sosial yang diadakan oleh Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Unila yaitu Karya Wisata Ilmiah (KWI) pada tahun 2018 di Desa Tanjung Tirto, Kecamatan Way Bungur, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung. Selain aktif di organisasi, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia Jurusan Kimia dan Biologi serta praktikum Pengantar Kimia Analisis Prodi Biologi Terapan pada tahun 2021-2022.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Kelurahan Rajabasa Raya, Kecamatan Rajabasa, Kota Bandar Lampung pada bulan Februari-Maret 2021. Selanjutnya penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) bertempat di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Laboratorium Lingkungan Dinas Lingkungan Hidup Pemerintah Provinsi Lampung dan menyelesaikan PKL pada bulan Oktober 2021. Penulis melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2022 dengan judul “**Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen BSPP 4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang**”.

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”
(Q.S. Al-Insyirah:6)

“Apapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalan menemukanmu”
(Ali bin Abi Thalib)

“Learn from yesterday, live for today, hope for tomorrow”
(Albert Einstein)

“Jalan pelan-pelan bukan berarti terlambat, bukan berarti tidak mampu jalan lebih cepat. Terkadang kita perlu hidup seperti kura-kura sebentar, untuk merasakan banyak hal dengan waktu yang lebih lama, untuk bisa memaksimalkan sebuah moment, karena tidak semua hal bisa terjadi dua kali”
(Rintik Sedu)

“At the end you only have yourself”
(Penulis)

PERSEMBAHAN



Dengan mengucapkan rasa syukur kehadirat Allah SWT juga shalawat yang senantiasa tercurahkan pada Rasulullah Muhammad SAW.

Saya persembahkan karya kecil ini sebagai tanda bakti dan cinta kepada orang tua yang sangat saya sayangi

Papi Fadril Anri dan Mami Helmi

Yang telah telah merawat dan memberikan kasih sayang tak terhingga dan motivasi kepada penulis. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang selalu diberikan kepada penulis.

Kakak ku satu satu nya

Sebagai tanda terima kasih, saya persembahkan karya ini untuk kakak Cilfyzha Vemithasya yang selalu memberikan motivasi dan semangat kepada penulis.

Rasa hormat saya kepada:

Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si.

Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.

Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc.

Serta seluruh dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila

Terima kasih untuk bimbingan, arahan, saran, masukan dan memberikan ilmu yang bermanfaat selama penulis menempuh kehidupan di kampus hingga mencapai gelar sarjana.

Serta

Almamater Tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillah robbil 'alamin. Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Produksi Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri Indigen BSPP 4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang**”. Skripsi ini adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa dalam proses penulisan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna. Namun berkat ridho Allah SWT dan masukan dari berbagai pihak, skripsi ini akhirnya dapat diselesaikan dengan baik. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orangtua penulis, Papi Fadril Anri dan Mami Helmi yang telah merawat yang selalu mendo'akan, mendengarkan keluh kesah, menyemangati, memberikan motivasi serta dukungan kepada penulis.
2. Kakak ku satu satunya, Cilfyzha Vemithasya yang telah memberikan semangat, serta dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku dosen pembimbing I atas segala kebaikan, ilmu, kritik, saran, kesabaran dan bimbingan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini dengan baik.
4. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., selaku dosen pembimbing II atas segala saran, nasihat, kesabaran, motivasi, dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc., selaku dosen pembahas yang telah memberikan arahan dan nasihat kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.

6. Bapak Syaiful Bahri, M.Si., selaku dosen pembimbing akademik, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas bimbingan, nasihat, motivasi, dan kesabaran dalam membimbing penulis selama masa perkuliahan.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku dekan FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas ilmu yang diberikan kepada penulis selama perkuliahan.
10. Seluruh laboran, staff, dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan studi.
11. *Nurhasanah's Research Group* 2018: Aulia Siti Pradina, Salsabila, Nur Mayana Putri, dan Muhammad Aan Saputra, terima kasih atas kerja sama dan dukungannya.
12. Mbak Wiwin Indrianti, S.Si. Terima kasih telah membantu dan memberikan motivasi kepada penulis selama penelitian, sukses selalu mbak Wiwin.
13. Kak Melly Yusnidar, S.Si., kak Ria Mela Rosi, S.Si., kak Qonita Nurul Husna, S.Si., kak Aiga Sheira Rait, S.Si., Kak Annisa Amelz Widiyani, S.Si. dan kak Muhammad Rizky Fadhillah, S.Si. Terima kasih telah membantu, serta memberikan dukungan kepada penulis. Semoga sukses selalu kakak- kakak.
14. Teman- teman Lab Biokimia: Aulia Siti Pradina, Lily Nur Safitri, Dwi Noviani, Eka Candra Wati, Lupia Widya Astuti, Olivia Novianti, Nafisah Nasution, Nur Mayana Putri, Salsabila, Salsabilla Bethari Purworini, Aprilia Fransiska, Firda Tiara Rochman, Muhammad Aan Saputra, Muhammad Raifar Gunawan, Muhammad Ridho Fajriansyah, Risna Milenia, Mbak Hanisa Damayana, dan Mbak Ella Gita Silvana.
15. Teman- teman Lab Organik: Antin Sri Prihatin, Andi Irawan, Hendriko Marisep, Eni Asro, Andika Wahyu Sinaga, Indra Prasetya, Lanang Rachmadi, Reyzka Aulia Wihardini, Mega Muryani, Rista Anggi, Ofriani Fatrika, Ramah Nia Faliha, dan Wulandari Agustin.

16. Teman- teman Lab Anorganik/Fisik: Shafa Ilina Faticha, Grace Febrianti, In Indriani, Afra Nabila Saputri, Atika Nisrina, Alivia Natasya Putri, Ninid Widya Sari Lubis, Tri Apriyani, Zhaafira Allia Zahra, Chetrine Enamia, Ester Hellen Novalina, Nurul Qomariyah, Putri Ayu Anggraini, Dinara Salsabilla, dan Luthfia Pritania.
17. Teman- teman Lab Polimer: Afifa Nabilla Mutiq, Alya Ika Nur Afifah, Aryani Putri Islami, Eka Anggun Surani, Annida Rezani, Alhuda Fidyati Fazira, Nabila Anastasya, Nurkhalisah, Zulfa Nirmala, Sahrul Junaidi, Randi Septianto, dan Chori Rafika.
18. Teman- teman Lab Analitik: Eliza Sundari, Aluni Anzalna Salshabilla, Rizka Nalia Pumita, Alfi Nurul Izzah, Savira Olga Kistianti, Sania Mirelda Sari, Yanesta Oxvyena, Anggi Lefiyani, Fauzia Sabrina, Wulandari, Indah Permatasari Eka Putri, Khoiriyah Dea, Kadek Fani Sugiyanti, Polado Xanana, dan Reyhan Azarian.
19. Tim Helikopter- helikopter: Yanesta Oxvyena, Salsabila, dan Salsabilla Bethari Purworini. Terima kasih selalu memberikan semangat, arahan, serta dukungan kepada penulis, sukses selalu *and see you on top guys!*
20. Tim Laskar Remix: Polado Xanana, Reyhan Azarian, Vincent FerdinandL, Salsabila, Salsabilla Bethari Purworini, dan Yanesta Oxvyena. Terima kasih untuk selalu ada baik suka maupun duka. Semoga kita bisa *nongki* lagi!
21. Tim *Apartment* Kinasih 88: Fauzia Sabrina, Nur Mayana Putri, dan Wulandari. Terima kasih telah membantu penulis baik suka maupun duka selama di kosan. Semoga kalian sukses selalu.
22. Teman- teman Kimia 2018 terutama kelas C terima kasih telah kebersamai sejak maba. Semoga kalian sukses selalu.
23. Astin Vidyasani, Arifah Rara, Yori Pratiwi, Virginia Nuh Reza, Neng Wiwit, Ayu Ranja Saputri, Rizky Hadiwijaya, Kania Nur Aisah, Sabrina Ocha Felinda, Alfonsa Maurena Widhia dan Munifah. Terima kasih telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis selama penelitian di lab.

24. Kakak- kakak angkatan 2015, 2016, dan 2017 serta adik- adik angkatan 2019 dan 2020. Terima kasih atas dukungan dan bantuannya.
25. Semua pihak yang banyak membantu, memberikan dukungan, doa, serta motivasi yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi ini. Semoga ketulusan bapak, ibu, dan rekan- rekan semua mendapat balasan pahala baik dari Allah SWT. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis serta pembaca.

Bandar Lampung, Mei 2023

Vezhia Sheiscatamya

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR.....	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Biosurfaktan	5
2.2. Mikroba Penghasil Biosurfaktan.....	6
2.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan	7
2.3.1. Substrat Pertumbuhan	8
2.3.2. Kondisi Lingkungan.....	10
2.3.3. Umur Kultur.....	11
2.4. Metode Pengujian	11
2.4.1. Uji Emulsifikasi	11
2.4.2. Uji <i>Oil Spreading</i>	12
2.4.3. Uji <i>Drop Collapse</i>	12
2.5. Kurva Pertumbuhan	13
2.5.1. Fase Lag.....	13
2.5.2. Fase Eksponensial	13
2.5.3. Fase Stationer	14
2.5.4. Fase Kematian	14
2.6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	14
2.7. <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR).....	15

III. METODE PENELITIAN	19
3.1. Waktu dan Tempat	19
3.2. Alat- alat yang digunakan	19
3.3. Bahan-bahan yang digunakan	20
3.4. Metode Penelitian	20
3.4.1. Sterilisasi Alat	20
3.4.2. Pembuatan Media.....	20
3.4.3. Peremajaan Isolat	21
3.4.4. Karakteristik Molekular 16S rRNA Isolat BSPP 4.....	21
3.4.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan	22
3.4.6. Produksi dan Ekstraksi Biosurfaktan	23
3.4.7. Uji Biosurfaktan.....	24
3.4.8. Analisa Biosurfaktan.....	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1. Bakteri Lokal Isolat BSPP 4	28
4.2. Karakteristik Molekular Bakteri Isolat BSPP 4	29
4.3. Kondisi Optimum Produksi Biosurfaktan.....	30
4.3.1. Variasi Konsentrasi Sumber Karbon	31
4.3.2. Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen	32
4.3.3. Variasi pH	33
4.3.4. Variasi Konsentrasi Salinitas	34
4.4. Biosurfaktan dari Isolat BSPP 4	35
4.5. Analisa KLT Biosurfaktan dari Bakteri Isolat BSPP 4.....	38
4.6. Analisa FTIR Biosurfaktan dari Bakteri Isolat BSPP 4.....	39
V. SIMPULAN DAN SARAN	42
5.1. Simpulan	42
5.2. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jenis biosurfaktan dan mikroba yang dihasilkan (Desai <i>and</i> Desai, 1993).....	6
2. Hasil Uji Biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP 4	36
3. Data FTIR Biosurfaktan Lipopeptida.....	41
4. Optimasi Variasi Konsentrasi Sumber Karbon (Gliserol)	52
5. Optimasi Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen (NaNO ₃)	52
6. Optimasi Variasi pH.....	52
7. Optimasi Variasi Konsentrasi Salinitas.....	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform: metanol: air (65:25:4) dibawah UV 254 nm (a) 366 nm (b) dan penampak bercak ninhidrin (c) pada supernatan <i>Bacillus cereus</i> (Setiani dkk., 2019).....	15
2. Spektrum FTIR biosurfaktan jenis lipopeptida dari bakteri <i>Nesterenkonia</i> sp. (Kiran <i>et al.</i> , 2017).....	16
3. Spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat BSPP 4 (Indrianti, 2022).	17
4. Spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP E1 (Yusnidar, 2021).	18
5. Bagan Alir Penelitian	27
6. Isolat BSPP 4	29
7. Pohon Filogenetik dari Bakteri Isolat BSPP 4	30
8. Variasi Konsentrasi Sumber Karbon.....	31
9. Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen	32
10. Variasi pH	33
11. Variasi Konsentrasi Salinitas	34

12. (A) Sinar UV 254 nm (B) Pereaksi Ninhidrin	37
13. Biosurfaktan setelah proses <i>freeze drying</i>	38
14. Hasil analisa KLT dari ekstrak biosurfaktan bakteri isolat BSPP 4 (A) Sinar UV 254 (B) Pereaksi Ninhidrin	39
15. Hasil spektrum FTIR Biosurfaktan (A) Kiran <i>et al</i> (2017) (B) Biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP 4	40
16. Data NCBI Isolat BSPP 4	51
17. Hasil uji emulsifikasi, <i>oil spreading</i> , dan <i>drop collapse</i> pada sumber karbon optimum (Gliserol) 3%	53
18. Hasil uji emulsifikasi, <i>oil spreading</i> , dan <i>drop collapse</i> pada sumber nitrogen optimum (NaNO ₃) 0,6%.....	53
19. Hasil uji emulsifikasi, <i>oil spreading</i> , dan <i>drop collapse</i> pada pH optimum...	54
20. Hasil uji emulsifikasi, <i>oil spreading</i> , dan <i>drop collapse</i> pada salinitas optimum.	54
21. Hasil produksi dan ekstraksi biosurfaktan dari bakteri isolat BSPP 4.....	54

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Surfaktan adalah molekul amfipatik yang terdiri dari molekul hidrofobik dan hidrofilik yang terletak di antara permukaan dua fase cair yang berbeda polaritas dan ikatan hidrogen, misalnya antara permukaan antara minyak dan air. Bagian hidrofilik dikenal sebagai bagian kepala dan hidrofobik dikenal sebagai bagian ekor. Surfaktan dapat mengikat molekul hidrokarbon yang tidak larut dalam air dan menurunkan tegangan permukaan serta membentuk mikroemulsi sehingga hidrokarbon dapat larut dalam air dan sebaliknya. Surfaktan dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari untuk keperluan di bidang pertanian, industri, medis, kosmetik dan farmasi. Namun penggunaan surfaktan dapat menimbulkan masalah dikarenakan sifat surfaktan yang beracun, tidak mudah terurai, dan dapat mengganggu proses degradasi mikroorganisme lainnya (Riffiani, 2010).

Pada saat ini, dengan kemajuan teknologi terdapat proses alternatif yang ramah lingkungan untuk menggantikan surfaktan dengan melibatkan mikroorganisme dalam prosesnya yaitu biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan salah satu senyawa produk metabolit yang memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik, yang dapat disintesis secara ekstraselular oleh mikroba dan sumber lain seperti jamur dan kapang, sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan (Elazzazy *et al.*, 2015).

Beberapa mikroba dapat menghasilkan surfaktan pada saat tumbuh pada berbagai substrat yang berbeda, mulai dari karbohidrat sampai hidrokarbon. Perubahan substrat seringkali mengubah juga struktur kimia dari produk sehingga akan mengubah sifat surfaktan yang dihasilkan. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap produksi biosurfaktan seperti jenis substrat pertumbuhan, jenis bakteri,

sumber nutrisi, dan faktor lingkungan seperti pH dan salinitas (Ciccyliona dan Nawfa, 2012).

Bakteri penghasil biosurfaktan dapat diperoleh dengan mengisolasi bakteri dari sampel tertentu misalnya pada perairan atau tanah yang tercemar. Beberapa peneliti telah melakukan isolasi dan identifikasi bakteri penghasil biosurfaktan. Ainul dkk (2021) telah mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri penghasil biosurfaktan yang berasal dari limbah cair perbengkelan yang tercemar minyak. Hasil penelitian yang dilaporkan adanya tujuh jenis bakteri yang menghasilkan biosurfaktan. Tujuh bakteri tersebut diidentifikasi secara morfologi dan uji biokimia didapatkan genus dari masing-masing isolat bakteri yaitu *Providencia* 38,8%, *Proteus* 50%, *Acynotobakter* 48,8%, *Bacillus* 52,1%, *Aeromonas* 47,6%, *Proteus* 54,7% dan *Serratia* 48,8%. Hasil uji emulsifikasi berkisar antara 48-54%. Uji emulsifikasi menandakan bahwa bakteri tersebut mampu menghasilkan biosurfaktan. Menurut Purnomohadi (2010) bakteri yang mampu menghasilkan indeks emulsifikasi berkisar 30% sampai 80% dapat dikatakan berpotensi menghasilkan biosurfaktan.

Produksi biosurfaktan dari mikroba tergantung dari jenis mikroorganisme dan kondisi pertumbuhan seperti sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan temperatur. Untuk mengetahui kemampuan tumbuh bakteri yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan dapat dilakukan dengan memvariasikan sumber karbon dan sumber nitrogen yang berbeda. Beberapa penelitian yang telah dilakukan melaporkan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* mampu menghasilkan biosurfaktan dengan menggunakan sumber karbon yang berasal dari glukosa (Priyani dkk, 2011). Penelitian lainnya yang dilakukan Wahyuningrum dkk (2019) menunjukkan produksi biosurfaktan dari *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18 meningkat secara signifikan dengan menggunakan sumber nitrogen yang berasal dari urea. Penelitian oleh Silva *et al.*(2010) melakukan berbagai variasi konsentrasi sumber karbon pada gliserol yakni 2, 3, 5, dan 7% dan variasi sumber nitrogen menggunakan NaNO_3 , ammonium sulfat, pepton, ragi sirup jagung dengan variasi konsentrasi (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 dan 0,6%) menunjukkan produksi

biosurfaktan yang optimal pada 3% gliserol dan 0,6% NaNO₃. Beberapa peneliti juga melaporkan biosurfaktan jenis lipopeptida dari beberapa bakteri diantaranya yaitu bakteri *Serratia marcescens* (Riyanto dkk, 2017), bakteri *Bacillus subtilis* ANR 88 yang berasal dari limbah rumah makan (Rane *et al.*, 2017), dan bakteri *Bacillus cereus* yang dilakukan oleh Setiani (2019). Selain itu juga, terdapat beberapa mikroba isolat lokal yang diduga dapat menghasilkan biosurfaktan jenis lipopeptida seperti bakteri *Bacillus cereus* asal air laut Panjang dan *Bacillus cereus* asal air laut pelabuhan Panjang (Citra, 2021; Yusnidar dkk, 2021), serta bakteri dari asal sedimen perairan Pelabuhan Panjang yang diduga mampu menghasilkan biosurfaktan lipopeptida pada kondisi menggunakan gliserol 2%, NaNO₃ 0,3%, konsentrasi inokulum 7,5% dan waktu pertumbuhan 96 jam.

Studi awal terhadap biosurfaktan dari bakteri indigen isolat BSPP 4 asal sedimen perairan Pelabuhan Panjang telah diperoleh bakteri tersebut mampu memproduksi biosurfaktan dengan menggunakan sumber karbon gliserol 2%, sumber nitrogen (NaNO₃) 0,3% dengan nilai indeks emulsi masing-masing sebesar 87% dan 66%. Penelitian tersebut telah melaporkan hasil analisis dengan FTIR bahwa biosurfaktan dari isolat BSPP 4 diduga sebagai jenis biosurfaktan *lipopeptida*. Namun pada penelitian ini belum dilakukan variasi konsentrasi pada sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan salinitas. Selain itu, bakteri isolat BSPP 4 juga belum dikarakterisasi lebih lanjut terkait karakteristik molekular.

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini dilakukan karakterisasi molekular 16S rRNA dari bakteri isolat BSPP 4, produksi biosurfaktan dari isolat BSPP 4 dengan memvariasikan konsentrasi sumber karbon, nitrogen, pH dan salinitas. Biosurfaktan yang dihasilkan dianalisa menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR).

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian yang akan dilakukan adalah:

1. Memperoleh karakteristik molekular dari bakteri isolat lokal BSPP 4 asal sedimen perairan Pelabuhan Panjang.
2. Mendapatkan kondisi optimum produksi biosurfaktan dari bakteri indigen BSPP 4 dengan memvariasikan konsentrasi sumber karbon, sumber nitrogen, pH dan salinitas.
3. Mendapatkan karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri isolat lokal BSPP 4 melalui analisa menggunakan KLT dan FTIR.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai kemampuan isolat lokal BSPP 4 dari sedimen perairan pelabuhan Panjang dalam memproduksi biosurfaktan lipopeptida. Biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan dapat diuji lebih lanjut terkait bioaktivitasnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosurfaktan

Biosurfaktan adalah kelas surfaktan yang dihasilkan dari organisme hidup dan dapat ditemukan dalam sel mikroba yang tersusun oleh gugus hidrofobik dan hidrofilik. Menurut Kosaric (1992) penggunaan surfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki keuntungan diantaranya tingkat toksisitas yang rendah, mudah terurai oleh mikroorganisme, dan dapat diproduksi dari bahan baku yang murah dan mudah didapatkan.

Biosurfaktan mempunyai sifat yang mirip seperti surfaktan sintetik, akan tetapi biosurfaktan lebih rendah tingkat toksisitasnya, mudah terurai secara biologi, lebih efektif pada suhu, pH dan kadar garam yang berlebihan, dan lebih mudah disintesis. Di samping itu, sifat aktif permukaan yang dimilikinya berbeda dengan surfaktan yang disintesis secara kimia. Biosurfaktan sebagian besar diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, ragi (khamir) dan kapang. Beberapa mikroba dapat menghasilkan surfaktan pada saat tumbuh pada berbagai substrat yang berbeda (Ciccyliona dan Nawfa, 2012).

Menurut (Horowitz *et al.*, 1975) biosurfaktan dikelompokkan berdasarkan berat molekulnya yang dibagi menjadi 2 kelompok yaitu:

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

hidrofilik dan hidrofobik serta lebih efektif pada stabilitas minyak dalam emulsi air.

2.2. Mikroba Penghasil Biosurfaktan

Klasifikasi biosurfaktan dapat dilihat dari komposisi kimia dan jenis mikroba yang menghasilkannya (Desai *and* Desai, 1993). Menurut Kosaric (1992) jenis biosurfaktan yang dihasilkan setiap mikroba berbeda-beda. Biosurfaktan dapat dikelompokkan berdasarkan jenis- jenis mikroorganisme penghasilnya. Berikut jenis- jenis mikroba lain penghasil biosurfaktan dan jenis biosurfaktan yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Jenis biosurfaktan dan mikroba yang dihasilkan (Desai *and* Desai, 1993)

Jenis Biosurfaktan	Jenis Mikroba
Glikolipida	
Trehalosa mylokot	<i>Arthrobacter paraffineus</i> ; <i>Mycobacterium phlei</i> ; <i>Rhodococcus crythropolis</i>
Trehalosa Ester	<i>Mycobacterium fortitum</i> ; <i>Micromonospora sp.</i> ; <i>Mycobacterium smegmatis</i> ; <i>Mycobacterium paraffinicum</i>
Mono, -di, dan Trisakarida mykolat	<i>Arthrobacter sp.</i> ; <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ; <i>Mycobacterium smegmatis</i> ; <i>Pseudomonas sp.</i>
Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Candida sp</i>
Soforolipida	<i>Torulopsis petrophilum</i> ; <i>Torulopsis apicola</i> ; <i>Torulopsis bombicola</i>
Fosfolipida dan Asam Lemak	<i>Candida sp.</i> ; <i>Corynebacterium sp.</i> ; <i>Micrococcus sp.</i>

Fosfolipida	<i>Acinetobacter sp.</i> ; <i>Aspergillus sp.</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Lipopeptida dan Lipoprotein	
Gramisiden	
Polimixin	<i>Bacillus brevis</i>
Ornithin-lipida	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ceripilin	<i>Pseudomonas rubescens</i>
Lisin – lipida	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ; <i>Streptomyces sioyaensis</i>
Surfaktin-subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Peptida lipida	<i>Bacillus licheniformis</i>
Viskosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Surfaktan Polimer	
Lipo hetero polisakarida	<i>Calcoacticus RAG-1</i>
Hetero Polisakarida	<i>Calcoacticus A2</i>
Polisakarida Protein	<i>Calcoacticus strain</i> <i>Candida lipolytica</i>
Manno-protein	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Karbohidrat protein	<i>Candida petrophilum</i> <i>Endomycopsis lipolytica</i>
Manno-komplek lipida	<i>Candida tropicalis</i>
Mannosa/erythrose – lipida	<i>Shizonella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i>
Kompleks karbohidrat protein lipida	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

2.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan

Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba akan berbeda tergantung pada jenis mikroba dan nutrisi yang dikonsumsinya. Demikian pula untuk jenis mikroba yang sama, jumlah surfaktan yang dihasilkan berbeda berdasarkan nutrisi yang dikonsumsinya (Duvjak *et al.*, 1983). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi

produksi biosurfaktan diantaranya substrat pertumbuhan, umur kultur, dan kondisi lingkungan seperti temperatur, pH, agitasi, ketersediaan oksigen, dan salinitas (Sahara *et al.*, 2011). Berikut ini beberapa faktor yang mempengaruhi produksi biosurfaktan:

2.3.1. Substrat Pertumbuhan

2.3.1.1. Sumber Karbon

Untuk menentukan hasil dan struktur dari biosurfaktan perlu dilakukan pemilihan sumber karbon yang baik. Pemilihan substrat sebagai sumber karbon harus diperhatikan karena sumber karbon yang digunakan akan berpengaruh pada komposisi biosurfaktan yang dihasilkan dan jalur reproduksinya (Banat *et al.*, 2000). Sumber karbon berperan penting untuk meningkatkan energi biosintesis. (Naiola dan Widhyastuti, 2000). Kemampuan bakteri menggunakan karbon dapat menentukan kualitas dan kuantitas dari biosurfaktan yang dihasilkan sehingga menyebabkan aktivitas emulsifikasi yang berlainan serta perbedaan kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan kultur.

Sumber karbon yang diketahui dapat digunakan untuk memproduksi biosurfaktan adalah karbohidrat, hidrokarbon, dan minyak nabati. Perbedaan sumber karbon dan panjang rantai substrat hidrokarbon sering berakibat signifikan terhadap konsentrasi akhir fermentasi biosurfaktan (Georgiou *et al.*, 1992) sebagai contoh, *Arthrobacter* hanya memproduksi 75% biosurfaktan ekstraseluler ketika ditumbuhkan pada asetat dan etanol namun dapat mencapai 100% biosurfaktan ekstraseluler ketika ditambahkan pada substrat hidrokarbon (Mulligan *et al.*, 2001). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sumber karbon yang berbeda dengan konsentrasi yang berbeda akan menghasilkan jumlah biosurfaktan yang berbeda pula.

Beberapa penelitian mengenai sumber karbon yang dilaporkan oleh Fatimah (2007) yaitu bakteri *Pseudomonas sp.* dapat menghasilkan biosurfaktan dengan menggunakan sumber karbon glukosa, heksadekana, dan pelumas. Berdasarkan hasil uji tegangan permukaan menunjukkan penurunan tegangan permukaan pada substrat glukosa dan heksadekana sementara substrat pelumas tidak. Hal ini

dinyatakan bahwa saat *Pseudomonas sp.* ditumbuhkan pada substrat glukosa dan heksadekana menghasilkan biosurfaktan yang aktif pada permukaan.

Wahyuningrum dkk (2019) juga melaporkan sumber karbon yang terdiri dari minyak zaitun, minyak jagung, minyak kelapa sawit, minyak kacang kedelai dan minyak bunga matahari dengan konsentrasi masing-masing 2%. Biosurfaktan yang dihasilkan meningkat pada saat menggunakan minyak zaitun dengan nilai indeks emulsi sebesar 76%. Rosi (2022) melakukan penelitian terhadap isolat PKT D4 dengan menggunakan sumber karbon minyak zaitun 10% dan mendapatkan nilai indeks emulsi sebesar 79,31%. Penelitian lainnya yang dilakukan Yusnidar (2022) terhadap isolat ALP E1 menghasilkan nilai indeks emulsi sebesar 78,5% dengan menggunakan sumber karbon yaitu minyak zaitun 10%.

2.3.1.2. Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen merupakan salah satu komponen yang dapat divariasikan untuk mendapatkan produksi biosurfaktan yang optimal. Sumber nitrogen berperan untuk mengontrol pH dalam medium. Peningkatan produktivitas melalui proses optimasi medium produksi, dapat mengurangi biaya produksi. Beberapa sumber nitrogen organik seperti asam aspartat, asam glutamat, asparagin, dan glisin dapat meningkatkan produksi biosurfaktan pada *Arthrobacter paraffineus*. Nitrat mampu meningkatkan produksi biosurfaktan pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Rhodococcus sp* (Desai and Banat, 1997).

Beberapa penelitian tentang sumber nitrogen yang dilaporkan antara lain oleh Budiarti (2000) bahwa penambahan ekstrak ragi sebagai sumber nitrogen yang lebih baik daripada urea, ditandai dengan banyaknya jumlah biosurfaktan yang dihasilkan. Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,1; 0,3 dan 0,5 g/150 mL medium. Pada penambahan urea diperoleh hasil terbaik pada konsentrasi 0,3 g/150 mL yang memproduksi biosurfaktan sebanyak 3,15 g/L. Pada penambahan ekstrak ragi diperoleh hasil terbaik dengan konsentrasi 0,06 g/150 mL medium yang memproduksi biosurfaktan sebanyak 3,56 g/L.

Laju pertumbuhan spesifik tertinggi terjadi pada konsentrasi ekstrak ragi sebesar 0,1 g/150 mL dan terus menurun pada konsentrasi 0,3 dan 0,5 g/150 mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak ragi yang lebih dari 0,3 g/150 mL sudah tidak dapat mendukung pertumbuhan bakteri. Penelitian yang dilakukan Sandri (2009) melaporkan bahwa pertumbuhan *Lysinibacillus sphaerichus* ketika ditumbuhkan dalam medium ammonium nitrat memberikan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan urea sebagai sumber nitrogen. Peneliti lainnya menggunakan lima macam sumber nitrogen antara lain urea, NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dan KNO_3 yang memberikan hasil terbaik pada media adalah urea sebagai sumber nitrogen. Hal tersebut ditunjukkan pada penggunaan urea menghasilkan biosurfaktan sebanyak 1,012 g/L (Alvionita dan Hertadi, 2021).

Yusnidar dkk (2021) telah melakukan penelitian terhadap isolat ALP E1 dengan menggunakan tiga sumber nitrogen yaitu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , dan urea. Hasil terbaik didapatkan pada sumber nitrogen NH_4Cl 0,26% dengan nilai indeks emulsi sebesar 79,31%. Produksi biosurfaktan yang dihasilkan sebanyak 0,211 g/3L.

2.3.2. Kondisi Lingkungan

Kondisi lingkungan dapat mempengaruhi pertumbuhan dan hasil produksi biosurfaktan. Faktor-faktor yang berpengaruh pada produksi biosurfaktan antara lain temperatur, pH, salinitas, agitasi, dan ketersediaan oksigen (Akbar, 2004). Kenaikkan atau penurunan temperatur besar kemungkinan dalam mengubah metabolisme mikroba. Hasbi dan Tabrani (2006) melakukan produksi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus macerans* dengan variasi temperatur 30 °C; 33,5 °C; dan 37 °C. Produksi biosurfaktan oleh *Bacillus macerans* diperoleh temperatur optimum pada 30 °C untuk memproduksi biosurfaktan sebesar 0,0815 mg/L.

Menurut Ciccyliana dan Nawfa (2012) pada penelitiannya menggunakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam menentukan kondisi optimum pH menggunakan variasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8. Hasil yang baik untuk memproduksi biosurfaktan dihasilkan pada pH 8 yang mendapatkan 0,033 g/L biosurfaktan. Produksi biosurfaktan meningkat jika agitasi dan aerasi ditingkatkan (Desai *and* Banat, 1997).

Pembentukan biosurfaktan oleh sel juga dipengaruhi oleh salinitas serta kadar oksigen. Salinitas dapat berfungsi membantu keseimbangan konsentrasi mineral dalam sel. Pengaruh salinitas terhadap produksi biosurfaktan tergantung pada efek aktivitas seluler. Apabila salinitas terganggu, maka akan mempengaruhi pertumbuhan sel dalam produksi biosurfaktan (Bhuvanawari *et al.*, 2016).

2.3.3. Umur Kultur

Salah satu faktor penting dalam memproduksi biosurfaktan adalah umur kultur. Semakin tua umur kultur maka semakin banyak nutrisi yang akan digunakan oleh mikroorganisme, sehingga nutrisi dalam media kultur semakin terbatas. Hal itu dapat menyebabkan perubahan pada sistem metabolisme sel dan produksi biosurfaktan. Produksi biosurfaktan secara signifikan meningkat pada saat memasuki fase stasioner sampai fase kematian bakteri (Mulligan *et al.*, 2001). Menurut Astuti dan Aditiawati (2001) bertambahnya umur kultur dapat berhubungan pula dengan pembentukan permukaan sel mikroba yang hidrofobik untuk digunakan dalam emulsi minyak dan air.

2.4. Metode Pengujian

2.4.1. Uji Emulsifikasi

Menurut Ward *et al.*, (2004) yang menyatakan bahwa uji emulsifikasi digunakan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan mengemulsikan zat cair yang berbeda kepolarannya. Indeks emulsifikasi berhubungan dengan konsentrasi surfaktan,

karena semakin kecil konsentrasi biosurfaktan, kemampuan senyawa tersebut untuk mengemulsifikasi minyak juga semakin berkurang. Emulsi adalah disperse suatu larutan dalam larutan lain dimana molekul-molekul kedua campuran tersebut tidak saling bercampur atau bercampur sebagian. Ada tiga bagian utama dari suatu emulsi yaitu fase terdispersi yang terdiri dari butiran minyak, fase pendispersi yaitu air, dan bagian terakhir adalah zat pengemulsi yang menjaga agar butir minyak tetap terdispersi di dalam air (Suryani dkk., 2000). Kumar *et al.*, (2008) menyatakan bahwa indeks emulsifikasi adalah aktivitas emulsi pada hidrokarbon uji dan ditetapkan sebagai persentase tinggi lapisan emulsi (cm) dibagi total tinggi dari cairan kolom.

2.4.2. Uji *Oil Spreading*

Uji *oil spreading* berguna untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dari bakteri yang diuji dengan mengamati kemampuan bakteri dalam menghilangkan lapisan minyak pada permukaan air. Bakteri penghasil biosurfaktan dapat menggantikan minyak dan menyebar di dalam air. Diameter dari zona bening di permukaan diukur dan dibandingkan dengan kontrol yang menggunakan media tanpa diinokulasi supernatan bakteri (Arora *et al.*, 2015)

2.4.3. Uji *Drop Collapse*

Uji *drop collapse* dilakukan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan. Prinsip dari uji ini yaitu tetesan oli yang sebelumnya berbentuk cembung menjadi mendatar ketika ditetesi oleh biosurfaktan. Uji ini dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes supernatan yang berasal dari kultur bakteri diatas media minyak pada wadah datar atau biasa digunakan cawan petri. Tetesan supernatan di atas minyak akan berbentuk datar jika mengandung biosurfaktan. Uji positif ditandai dengan adanya sampel yang menghasilkan tetesan berbentuk datar, sedangkan uji negatif ditandai dengan tetesan yang berbentuk bulat (Wibisana, 2018).

2.5. Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan diperlukan untuk mengetahui fase pertumbuhan biakan. Fase pertumbuhan dimulai dari fase lag (fase adaptasi), fase eksponensial (fase log), fase stasioner dan fase kematian.

2.5.1. Fase Lag

Fase lag atau fase adaptasi merupakan kemampuan bakteri menyesuaikan diri dengan konsisi lingkungan baru. Kemampuan adaptasi bakteri pada fase lag sangat beragam, hal ini dipengaruhi oleh komposisi media, jumlah sel pada inokulum awal, kondisi pH, suhu dan sifat fisiologis mikroba pada media sebelumnya. Fase lag juga disebut dengan fase awal ataupun fase penyesuaian aktivitas mikroba pada lingkungan baru. Fase lag biasanya berlangsung mulai dari beberapa menit hingga beberapa jam (Rolfe *et al.*, 2012).

2.5.2. Fase Eksponensial

Fase eksponensial merupakan fase pertumbuhan yang kedua. Fase ini dibuktikan dengan terjadinya periode pertumbuhan yang sangat cepat. Pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial dipengaruhi oleh kondisi lingkungan termasuk suhu, pH, kelembaban udara, *nutrient* dalam media dan sifat genetik mikroba. Fase eksponensial merupakan fase yang diperlukan mikroba untuk pembelahan sel atau penggandaan yang disebut dengan waktu generasi. Pada fase ini mikroba membutuhkan energi lebih banyak dari pada fase lainnya, dan kultur sangat sensitif terhadap keadaan lingkungan. Pada akhir fase log, kecepatan pertumbuhan populasi menurun dikarenakan :

1. Nutrien di dalam medium sudah berkurang.
2. Adanya hasil metabolisme yang mungkin beracun atau dapat menghambat pertumbuhan mikroba.

2.5.3. Fase Stationer

Fase stasioner merupakan fase ketika laju pertumbuhan sama dengan laju kematian mikroba, sehingga hasilnya jumlah mikroba tersebut secara keseluruhan akan tetap. Bakteri yang tumbuh akan mencapai titik ketika laju pertumbuhan menurun, ini menunjukkan awal fase stasioner. Pada fase ini jumlah populasi sel tetap karena jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Ukuran sel pada fase ini menjadi lebih kecil karena sel tetap membelah meskipun zat-zat nutrisi sudah habis. Akibat kekurangan zat nutrisi, sel kemungkinan mempunyai komposisi yang berbeda dengan sel yang tumbuh pada fase logaritmik. Pada fase ini sel-sel lebih tahan terhadap keadaan ekstrim seperti panas, dingin, radiasi, dan bahan-bahan kimia.

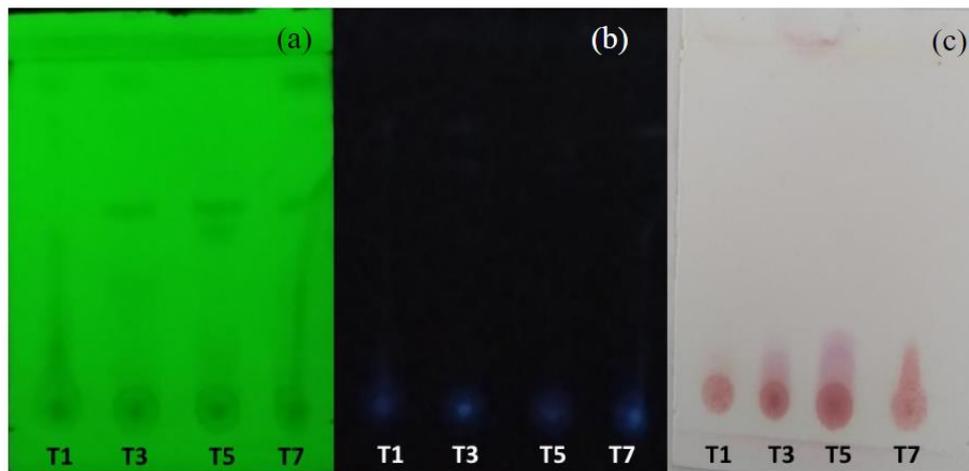
2.5.4. Fase Kematian

Fase kematian adalah fase yang dapat dilihat dengan adanya peningkatan jumlah laju kematian yang melebihi jumlah laju pertumbuhan. Pada fase ini sebagian populasi mikroba mulai mengalami kematian karena beberapa sebab yaitu *nutrient* didalam medium telah habis dan energi cadangan di dalam sel habis (Risna dkk., 2022).

2.6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis adalah salah satu metode pemisahan kromatografi yang fleksibel dan banyak digunakan. Metode analisis kromatografi lapis tipis (KLT) telah menjadi bagian dari teknik analisis rutin pada laboratorium analisis dan pengembangan produk karena memiliki beberapa keuntungan. Keuntungan utama metode analisis kromatografi lapis tipis adalah analisis beberapa sampel dapat dilakukan secara simultan dengan menggunakan fase gerak dalam jumlah kecil sehingga lebih hemat waktu dan biaya analisis serta lebih ramah lingkungan (Hilmi dkk., 2013).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Setiani, dkk (2019) melaporkan bahwa kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan uji kualitatif untuk mengetahui sifat kimia biosurfaktan berdasarkan tingkat kepolaran. Pada penelitian tersebut pelarut yang digunakan yaitu kloroform, metanol, dan air dengan perbandingan 65:25:4 (v:v:v), serta pengamatan di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm, 366 nm, dan penambahan ninhidrin, menunjukkan adanya bercak seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT menggunakan fase gerak kloroform: metanol: air (65:25:4) dibawah UV 254 nm (a) 366 nm (b) dan penampak bercak ninhidrin (c) pada supernatan *Bacillus cereus* (Setiani dkk., 2019)

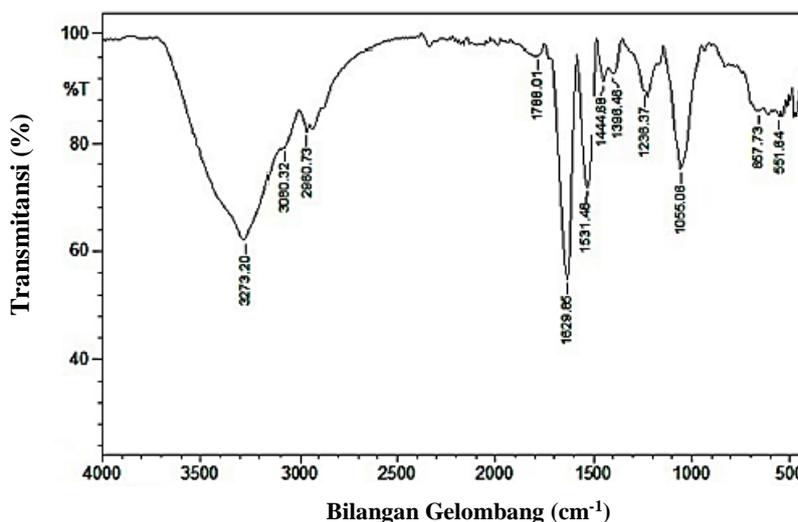
Berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis pada Gambar 1, biosurfaktan menunjukkan adanya bercak di atas permukaan silika gel dibawah sinar UV 366 nm. Senyawa biosurfaktan positif mengandung asam amino bebas ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah setelah penyemprotan ninhidrin dan pemanasan dengan oven pada suhu 100 °C. Hal ini menunjukkan adanya senyawa biosurfaktan yang termasuk golongan lipopeptida (Setiani dkk., 2019)

2.7. *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

FTIR merupakan teknik analisis yang berfungsi untuk melihat gugus-gugus dalam sebuah molekul ataupun senyawa melalui vibrasi yang ditimbulkan oleh atom tersebut. (Hashim *et al.*, 2010). FTIR mampu membedakan spektrum dari dua

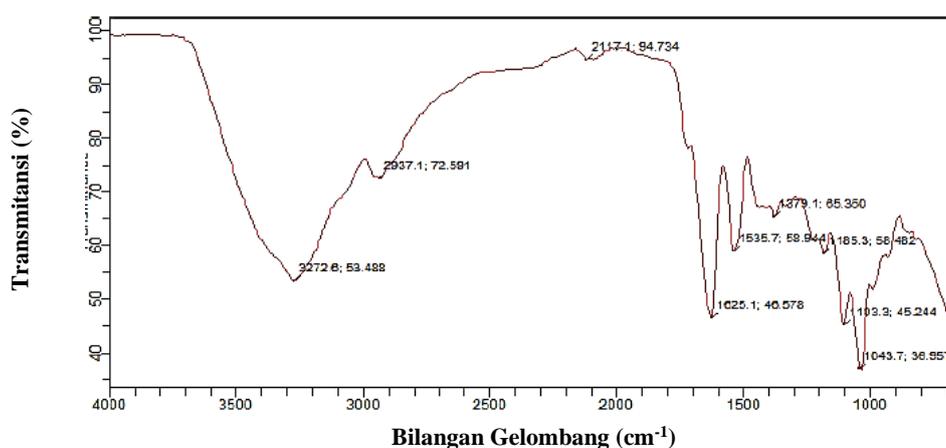
sampel yang berbeda berdasarkan karakteristik struktur intramolekulernya dimana kemampuan menyerap cahaya dari suatu senyawa akan berbeda bergantung pada sifat fisikokimia, ikatan antar atom dalam senyawa dan karakteristik gugus fungsinya. FTIR digunakan untuk mengidentifikasi karakteristik gugus fungsi. Prinsip kerja dari FTIR adalah mengenali gugus fungsi suatu senyawa dari absorbansi inframerah yang dilakukan terhadap senyawa tersebut. Pola absorbansi yang diserap oleh tiap-tiap senyawa berbeda-beda, sehingga masing-masing senyawa dapat dibedakan dan dikuantifikasikan (Sankari *et al.*, 2010).

Beberapa penelitian yang telah dilaporkan tentang biosurfaktan lipopeptida diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Kiran *et al.* (2017) tentang karakterisasi biosurfaktan dari bakteri *Nesterenkonia* sp. dengan FTIR. Karakterisasi dengan FTIR didapatkan puncak pada 3273 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan -NH . Pada serapan daerah 1692 menunjukkan adanya ikatan -CO-N . Pada daerah puncak 1531 cm^{-1} menunjukkan adanya pembentukan ikatan N-H . Peregangan gugus fungsi C-O berada pada daerah 1055 cm^{-1} . Berdasarkan spektrum FTIR biosurfaktan yang diproduksi dari bakteri *Nesterenkonia* sp. termasuk ke dalam jenis lipopeptida yang dapat dilihat pada Gambar 2.



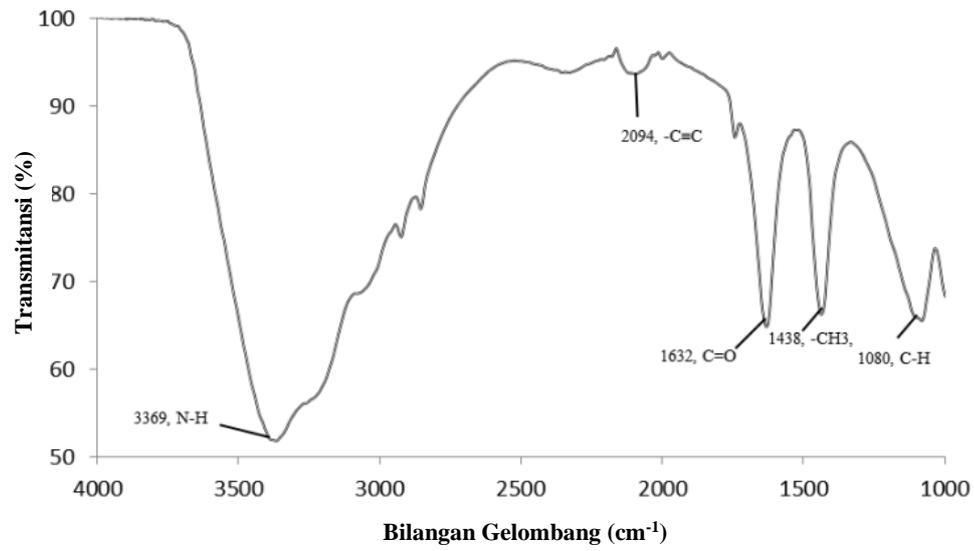
Gambar 2. Spektrum FTIR biosurfaktan jenis lipopeptida dari bakteri *Nesterenkonia* sp. (Kiran *et al.*, 2017)

Indrianti (2022) melaporkan adanya biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri isolat lokal BSPP 4 dan diduga termasuk ke dalam jenis biosurfaktan lipopeptida. Karakterisasi dengan FTIR diperoleh puncak pada 3272 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan N–H. Pada serapan daerah 1625 cm^{-1} menunjukkan terdapat vibrasi peregangan CO–N, daerah 1535 cm^{-1} deformasi ikatan N–H dan vibrasi peregangan C–N. Pada daerah $1625 - 1379\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi peregangan C–H (rantai alifatik). Serapan pada daerah 1103 cm^{-1} dan daerah 1185 cm^{-1} menunjukkan vibrasi peregangan C–O. Spektrum FTIR yang dihasilkan oleh bakteri isolat BSPP 4 dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat BSPP 4 (Indrianti, 2022).

Yusnidar (2022) melaporkan bahwa biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri isolat ALP E1 asal air laut Pelabuhan Panjang juga termasuk ke dalam jenis biosurfaktan lipopeptida. Karakterisasi dengan FTIR diperoleh spektrum IR yang terbentuk yaitu pada puncak karakteristik 3369 cm^{-1} yang menunjukkan adanya ikatan N–H. Puncak spektrum pada 2094 cm^{-1} menunjukkan adanya intensitas $\text{C}\equiv\text{C}$. Spektrum pada bilangan gelombang 1632 cm^{-1} menunjukkan keberadaan $\text{C}=\text{O}$. Pita serapan pada bilangan gelombang 1438 cm^{-1} dan 1080 cm^{-1} masing-masing mewakili $-\text{CH}_3$ dan ikatan C–H. Spektrum IR yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP E1 dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP E1 (Yusnidar, 2022).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Desember 2022 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung. Karakteristik molekular 16S rRNA dan analisa biosurfaktan menggunakan FTIR dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung. Analisa KLT dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

3.2. Alat- alat yang digunakan

Adapun alat- alat yang digunakan pada penelitian ini adalah erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, gelas kimia, gelas ukur, spatula, pipet tetes, jarum ose, tabung sentrifuga, alumunium foil, plastik *wrap*, bunsen, indikator pH, mikropipet model *Dragon Lab*, vorteks model *Grant Bio PV-1*, oven model *T60 Heraus*, inkubator model *Precistern P'selecta*, sentrifuga model *225 Fisher Scientific*, *autoclave* model *S-90N*, *shaker* model *reciprocating shaker SSL2*, *hotplate stirrer* model *Stuart 162*, neraca analitik model *DJ-V220A Lucky*, *Laminar Air Flow (LAF)* model *Curma 9005-FL*, *freeze dryer* model *Scanvac Cool Safe Labogene*, *Fourier Transform Infra Red (FTIR)* model *Agilent Technologies Carry 630*, *chamber*, dan plat KLT.

3.3. Bahan- bahan yang digunakan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat lokal BSPP 4 yang telah didapatkan dari sedimen perairan Pelabuhan Panjang (Indrianti, 2022), *nutrient agar*, *nutrient broth*, akuades, kapas, kasa, gliserol, natrium nitrat (NaNO_3), ninhidrin, kloroform, metanol, asam asetat, oli, pelumas, dan *mineral salt medium* (MSM) yang meliputi KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, dan $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.4. Metode Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat yang telah bersih, kemudian dibungkus dengan kertas lalu disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Selanjutnya alat- alat dikeringkan dalam oven.

3.4.2. Pembuatan Media

- Media *Nutrient Agar* (NA)

Sebanyak 2,8 gram NA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, lalu dipanaskan di atas penangas air dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. NA yang telah disterilkan selanjutnya ditunggu hingga tidak terlalu panas dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 15- 20 mL kemudian diletakkan pada posisi miring. Media agar ini digunakan untuk meremajakan isolat bakteri.

- Media *Nutrient Broth* (NB)

Sebanyak 1,3 gram NB dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 100 mL akuades lalu dipanaskan sampai mendidih. NB yang telah panas selanjutnya ditutup dengan sumbat dan disterilkan menggunakan *autoclave*

pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media *Nutrient Broth* digunakan sebagai media inokulum atau adaptasi bakteri.

- **Mineral Salt Medium (MSM)**

Mineral Salt Medium (MSM) digunakan untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Komposisi MSM yang digunakan yaitu KH_2PO_4 0,2 g; K_2HPO_4 0,5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3 g; NaCl 0,01 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0002 g, dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dihomogenkan dengan *stirrer*. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat lalu disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Media *Mineral Salt Medium* (MSM) adalah media selektif untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan.

3.4.3. Peremajaan Isolat

Peremajaan ini berfungsi untuk menjaga nutrisi isolat bakteri yang digunakan sebagai stok kultur biakan untuk menguji bakteri yang berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan serta optimasi produksi biosurfaktan. Peremajaan ini dilakukan pada media *nutrient* agar miring dengan menginokulasikan 1 ose isolat bakteri asal sedimen Pelabuhan Panjang (BSPP 4) dengan metode gores zig-zag, dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C. Isolat bakteri hasil peremajaan siap digunakan sebagai stok kultur dan disimpan di dalam lemari pendingin 4 °C (Kalyani *et al.*, 2014).

3.4.4. Karakteristik Molekular 16S rRNA Isolat BSPP 4

Identifikasi molekuler dari strain bakteri penghasil biosurfaktan dilakukan dengan analisis 16S rRNA. DNA genom diisolasi dari kultur murni dan digunakan untuk amplifikasi gen 16S rRNA dengan PCR. Gen dari DNA bakteri diamplifikasi menggunakan primer 16S rRNA (ribosomalRNA) dengan Forward (5'-3') 63F (CAGGCCTAACACATGCAAGTC) dan Reverse (5'-3') 1387 R

(GGGCGGWGTGTACAAGGC). Setiap pereaksi PCR terdiri dari 10,5µL mastermix MyTaq™ HS Red Mix , 0,25 µL primer Forward (F), 0,25 µL primer Reverse (R), 8 µL ddH₂O, dan 2µL sampel DNA yang dimasukkan pada microtube berukuran 0,2 mL. Program thermocycling yang digunakan memiliki 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (94°C selama 5 menit), tahap denaturasi (94 °C selama 1 menit), tahap penempelan primer atau annealing (50 °C selama 1 menit), pemanjangan atau *elongation* (72 °C selama 1 menit), elongasi akhir (72 °C selama 5 menit), dan *cooling* (20 °C selama 10 menit). Tahap denaturasi, penempelan primer (annealing), dan pemanjangan (*elongation*) diulang sebanyak 30 siklus (Marchesi *et al.*, 1998). Produk PCR yang telah dimurnikan siap untuk ditentukan dan diurutkan. Urutan nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis dan disejajarkan dengan urutan gen 16S rRNA dari kelompok prokariotik yang tersedia di basis data GenBank menggunakan BLAST-n. Hasil yang diperoleh selanjutnya dianalisis filogenetik menggunakan program MEGA 11.

3.4.5. Optimasi Produksi Biosurfaktan

3.4.5.1. Variasi Konsentrasi Sumber Karbon

Sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini adalah gliserol dengan variasi konsentrasi 3%; 5%; dan 7%. Inokulum dari media NB ditambahkan ke dalam masing-masing media MSM pada erlenmeyer yang telah steril. Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker* selama 96 jam, suhu 30 °C dan kecepatan 110 rpm. Media yang telah diinkubasi kemudian dilakukan uji biosurfaktan yaitu uji indeks emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Nugroho, 2006).

3.4.5.2. Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen

Optimasi sumber nitrogen dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum dari variasi konsentrasi sumber nitrogen. Penelitian ini menggunakan sumber nitrogen yaitu NaNO₃ dengan variasi 0,4%; 0,6%; dan 0,8%. Inokulum dari media NB ditambahkan ke dalam masing-masing media MSM ke dalam erlenmeyer yang

telah disteril. Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker* pada suhu 30 °C, kecepatan 110 rpm selama 96 jam. Hasil yang diperoleh dilakukan uji biosurfaktan yaitu uji indeks emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Utami *et al.*, 2020)

3.4.5.3 Variasi pH

Optimasi pH dilakukan dengan membuat variasi pH media MSM menjadi pH 6, 7, dan 8 dengan menambahkan larutan NaOH 1 N dan HCl 1 N. Media MSM ditambahkan sumber karbon, sumber nitrogen yang telah optimum dan disterilisasi menggunakan *autoclave*. Setelah media steril lalu ditambahkan 1% (v/v) inokulum dari media NB ke dalam setiap variasi pH media MSM. Media MSM tersebut diinkubasi menggunakan *shaker* suhu 30 °C dan kecepatan 110 rpm selama 96 jam. Setelah itu dilakukan uji biosurfaktan yang meliputi uji emulsifikasi, uji *drop collapse* dan uji *oil spreading* (Riyanto dkk., 2022).

3.4.5.4 Variasi Konsentrasi Salinitas

Penentuan salinitas media dilakukan pada kondisi pH optimum dengan variasi konsentrasi 0,1%; 0,3%; 0,5%. Kultur bakteri pada media inokulum diambil sebanyak 7,5% (Indrianti, 2022) dimasukkan ke dalam setiap media MSM dengan salinitas yang berbeda. Selanjutnya media *dishaker* menggunakan *shaker* kecepatan 110 rpm suhu 30 °C pada waktu optimum yaitu 96 jam. Variasi konsentrasi salinitas masing-masing dilakukan uji biosurfaktan yang meliputi uji emulsifikasi, uji *oil spreading* dan uji *drop collapse* (Dhail, 2012).

3.4.6. Produksi dan Ekstraksi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan bertujuan untuk mendapatkan ekstrak biosurfaktan dari isolat bakteri BSPP 4. Sumber karbon, sumber nitrogen, konsentrasi inokulum media, dan konsentrasi salinitas yang digunakan dalam proses produksi

biosurfaktan menggunakan kondisi optimum yang telah diperoleh pada tahap optimasi media MSM. Produksi biosurfaktan dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri BSPP 4 ke dalam media NB dan dishaker selama 24 jam di dalam *shaker* dengan kecepatan 110 rpm dan suhu 30 °C. Konsentrasi inokulum optimum kultur 24 jam pada media NB dipindahkan ke dalam 500 mL media MSM yang telah ditambah sumber karbon dan sumber nitrogen optimum. Media produksi kemudian dishaker menggunakan *shaker* dengan kecepatan 110 rpm, suhu 30 °C selama 96 jam. Media disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dikumpulkan untuk proses ekstraksi biosurfaktan.

Biosurfaktan diekstraksi menggunakan metode presipitasi asam. Cara yang dilakukan yaitu membuat pH supernatan bebas sel menjadi pH 2 dengan menambahkan HCl 6 M. Supernatan tersebut dibiarkan mengendap selama 24 jam pada suhu 4 °C. Endapan tersebut kemudian dikumpulkan dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit. Ekstrak kasar biosurfaktan yang terbentuk dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer* hingga diperoleh ekstrak biosurfaktan kering (Mnif *et al.*, 2016). Biosurfaktan kering yang diperoleh kemudian ditimbang dan didapatkan berat yang konstan.

3.4.7. Uji Biosurfaktan

3.4.7.1. Uji Emulsifikasi

Uji emulsifikasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam mengemulsikan lapisan lemak. Kultur cair bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Supernatan dicampur dengan oli bekas di dalam tabung reaksi dengan perbandingan 1:1 (2 mL supernatan dicampur dengan 2 mL oli bekas). Campuran divorteks selama 2 menit dan selanjutnya didiamkan 24 jam sehingga terbentuk emulsi yang stabil dan dihitung nilai emulsifikasinya (Pereira *et al.*, 2013).

$$\text{Indeks Emulsifikasi} = \frac{\text{tinggi lapisan teremulsi (cm)}}{\text{tinggi total cairan (cm)}} \times 100\% \quad (1)$$

3.4.7.2. Uji *Oil Spreading*

Uji *oil spreading* digunakan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dari bakteri yang diuji, dengan mengamati kemampuan bakteri dalam menghilangkan lapisan minyak pada permukaan air. Sebelum melakukan uji kultur cair bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Akuades dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL diikuti dengan penambahan pelumas hingga membentuk lapisan tipis pada permukaan akuades. Supernatan dari kultur bakteri kemudian ditambahkan sebanyak 1 tetes ke permukaan pelumas. Hasil positif ditandai dengan lapisan minyak yang terpisah dan membentuk zona bening (Gozan dkk., 2014).

3.4.7.3. Uji *Drop Collapse*

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

3.4.8. Analisa Biosurfaktan

3.4.8.1. Analisa Biosurfaktan dengan menggunakan KLT

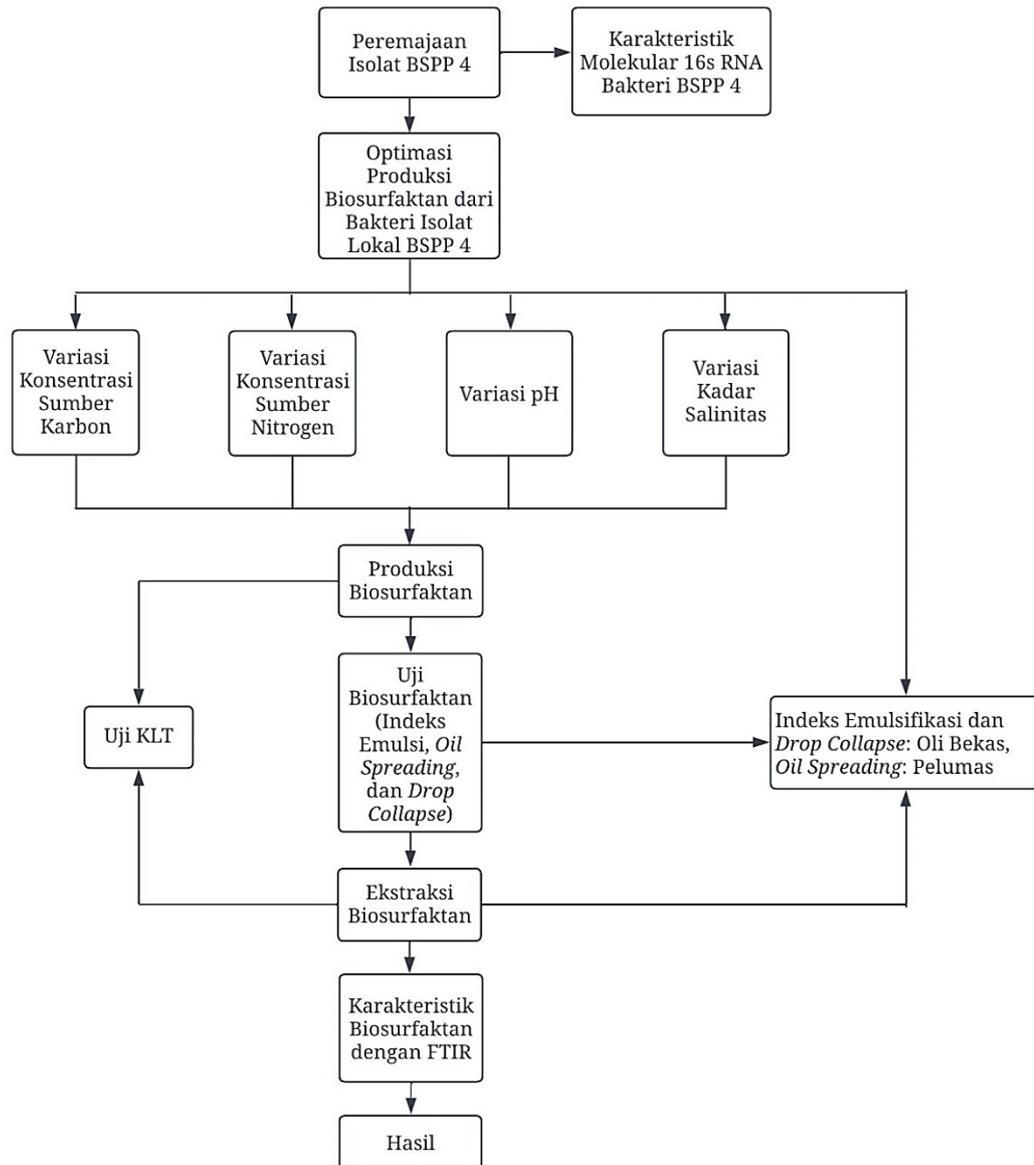
Analisa biosurfaktan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan pada tahap uji biosurfaktan setelah produksi dan setelah ekstraksi. Fase gerak yang digunakan yaitu kloroform, metanol dan asam asetat dengan perbandingan

65:25:4. Plat KLT 4x5 cm, diukur batas atas dan bawah masing-masing 0,5 cm. Supernatan dan ekstrak ditotolkan di batas bawah plat KLT kemudian dimasukkan ke dalam *chamber* yang sudah berisi eluen dengan perbandingan kloroform : metanol : asam asetat (65:25:4), ditunggu hingga terelusi naik. Plat KLT yang sudah terelusi kemudian dikeluarkan dan dibiarkan hingga kering. Plat yang sudah kering selanjutnya diamati dengan menggunakan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm kemudian plat disemprot dengan ninhidrin dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 100 °C dan diamati secara visual (Das *et al.*, 2009).

3.4.8.2. Analisa Biosurfaktan dengan menggunakan FTIR

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

Adapun bagan alir dari penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Bagan Alir Penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan simpulan sebagai berikut:

1. Berdasarkan hasil analisa filogenetik, bakteri isolat BSPP 4 terindikasi genus *Bacillus* dan spesies *Bacillus cereus*.
2. Kondisi optimum produksi biosurfaktan bakteri indigen BSPP 4 yaitu menggunakan sumber karbon gliserol 3%, sumber nitrogen NaNO_3 0,6%, pH 7, dan konsentrasi salinitas 0,3%.
3. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat BSPP 4 berwarna kuning dengan berat sebesar 0,1087 g/L.
4. Berdasarkan hasil analisa KLT menunjukkan bercak noda merah muda menandakan adanya biosurfaktan lipopeptida dan hasil FTIR biosurfaktan dari isolat BSPP 4 merupakan biosurfaktan jenis lipopeptida.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh, disarankan pada penelitian selanjutnya antara lain untuk melakukan optimasi produksi biosurfaktan dengan menambahkan parameter agitasi dan aerasi, dilakukan analisa lebih lanjut menggunakan instrumentasi lainnya serta uji bioaktivitas seperti antijamur dan antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainul, A., Hasbi, M., dan Purwanto, E. 2021. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah Cair Perbengkelan. *Jurnal Ilmu Perairan*. 9(1):31-37.
- Akbar, M. A. 2004. *Optimasi Sumber Karbon dan Konsentrasi Pada Produksi Biosurfaktan Oleh Bakteri Isolat IG dari Tarakan (Tesis)*. Fakultas Teknologi Industri. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Alvionita, M., dan Hertadi, R. 2021. Pengaruh Jenis Sumber Nitrogen Pada Produksi Biosurfaktan Oleh Bakteri Halofil. *IJCA (Indonesian Journal of Chemical Analysis)*. 4(1):11-17.
- Arora, S. K., Sony, J., Sharma, A., and Taneja, M. 2015. Production and Characterization of Biosurfactant from *Pseudomonas spp.* *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(1):245-253.
- Astuti, D. I., dan Aditiawati, P. 2001. Optimasi Konsentrasi “Crude Oil” dan Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Sumur Bangko. *Proceeding Simposium Nasional IATMI 2001*. 3(1):1-5.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., and Cameotra, S. S. 2000. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(5):495-508.
- Bhuvaneswari, M., Sivagurunathan, P., and Uma, C. 2016. Utilization of Different Carbon Source for Biosurfactant Production by a Marine *Pseudomonas sp* PNB 34 from Cuddalore District. *International Journal of Advanced Research in Biological Science*. 3(12):57-62.
- Budiarti, R.S. 2000. *Optimasi Konsentrasi Crude Oil dan Sumber Nitrogen Pada Produksi Biosurfaktan Oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik dan Bangko (Tesis)*. Fakultas Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung. Bandung.

- Ciccyliana, D. Y., dan Nawfa, R. 2012. Pengaruh pH terhadap Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Lokal. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 1(2):1-6.
- Citra, S. 2021. *Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Air Laut Pelabuhan Panjang Menggunakan Sumber Karbon Minyak Bumi (Skripsi)*. Universitas Lampung. Lampung.
- Damayanti, B., Sumardi, S., Arifiyanto, A., Handayani, K., Kanedi, M., Handerlin, Putri, M., dan Lukyta, R.R.C. 2022. Pengaruh Media Pertumbuhan dan pH Terhadap Aktivitas Biosurfaktan dari Bakteri *Serratia marcescens* strain MBC 1 pada Minyak Jelantah. *IJCA (Indonesian Journal of Chemical Analysis)*. 5(1):1-8.
- Das, P., Mukherjee, S. and Sen, R. 2009. Substrate Dependent Production of Extracellular Biosurfactant by a Marine Bacterium. *Journal Bioresource Technology*. 100(2):1015-1019.
- Desai, J. D. and Banat, I. M. 1997. Microbial Production of Surfactant and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 61(1):54-55.
- Desai, J. D. and Desai, A. J. 1993. *Production of Biosurfactant In Biosurfactant: Production, Properties, Application*. Kosari (ed). Marcel Dekker. New York.
- Dhail, S. 2012. Isolation of Potent Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Spilled Marine Water and Marine Sediments. *African Journal of Biotechnology*. 11(103):16751-16757.
- Duvnjak, Z., Cooper, D. G. and Kosaric, N. 1983. *Effect on N sources on Surfactant Production by Arthrobacter Parafineus ATCC 19558 In : Microbial Enhanced Oil Recovery*. Ed.
- 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*. 22(4):466-475.
- Fatimah. 2007. Uji Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas sp.* pada Substrat yang Berbeda. *Jurnal Berkala Penelitian Hayati*. 12(1):181-185.

- Georgiou, G., Sung-Chyr Lin, and M.M. Sharma. 1992. Surface Compounds From Microorganisms. *Bio/Technology*. 10:60-65.
- Gozan, M., Izzah, N. F., Cut, N., dan Abdul, H. 2014. Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan Substrat Limbah Biodiesel Terzonasi Untuk Peningkatan Perolehan Minyak Bumi. *Jurnal Warta Industri Hasil Pertanian*. 31(2):39-44.
- Hasbi, O. M., dan Tabrani, G. 2006. Meningkatkan Produksi Biosurfaktan Bakteri *Bacillus macerans* STRAIN TS9-8 dengan Perlakuan Faktor Lingkungan (pH, Suhu dan Suplai Oksigen). *Jurnal Nasional Teknik Kimia*. 1(1):1-8.
- Hashim, D. M., Man, Y. B. C., Norakasha, R., Shuhaimi, M., Salmah, Y., and Syahariza, Z. A. 2010. Potential Use of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Differentiation of Bovine and Porcine Gelatins. *Journal Food Chemistry*. 118(3):856-860.
- Hilmi, A., Sudjarwo, dan Darmawati, A. 2013. Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Penetapan Kadar Kolkisin dalam Infus Daun Kembang Sungsang (*Gloriosa Superba Linn*). *Jurnal Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. 2(2):5-12.
- Horowitz, A., Gutnick, D. and Rosenberg, E. 1975. Sequential Growth of Bacteria on Crude Oil. *Journal Applied Microbiology*. 30(1):10-19.
- Indrianti, W. 2022. *Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat Lokal BSPP 4 Asal Sedimen Perairan Pelabuhan Panjang dan Uji Potensi Antibakteri (Skripsi)*. Universitas Lampung. Lampung.
- 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. *Frontiers in Microbiology*. 8(1):1-11.
- Kalyani, A. L., Naga, S. T., Sangkar, G. G., and Prabhakar, T. 2014. Isolation and Antimicrobial Activity of Rhamnolipid Biosurfactant from Oil Contaminated Soil Sample using Humic Acid Salts Vitamin Agar. *Journal of Research in Eng and Techn*. 3:357-364.

- Kosaric, N. 1992. Biosurfactants in Industry. *Journal Pure and Applied Chemistry*. 64(11):1731-1737.
- Kumar, M., León, V., De Sisto Materano, A., Ilzins, O. A., and Luis, L. 2008. Biosurfactant Production and Hydrocarbon-Degradation by Halotolerant and Thermotolerant *Pseudomonas sp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24(7):1047-1057.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D. and Wade, W.G. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers that Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Journal Applied and Environmental Microbiology*. 64(2):795-799.
- Martins, P. C., Bastos, C. G., Granjeiro, P. A., and Martins, V. G. 2018. New Lipopeptide Produced by *Corynebacterium aquaticum* from A Low-Cost Substrate. *Journal Bioprocess and Biosystems Engineering*. 41(8):1177-1183.
- 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*. *Journal Environmental Science and Pollution Research*. 23(7):6690-6699.
- Mulligan, C. N., Yong, R. N., and Gibbs, B. F. 2001. Surfactant-Enhanced Remediation of Contaminated Soil. *Journal Engineering Geology*. 60(1):371-380.
- Naiola, E., dan Widhyastuti, N. 2002. Isolasi, Seleksi dan Optimasi Produksi Protease dari Beberapa Isolat Bakteri. *Jurnal Berita Biologi*. 6(3):467-473.
- Nugroho, A. 2006. Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Pengguna Hidrokarbon dengan Penambahan Variasi Sumber Karbon. *Biodiversitas*. 7(4):312-316.
- 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*. 111(1):259-268.

- Plaza, G. A., Zjawioni, I. and Banat, I. M. 2006. Use of Different Methods for Detection of Thermophilic Biosurfactant-Producing Bacteria from Hydrocarbon-Contaminated and Bioremediated Boils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 50:71-77.
- Priyani, N., Erman, M. dan Nikmah, R. B. 2011. Optimasi Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas Aureginosa* dengan Variasi Sumber Karbon dan Nitrogen. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*. Medan.
- Purnomohadi, A. 2010. *Potensi Antibakteri dan Analisis Emulsifikasi Biosurfaktan dari Isolat Bakteri Lokal (Skripsi)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Putri, M., and Hertadi, R. 2015. Effect of Glycerol as Carbon Source for Biosurfactant Production by Halophilic Bacteria *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12. *Procedia Chemistry*.16(1):321-327.
- Rane, A. N., Baikar, V. V., Ravi Kumar, D. V., and Deopurkar, R. L. 2017. Agro-Industrial Wastes for Production of Biosurfactant by *Bacillus subtilis* ANR 88 and Its Application In Synthesis Of Silver and Gold Nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*.8(1):1-12.
- Riffiani, R. 2010. Bakteri Penghasil Biosurfaktan yang Diisolasi dari Pulau Laki Kepulauan Seribu. *Jurnal Hidrosfir Indonesia*. 5(3):9-16.
- Risna, Y. K., Harimurti, S., Wihandoyo., dan Widodo. 2022. Kurva Pertumbuhan Isolat Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 24(1):1-7.
- Riyanto, C.L.R., Sumardi, F. S., dan Ekowati, C.N. 2021. Aktivitas Biosurfaktan *Serratia Marcescens* strain MBC1 dalam Mengemulsikan Solar dengan Variasi pH dan Media. *Jurnal Sumberdaya Alam dan Lingkungan*. 8(3) :114-122.
- Rolfe, M. D., Rice J. C. J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A. D. S., Alston M., Stringer M. F., Betts R. P., Baranyi J., Peck M. W., and J. C. D. Hinton. 2012. Lag Phase is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology*. 194(3):686-701.

- Rosi, R. M. 2022. *Produksi Dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Isolat PKT D4 serta Studi Aktivitasnya Sebagai Antijamur (Skripsi)*. Universitas Lampung. Lampung.
- Sandri, D. 2009. *Bakteri Hidrokarbonolastik Tanah Tercemar Penghasil Biosurfaktan: Skrining dan Identifikasi Bakteri, Optimasi Produksi dan Karakterisasi Produknya. (Tesis)*. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sahara, B. S., Sahu, S. K. and Sharma, D. 2011. An Overview on Biosurfactants. *Journal Genetic Engineering and Biotechnology*. 20(2):2932.
- Sankari G., Kriahnamoorthy, E. Jayakumaran S., Gunaekaran S., Priya V.V., Subramaniam S., and Mohan S.K. 2010. Analysis of Serum Immunoglobulins using Fourier Transform Infrared Spectral Measurements. *Journal Biology and Medicine*. 2(3):42-48.
- Setiani, N.A., Agustina, N., Mardiah, I., Hamdani, S., dan Astriany, D. 2019. Potensi *Bacillus cereus* dalam Produksi Biosurfaktan. *Jurnal Biologi Udayana*. 24(2):135-141.
- Silva, S. N. R. L., Farias, C. B. .B, Rufino, R. D., Luna, J. M., and Sarubbo, L. A. 2010. Glycerol as Substrate for The Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 79:174-183.
- Suryani, A. Sailah, I. dan Hambali, E. 2000. *Teknologi Emulsi*. Jurusan Teknologi Industri Pertanian. IPB Press. Bogor.
- Utami, S.D., Astuti, D.I., and Purwasena, I.A. 2020. Nitrogen Optimization on Rhamnolipid Biosurfactant Production from *Pseudoxanthomonas* sp. G3 and its preservation techniques. *Sains Malaysiana*. 49(9):2119-2127.
- Yakimov MM, Kenneth, Timmis, Wray V, Fredrickson L (1995). Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied Environmental Microbiology*. 61(5):1706-1713.

- Yusnidar, M. 2022. *Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen ALP E1 Asal Air Laut Pelabuhan Panjang serta Uji Antibakteri dan Antijamur (Skripsi)*. Universitas Lampung. Lampung.
- Yusnidar, M., Laila, A., dan Nurhasanah. 2021. Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat ALP E1 Air Laut Pelabuhan Panjang dengan Variasi Sumber Nitrogen. *Seminar Nasional Bersama FMIPA Unila*.
- Wahyuningrum, D., Hertadi, R., dan Yuliana, C. 2019. Produksi Optimasi Biosurfaktan dari Bakteri Halofilik *Chromohalobacter japonicus* BK-AB18. *Chemical Engineering Research Article*. 2(2):56-65.
- Ward, N., Larsen, Ø., Sakwa, J., Bruseth, L., Khouri, H., Durkin, A. S., Dimitrov, G., Jiang, L., Scanlan, D., Kang, K. H., Lewis, M., Nelson, K. E., Methé, B., Wu, M., Heidelberg, J. F., Paulsen, I. T., Fouts, D., Ravel, J., Tettelin, H., and Eisen, J. A. 2004. Genomic Insights into Methanotrophy: The Complete Genome Sequence of *Methylococcus Capsulatus* (Bath). *PLoS Biology*. 2(10).
- Wibisana, A. 2018. Isolasi dan Skrining Mikroba Penghasil Biosurfaktan dari Air Laut Tercemar Minyak. *Jurnal Ilmiah Teknik Kimia UNPAM*. 2(2):11-18.