

**PRODUKSI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS
BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI *Bacillus* sp.
ALP D1 MENGGUNAKAN *Palm Oil Mill Effluent* (POME) SEBAGAI
SUMBER KARBON**

(Tesis)

Oleh

HANISA DAMAYANA



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2024**

**PRODUKSI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS
BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI *Bacillus* sp.
ALP D1 MENGGUNAKAN *Palm Oil Mill Effluent* (POME) SEBAGAI
SUMBER KARBON**

Oleh

HANISA DAMAYANA

Tesis

**Sebagai Salah Satu Syarat unuk Mencapai Gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

**Program Pascasarjana Magister Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

PRODUKSI, KARAKTERISASI, DAN UJI BIOAKTIVITAS BIOSURFAKTAN LIPOPEPTIDA DARI BAKTERI *Bacillus* sp. ALP D1 MENGGUNAKAN *Palm Oil Mill Effluent* (POME) SEBAGAI SUMBER KARBON

Oleh

HANISA DAMAYANA

Biosurfaktan merupakan produk metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 menggunakan limbah POME dalam memproduksi biosurfaktan lipopeptida dan mengetahui bioaktivitasnya. Metode yang dilakukan meliputi optimasi parameter produksi biosurfaktan (konsentrasi POME, waktu produksi, konsentrasi NaNO₃, pH, dan salinitas), analisis biosurfaktan diukur dengan IE₂₄, *oil spreading* (OS), *drop collapse* (DC), karakterisasi biosurfaktan menggunakan KLT, FTIR, dan LC-MS, serta uji bioaktivitas biosurfaktan sebagai antibakteri, antifungi, dan antioksidan. Hasil produksi biosurfaktan diketahui bahwa bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 optimum pada konsentrasi POME 3%, waktu produksi 72 jam, konsentrasi NaNO₃ 3%, pH 6, dan salinitas 7%, serta diperoleh IE₂₄ 69,44%, uji OS 8,5 cm, dan uji DC positif. Produk biosurfaktan yang dihasilkan berwarna kuning kecoklatan dengan berat 0,068 g. Hasil analisis data KLT memperlihatkan spot berwarna merah muda dengan pereaksi ninhidrin mengindikasikan adanya kelompok nitrogen dari peptida pada biosurfaktan. Spektrum FTIR menunjukkan puncak serapan gugus fungsi pada 3384 dan 3280 cm⁻¹ (regangan N-H) dan 1632 cm⁻¹ (regangan CO-N) menunjukkan kelompok peptida, dan spektrum ESI-MS(+) pada waktu retensi 14,64 menit dengan bobot molekul sebesar 889 g/mol mengindikasikan biosurfaktan lipopeptida. Aktivitas biosurfaktan terbaik pada antibakteri memunculkan zona bening 10,11 mm terhadap *Escherichia coli*, antifungi pada zona bening 15,18 mm pada *Candida albicans*, dan antioksidan sebesar 36,60% pada konsentrasi biosurfaktan 1 mg/mL.

Kata kunci : Biosurfaktan, IE₂₄, lipopeptida, antibakteri, antifungi, antioksidan

ABSTRACT

PRODUCTION, CHARACTERIZATION, AND BIOACTIVITY TEST OF BIOSURFACTANT LIPOPEPTIDE FROM *Bacillus* sp. ALP D1 USING *Palm Oil Mill Effluent (POME)* AS CARBON SOURCE

By

HANISA DAMAYANA

Biosurfactants are secondary metabolite products produced by microorganisms. This study aims to obtain the optimum conditions of *Bacillus* sp. ALP D1 uses POME waste in producing lipopeptide biosurfactants and determines their activities as antibacterial, antifungal and antioxidant. The method used includes optimization of biosurfactant production parameters (POME concentration, production time, NaNO₃ concentration, pH, and salinity), biosurfactant analysis measured by IE₂₄, oil spreading (OS), drop collapse (DC), biosurfactant characterization using TLC, FTIR, LC-MS, and biosurfactant bioactivity tests as antibacterial, antifungal and antioxidant. The biosurfactant test results revealed that *Bacillus* sp. ALP D1 was optimum at 3% POME concentration, 72 hours production time, 3% NaNO₃ concentration, pH 6, and 7% salinity, and obtained IE₂₄ 69.44%, 8.5 cm OS test, DC positive. The result of biosurfactant product is brownish yellow in color with a weight of 0.068 g. The results of TLC showed that pink spots using ninhydrin reagent indicated the presence of nitrogen groups from peptides in biosurfactants, FTIR spectrum showed absorption peaks of functional groups at 3384 and 3280 cm⁻¹ (stretching of N-H) and 1632 cm⁻¹ (stretching of CO-N) indicated peptide groups, and ESI-MS(+) spectrum appeared at a retention time of 14.64 minutes with a molecular weight of 889 m/z indicating a lipopeptide biosurfactant. The best biosurfactant activity in antibacterial appeared clear zone of 10.11 mm in *Escherichia coli*, antifungal appeared a clear zone of 15.18 mm in *Candida albicans*, and an antioxidant of 36.60% at a biosurfactant concentration of 1 mg/mL.

Keywords : Biosurfactant, IE₂₄, lipopeptide, antibacterial, antifungal, antioxidant

Judul Tesis : **Produksi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 Menggunakan Palm Oil Mill Effluent (POME) Sebagai Sumber Karbon.**

Nama : **Hanisa Damayana**

NPM : 2127011004

Program Studi : **Magister Kimia**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP. 197412111998022001



Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc.
NIP. 197007052005011003

2. Ketua Program Studi Magister Kimia



Dr. Nurhasanah, M.Si.
NIP. 197412111998022001

MENGESAHKAN

1. TIM PENGUJI

Ketua : Dr. Nurhasanah, M.Si.

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

Penguji Bukan Pembimbing

Anggota : Prof. Dr. Rudy T.M. Situmeang, M.Sc., Ph.D.

Anggota : Prof. Suharso, S.Si., Ph.D.

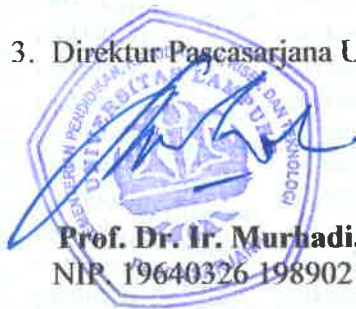
Anggota : Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 19710012005011002

3. Direktur Pascasarjana Universitas Lampung



Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : 15 Februari 2024

PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hanisa Damayana

Nomor Pokok Mahasiswa : 2127011004

Program Studi : Magister Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam


Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam tesis yang berjudul “Produksi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 Menggunakan *Palm Oil Mill Effluent* (POME) Sebagai Sumber Karbon” merupakan benar hasil karya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ternyata kelak di kemudian hari terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka saya akan bertanggung jawab sepenuhnya.

Bandar Lampung, 16 Januari 2024

Yang menyatakan




Hanisa Damayana
NPM. 2127011004

RIWAYAT HIDUP

Hanisa Damayana, dilahirkan di Bandar Lampung, pada tanggal 7 Juni 1996, sebagai anak pertama dari bersaudara dari pasangan Bapak Drs. Daud dan Ibu Maryanti, SE. Penulis mengawali pendidikan formal pada tahun 2001 di TK Sandy Putra Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2002. Kemudian pada tahun 2002 melanjutkan pendidikan SD Negeri 2 Rawa Laut Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2008. Selanjutnya pada tahun 2008 melanjutkan pendidikan SMP Negeri 5 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2011. Lalu pada tahun 2011 melanjutkan pendidikan SMA Negeri 1 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2014.

Pada tahun 2014, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Pendidikan Kimia, Jurusan Pendidikan MIPA, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN dan lulus pada tahun 2018. Selanjutnya pada tahun 2021 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Magister Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Selama menjadi mahasiswa Magister Kimia, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biologi Terapan. Penulis juga berkesempatan mengikuti seminar internasional sebagai presenter ICMNS 2023 bulan Februari 2023 dan *The 13th International Conference on Green Technology (ICGT-13)* di bulan Oktober 2023.

MOTTO

“Cukuplah Allah menjadi Penolong kami dan Allah adalah sebaik-baiknya Pelindung.”

(Q.S. Al-Imron : 173)

Angin tidak berhembus untuk menggoyangkan pohon, melainkan untuk menguji kekuatan akarnya.

(Ali bin Abi Thalib)

Memilih suatu pilihan merupakan hal mudah, namun bertahan hingga akhir pada pilihan tersebut merupakan hal tersulit untuk dapat dilakukan.

(Hanisa Damayana)

PERSEMBAHAN



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.

Ku persembahkan karya ini sebagai wujud bakti dan sayangku kepada:

Diriku Sendiri

Kedua Orang Tua Ku Tercinta

Mami Maryanti dan Papi Daud

Terimakasih telah senantiasa memberikan do'a, cinta kasih, serta dukungan baik secara materiil maupun moril.

Kedua Adikku Tersayang

Ahmad Aditya Gocendra Daud dan Meydita Putri Mahardika

Terimakasih telah memberikan do'a dan dukungannya kepada Penulis.

Pembimbing Penelitian

Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si.

Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc.

Bapak, Ibu Dosen Jurusan Kimia

Atas ilmu yang diberikan selama saya menempuh Pendidikan di kampus.

Serta,

Keluarga besar Biokimia Universitas Lampung

SANWACANA

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang memberikan rahmat dan ridho-Nya sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan judul “Produksi, Karakterisasi, dan Uji Bioaktivitas Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 Menggunakan *Palm Oil Mill Effluent* (POME) Sebagai Sumber Karbon” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains di MIPA Universitas Lampung.

Saya menyadari sepenuhnya bahwa kemampuan dan pengetahuan saya masih terbatas, oleh karena itu adanya bimbingan dan arahan dari berbagai pihak sangat membantu dalam menyelesaikan tesis ini. Dalam kesempatan ini, saya mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si. selaku Pembimbing I atas kesediaan, kesabaran, dan keikhlasannya untuk memberikan bimbingan, motivasi, kritik, dan saran selama masa studi dan penulisan tesis.
2. Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc. selaku Pembimbing II atas kesediaannya memberikan bimbingan, motivasi, kritik, dan saran untuk tesis ini.
3. Bapak Prof Dr. Rudy T.M. Situmeang, M.Sc., Ph.D. selaku Pembahas I atas masukan dan perbaikan yang diberikan terhadap penulisan tesis ini.
4. Bapak Prof Suharso, S.Si., Ph.D. selaku Pembahas II atas masukan dan perbaikan yang diberikan terhadap penulisan tesis ini.
5. Ibu Prof Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku Pembahas III atas masukan dan perbaikan yang diberikan terhadap penulisan tesis ini.

6. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S. M.S. selaku Dosen Pengampuh terbanyak di *peer group* Biokimia selama penulis menimba ilmu di jurusan, terima kasih atas segala ilmu yang telah diajarkan dan saran dalam penelitian selama ini.
7. Seluruh dosen dan segenap civitas akademik Jurusan Kimia atas ilmu yang telah diberikan.
8. Tim Hibah Kemenristekdikti 2023 yang telah mendanai penelitian ini hingga selesai.
9. Prayoga Heriyanto, S.H. selaku sahabat, keluarga, mitra belajar dan kerja selama menjalankan privat CPNS sejak tahun 2021 terimakasih atas segala bantuan dan toleransinya selama ini.
10. Sahabat terbaik di Pendidikan Kimia'14 khususnya Rizka Puspita, Jihan Rifka Nabila, Putriana, Jariska Meidhanisa Wulandari, Dina Kiftatul Kusnia, Enti Yulita, Chikita Mardwi Patmi, dan Qudwah Muttawaqilah.
11. Sahabat-sahabat seperjuangan Magister Kimia'21 khususnya Siwi Meutia Sadewi, S.Si., M.Si. yang selalu membantu dan memotivasi dalam penyelesaian tesis ini.
12. Sahabat-sahabat keluarga besar Laboratorium Biokimia dan Kimia Organik yang telah kebersamai dalam melakukan penelitian di Laboratorium khususnya Vezhia, Aulia, Salsabila, Virginia, Kania, Wulan, Saidah, Astin, Cindy, Yori, Putpita, Rara, Marcella, Nabila, Verinda, Hilda, Partini, Adhya, dan Dinus.
13. Orang-orang baik yang saya temui selama ini, terimakasih.
14. Kucing-kucing yang ku temui dan kusayangi sejak 2019 khususnya Tom, Oyen, Runa, Tara, Jeje, Kiwi, Bara, Milky, Blacky, Bubble, Mini, Kenzo, dan Aiki, terimakasih telah memberi warna baru di hidup ini.

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
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. Biosurfaktan Lipopeptida	5
2.2.1. <i>Surfaktin</i>	6
2.2.2. <i>Iturin</i>	7
2.2.3. <i>Fengycin</i>	7
2.2.4. <i>Kurstakin</i> dan <i>Locillomycin</i>	8
2.5.5. <i>Lichenisin</i>	8
2.5.6. <i>Viscosin</i>	8
2.5.7. <i>Amphisin</i>	8
2.5.8. <i>Polymyxin</i>	9
2.5.9. <i>Pseudofaktin II</i>	9
2.3. Bakteri <i>Bacillus</i> sp.....	10
2.4. Aplikasi Biosurfaktan	10
2.5. <i>Palm Oil Mill Effluent</i> (POME)	13
2.6. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan.....	13
2.6.1. Sumber Karbon	13
2.6.2. Sumber Nitrogen	14
2.6.3. pH.....	14
2.6.4. Salinitas	14
2.7. Pengujian Senyawa Biosurfaktan	15
2.7.1. Uji Indeks Emulsifikasi.....	15
2.7.2. Uji <i>Oil Spreading</i>	15
2.7.3. Uji <i>Drop Collapse</i>	16
2.8. Ekstraksi Biosurfaktan.....	16
2.9. Karakterisasi Biosurfaktan	16
2.9.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	16
2.9.2. <i>Fourier Transform InfraRed</i> (FTIR).....	17
2.9.3. <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LC-MS).....	19

2.10.	<i>Response Surface Method (RSM)</i>	20
2.11.	Uji Bioaktivitas Biosurfaktan	21
2.11.1.	Uji Antibakteri	21
2.11.2.	Uji Antifungi	21
2.11.3.	Uji Antioksidan	22
III.	METODE PENELITIAN	23
3.1.	Waktu dan Tempat	23
3.2.	Alat dan Bahan	23
3.3.	Prosedur Penelitian	24
3.3.1.	Tahap Persiapan	24
3.3.2.	Pembuatan Media	24
3.3.2.1.	Media <i>Nutrient Agar</i> (NA)	24
3.3.2.2.	Media <i>Nutrient Broth</i> (NB)	25
3.3.2.3.	Media <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM)	25
3.3.2.4.	Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	25
3.3.2.5.	Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	26
3.3.2.6.	Media <i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (SDA)	26
3.3.3.	Peremajaan Isolat dan Mikroba Uji	26
3.3.4.	Optimasi Produksi Biosurfaktan dari <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	27
3.3.4.1.	Sumber Karbon (POME) dan Waktu Produksi	27
3.3.4.2.	Sumber Nitrogen (NaNO_3)	27
3.3.4.3.	pH	28
3.3.4.4.	Salinitas	28
3.3.4.5.	Desain Eksperimen RSM-CCD	28
3.3.5.	Produksi Biosurfaktan	29
3.3.5.1.	Uji Indeks Emulsifikasi	29
3.3.5.2.	Uji <i>Oil Spreading</i>	30
3.3.5.3.	Uji <i>Drop Collapse</i>	30
3.3.6.	Ekstraksi Biosurfaktan	30
3.3.7.	Karakterisasi Biosurfaktan	31
3.3.7.1.	Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	31
3.3.7.2.	<i>Fourier Transform InfraRed</i> (FTIR)	31
3.3.7.3.	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LC-MS)	32
3.3.8.	Uji Antibakteri	32
3.3.9.	Uji Antifungi	33
3.3.10.	Uji Antioksidan	33
3.4.	Skema Alur Penelitian	35
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1.	Kondisi Optimum Parameter Produksi Biosurfaktan	36
4.1.1.	Sumber Karbon dan Waktu Produksi Optimum	36
4.1.2.	Sumber Nitrogen, pH, dan Salinitas Optimum Menggunakan Pendekatan RSM	38
4.2.	Biosurfaktan dari <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	41
4.3.	Karakteristik Biosurfaktan dari <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	44
4.3.1.	Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	44
4.3.2.	<i>Fourier Transform InfraRed</i> (FTIR)	46

4.3.3	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometry (LC-MS)</i>	48
4.4.	Bioaktivitas Biosurfaktan dari Bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	49
4.4.1.	Aktivitas Antibakteri	49
4.4.2.	Aktivitas Antifungi.....	51
4.4.3.	Aktivitas Antioksidan.....	52
V.	SIMPULAN DAN SARAN	54
5.1.	Simpulan.....	54
5.2.	Saran	55
	DAFTAR PUSTAKA	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi biosurfaktan lipopeptida dan mikroorganisme penghasilnya	6
2. Aplikasi biosurfaktan	11
3. Serapan FTIR biosurfaktan yang diperoleh <i>B. subtilis</i> C19.....	17
4. Kategori tingkat kekuatan aktivitas antibakteri.....	21
5. Kategori tingkat kekuatan aktivitas antifungi	22
6. Rentang dan tingkatan parameter optimasi biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	29
7. Rancangan Desain RSM-CCD untuk parameter konsentrasi NaNO ₃ (sumber nitrogen), pH, dan salinitas	38
8. Analisis varians (ANOVA) untuk pendekatan RSM-CCD.....	40
9. Perbandingan hasil spektrum FTIR biosurfaktan lipopeptida.....	47
10. Aktivitas antioksidan biosurfaktan lipopeptida dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 pada berbagai konsentrasi.....	52
11. Persentase indeks emulsifikasi (IE ₂₄) pada penambahan POME 3%.....	63
12. Persentase indeks emulsifikasi (IE ₂₄) pada penambahan POME 4%.....	63
13. Persentase indeks emulsifikasi (IE ₂₄) pada penambahan POME 5%.....	64
14. Nilai OD pada penambahan POME 3%	64
15. Nilai OD pada penambahan POME 4%	64
16. Nilai OD pada penambahan POME 5%	65
17. Aktivitas antibakteri biosurfaktan lipopeptida dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	67
18. Aktivitas antifungi biosurfaktan lipopeptida dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	67

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia dari <i>Surfaktin</i> (a); <i>Iturin</i> (b); <i>Fengcyin</i> (c); <i>Lichenisin</i> (d).....	9
2. Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri <i>B. alditunis</i> MS16.....	18
3. Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri <i>K. gibsonii</i>	19
4. Spektrum ESI-MS (+) biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan dari bakteri <i>B. licheniformis</i> V9T14.....	20
5. Aktivitas antioksidan biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> strain BS-VSG4 dan BS-VS16.....	22
6. Skema alur penelitian.....	35
7. Pengukuran %IE24 dan OD selama waktu pertumbuhan 120 jam pada variasi konsentrasi POME 3, 4, dan 5%.....	37
8. Desain 3 dimensi RSM-CCD pada parameter konsentrasi NaNO ₃ , pH, dan salinitas.....	39
9. Hasil uji positif indeks emulsifikasi sampel dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (a); kontrol negatif uji indeks emulsifikasi dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (b).	41
10. Hasil uji positif <i>oil spreading</i> biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (a); kontrol negatif uji <i>oil spreading</i> dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (b)...	42
11. Hasil uji positif <i>drop collapse</i> biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (a); kontrol negatif uji <i>drop collapse</i> dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 (b)..	43
12. Ekstrak kasar biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1.....	44
13. Hasil KLT ekstrak biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 menggunakan fase gerak kloroform : metanol : air (65:25:4) pada panjang gelombang sinar UV 254 nm (a); dan pereaksi ninhidrin (b);Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	45
14. Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri <i>Bacillus</i> sp. ALP D1	46
15. Waktu retensi biosurfaktan yang diperoleh dari <i>Bacillus</i> sp. ALP D1 pada LC-MS	48

16. Bobot molekul biosurfaktan yang diperoleh dari *Bacillus* sp. ALP D1 pada LC-MS 48
17. Uji antibakteri biosurfaktan lipopeptida dari *Bacillus* sp. ALP D1 pada *S. aureus* menggunakan difusi cakram (A= Ekstrak biosurfaktan, B= kontrol positif; C= Kontrol negatif)..... 50
18. Uji antibakteri biosurfaktan lipopeptida dari *Bacillus* sp. ALP D1 pada *E. coli* menggunakan difusi cakram (A= Ekstrak biosurfaktan, B= kontrol positif; C= Kontrol negatif).....50
19. Uji antifungi biosurfaktan lipopeptida dari *Bacillus* sp. ALP D1 pada *F. oxysporum* menggunakan difusi cakram (A= Kontrol negatif, B= Ekstrak biosurfaktan, C= kontrol positif)..... 51
20. Uji antifungi biosurfaktan lipopeptida dari *Bacillus* sp. ALP D1 pada *C. albicans* menggunakan difusi cakram (A= Kontrol negatif, B= Ekstrak biosurfaktan, C= kontrol positif)..... 51

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Biosurfaktan merupakan senyawa amfifatik yang berperan sebagai agen aktif permukaan dan diproduksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, fungi, atau ragi (Basit *et al.*, 2018). Biosurfaktan terdiri atas dua bagian yakni gugus hidrofilik dan gugus hidrofobik yang membuatnya mampu bekerja antara cairan dengan polaritas yang berbeda (seperti minyak dan air), sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan dan antarmuka cairan (Banat *et al.*, 2010). Selain itu, biosurfaktan memiliki keunggulan dibandingkan surfaktan sintetis yakni sifatnya yang ramah lingkungan, biodegradabilitas tinggi, toksisitas rendah, dan stabilitas yang lebih baik pada kondisi ekstrim seperti pH, suhu, serta salinitas (Salek and Euston, 2019). Dibalik keunggulannya, produksi biosurfaktan masih terkendala khususnya di bidang industri yakni biaya produksi yang tinggi, membuat penggunaannya masih terbatas. Alternatif sumber bahan baku yang murah seperti limbah dapat meningkatkan efektivitas biaya produksi biosurfaktan (Suryanti *et al.*, 2016; Sari *et al.*, 2020).

Produksi biosurfaktan yang berasal dari spesies bakteri yang sama, namun menggunakan substrat pertumbuhan yang berbeda dapat menghasilkan jenis biosurfaktan yang berbeda pula. Hal ini dikarenakan jenis biosurfaktan juga dipengaruhi substrat pertumbuhan. Beberapa studi telah dilaporkan terkait penggunaan limbah dalam produksi biosurfaktan yaitu limbah cair tepung singkong sebagai substrat dalam memproduksi lipid mannosilerithritol dari bakteri *Pseudozyma tsukubaensis* (Andrade *et al.*, 2017). Biosurfaktan lipopeptida dari *Bacillus subtilis* ANR 88 diproduksi menggunakan ekstrak ampas tebu dan kulit

jeruk (Rane *et al.*, 2017). Chaprão *et al.* (2018) menggunakan substrat sirup jagung dan molase masing-masing 3% untuk memproduksi biosurfaktan lipopeptida dari bakteri *B. methylotrophicus*. Produksi biosurfaktan dari bakteri asam laktat dilakukan menggunakan whey (Alkan *et al.*, 2019). Produksi biosurfaktan dari isolat bakteri *Halomonas meridiana* BK-AB4 menggunakan limbah cair kelapa sawit atau yang lebih dikenal sebagai *Palm Oil Mill Effluent* (POME) (Sari *et al.*, 2020).

POME merupakan salah satu bentuk limbah cair kelapa sawit yang dapat dimanfaatkan dalam produksi biosurfaktan. POME juga menjadi solusi alternatif sebagai substrat yang murah jika dibandingkan dengan substrat glukosa dan fruktosa (Zambry *et al.*, 2021). Beberapa produk biosurfaktan yang dihasilkan dari penggunaan POME yakni kelompok lipopeptida dari isolat bakteri lokal dari minyak di salah satu daerah Sumatera Selatan (Purwasena *et al.*, 2021) dan surfaktin yang diproduksi dari bakteri *B. subtilis* ATCC 21322 juga termasuk dalam biosurfaktan lipopeptida (Abas *et al.*, 2013).

Biosurfaktan banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti bioremediasi, industri pengolahan makanan, industri minyak, farmasi, dan kesehatan (Hentati, 2019). Aplikasi biosurfaktan di bidang kesehatan terkait dengan kemampuannya yang dapat berperan sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, antibiofilm, antivirus, antikanker, dan sebagainya (Salek and Euston, 2019). Beberapa hasil studi terkait bioaktivitas dari biosurfaktan telah dilaporkan seperti biosurfaktan lipopeptida yang diproduksi oleh strain *B. methylotrophicus* DCS1 menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi sebesar 80,6% pada konsentrasi 1 mg/mL (Jemil *et al.*, 2017). Selanjutnya, aktivitas sebagai antibakteri pada *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, antifungi pada *Aspergillus niger* dan *Candida albicans* masing-masing terbaik di konsentrasi 30 mg/ml, serta aktivitas antioksidan diperoleh sebesar 63% pada konsentrasi 2 mg/mL pada biosurfaktan lipopeptida dari strain *B. cereus* (Basit *et al.*, 2018). Giri *et al.* (2019) mengungkapkan biosurfaktan dari *B. subtilis* VSG4 dan *B. licheniformis* VS16 memiliki aktivitas sebagai antibakteri, serta

memiliki aktivitas antioksidan masing-masing sebesar 69,1% dan 73,5% pada konsentrasi 5 mg/mL. Yusnidar (2021) mengungkapkan biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan dari bakteri indigen lokal ALP E1 memiliki aktivitas antibakteri yakni dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* serta antifungi dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* dan *A. fumigatus*. Rosi (2022) juga melaporkan biosurfaktan glikolipid dari isolat bakteri indigen lokal PKT D4 menunjukkan aktivitas antifungi pada *Candida* sp., *C. albicans*, *A. fumigatus*, dan *A. flavus*.

Studi pendahuluan terhadap *Bacillus* sp. ALP D1 telah dilaporkan aktivitasnya dalam menghasilkan biosurfaktan dengan indeks emulsifikasi (IE_{24}) sebesar 60,61%, menggunakan sumber karbon solar 1%, pH 7, salinitas 0,01%, dan waktu inkubasi 48 jam (Citra, 2021). Namun, *Bacillus* sp. ALP D1 yang telah dilaporkan belum dilakukan karakterisasi lebih lanjut untuk mengetahui biosurfaktan yang dihasilkan dan belum dilakukan pengujian bioaktivitas biosurfaktannya sebagai antibakteri, antifungi, dan antioksidan.

Berdasarkan uraian tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi biosurfaktan lipopeptida dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 menggunakan POME sebagai sumber karbon, $NaNO_3$ sebagai sumber nitrogen, pH, dan salinitas, dikarakterisasi menggunakan KLT, FTIR, dan LC-MS dan diuji bioaktivitas biosurfaktannya sebagai antibakteri, antifungi, dan antioksidan.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan kondisi optimum POME dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 dalam memproduksi biosurfaktan.
2. Mengetahui karakteristik biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 dengan POME sebagai sumber karbon.
3. Mengetahui aktivitas antibakteri, antifungi, dan antioksidan dari biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus* sp. ALP D1.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan dalam pemanfaatan limbah cair kelapa sawit / *Palm Oil Mill Effluent* (POME) sebagai substrat pertumbuhan berbagai mikroba dalam memproduksi biosurfaktan dan biosurfaktan yang diperoleh ini dapat dikembangkan lebih lanjut di berbagai bidang aplikasi lainnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosurfaktan

Biosurfaktan merupakan surfaktan alami yang diproduksi oleh mikroorganisme dan bersifat agen aktif permukaan karena memiliki dua sisi aktif yakni sisi hidrofilik dan hidrofobik yang dapat mengurangi tegangan permukaan dan antarmuka dengan terakumulasi pada antarmuka antara dua cairan yang tidak dapat bercampur seperti minyak dan air. Hal ini pula yang menandakan bahwa surfaktan juga membantu kelarutan senyawa polar dalam pelarut organik.. Karena sifat biosurfaktan yang menarik seperti toksisitas yang lebih rendah, tingkat biodegradabilitas yang lebih tinggi, kapasitas pembusaan yang lebih tinggi, dan aktivitas optimal pada kondisi suhu ekstrim, tingkat pH, dan salinitas membuatnya semakin diminati dalam bidang saintifik dan industri. Aplikasi produksi biosurfaktan lainnya yakni dalam bidang makanan, kosmetik, kesehatan, pembersihan bahan kimia beracun yang berasal dari industri dan pertanian (Salek *and* Euston, 2019).

2.2. Biosurfaktan Lipopeptida

Carolin *et al.*, (2021) mengemukakan biosurfaktan lipopeptida merupakan salah satu kelompok biosurfaktan yang terkenal. Biosurfaktan lipopeptida terbagi menjadi dua bagian utama yakni bagian ekor yang bersifat hidrofobik tersusun atas rantai hidrokarbon dan bagian kepala yang bersifat hidrofilik tersusun atas peptida. Residu kationik dan anionik tersedia dalam beberapa peptida maupun

terkadang ada asam amino non protein juga. Biosurfaktan lipopeptida juga dapat diklasifikasikan berdasarkan mikroba penghasilnya, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi biosurfaktan lipopeptida dan mikroorganisme penghasilnya (Carolin *et al.*, 2021)

Jenis Lipopeptida	Mikroba Penghasilnya
Surfaktin	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. marina</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Enterobacter</i> sp. strain N18
Lichenisin	<i>B. licheniformis</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Polimixin	<i>P. polymyxa</i>
Pseudofaktin II	<i>Pseudomonas</i> sp.
Fengycin	<i>B. mojavensis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. subtilis</i>
Iturin	<i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>A. carbonarius</i>
Amphisin	<i>P. fluorescens</i>
Kurstakin	<i>B. thuringiensis</i> , <i>B. mojavensis</i>
Syringafactin	<i>P. syringae</i>
Fusaricidins	<i>P. polymyxa</i>
Viscosin	<i>P. fluorescens</i>
Bacillomycin D	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Pumilacidin	<i>B. pumilus</i> , <i>B. safensis</i> , <i>B. mojavensis</i>

Keberagaman biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan memungkinkan tipe struktur yang berbeda pula, sebagaimana dijelaskan di bawah ini (Carolin *et al.*, 2021).

2.2.1. Surfaktin

Surfaktin adalah salah satu biosurfaktan lipopeptida yang sering digunakan karena ia memiliki kemampuan mereduksi tegangan permukaan yang lebih efektif dibandingkan biosurfaktan lipopeptida lainnya. Ia berada pada kelompok lipopeptida siklik yang terdiri dari struktur heptapeptida siklik yang dihubungkan oleh asam lemak β -hidroksil dengan C₁₃₋₁₅ dan lingkaran tujuh asam amino seperti L-asparagin (Asn), L-leusin (Leu), asam glutamat (Glu), L-leusin (Leu),

L-valin (Val) dan dua D-leusin yang terpaud dengan lakton. Saat ini telah ditemukan lebih dari 30 jenis *Surfaktin* dengan residu asam amino dan residu asam lemak yang berbeda, namun molekul *Surfaktin* tetap identik tergantung pada urutan kiral. Penemuan *Surfaktin* banyak dihasilkan oleh *Bacillus* sp. yang memiliki berbagai bioaktivitas seperti antimikroba, antimikroplasma, dan antivirus.

2.2.2. *Iturin*

Struktur *Iturin* tersusun atas heptapeptida siklik yang terdiri dari enam varian seperti *iturin* A dan C, *bacillomycin* D, F, L, dan *mycosubtilin*. Satu-satunya spesies yang menghasilkan *bacillomycin* L selain *iturin* A dan *bacillomycin* D adalah *B. velezensis*. Varian *iturin* ini berbeda pada posisi dan komposisi asam amino serta panjang asam lemaknya. Struktur umum lipopeptida ini terdiri dari tujuh asam amino seperti Tirosin (Tyr), Asparagin (Asn), Serin (Ser), Glutamin (Gln), Prolin (Pro), Glutamat (Glx), Threonin (Thr) dengan panjang ekor hidrofobik C₁₄-C₁₇. Struktur ini menggambarkan bahwa senyawa tersebut bersifat amfifatik dan mengarah ke membran sel yang merupakan tempat kerja yang paling mungkin. Dalam lipopeptida ini, siklisasi terjadi antara asam amino pertama dan terakhir yang dihubungkan oleh ikatan amino.

2.2.3. *Fengycin*

Fengycin adalah dekapeptida yang bergabung dengan rantai asam lemak β -hidroksil (C₁₄-C₁₈) dalam bentuk linear dan siklisasi terjadi antara rantai samping fenol pada posisi 3 dan C-terminal asam amino pada posisi 10. Jenis *Fengycin* terdiri dari *Fengycin* A dan B yang pertama kali ditemukan oleh Vanittanakom dan Loeffler tahun 1986 pada strain *B. subtilis*. *Fengycin* ini dapat mengubah struktur dan permeabilitas membran sel karena berinteraksi langsung dengan lapisan ganda lipid dan molekul sterol.

2.2.4. *Kurstakin dan Locillomycin*

Kurstakin dari *B. thuringiensis* merupakan heptapeptida parsial dengan asam lemak berbeda yang dihubungkan melalui asam amino. Residu yang terdapat pada *Kurstakin* adalah Thr, Gly (Glisin), Ala (Alanin), Ser (Serin), His (Histidin) dan Gln. *Locillomycin* dari *B. subtilis* merupakan nonapeptida yang terdiri dari asam amino seperti Thr, Gln, Asp, Gly, Asn, Asp, Gly, Tyr dan Val.

2.2.5. *Lichenisin*

B. licheniformis menghasilkan lipopeptida lichenisin pertama pada tahun 1995 dengan stabilitas yang sangat baik pada kondisi lingkungan yang berbeda dan bertindak secara sinergis pertama (Yakimov *et al.*,1995). Ini mengandung tujuh asam amino seperti L-Gln-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Ile (Isoleusin). Struktur *Lichenisin* ini mirip dengan *Surfaktin* namun perbedaan kecilnya adalah adanya residu glutaminil sebagai pengganti asam glutamat.

2.2.6. *Viscosin*

Viscosin adalah bentuk siklik lipopeptida dengan 9 asam amino seperti L-Leu-D-Gln-D-aThr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Ser-L-Ile bergabung dengan asam lemak β -hidroksidekanoil C₁₀-C₁₂. *Viscosin* disintesis oleh bakteri tanah dan laut seperti *Pseudomonas* sp. dengan bantuan NRPS.

2.2.7. *Amphisin*

Amphisin adalah dekapeptida siklik yang ditemukan oleh Sorensen tahun 2001 dalam *Pseudomonas* sp. strain DSS7. Ini memiliki toksisitas rendah dan dapat terbiodegradasi karena mengandung asam amino yang terikat pada asam lemak β -hidroksidekanoil. *Amphisin* ini terdiri dari 11 asam amino (D-Leu-D-Asp-D-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp) dalam bagian peptidanya.

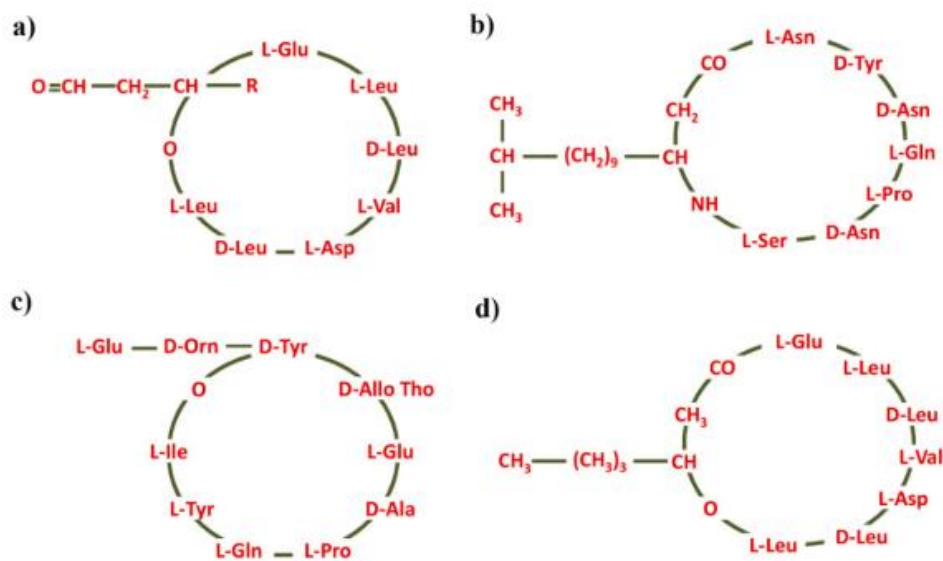
2.2.8. Polymyxin

Polymyxin terdiri dari peptida siklik yang mengandung 5-L-asam2,4 diaminobutirat dan gugus γ -amino dengan ekor hidrofobik panjang yang dihasilkan oleh spesies *Pseudomonas* (Poursoleiman et al., 2019). Berdasarkan spesies *Pseudomonas*., berbagai variasi *Polymyxin* seperti *Polymyxin B* dan *E* telah diproduksi dan memiliki aktivitas antibakteri terbaik melalui mekanisme interaksi elektrostatik dan hidrofobik dengan lipopolisakarida pada bakteri.

2.2.9. Pseudofaktin II

Pseudofaktin II adalah oktapeptida siklik dengan asam amino Gly-Ser-Thr-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu sebagai bagian peptida dan bagian lipid dari lipopeptida ialah asam palmitat yang berikatan dengan bagian peptida. *Pseudofaktin* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *E. hirae*, *S. epidermidis*, *Proteus mirabilis*, dan *C. albicans*. Jenis biosurfaktan lipopeptida ini memiliki struktur yang beragam.

Contoh beberapa struktur kimia dari jenis biosurfaktan lipopeptida dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia dari *Surfaktin* (a); *Iturin* (b); *Fengycin* (c); *Lichenisin* (d) (Carolin et al., 2021).

2.3. Bakteri *Bacillus* sp.

Madigan (2005) mengemukakan klasifikasi bakteri *Bacillus* sp. sebagai berikut.

Kerajaan : Bakteri
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Bangsa : Bacillales
Suku : Bacillaceae
Marga : *Bacillus*
Jenis : *Bacillus* sp.

Bacillus sp. merupakan bakteri aerob berbentuk basil yang dapat ditemukan di air, tanah, dan sisa tanaman. Sebagian besar *B. sp.* bersifat motil dengan flagela lateral dan termasuk bakteri gram positif yang dinding selnya tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tebal dan cenderung kaku (Pelczar *and* Chan, 2005). Beberapa penelitian telah melaporkan *Bacillus* sebagai penghasil biosurfaktan lipopeptida yakni *B. methylotropicus* DCS1 yang memproduksi biosurfaktan lipopeptida dengan tipe yang belum diketahui (Jemil *et al.*, 2017). Biosurfaktan lipopeptida tipe surfaktin dihasilkan dari *Bacillus* strain NH-100 dan NH-217 (Sarwar *et al.*, 2018).

Kebermanfaatan bakteri *Bacillus* sp. sebagai penghasil biosurfaktan telah membuatnya diaplikasikan sebagai anti mikroba dan biodegradasi. Sebagaimana dilaporkan pada biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus* indigen lokal PKT D4 yang memiliki aktivitas antifungi terhadap *Candida* sp., *C. albicans*, *A. fumigatus*, dan *A. flavus* (Rosi, 2022).

2.4. Aplikasi Biosurfaktan

Berbagai biosurfaktan telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti industri, farmasi, kesehatan, kosmetik, makanan, bioremediasi, dan sebagainya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Aplikasi biosurfaktan (Vieira, *et al.*, 2021)

Aplikasi	Jenis Biosurfaktan	Mikroba penghasil
Bahan pembuatan detergen	Tidak diketahui	<i>B. subtilis</i>
Penghapusan cat	Lipopeptida	
Agan antioksidan, antimikroba dan/atau antiperekat terhadap pembentukan biofilm mikroba	Tidak diketahui	<i>Corynebacterium aquaticum</i> , <i>C. spp.</i>
Pemulihan minyak yang ditingkatkan oleh mikroba	Lipopeptida	<i>B. subtilis</i> dan <i>B. licheniformis</i>
Bioremediasi polutan hidrofobik	Posfolipopeptida	
Agan antibakteri dan antibiofilm	Lipopeptida	<i>B. subtilis</i>
	Lipopeptida	<i>Paenibacillus</i> sp.
	Sophorolipid	<i>Starmerella bombicola</i> (sebelumnya <i>C. bombicola</i>)
Bahan pembuatan pasta gigi	Lipopeptida	<i>B. subtilis</i>
	Tidak diketahui	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. metylotrophicus</i> , dan <i>S. bombicola</i>
Agan antimikroba dan pemulihan minyak yang ditingkatkan	Lipopeptida	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Penghambat proliferasi sel dan penginduksi apoptosis sel LoVo (kanker usus besar)	Surfaktin	<i>B. subtilis</i>
Aktivitas anti-proliferatif terhadap garis sel kanker yang berbeda	Glikolipid	<i>Rhodotorula babjevae</i>
Induser apoptosis pada sel kanker payudara manusia MCF-7	Surfaktin	<i>B. natto</i>
Induser apoptosis pada sel kanker hati manusia H7402	Sophorolipid	<i>Wickerhamiella domercqiae</i>
Induser apoptosis pada garis sel karsinoma paru A549	Surfaktin	<i>B. atrophaeus</i>
Agan antikanker terhadap kanker payudara	Surfaktin	<i>Micromonospora marina</i>
Agan antivirus	Surfaktin	<i>B. subtilis</i>
Remediasi logam berat	Asam lemak glikosida	<i>C. tropicali</i>

Bioremediasi lingkungan laut yang tercemar tumpahan minyak	Lipopeptida	<i>B. cereus</i>
Agen antimikroba	Glikolipid	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Penghambat kontaminasi jamur dan ochratoxin A (OTA) selama proses produksi wine	Lipopeptida	<i>Acinetobacter junii</i>
Bahan pembuatan obat kumur	Lipopeptida	<i>B. subtilis</i>
Kontrol biologis dalam sistem hidroponik tertutup, dimana oomycetes adalah patogen tanaman utama	Glikolipopeptida	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Bahan pembuatan kue kering	Tidak diketahui	<i>P. aeruginosa, B. cereus, dan S. bombicola</i>
Bahan pembuatan mayones	Lipopeptida	<i>P. koreensis</i>
Bahan saus salad	Asam lemak	<i>C. utilis</i>
Agen larvasida	Tidak diketahui	<i>C. utilis</i>
Agen penyembuh luka	Surfaktan polimer	<i>C. utilis</i>
Pembersihan tangki penyimpanan minyak	Lipopeptida	<i>B. subtilis</i>
Senyawa probiotik	Glikolipid	<i>W. anomalus</i>
Remediasi hidrokarbon aromatik polisiklik (PAH)	Glikolipid	<i>P. aeruginosa</i>
	Surfaktin, pumilacidin	<i>H. venusta</i>
	Glikolipid	<i>P. cepacia</i>
	Surfaktin	<i>B. subtilis</i>
	Glikolipid	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>A. baumannii</i>
Pemulihan minyak dari lumpur minyak	Rhamnolipid	<i>P. aeruginosa</i>

2.5. *Palm Oil Mill Effluent (POME)*

Palm Oil Mill Effluent (POME) merupakan limbah cair yang dihasilkan dari kelapa sawit. POME memiliki sifat yang berminyak dan tidak beracun. Selain itu, keberlimpahan POME di Indonesia sebagai hasil produksi *Crude Palm Oil (CPO)* dari pabrik-pabrik industri sawit membuatnya dimanfaatkan sebagai media (substrat pertumbuhan) dikarenakan kandungannya yang kaya akan karbohidrat, protein, lipid, dan senyawa nitrogen (Rengga dkk., 2016). Beberapa penelitian telah melaporkan penggunaan POME sebagai media pertumbuhan yakni POME sebagai sumber karbon dalam optimasi produksi biosurfaktan dari bakteri *H. meridiana* BK-AB4 (Sari *et al.*, 2020). POME terpilih sebagai sumber karbon terbaik dalam meningkatkan produksi biosurfaktan termostabil pada aplikasinya sebagai *Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)* (Purwasena *et al.*, 2021). Pada penelitian ini, POME yang digunakan berasal dari PT Indo *Energy Solution (IES)* dan dimanfaatkan sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan lipopeptida dari bakteri indigen lokal yakni *Bacillus* sp. ALP D1.

2.6. Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan

Biosurfaktan yang dihasilkan dapat beragam jenisnya, hal ini dikarenakan pengaruh dari parameter produksi biosurfaktan yang berupa sumber nutrisi (karbon dan nitrogen), pH, dan salinitas.

2.6.1. Sumber Karbon

Kualitas dan kuantitas produksi biosurfaktan dipengaruhi oleh sifat substrat karbon diesel, minyak mentah, glukosa, sukrosa, gliserol yang telah dilaporkan dapat digunakan sebagai sumber substrat karbon yang baik dalam produksi biosurfaktan (Gakpe *et.al.*, 2007). Selain itu, hidrokarbon seperti heksadekana, gliserol, *parafin oil* dan *crude oil* juga dapat digunakan sebagai sumber karbon yang baik untuk pertumbuhan produksi biosurfaktan.

2.6.2. Sumber Nitrogen

Nitrogen penting dalam media produksi biosurfaktan karena mengandung cukup banyak nutrisi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Senyawa bernitrogen seperti pepton, urea, ekstrak ragi, ammonium sulfat, ammonium nitrat, ammonium klorida, natrium nitrat, ekstrak daging dan ekstrak *malt* telah banyak digunakan untuk produksi biosurfaktan. Ekstrak ragi adalah sumber nitrogen yang paling banyak digunakan untuk produksi biosurfaktan, penggunaannya dapat tergantung pada konsentrasi media kultur dan mikroorganisme yang digunakan. Garam ammonium dan urea lebih disukai sebagai sumber nitrogen untuk produksi biosurfaktan oleh *Arthrobacter paraffineus* sedangkan nitrat mendukung produksi surfaktan maksimum pada *P. aeruginosa*. Kalium nitrat adalah sumber nitrogen sederhana terbaik dari enam sumber nitrogen di antaranya ammonium klorida, ammonium sulfat, pepton, urea, ekstrak ragi dan ammonium nitrat (Adamczak and Bednarski, 2000).

2.6.3. pH

Selain sumber nutrisi (karbon dan nitrogen), faktor lingkungan juga berperan penting dalam produksi biosurfaktan. pH merupakan salah satu parameter produksi yang berasal dari lingkungan selain suhu, konsentrasi inokulum, kecepatan aerasi, dan agitasi. Untuk memperoleh biosurfaktan dalam jumlah besar saat produksi biosurfaktan, kita juga perlu mengetahui kondisi pH optimumnya (Setiani dkk., 2020).

2.6.4. Salinitas

Konsentrasi garam dari media tertentu juga memiliki efek pada produksi biosurfaktan. NaCl yang ditambahkan pada media dengan kadar yang tinggi dapat menyebabkan sel bakteri mengalami plasmolisis. Lingkungan dengan kondisi hipertonik menyebabkan air berdifusi keluar sehingga membran plasma

mengkerut. Plasmolisis mudah terjadi pada bakteri Gram negatif, seperti *P. aeruginosa* (Kumar, 2012).

2.7. Pengujian Senyawa Biosurfaktan

Aktivitas biosurfaktan pada suatu senyawa dapat ditentukan melalui beberapa pengujian seperti uji indeks emulsifikasi (IE_{24}), uji *oil spreading* (OST), dan uji *drop collapse* (DC).

2.7.1. Uji Indeks Emulsifikasi

Emulsifikasi merupakan proses pencampuran antara dua buah fase cair yang tidak dapat bercampur dengan bantuan agen emulsifikasi (biosurfaktan) (Firmansyah, 2021). Faktor-faktor yang menentukan kestabilan suatu emulsi adalah ukuran partikel dan distribusi, jenis pengemulsi yang digunakan, rasio antara fasa terdispersi dan fasa pendispersi serta perbedaan tegangan antara dua fasa. Emulsi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu penambahan air atau minyak dan penambahan elektrolit (Rahmawati, 2005). Menurut Willumsen and Karlson (1997), nilai indeks emulsi di atas 50% dinyatakan sebagai penghasil biosurfaktan yang baik.

2.7.2. Uji Oil Spreading

Uji *oil spreading* dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam menghilangkan lapisan minyak pada permukaan air dengan prinsip penurunan tegangan permukaan antara fasa air dan minyak. Teknik ini dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk ketika setetes larutan yang mengandung biosurfaktan ditempatkan pada permukaan minyak-air (Morikawa *et al.*, 2000).

2.7.3. Uji Drop Collapse

Uji *drop collapse* didasarkan pada mendatarnya permukaan oli ketika ditetesi oleh biosurfaktan. Metode ini adalah cara yang sensitif dan mudah untuk dilakukan karena hanya membutuhkan volume kecil (~5 μ L) larutan biosurfaktan untuk menguji sifat biosurfaktan (Shokouhfard *et al.*, 2015).

2.8. Ekstraksi Biosurfaktan

Ekstraksi bertujuan memisahkan lipid seluler atau cairan dari konstituen lain, protein, polisakarida, dan molekul kecil. Oleh karena itu, proses tersebut memerlukan penggunaan pelarut murni dan peralatan gelas yang bersih. Ekstraksi biosurfaktan dapat menggunakan pengendapan aseton dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 50 mL supernatan kultur, selanjutnya diekstrak dengan aseton (1:1) dalam satuan mL dan diinkubasi semalam pada suhu 4 °C, sehingga diperoleh endapan, kemudian diliofilisasi. Seleksi mikroorganisme penghasil biosurfaktan menggunakan limbah agroindustri dan ekstraksi biosurfaktan dengan metode presipitasi asam dengan penambahan HCl 6 N (Nitschke *et.al.*, 2004).

2.9. Karakterisasi Biosurfaktan

Karakterisasi biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui jenis biosurfaktan yang dihasilkan. Terdapat beberapa metode karakterisasi biosurfaktan yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT), *Fourier Transform InfraRed* (FTIR), dan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS).

2.9.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan analisis kualitatif yang didasarkan pada pemisahan kepolaran yang berbeda antara sampel (biosurfaktan) dengan pelarutnya. Prinsip kerja KLT yakni distribusi senyawa antara fase stasioner padat (plat kaca/plastik) dengan fase bergerak (cair) yang bergerak di atas fase

padat (Kumar *et al.*, 2013). Sampel biosurfaktan lipopeptida yang dianalisis menggunakan plat KLT akan diamati pada sinar UV (254 nm), 366 nm, dan penambahan pereaksi ninhidrin mendeteksi munculnya bercak (spot) berwarna merah muda yang menandakan uji positif atau sampel biosurfaktan teridentifikasi sebagai lipopeptida (Setiani dkk., 2020).

2.9.2. *Fourier Transform InfraRed (FTIR)*

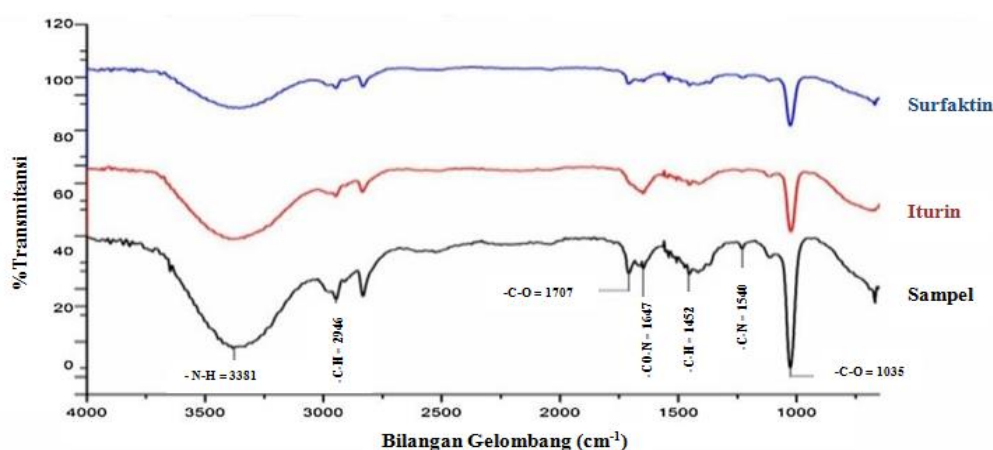
FTIR merupakan salah satu metode karakterisasi yang digunakan untuk mendeteksi gugus-gugus fungsi dan keseluruhan ikatan kimia yang terdapat pada biosurfaktan yang dihasilkan. Sampel biosurfaktan yang dianalisis dengan FTIR, terkumpul pada rentang $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (Joshi *et al.*, 2016). Sampel biosurfaktan lipopeptida yang terdeteksi akan memunculkan berbagai peak (puncak serapan) yang mengidentifikasi kelompok gugus fungsi atau ikatan kimia yang terdapat pada senyawa lipopeptida dengan mencocokkan pada berbagai literatur kisaran rentang biosurfaktan lipopeptida di bawah ini.

Yuliani (2018) mengungkapkan spektrum FTIR biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan oleh *B. subtilis* C19 menunjukkan serapan pada $3300\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, mengindikasikan adanya regangan O-H, serapan pada $3400\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya regangan N-H, dan serapan $1700\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya regangan C=O dari amida sekunder. Bagian hidrofobik dari biosurfaktan menunjukkan serapan pada $2960\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ yang mengindikasikan adanya regangan C-H alifatik. Berikut penjabaran mengenai spektrum FTIR pada *B. subtilis* C19 dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Serapan FTIR biosurfaktan yang diperoleh *B. subtilis* C19 (Yuliani, 2018).

Absorbansi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
Regangan O-H dari gugus -COOH	2958
Regangan N-H	3327
Regangan alifatik C-H	2852, 2922, 1483, 1400
Regangan CO-N	1681

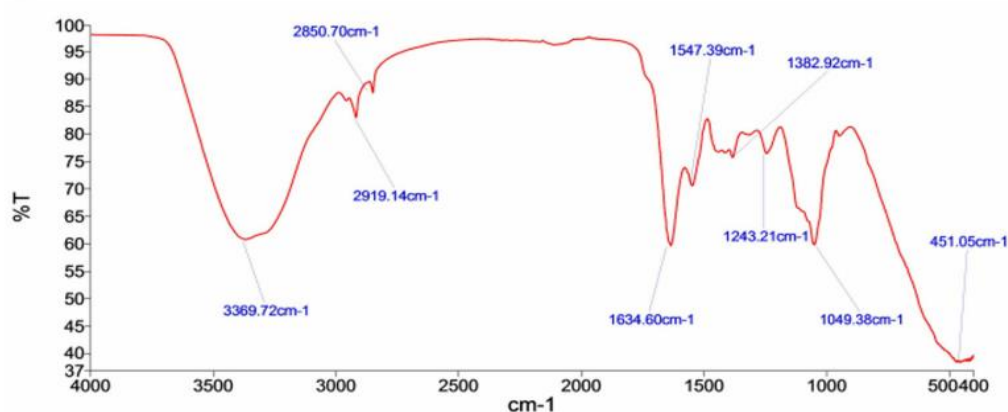
Goswami *and* Deka (2019) mengungkapkan spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan oleh *B. alditunis* MS 16 (Gambar 1) menunjukkan pita serapan kuat konsisten dengan adanya komponen peptida pada 1647 cm^{-1} yang dihasilkan dari regangan ikatan dari CO-N dan 1540 cm^{-1} yang dihasilkan dari deformasi N-H yang dikombinasikan dengan mode regangan C-N. Puncak serapan luas diamati antara 3500 hingga 3200 cm^{-1} mengindikasikan keberadaan senyawa karbon dengan gugus amino yang diperoleh dari vibrasi regangan N-H dengan ikatan hidrogen antarmolekul. Selanjutnya, serapan antara 1800 sampai 1700 cm^{-1} diamati karena regangan C=O menunjukkan adanya lakton dalam sampel. Adanya pita serapan pada 1000 - 1100 cm^{-1} menunjukkan vibrasi O-C-O dari asam karboksilat, aldehida dan keton. Pita frekuensi 1540 cm^{-1} menunjukkan munculnya regangan -C-N karena adanya molekul amida II dalam sampel yang merupakan karakteristik ikatan peptida. Pita serapan pada 2960 - 2860 cm^{-1} dan 1470 - 1370 cm^{-1} mencerminkan regangan (-C-H) dari CH_3 dan CH_2 dalam rantai alifatik sampel biosurfaktan. Spektrum FTIR yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum yang dihasilkan oleh standar *Surfaktin* dan *Iturin* yang tersedia secara komersial dan hasilnya menunjukkan adanya ikatan C-N, ikatan amida I, cincin lakton, rantai alifatik dan kelompok -OH/-NH. Berdasarkan spektrum FTIR biosurfaktan yang dihasilkan identik dengan lipopeptida (Gambar 2).



Gambar 2. Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri *B. alditunis* MS16 (Goswami *and* Deka, 2019).

Nor *et al.* (2021) mengemukakan spektrum FTIR biosurfaktan lipopeptida dari *Kurthia gibsonii* ditandai dengan yang pita peptida pada 3369 cm^{-1} menunjukkan

adanya regangan N-H. Asimilasi memuncak pada posisi 1634, 1243, dan 1049 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus karbonil ester (ikatan $-\text{C}=\text{O}$ pada $-\text{COOH}$). Pita pada 2919 dan 2851 cm^{-1} mencerminkan rantai alifatik ($-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$). Nilai puncak berbeda yang diamati pada 1547 cm^{-1} sesuai dengan pita N-H yang terdeformasi dan kuat, dan puncak pada 1381 cm^{-1} mencerminkan pita $\text{N}=\text{O}$. Adapun spektrum FTIR pada *K. gibsonii* dapat dilihat pada Gambar 3.



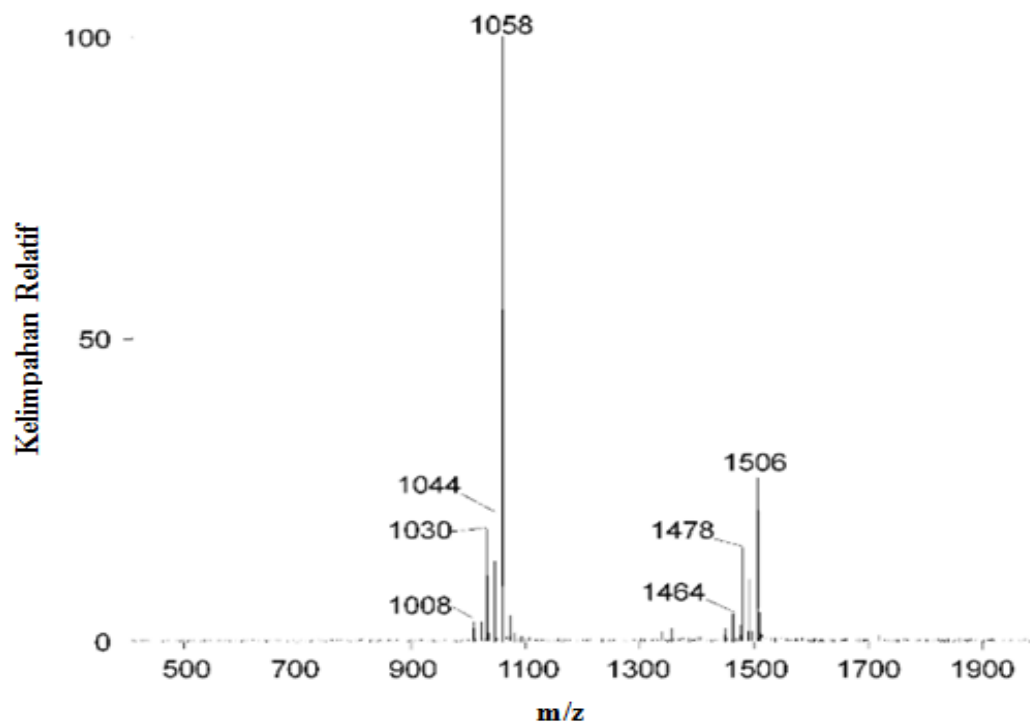
Gambar 3. Spektrum FTIR biosurfaktan dari bakteri *K. gibsonii* (Nor *et al.*, 2021).

2.9.3. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

LC-MS ialah metode analisis yang menggabungkan teknik kromatografi cair dan spektroskopi massa untuk dapat memberikan identifikasi senyawa dengan batas deteksi tinggi. Analisis LC-MS hanya bekerja pada sampel cair, namun tidak terbatas pada senyawa volatil. Sampel biosurfaktan yang dianalisis dengan LC-MS akan memunculkan senyawa yang dihasilkan dengan membandingkan waktu retensinya (R_f) dengan sampel asli dan spektrum massa dengan database spektrum massa *chemspider* (Lim and Lord, 2002).

Pecci *et al.* (2010) mengungkapkan bahwa analisis LC-MS menunjukkan biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan dari *B. licheniformis* V9T14. Spektrum ESI-MS (+) menunjukkan kelompok spesi ion molekul *Surfaktin* dalam rentang

1000-1100 m/z dan *Fengycin* muncul pada rentang 1450-1550 m/z pada biosurfaktan lipopeptida dari *B. licheniformis* yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum ESI-MS (+) biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan dari bakteri *B. licheniformis* V9T14 (Pecci *et al.*, 2010).

2.10. *Response Surface Method (RSM)*

Response Surface Method (RSM) merupakan salah satu analisa statistik yang digunakan untuk mengetahui kondisi optimum dari parameter sebagai variabel bebas dengan cara menentukan rentang dan level dari masing-masing parameter yang digunakan. Keunggulan metode RSM ini sendiri yakni ia menghasilkan rancangan desain kondisi optimum produksi biosurfaktan setelah penginputan rentang dan level masing-masing parameter, selain itu desain RSM digunakan untuk memperkirakan parameter optimum yang ditunjukkan pada interaksi antar parameternya (Juliarti dan Alfaizah, 2013).

2.11. Uji Bioaktivitas Biosurfaktan

Biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 akan diuji bioaktivitasnya sebagai antibakteri, antifungi, dan antioksidan.

2.11.1. Uji Antibakteri

Uji antibakteri merupakan uji aktivitas antibakteri yang dilakukan oleh biosurfaktan. Uji antibakteri dilakukan oleh bakteri *B. BS-VS16* memberikan zona hambat terbesar ($12,6 \pm 0,4$ mm) terhadap *S. aureus* ATCC 29523, sedangkan *BS-VSG4* menunjukkan zona hambat terbesar terhadap *E. coli* MTCC 65 ($13 \pm 0,5$ mm). Kedua biosurfaktan tersebut sangat efektif menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif yang diuji (Giri *et.al.*, 2019). Adapun kategori tingkat kekuatan aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kategori tingkat kekuatan aktivitas antibakteri (Davis and Stout, 1971).

Kategori	Diameter Zona Hambat (mm)
Lemah	≤ 5
Sedang	5-10
Kuat	10-20
Sangat kuat	≥ 20

2.11.2. Uji Antifungi

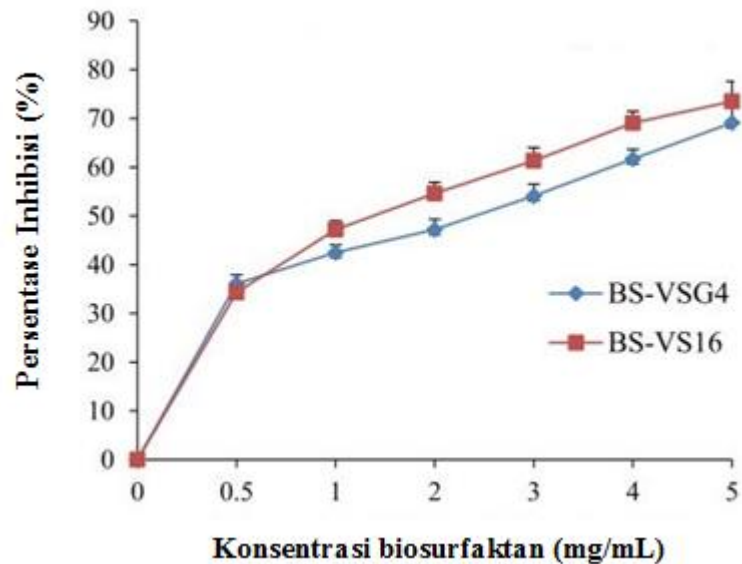
Uji antifungi merupakan salah satu uji bioaktivitas biosurfaktan terhadap fungi untuk diketahui aktivitasnya sebagai anti fungi. Uji antifungi dilakukan oleh *B. altitudinis* MS16 pada fungi patogen seperti *Sclerotinia sclerotiorum* dengan 41,2% penghambatan, *Colletotrichum gloeosporioides* dengan penghambatan 42,8%, atau *Corynespora cassiicola* dengan penghambatan 33,8%, *Fusarium verticillioides* (29,9%) dan *F. oxysporum.f.sp. Pisi* sebesar 22,9% (Goswami and Deka, 2019). Adapun kategori tingkat kekuatan aktivitas antibakteri dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Kategori tingkat kekuatan aktivitas antifungi (Aliose dkk., 2018).

Kategori	Diameter Zona Hambat (mm)
Lemah	<10
Sedang	10-15
Kuat	16-20
Sangat kuat	>20

2.11.3. Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan biosurfaktan. Aktivitas antioksidan biosurfaktan ditentukan setelah pengujian dengan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Aktivitas antioksidan dari biosurfaktan diukur dalam rentang konsentrasi 0,5-5,0 mg/mL, yang dapat dilihat pada Gambar 5. Aktivitas antioksidan biosurfaktan terbaik dari bakteri *B.* ini ditunjukkan dengan persentase DPPH radikal tertinggi pada BS-VSG4 sebesar 69,1% dan BS-VS16 sebesar 73,5% di konsentrasi 5,0 mg/mL pada masing-masing (Giri *et al.*, 2019).

**Gambar 5.** Aktivitas antioksidan biosurfaktan dari bakteri *Bacillus* strain BS-VSG4 dan BS-VS16 (Giri *et al.*, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Agustus 2023 di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Karakterisasi Biosurfaktan menggunakan *Fourier Transform InfraRed* (FTIR) dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Sentul Bogor, serta Uji Antibakteri dan Antifungi dilakukan di Balai Veteriner Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini ialah tabung reaksi, cawan petri, gelas kimia, tabung ukur, labu takar 100 mL, pipet tetes, rak tabung reaksi, Erlenmeyer, *autoclave* model S-90N, *freezer* model Sanyo, jarum ose, aluminium foil, *shaker* inkubator model Environ, *reciprocating shaker* SSL2, neraca analitik model Ainsworth AA160, *Laminar Air Flow* (LAF) model Curma 9005-FL, *magnetic stirrer*, oven model T60 Heraeus, bunsen, spatula, *hotplate* model Stuart CB162, vortex model Grant-Bio PV-1, aluminium foil, mikropipet model Dragon Lab, mikrotip, pH indikator, sentrifuga model 225 Fisher Scientific, tabung Eppendorf, plat KLT, kertas cakram, *chamber*, FTIR model Agilent Technologies Carry, UV-Vis model Carry Win UV 32, dan LC Acquity UPLC®H-Class System dengan MS Xevo G2-S QToF (Waters, USA) serta Acquity UPLC®HSS C18 column (Setiani dkk., 2020).

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini ialah isolat bakteri *Bacillus* sp. D1 asal air laut Pelabuhan Panjang yang merupakan stok kultur di Laboratorium Biokimia, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *Muller Hinton Agar* (MHA), kain kasa, kapas, akuades, benzena, *Palm Oil Mill Effluent* (POME) yang diperoleh dari PT Indo *Energy Solutions* (IES), NaNO_3 , HCl, NaOH, media *Mineral Salt Medium* (MSM) terdiri dari KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, serta ninhidrin, metanol, kloroform, aseton untuk uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kloramfenikol untuk uji antibakteri, nistatin untuk uji antifungi, dan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) untuk uji antioksidan.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan dilakukan sterilisasi peralatan. Sterilisasi dilakukan untuk menghindari adanya kontaminan yang tidak diinginkan. Sebelumnya peralatan tersebut dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas hingga tertutup seluruh permukaannya. Selanjutnya, peralatan dimasukkan ke dalam *autoclave* dengan temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian dikeringkan dan disimpan dalam oven.

3.3.2. Pembuatan Media

3.3.2.1. Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk meremajakan isolat bakteri. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 2,8 g *Nutrient Agar* dalam 100 mL akuades. Selanjutnya, media dipanaskan sampai mendidih lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan sumbat. Kemudian media disterilkan dalam

autoclave pada temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Terakhir, tabung reaksi berisi media diletakkan pada posisi miring (Sujaya, 2014).

3.3.2.2. Media Nutrient Broth (NB)

Media *Nutrient Broth* merupakan media yang digunakan sebagai media inokulum atau adaptasi bakteri. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 1,3 g *Nutrient Broth* dalam 100 mL akuades lalu dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditutup dengan sumbat dan media disterilkan dalam *autoclave* dengan temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu, media disimpan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan siap untuk digunakan (Sujaya, 2014).

3.3.2.3. Media Mineral Salt Medium (MSM)

Media *Mineral Salt Medium* (MSM) merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Media ini dibuat dari bahan-bahan yang telah ditimbang sebelumnya seperti 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, glukosa 0,03 g dan *yeast extract* 0,003 g. Media dilarutkan dengan 100 mL akuades steril kemudian dihomogenkan dengan stirrer. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat lalu disterilkan dalam *autoclave* pada temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Terakhir, media disimpan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) dan siap untuk digunakan (Francy *et al.*, 1991).

3.3.2.4. Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Media *Mueller Hinton Agar* merupakan media yang digunakan untuk meremajakan bakteri uji. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 3,8 g MHA dalam 100 mL akuades. Selanjutnya, media dipanaskan sampai mendidih lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat. Kemudian media disterilkan dalam *autoclave* pada temperatur 121 °C, tekanan 1 atm selama 15

menit. Terakhir, medium dituang ke cawan petri steril lalu dibiarkan memadat dan media telah siap untuk digunakan (Sujaya, 2014).

3.3.2.5. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media PDA merupakan media yang digunakan untuk meremajakan fungi uji. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 3,9 g PDA dalam 100 mL akuades. Selanjutnya, media dipanaskan sampai mendidih lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat. Kemudian media disterilkan dalam *autoclave* pada temperatur 121 °C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Terakhir, tabung reaksi berisi media diletakkan pada posisi miring (Azzahra dkk., 2020).

3.3.2.6. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA)

Media SDA ialah media yang digunakan untuk melakukan uji antifungi. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 6,5 g SDA dalam 100 mL akuades. Selanjutnya media dipanaskan hingga larut dengan sempurna dan tidak terjadi penggumpalan. Medium yang telah jadi dimasukkan ke dalam tabung reaksi sesuai kebutuhan dan ditutup. Kemudian media disterilkan dalam *autoclave* dengan temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Terakhir, medium dituang ke cawan petri steril lalu dibiarkan memadat dan media telah siap untuk digunakan (Warsinah dkk., 2011).

3.3.3. Peremajaan Isolat dan Mikroba Uji

Peremajaan isolat bakteri ini dilakukan untuk menjaga nutrisi isolat bakteri yang digunakan sebagai stok kultur bakteri *Bacillus* sp. ALP D1, bakteri uji (*E.coli* dan *S. aureus*) dan fungi uji (*C. albicans* dan *F. oxysporum*). Peremajaan ini dilakukan pada media *Nutrient Agar* miring untuk bakteri uji, sedangkan untuk fungi uji dilakukan di media *Potato Dextrose Agar*. Sebanyak masing-masing 1 ose isolat bakteri lokal ALP D1 dan bakteri uji diinokulasikan ke permukaan media secara zig-zag kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37 °C.

Setelah itu biakan hasil peremajaan siap digunakan sebagai stok kultur dan disimpan didalam lemari pendingin 4 °C.

3.3.4. Optimasi Produksi Biosurfaktan dari *Bacillus* sp. ALP D1

Optimasi dilakukan untuk dapat memperoleh biosurfaktan secara optimum dengan memperhatikan kondisi proses produksi biosurfaktan itu sendiri seperti sumber karbon (POME) dan waktu produksi dilakukan bersamaan secara langsung dalam penelitian, sedangkan optimasi konsentrasi sumber nitrogen, pH, dan salinitas dilakukan setelah optimasi POME dan waktu produksi berdasarkan pendekatan desain RSM (*Response Surface Method*). Berikut parameter-parameter produksi yang dioptimasi pada penelitian ini.

3.3.4.1. Sumber Karbon (POME) dan Waktu Produksi

Sumber karbon yang digunakan pada penelitian ini ialah *Palm Oil Mill Effluent* (POME) sebagai sumber karbon. Optimasi sumber karbon dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi POME sebesar 3, 4, dan 5%. Biakan isolat bakteri 1% dari media NB dimasukkan ke dalam media MSM yang telah diberi POME. Selanjutnya, biakan bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C, kecepatan 110 rpm selama 120 jam menggunakan *shaker* inkubator. Terakhir, dilakukan pengujian biosurfaktan meliputi pengukuran indeks emulsifikasi (%IE₂₄) dilakukan setiap 12 jam sekali (Purwasena *et al.*, 2021).

3.3.4.2. Sumber Nitrogen (NaNO₃)

Sumber nitrogen yang digunakan pada penelitian ini ialah NaNO₃. Optimasi sumber nitrogen dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi NaNO₃ sebesar 1%, 2%, dan 3%, dengan menambahkan konsentrasi sumber karbon (POME) dan waktu produksi yang telah didapat kondisi optimum sebelumnya. Kemudian, sebanyak 1% hasil biakan isolat bakteri dari media NB dimasukkan ke dalam media MSM yang telah diberi sumber nutrisi. Selanjutnya, biakan bakteri

diinkubasi pada suhu 30 °C, kecepatan 110 rpm selama 24 jam menggunakan *shaker* inkubator. Terakhir, dilakukan pengujian biosurfaktan meliputi uji indeks emulsifikasi (Batubara, 2011).

3.3.4.3. pH

Optimasi pH dilakukan dengan cara memasukkan 1% hasil biakan isolat bakteri dari media NB ke dalam campuran media MSM yang telah ditambah sumber nutrisi optimum dan dibuat variasi pH sebesar 6, 7, dan 8 dengan menambahkan larutan HCl dan NaOH 1 N, dan ditambahkan konsentrasi sumber karbon (POME) dan waktu produksi yang telah didapat kondisi optimum sebelumnya. Selanjutnya, biakan bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C, kecepatan 110 rpm selama 120 jam menggunakan *shaker* inkubator. Terakhir dilakukan pengujian biosurfaktan meliputi uji indeks emulsifikasi (Yakimov, 1995).

3.3.4.4. Salinitas

Optimasi salinitas dilakukan dengan cara memasukkan 1% hasil biakan isolat bakteri dari media NB ke dalam campuran media MSM yang telah ditambah sumber nutrisi optimum pada pH optimum dan NaCl yang divariasikan konsentrasinya sebesar sebesar 3, 5, dan 7%, dengan menambahkan konsentrasi sumber karbon (POME) dan waktu produksi yang telah didapat kondisi optimum sebelumnya. Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada suhu 30°C, kecepatan 110 rpm. Terakhir, dilakukan pengujian pengujian biosurfaktan meliputi uji indeks emulsifikasi (Yakimov *et al.*, 1995).

3.3.4.5. Desain Eksperimen RSM-CCD

Pada penelitian ini, parameter produksi seperti konsentrasi sumber nitrogen, pH, dan kadar salinitas dilakukan menggunakan rancangan desain RSM-CCD (*Response Surface Method-Central Composite Design*), sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 6. Hal ini dikarenakan meminimalisir munculnya multivariat pada

rancangan desain, selain itu optimasi pada sumber karbon (POME) dan waktu produksi sudah dilakukan terlebih dulu sebelum membuat rancangan desain RSM.

Tabel 6. Rentang dan tingkatan parameter optimasi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1

Parameter	Rentang dan Tingkatan		
	-1	0	+1
Konsentrasi NaNO ₃ (%)	1	2	3
pH	6	7	8
Salinitas (%)	3	5	7

3.3.5. Produksi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan dilakukan untuk mendapatkan biosurfaktan dari bakteri lokal isolat ALP D1 yang dilakukan sesuai dengan hasil yang telah didapatkan pada studi pendahuluan. Sebanyak 1000 µL bakteri lokal ALP D1 ditumbuhkan dalam media MSM 100 mL yang mengandung sumber karbon dan nitrogen optimum pada konsentrasi, waktu, pH, dan salinitas optimum (Hentati *et al.*, 2019). Kemudian, kultur bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C, kecepatan 110 rpm menggunakan *shaker* inkubator. Setelah itu, kultur disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit lalu supernatan yang diperoleh diuji emulsifikasi, uji *drop collapse*, uji *oil spreading* (Francy *et al.*, 1991) dan digunakan untuk tahap ekstraksi.

3.3.5.1. Uji Indeks Emulsifikasi

Uji indeks emulsifikasi merupakan uji untuk mengetahui bakteri yang memiliki aktivitas biosurfaktan. Uji dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL supernatan yang telah didapat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL benzena sebagai substrat non-polar pembentuk emulsi. Kontrol negatif menggunakan akuades. Campuran tersebut divorteks dengan kecepatan tinggi selama 2 menit kemudian didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam dan diukur tinggi emulsinya

(Goswami *and* Deka, 2019). Indeks emulsifikasi (%IE₂₄) ditentukan menggunakan rumus seperti pada Persamaan (1):

$$\%IE_{24} = \frac{\text{tinggi lapisan teremulsi (cm)}}{\text{tinggi total cairan (cm)}} \times 100\% \dots\dots\dots(1)$$

3.3.5.2. 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. Uji dilakukan dengan cara sebanyak 30 mL akuades dimasukkan ke dalam cawan petri bersih pada tempat yang datar, kemudian ditambahkan 1 mL oli bekas. Setelah itu dimasukkan secara perlahan 20 µL supernatan kultur pada tengah lapisan oli bekas. Kontrol negatif menggunakan akuades. Uji positif dapat teramati apabila terjadi zona bening akibat penyisihan lapisan oli bekas oleh biosurfaktan (Morikawa *et al.*, 2000).

3.3.5.3. Uji Drop Collapse

Uji *drop collapse* dilakukan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan. Uji ini dilakukan dengan meneteskan 20 µL minyak pelumas (oli bekas) pada permukaan kaca (bersih) dan didiamkan selama 1 jam agar stabil. Selanjutnya, di atas tetesan minyak ditetesi supernatan sebanyak 10 µL. Kontrol negatif menggunakan akuades. Tetesan supernatan di atas minyak akan berbentuk datar jika mengandung biosurfaktan (Bodour *et al.*, 2003).

3.3.6. Ekstraksi Biosurfaktan

Supernatan yang diperoleh pada tahap produksi, selanjutnya diekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode presipitasi asam. Tahap pertama dilakukan dengan mensentrifugasi kultur sampel pada kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit untuk menghilangkan sel. Biosurfaktan diperoleh dari pengendapan supernatan bebas sel setelah penambahan HCl 6 N hingga pH 2 lalu didiamkan

pada suhu 4 °C selama 24 jam. Selanjutnya, biosurfaktan yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan *freeze drying* lalu ditimbang (Nitschke *et al.*, 2004). Hasil pengeringan berupa ekstrak kasar biosurfaktan akan digunakan pada tahap berikutnya yaitu karakterisasi dan uji bioaktivitas (antibakteri, antifungi, dan antioksidan).

3.3.7. Karakterisasi Biosurfaktan

Beberapa biosurfaktan biasa dikarakterisasi dengan berbagai teknik analisis seperti KLT (Kromatografi Lapis Tipis), FTIR (*Fourier Transform Infrared*), dan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy*).

3.3.7.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Biosurfaktan kasar dipisahkan pada pelat silika gel menggunakan eluen kloroform, metanol, dan air dengan perbandingan (65:25:4, v/v/v) sebagai sistem pelarut yang berkembang dengan reagen pengembang warna yang berbeda. Spot yang terbentuk divisualisasikan dengan reagen ninhidrin (250 mg dalam 50 mL aseton). Selanjutnya sampel biosurfaktan lipopeptida yang dianalisis menggunakan plat KLT akan diamati pada sinar UV (254 nm), 366 nm, dan penambahan reagen ninhidrin untuk mendeteksi munculnya bercak (spot) berwarna merah muda yang menandakan uji positif atau sampel biosurfaktan teridentifikasi sebagai lipopeptida (Das *et. al.*, 2008).

3.3.7.2. *Fourier Transform InfraRed* (FTIR)

Produk kasar biosurfaktan sebanyak 1 mg dicampur dengan 100 mg KBr. Kemudian campuran dimasukkan ke dalam cetakan pelet lalu ditekan menggunakan *press* hidrolik. Selanjutnya, sampel dikeluarkan dari cetakan dan dianalisis menggunakan FTIR dengan bilangan gelombang 400 hingga 4000 cm⁻¹ (Joshi *et. al.*, 2016).

3.3.7.3. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)*

Preparasi analisis lipopeptida dengan LC-MS dimulai dengan 10 mL supernatan hasil produksi diasamkan dengan 6 M HCl hingga pH 2. Selanjutnya, disimpan selama 24 jam pada suhu 4 °C, endapan yang terbentuk dikumpulkan melalui sentrifugasi (10.000 g, selama 20 menit) dan kemudian dicampur dengan 10 ml akuades dan tambahkan 1 M NaOH tetes demi tetes hingga pH 7. Lalu, ekstraksi lipopeptida yang terbentuk sebanyak 2 kali dengan campuran etil asetat dan metanol (4 : 1, v/v), serta ditambahkan natrium sulfat anhidrat ke fase organik yang terkumpul dan setelahnya saring pelarut organik dengan diuapkan.

Ekstrak lipopeptida diuji LC-MS dengan dilarutkan dalam 1 mL metanol. Sampel 5 µl diinjeksi ke kolom Allure[®] PFP Propyl (50 x 2,1 mm, ukuran partikel 5 µm) dipertahankan pada suhu 40°C. Untuk pemisahan sampel, fase gerak terdiri dari air (A) dan metanol (B) ditambah dengan 2 mmol/L amonium format dan 0,2% asam format digunakan. Waktu kerja adalah 8 menit dengan gradien pelarut dimulai pada 60% B. Setelah 1 menit, selama menit berikutnya B meningkat menjadi 100%, dan dipertahankan pada 100% selama empat menit tambahan sebelum kembali ke komposisi pelarut awal lebih dari 2 menit. Laju alirnya sebesar 600 ml min⁻¹ (Plaza *et al.*, 2015).

3.3.8. Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap biosurfaktan yang dihasilkan dari tahap ekstraksi. Uji antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Aktivitas antibakteri dari biosurfaktan diuji secara kuantitatif yang efektif melawan bakteri *S. aureus* (Gram positif) dan *E. coli* (Gram negatif).

Uji aktivitas antibakteri dimulai dari pengkulturan masing-masing bakteri pada media NB dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Selanjutnya, masing-masing 1mL suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam cawan petri steril berbeda,

ditambahkan media MHA, dihomogenkan, dan dibiarkan hingga memadat. Kertas cakram berisi 20 μ L *crude* biosurfaktan pada konsentrasi 30 mg/mL, kloramfenikol (10 μ L) sebagai kontrol positif, dan akuades sebagai kontrol negatif diletakkan di atas lapisan agar dengan pengaturan jarak. Terakhir, kultur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening di sekitar kertas cakram (Das *et al.*, 2008).

3.3.9. Uji Antifungi

Uji aktivitas antifungi dilakukan terhadap biosurfaktan yang dihasilkan dari tahap ekstraksi. Uji antifungi dilakukan dengan metode difusi cakram pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Aktivitas antifungi dari biosurfaktan diuji secara kuantitatif yang efektif melawan fungi *C. albicans* dan *F. oxysporum*.

Uji aktivitas antifungi dilakukan dengan menginokulasikan suspensi fungi sebanyak 0,2 mL ke dalam media SDA, diratakan menggunakan *spreader*. Kemudian, kertas cakram yang telah dicelupkan biosurfaktan dengan konsentrasi 30 mg/mL diletakkan di atas lapisan agar. Kontrol positif menggunakan nistatin 30 μ g/mL (Marzuki, 2018). Kultur kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Terakhir, dilakukan pengukuran zona hambat di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.

3.3.10. Uji Antioksidan

Aktivitas antioksidan dari biosurfaktan ditentukan oleh uji 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Sekitar 1 mL larutan biosurfaktan pada berbagai konsentrasi 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, dan 1 (mg/mL) dicampurkan ke dalam 1 mL larutan DPPH, dibiarkan dalam ruang gelap selama 30 menit. Kemudian, sampel diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Kontrol negatif berisi akuades (Chen *et al.*, 2014).

Persentase inhibisi dapat dihitung dengan rumus seperti pada Persamaan (2):

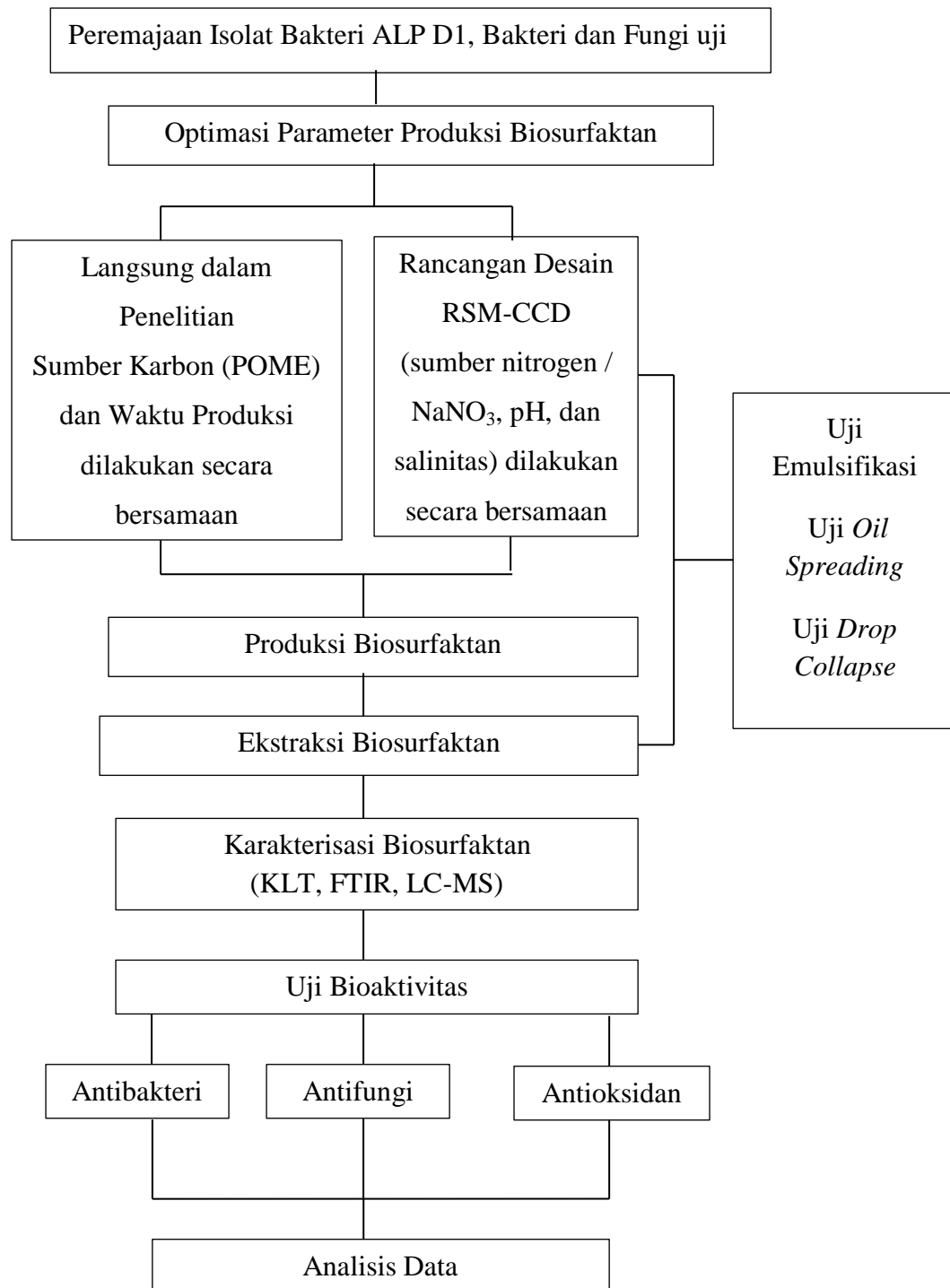
$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Abs. blanko} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan:

Abs. Blanko = Absorbansi metanol 3 mL + DPPH 2 mL

Abs. Sampel = Absorbansi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1

3.4. Skema Alur Penelitian



Gambar 6. Skema alur penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan pada biosurfaktan lipopeptida dari bakteri *Bacillus* sp. ALP D1 maka dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Kondisi optimum biosurfaktan diperoleh pada konsentrasi POME 3%, waktu inkubasi 72 jam, konsentrasi NaNO_3 3%, pH 6, dan kadar salinitas 7% dengan hasil produksi yang dinyatakan dalam IE_{24} sebesar 69,44% dan berat ekstrak kasar sebanyak 0,068 g.
2. Hasil analisis karakterisasi biosurfaktan lipopeptida pada kromatografi lapis tipis dinyatakan dengan bercak berwarna merah muda menggunakan reagen ninhidrin, spektrum FTIR ditunjukkan pada puncak serapan 3384 cm^{-1} dan 3280 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus amino yang diperoleh dari regangan antar gugus N-H, serapan 1543 cm^{-1} menyatakan deformasi ikatan N-H dan regangan C-N, dan regangan CO-N pada serapan 1632 cm^{-1} , serta spektrum ESI-MS(+) muncul pada waktu retensi 14,64 menit dan bobot molekul 889 gram/mol dengan adanya gugus amino pada struktur $\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{N}_6\text{O}_{10}$ diprediksi sebagai biosurfaktan lipopeptida dengan tipe yang belum diketahui.
3. Uji bioaktivitas biosurfaktan lipopeptida terbaik yakni antibakteri terhadap bakteri *E. coli* memunculkan zona hambat 10,11 mm pada kategori sedang, antifungi *C. albicans* memunculkan zona hambat 15,18 mm pada kategori sedang, dan antioksidan muncul pada konsentrasi biosurfaktan 1 mg/mL dinyatakan dalam inhibisi sebesar 36,60%.

5.2. Saran

Adapun saran penelitian ini ialah dapat mencari tahu struktur senyawa lebih lanjut berdasarkan karakterisasi lainya dengan spektroskopi H-NMR dan C-13 NMR dan mengaplikasikan biosurfaktan pada berbagai bidang lainnya seperti antivirus, antibiofilm, dan anti-perekat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abas, M. R., Kader, A. J. A., Khalil, M. S., Hamid, A. A., and Isa, M. H. 2013. Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21322 by Using Treated Palm Oil Mill Effluent (POME) as Fermentation Media. *Int. Conf. Food. Agric. Sci.* 55 : 87-93.
- Adamczak, M., and Bednarski, W. 2000. Influence of Medium Composition and Aeration on The Synthesis of Biosurfactants Produced by *Candida antartica*. *Biotechnol. Lett.* 22 : 313-316.
- Aliose, Y., Kartika, A., Zain, E. A., dan Azzura, V. 2018. Uji Potensi Antijamur *Candida albicans* Ekstrak Daun Gelinggang (*Cassia alata* L.) Dibandingkan Sediaan Daun Sirih yang Beredar di Pasaran Secara in Vitro. *Jurnal Kimia Riset*, 3(2) : 108-115.
- Alkan, Z., Erginkaya, Z., Konuray, G., and Turhan, E. Ü. 2019. Production of Biosurfactant by Lactic Acid Bacteria Using Whey as Growth Medium. *Turk. J. Vet. Anim.* 43(5) : 676–683.
- Andrade, C. J. de., Andrade, L. M. de., Rocco, S. A., Sforça, M. L., Pastore, G. M., and Jauregi, P. 2017. A Novel Approach for The Production and Purification of Mannosylerythritol Lipids (MEL) by *Pseudozyma tsukubaensis* Using Cassava Wastewater as Substrate. *Sep. Purif. Technol.* 180 : 157–167.
- Azzahra, N., Jamilatun, M., dan Aminah, A. 2020. Perbandingan Pertumbuhan *Aspergillus fumigatus* pada Media Instan Modifikasi *Carrot Sucrose Agar* dan *Potato Dextrose Agar*. *JMI.* 4(1) :168–174.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., Smyth, T. J., and Marchant, R. 2010. Microbial Biosurfactants Production, Applications and Future Potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(2) : 427–444.
- Basit, M., Rasool, M. H., Naqvi, S. A. R., Waseem, M., and Aslam, B. 2018. Biosurfactants Production Potential of Native Strains of *Bacillus cereus* and Their Antimicrobial, Cytotoxic and Antioxidant Activities. *Pak. J. Pharm. Sci.* 31(1) : 251–256.

- Batubara, N. R. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* dengan Variasi Sumber Karbon dan Nitrogen. *Skripsi*. USU. Medan.
- Bodour, A. A., Dress, K. P., and Maier, R. M. 2003. Distribution of Biosurfactant Producing Bacteria in Undistributed and Contaminated Arid Southwestern Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6) : 3280-3287.
- Carolin, C. F., Kumar, P. S., and Ngueagni, P. T. 2021. A Review on New Aspects of Lipopeptide Biosurfactant: Types, Production, Properties and Its Application in The Bioremediation Process. *J. Hazard. Mater.* 407 : 1-15.
- Chaprao, M. J., Silva, R. de C. F. S. da., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., and Sarubbo, L. A. 2018. Production of A Biosurfactant from *Bacillus methylotrophicus* UCP1616 for Use in The Bioremediation of Oil-Contaminated Environments. *Ecotoxicol.* 27(10) : 1310–1322.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., and Chen, W. 2014. Screening for Potential New Probiotic Based on Probiotic Properties and A-Glucosidase Inhibitory Activity. *Food Control*, 35(1) : 65–72.
- Citra, S. 2021. Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Air Laut Pelabuhan Panjang Menggunakan Sumber Karbon Minyak Bumi. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Das, P., Mukherjee, S., and Sen, R. 2008. Antimicrobial Potential of A Lipopeptide Biosurfactant Derived from A Marine *Bacillus circulans*. *J. Appl. Microbiol.* 104(6) : 1675–1684.
- Davis, W. W., and Stout, T. R. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *Appl. Microbiol.* 22(4) : 659-665.
- Firmansyah, A. 2021. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan pada Kolam Anaerob IPAL Industri Minyak Sawit. *Sumberdaya dan Lingkungan Akuatik.* 2(1) : 204–214.
- Francy, D. S., Thomas, J. M., and Raymond, R. L. 1991. Emulsification of Hydrocarbons by Subsurface Bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 8 : 237–245.
- Gakpe, E., Rahman, P. K. S. M., and Hatha, A. A. M. 2007. Microbial Biosurfactants – Review. *J. Mar. Atmosp. Res.* 3(2) : 1–17.
- Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., and Park, S. C. 2019. Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Adhesive Activities of Biosurfactants Isolated from *Bacillus* strains. *Microb. Pathog.* 132 : 66–72.

- Goswami, M., and Deka, S. 2019. Biosurfactant Production by A Rhizosphere Bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and Its Promising Emulsification and Antifungal Activity. *Colloids Surf. B.* 178 : 285–296.
- Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., and Chamkha, M. 2019. Production, Characterization and Biotechnological Potential of Lipopeptide Biosurfactants from A Novel Marine *Bacillus stratosphericus* Strain FLU5. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167 : 441–449.
- Jemil, N., Ayed, H. B., Manresa, A., Nasri, M., and Hmidet, N. 2017. Antioxidant Properties, Antimicrobial and Anti-Adhesive Activities of DCS1 Lipopeptides from *Bacillus methylotrophicus* DCS1. *BMC Microbiol.* 17 (144) : 1-11.
- 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.* 7 : 1–14.
- Juliarti, E., dan Alfaizah, I. 2013. Optimalisasi Penambahan Nutrien Terhadap Kadar Protein pada Fermentasi Padat Kulit Umbi Ubi Kayu Menggunakan Response Surface Methode (RSM). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri.* 2(2) : 25-32.
- Kumar, S. 2012. *Textbook of Microbiology*. Jaypee. India.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., and Sarangi, M. 2013. Thin Layer Chromatography : A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 18(1) : 126–132.
- Lim, C. K., and Lord, G. 2002. Current Developments in LC-MS For Pharmaceutical Analysis. *Biol. Pharm. Bull.* 25(5) : 547–557.
- Madigan, M. 2005. *Brock Biology of Microorganisms (11th ed.)*. Prentice Hall. New Jersey.
- Marzuki, A., Djide, M. N., Sartika., Rosany, T. 2018. Uji Aktivitas Ekstrak Kulit Batang Banyuru (*Pterospermum celebicum* Miq.) dan Ekstrak Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.)Willd.) Sebagai Antifungi Terhadap *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*. *Jurnal Ilmiah Farmasi.* 7 (3) : 354-362.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. A. 2000. Study on The Structure-Function Relationship of Lipopeptide Biosurfactants. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1488(3): 211–218.

- Nitschke, M., Ferraz, C., and Pastore, G. M. 2004. Selection of Microorganisms for Biosurfactant Production Using Agroindustrial Wastes. *J. Microbiol.* 35: 81-85.
- Nor, F. H. M., Abdullah, S., Yuniarto, A., Ibrahim, Z., Nor, M. H. M., and Hadibarata, T. 2021. Production of Lipopeptide Biosurfactant by *Kurthia gibsonii* KH2 and Their Synergistic Action in Biodecolourisation of Textile Wastewater. *Environ. Technol. Innov.* 22.
- Pecci, Y., Rivardo, F., Martinotti, M. G., and Allegrone, G. 2010. LC/ESI-MS/MS Characterisation of Lipopeptide Biosurfactants Produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 Strain. *J. Mass Spectrom.* 45(7) : 772–778.
- Pelczar, M. J., and Chan, E. C. S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 1*. Penerjemah Hadiotomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L. UI Press. Jakarta.
- Plaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K. Bernat, P. 2015. Detection of Biosurfactants in *Bacillus* Species: Genes and Products Identification. *J. Appl. Microbiol.* 119(4) : 1023-1034.
- Purwasena, I. A., Astuti, D. I., and Rusiwardani, N. S. 2021. Screening and Optimization of Carbon Source to Increase High Thermostabile Biosurfactant Production for Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) Application. *J. Phys. Conf. Ser.* 1772(1) : 1-7.
- Rahmawati, F. M. A., and Worowidyawati, H. 2005. Sintesis Semikonduktor Nanopartikel CdS dalam Medium Mikroemulsi Hasil Transformasi Fasa Sistem Air/SDS/Etanol/n-Heksana. *Indo. J. Chem.* 5(2) : 92-97.
- 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. *Front. Microbiol.* 8 :1–12.
- Rengga, W. D. P., Riyadi, D. H. S., Bintang, A., dan Kuntoro. 2016. Kajian Produksi dan Proses Biosurfaktan Rhamnolipida dari Limbah Industri Minyak Sawit dan Turunannya Menggunakan *Pseudomonas Aeruginosa*. *Prosiding Seminar Nasional Energi dan Teknologi.* 84-94.
- Rosi, R. M. 2022. Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Isolat PKT D4 serta Studi Bioaktivitasnya sebagai Anti Jamur. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Salek, K., and Euston, S. R. 2019. Sustainable Microbial Biosurfactants and Bioemulsifiers for Commercial Exploitation. *Process Biochem.* 85 : 143–155.

- Sari, C. N., Hertadi, R., Fahriz, A., Harahap, P., Yusuf, M., Ramadhan, A., and Gozan, M. 2020. Originated from Bledug Kuwu Mud Volcano in Central Java for Microbial Enhanced Oil Recovery. *Processes*. 8(716) : 1–17.
- Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., and Hafeez, F. Y. 2018. Biocontrol Activity of Surfactin A Purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 Against Rice Bakanae Disease. *Microbiol. Res.* 209 : 1-13.
- Setiani, N. A., Agustina, N., Mardiah, I., Hamdani, S., and Astriany, D. 2020. Potensi *Bacillus cereus* dalam Produksi Biosurfaktan. *Jurnal Biologi Udayana*, 24(2) : 135-141.
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Shahandashti, R. V., Feizabadi, M.M., and Teimourian, S. 2015. The Inhibitory Effect of A *Lactobacillus acidophilus* Derived Biosurfactant on Biofilm Producer *Serratia marcescens*. *Iran J Basic Med Sci.* 18 : 1001-1007.
- Soo-Hwan, K., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choil, S. J., and Lee, D.S. 2011. Antibacterial Activity of Silver-Nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39 (1) : 77-85.
- Sujaya, I. N. 2014. Petunjuk Praktikum Biologi Dasar. *Paper Knowledge . Toward a Media History of Documents*, 5(2) : 40–51.
- Suryanti, V., Hastuti, S., and Handayani, D. S. 2016. Biosintesis Biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* Menggunakan Limbah Cair Industri Tapioka sebagai Media. *Alchemy*. 10(1) : 22-30.
- Vieira, I. M. M., Santos, B. L. P., Ruzene, D. S., and Silva, D. P. 2021. An Overview of Current Research Developments in Biosurfactants. *J. Ind. Eng. Chem.* 100 : 1-8.
- Warsinah, dan Sunarto. 2011. Identifikasi Senyawa Antifungi Dari Batang Kecapi (*Sandoricum koetjape*) dan Aktivitasnya Terhadap *Candida Albicans*. *Majalah Obat Tradisional*. 16(3) : 165-173.
- Willumsen, P. A., and Karlson, U. 1997. Screening of Bacteria, Isolated from PAH-Contaminated Soils, for Production of Biosurfactants and Bioemulsifiers. *Biodegradation*. 7(5) : 415–423.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V., and Fredrickson, H. L. 1995. Characterization of A New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5) : 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. Bandar Lampung.
- Yuliani, H., Perdani, M. S., Savitri, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarko, A., and Hermansyah, Heri. 2018. Antimicrobial Activity of Biosurfactant Derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*. 153 : 274-278.
- Zambry, N. S., Rusly, N. S., Awang, M. S., Md Noh, N. A., and Yahya, A. R. M. 2021. Production of Lipopeptide Biosurfactant in Batch and Fed-Batch *Streptomyces* sp. PBD-410L Cultures Growing on Palm Oil. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 44(7) : 1577–1592.
- Zheng, Z. D., Zeng, Z., Xue, B., Deng, Y., Sun, M., Tang, Y. J., and Lifang, R. 2018. *Bacillus thuringiensis* Produces The Lipopeptide *thumolycin* to Antagonize Microbes and Nematodes. *J.Micres* 215 : 22-28.