

Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Isolat ALP E1 Air Laut Pelabuhan Panjang dengan Variasi Sumber Nitrogen

Melly Yusnidar¹, Aspita Laila¹, Nurhasanah^{1*}, Saiful Bahri¹, Ni Luh G.R. Juliasih¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Jl. Soemantri Brojonegoro No 1 Bandar Lampung

*Email korespondensi: nur.hasanah@fmipa.unila.ac.id

Dikirim: 25-03-2022, Diterima: 25-04-2022, Diterbitkan: 02-05-2022

Abstrak

Biosurfaktan adalah senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan secara struktur memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik. Biosurfaktan dapat digunakan untuk menurunkan tegangan permukaan dan menghilangkan polutan atau kontaminan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan sumber nitrogen yang relatif lebih baik dan kondisi optimum untuk produksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1 asal air laut Pelabuhan Panjang. Metode penelitian meliputi optimasi sumber nitrogen (ammonium sulfat, ammonium klorida, dan urea) dengan variasi konsentrasi sumber karbon optimum minyak zaitun 10%, waktu pertumbuhan, pH, dan kadar salinitas. Pengujian biosurfaktan dilakukan dengan penentuan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}), *Drop Collapse* dan *Oil Spreading*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri isolat ALP E1 mampu menghasilkan biosurfaktan dengan sumber nitrogen ammonium klorida 0,26% dan sumber karbon minyak zaitun 10%, waktu pertumbuhan 72 jam, pH 6 dan kadar salinitas 0,5 % dengan IE_{24} 79,31%. Uji *Drop Collapse* menunjukkan adanya zona bening berukuran 3,2 cm dan uji *Oil Spreading* memberikan hasil uji positif. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ALP E1 mampu menghasilkan biosurfaktan relatif lebih baik dengan menggunakan ammonium klorida 0,26% sebagai sumber nitrogen, minyak zaitun 10% dengan kondisi optimum pertumbuhan pada waktu 72 jam, pH 6 dan kadar salinitas 0,5%.

Kata kunci: Air laut; Bakteri indigen; Biosurfaktan; Indeks emulsi; Sumber nitrogen

1. Pendahuluan

Pelabuhan Panjang merupakan salah satu pelabuhan internasional yang terletak di Kecamatan Panjang, Kota Bandar Lampung, Lampung, Indonesia. Pelabuhan Panjang saat ini telah tumbuh dan berkembang menjadi pelabuhan Samudera yang melayani pelayaran antar pulau dan antar Negara. Pertumbuhan dan perkembangan Pelabuhan Panjang hingga saat ini menyebabkan banyaknya tumpahan limbah minyak. Lingkungan laut telah banyak tercemar minyak sehingga menjadikan minyak sebagai salah satu kontaminan organik paling melimpah. Oleh sebab itu, banyaknya media yang terus-menerus menjadikan kasus kebocoran ribuan ton minyak yang mencemari air laut (Pirôllo *et al.*, 2000-2013). Selain itu, molekul-molekul yang terkandung dalam hidrokarbon seperti BTEX (Benzena, Toluena, Etil Benzena, dan Xilena) dapat merusak biota laut. Jika semua ekosistem tersebut terkontaminasi limbah hidrokarbon, maka seluruh biota laut akan berkurang mutu kualitasnya bahkan bisa mati.

Salah satu cara untuk memecahkan masalah lingkungan ini adalah dengan melibatkan proses surfaktan menggunakan mikroorganisme, biasa disebut biosurfaktan guna menghilangkan polutan kontaminan. Biosurfaktan adalah surfaktan yang memiliki molekul amfifilik, molekul hidrofobik dan hidrofilik yang bekerja diantara cairan dengan polaritas yang berbeda (minyak-air dan air-minyak). Biodegradasi oleh biosurfaktan dari hidrokarbon terjadi melalui dua mekanisme yaitu ketersediaan substrat biologis hidrofobik untuk mikroorganisme dengan pengurangan tegangan permukaan yang konsekuensi dari media sekitar bakteri dan pengurangan tegangan antarmuka hidrofilik antara dinding sel bakteri dan molekul hidrokarbon (Aparna *et al.*, 2011). Biosurfaktan memiliki keunggulan yang tak terhitung jumlahnya dibandingkan dengan surfaktan kimia, terutama sebagai biodegradabilitas, kompatibilitas dengan lingkungan, toksisitas rendah, selektivitas tinggi dan aktivitasnya bahkan dalam suhu, pH, dan salinitas pada kondisi ekstrim (Banat *et al.*, 2010).

Beberapa penelitian terkait telah berhasil menemukan isolat bakteri lokal yang diuji kemampuannya dalam menghasilkan biosurfaktan. Bakteri isolat lokal tersebut diantaranya isolat LKT B1 dengan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) 45,45% dan PKT B3 dengan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) 46,87% yang paling berpotensi menghasilkan biosurfaktan (Cahyani, 2020). Upaya lain untuk mengoptimalkan bioremediasi ramah lingkungan yaitu penelitian yaitu mengisolasi bakteri dari air laut yang terkontaminasi minyak di Perairan Pelabuhan Panjang, (Citra, 2019). Bakteri hasil isolasi dengan potensi terbaik menghasilkan biosurfaktan yaitu isolat ALP E1 dengan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) 27%. Namun indeks emulsifikasi yang dihasilkan masih terlalu rendah sehingga perlu dilakukan optimasi untuk memproduksi biosurfaktan dengan sumber nitrogen agar nilai indeks emulsifikasi yang diperoleh meningkat. Selain itu, kondisi optimum untuk memproduksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1 juga masih belum diketahui. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi biosurfaktan menggunakan variasi konsentrasi sumber nitrogen, kondisi pertumbuhan seperti waktu produksi, pH, dan kadar salinitas. Kondisi optimum yang diperoleh dari tahap ini akan dijadikan acuan untuk memproduksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1.

2. Metode

2.1. Preparasi Alat

Pada penelitian ini dilakukan preparasi alat-alat gelas dan bahan yang akan digunakan. Peralatan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu untuk menghindari kontaminasi yang tidak diinginkan. Sterilisasi ini dilakukan menggunakan *autoclave* model S-90N dengan cara menyiapkan alat-alat gelas terlebih dahulu, kemudian dicuci, dikeringkan, lalu dibungkus dengan kertas yang menutupi seluruh permukaan alat. Selanjutnya alat-alat tersebut dimasukkan dalam *autoclave* model S-90N dengan temperatur 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Alat-alat tersebut lalu dikeringkan dan disimpan dalam oven pada suhu 80°C.

2.2. Pembuatan Media

2.2.1. Media Nutrient Agar

Media *Nutrient Agar* digunakan untuk meremajakan bakteri isolat ALP E1. Media ini dibuat dengan 1,4 g *Nutrient Agar* yang telah ditimbang dengan neraca analitik Ainsworth AA-160 dalam 50 mL aquades. Selanjutnya media dididihkan lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan sumbat, kemudian media disterilkan dalam *autoclave* model S-90N diletakkan dalam posisi miring.

2.2.2. Media Nutrient Broth

Media *Nutrient Broth* merupakan media yang digunakan sebagai media inokulum atau adaptasi bakteri. Media ini dibuat dengan cara melarutkan 0,26 g *Nutrient Broth* yang telah ditimbang dengan neraca analitik Ainsworth AA-160 dalam 20 mL aquades lalu dipanaskan hingga mendidih, kemudian ditutup dengan sumbat dan media disterilkan dalam *autoclave* model S-90N. Setelah itu, media disimpan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) Curma Model 9005-FL dan siap untuk digunakan.

2.2.3. Media Mineral Salt Medium (MSM)

Media *Mineral Salt Medium* (MSM) merupakan media selektif untuk pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Media ini dibuat dengan cara masing-masing bahan KH_2PO_4 0,2 gram, K_2HPO_4 0,5 gram, $(NH_4)_2SO_4$ 0,3 gram, NaCl 0,01 gram, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 gram, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02 gram, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001 gram, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,0002 gram, glukosa 0,03 gram dan yeast extract 0,003 gram yang telah ditimbang dengan neraca analitik Ainsworth AA-160, kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquades lalu dihomogenkan. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat lalu disterilkan dalam *autoclave* model S-90N. Setelah itu, media disimpan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) Curma Model 9005-FL dan siap untuk digunakan.

2.3. Uji Biosurfaktan

2.3.1. Uji Indeks Emulsifikasi (IE₂₄)

Indeks Emulsifikasi (IE₂₄) adalah aktivitas emulsifikasi pada hidrokarbon uji dan ditetapkan sebagai persentase tinggi lapisan emulsi (cm) dibagi total tinggi dari cairan kolom (cm) (Pereira *et al.*, 2013). Jumlah senyawa biosurfaktan yang terbentuk mempengaruhi kemampuan senyawa biosurfaktan dalam mengurangi tegangan pada permukaan cairan. Konsentrasi biosurfaktan berbanding lurus dengan jumlah bakteri yang terdapat di dalamnya (Anandaraj and Thivakaran., 2010).

Uji dilakukan dengan cara kultur cair bakteri disentrifus menggunakan sentrifus Model 225 Fisher Scientific dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Selanjutnya sebanyak 2 mL supernatan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL benzena dan n-heksana sebagai substrat non polar pembentuk emulsi. Campuran tersebut di vorteks dengan kecepatan tinggi selama 2 menit. Kriteria nilai indeks emulsifikasi yang baik adalah mencapai 50% keatas (Willumsen and Karlson, 2008). Nilai Indeks Emulsifikasi (IE₂₄) dapat dilihat menggunakan formula (1) dibawah ini

Indeks emulsifikasi (%) ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

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

2.3.2. 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 disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit sehingga supernatan dan pelet terpisah. Uji dilakukan dengan cara sebanyak 30 mL aquades dimasukkan ke dalam cawan petri pada tempat yang datar, kemudian ditambahkan 1 mL oli bekas. Setelah itu dimasukkan secara perlahan 20 µL supernatan kultur pada tengah lapisan oli bekas. Uji positif dapat teramati apabila terjadi zona bening akibat penyisihan lapisan oli bekas oleh biosurfaktan (Morikawa *et al.*, 2000).

2.3.3. Uji Drop Collapse

Uji *drop collapse* dilakukan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan. Sebelum melakukan uji, kultur bakteri disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit sehingga didapatkan supernatan. Uji ini dilakukan dengan meneteskan 20 µL minyak pelumas pada permukaan kaca (bersih) dan didiamkan selama 1 jam agar stabil. Selanjutnya, di atas tetesan minyak ditetesi supernatan sebanyak 10 µL. Tetesan supernatan di atas minyak akan berbentuk datar jika mengandung biosurfaktan (Bodour *et al.*, 1998).

2.4. Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen

Variasi konsentasi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi optimum sumber nitrogen pertumbuhan bakteri penghasil biosurfaktan. Sumber nitrogen yang digunakan meliputi ammonium sulfat, ammonium nitrat dan urea dengan variasi konsentrasi 0,26 % dan 0,35%. Pembuatan variasi konsentrasi diawali dengan membuat media NB terlebih dahulu kemudian diambil 1 ose bakteri isolat ALP E1 secara steril di dalam Laminar Air Flow (LAF) Curma Model 9005-FL lalu dibiakkan dalam 20 mL media NB, setelah itu biakan diinkubasi dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam.

Selanjutnya inokulum dipindahkan ke media kultivasi berupa media MSM dengan berbagai variasi sumber nitrogen yaitu ammonium sulfat, ammonium nitrat dan urea masing-masing konsentrasinya 0,26% dan 0,35%, kemudian media MSM yang telah mengandung sumber nitrogen, ditambahkan juga sumber karbon yang telah optimum yaitu minyak zaitun 10% [4]. Media kultivasi tersebut diinkubasi dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam.

2.5. Optimasi Produksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Optimasi produksi dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum produksi bakteri penghasil biosurfaktan. Optimasi produksi dilakukan dengan variasi waktu, pH, dan kadar salinitas media pertumbuhan bakteri dengan uji biosurfaktan.

2.5.1. Optimasi Waktu Produksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Optimasi waktu produksi bakteri isolat ALP E1 dilakukan sebagai parameter pengukuran uji emulsifikasi yang mana nilai indeks emulsifikasi dapat dijadikan sebagai salah satu parameter produksi biosurfaktan dengan dapat menentukan waktu optimum produksi selama 120 jam. Parameter waktu produksi bakteri ALP E1 diawali dengan cara 1 ose isolat bakteri ALP E1 diinokulasikan ke dalam 20 mL media cair NB, kemudian biakan bakteri diinkubasi dengan *shaker incubator* pada suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Setelah itu hasil biakan dipindahkan sebanyak 1% dari media NB ke dalam media MSM dengan berbagai variasi konsentrasi sumber nitrogen (ammonium sulfat, ammonium klorida, dan urea) dengan konsentrasi 0,26% dan 0,35% [11] yang telah ditambahkan minyak zaitun 10% sebagai sumber karbon optimum (Cahyani,2020). Selanjutnya biakan bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm selama 120 jam. Pengukuran nilai OD (*Optical Density*) dilakukan setiap 12 jam sekali. Sebanyak 0,3 mL kultur dan 2,7 mL aquades dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis Model Agilent Carry-100 pada panjang gelombang 600 nm. Setelah itu dilakukan uji biosurfaktan meliputi Indeks Emulsifikasi (IE₂₄), uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* [12].

2.5.2. Optimasi pH Bakteri Penghasil Biosurfaktan

Optimasi pH dilakukan untuk mengetahui pH yang optimal dalam produksi biosurfaktan. Optimasi pH dilakukan dengan cara hasil biakan bakteri isolat dari media NB dimasukkan sebanyak 1% ke dalam media MSM dengan campuran media MSM berupa sumber nitrogen (ammonium klorida, ammonium sulfat dan urea) dengan konsentrasi 0,26% dan 0,35% (Zuhri *et al.*, 2013) serta minyak zaitun 10% sebagai sumber karbon optimum (Cahyani, 2020) dengan variasi pH 4; 5; 6; 7; 8 dan 9 yang diukur menggunakan pH meter Metrohm Mobile 826. Biakan bakteri lalu diinkubasi pada suhu 30 °C menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm selama waktu produksi optimum dari masing-masing isolat bakteri. Kemudian dilakukan uji meliputi Indeks Emulsifikasi (IE₂₄), uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Yakimov *et al.*, 1995).

2.5.3. Optimasi Kadar Salinitas Bakteri Penghasil Biosurfaktan

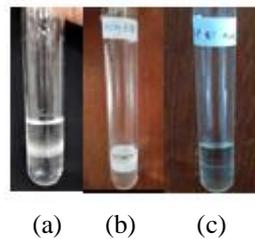
Optimasi kadar salinitas dilakukan untuk mengetahui kadar salinitas yang optimal untuk produksi biosurfaktan. Optimasi kadar salinitas dilakukan dengan cara inokulum NB dimasukkan sebanyak 1% ke dalam campuran media MSM berupa sumber nitrogen (ammonium klorida, ammonium sulfat dan urea) dengan konsentrasi 0,26% dan 0,35% (Zuhri *et al.*, 2013) serta minyak zaitun 10% sebagai sumber karbon optimum (Cahyani, 2020) lalu ditambahkan NaCl dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi NaCl yang ditambahkan adalah 0,5; 1; 3; 5 dan 9 %. Selanjutnya biakan bakteri diinkubasi pada suhu 30 °C menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm selama waktu dan pH optimum. Kemudian dilakukan uji meliputi Indeks Emulsifikasi (IE₂₄), uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* (Yakimov *et al.*, 1995).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Uji Biosurfaktan

3.1.1. Uji Indeks Emulsifikasi (IE₂₄)

Pada uji emulsifikasi, isolat yang telah di remajakan dan di kultivasi pada media selektif MSM, dilakukan pengujian dengan uji emulsifikasi. Uji emulsifikasi bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat untuk menghasilkan emulsi dengan penambahan pelarut organik non polar (benzena) sebagai variabel untuk menurunkan tegangan permukaan kedua zat yang berbeda kepolaran. Adapun hasil uji emulsifikasi dapat dilihat pada (Gambar 1).



Gambar 1. Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) Isolat ALP E1 pada (a) n-heksana (b) Benzena (c) Aquades

Isolat ALP E1 yang telah dikultivasi pada media MSM (Gambar 1) (a) menunjukkan hasil Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) sebesar 27% menggunakan pelarut organik non polar n-heksana dan (b) Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) 34% menggunakan pelarut organik non polar benzena. Penggunaan benzena sebagai pelarut organik non polar menunjukkan hasil yang lebih besar dibandingkan menggunakan n-heksana. Titik didih benzena lebih besar dari n-heksana sehingga menyebabkan benzena memiliki kelarutan yang lebih besar dibandingkan dengan n-heksana. Sedangkan (c) sebagai kontrol tidak dapat teremulsi karena perbedaan kepolaran antara n-heksana dan benzena yang bersifat hidrofobik dan air yang bersifat hidrofilik.

3.1.2. Uji *Drop Collapse*

Uji kualitatif biosurfaktan dapat dilihat dari kemampuannya dalam menurunkan tegangan permukaan. Salah satu uji kualitatif biosurfaktan adalah dengan uji *drop collapse* yang bertujuan untuk melihat kemampuan senyawa biosurfaktan dalam memecah atau menurunkan tegangan permukaan selama kurang dari 1 menit. Oli bekas dapat digunakan sebagai parameter pengujian *drop collapse*. Apabila hasil uji *drop collapse* menunjukkan penurunan tegangan permukaan lebih dari 1 menit maka biosurfaktan memiliki kualitas buruk dan belum bisa digunakan untuk proses bioremediasi (Youssef *et al.*, 2004). Adapun hasil pengujian *drop collapse* bakteri isolat ALP E1 ditunjukkan pada (Gambar 2).



Gambar 2. Uji *Drop Collapse* Isolat Indigen ALP E1 pada (a) Kontrol (b) Sampel

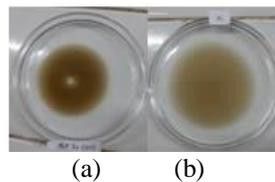
Pada uji *drop collapse*, bila bakteri ditambahkan 1 tetes oil kemudian menjadi mendatar atau melebar maka bakteri positif menghasilkan biosurfaktan, bila tetesan bentuknya tetap tidak ada perubahan menunjukkan hasil negatif (Plaza *et al.*, 2006).

Berdasarkan (Gambar 2) (a) Kontrol negatif yang digunakan berupa tetesan air pada bagian permukaan oli bekas. Hasil tetesan pada 52 yaitu cembung dan tidak mendatar. Hal ini menunjukkan bahwa air dan oli tidak dapat bercampur karena kedua zat berbeda kepolaran, sedangkan pada (b) berupa oli bekas yang ditetesi isolat ALP E1 menunjukkan bentuk tetesan yang mendatar dan melebar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri isolat ALP E1 mampu menurunkan tegangan permukaan.

3.1.3 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 positif dapat

teramati apabila terjadi zona bening akibat penyisihan lapisan oli bekas oleh biosurfaktan (Yakimov *et al.*, 1995). Adapun hasil pengujian *Oil Spreading* bakteri isolat ALP E1 dapat ditunjukkan pada (Gambar 3).



Gambar 3. Uji *Oil Spreading* Isolat Indigen ALP E1 pada (a) Kontrol (b) Sampel

Berdasarkan (Gambar 3) (a), bakteri isolat ALP E1 dapat memecah permukaan oli dan membentuk zona bening disekitar lapisan oli. Zona bening yang terbentuk berukuran 0,002 cm, sedangkan pada (b) kontrol negatif tidak membentuk zona bening karena air tidak dapat bercampur dengan oli bekas.

3.2. Variasi Konsentrasi Sumber Nitrogen

Sumber nitrogen yang digunakan pada tahap ini adalah ammonium sulfat, ammonium klorida dan urea. Variasi konsentrasi sumber nitrogen yang digunakan yaitu 0,26% dan 0,35%. Pada uji biosurfaktan yang telah dilakukan pada variasi sumber nitrogen, diperoleh data pada (Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3).

Tabel 1. Uji Indeks Emulsifikasi (IE₂₄)

Sumber Nitrogen	Indeks Emulsifikasi (IE ₂₄ %)	
	0,26 %	0,35%
Ammonium Sulfat	24%	41%
Ammonium Klorida	51%	37%
Urea	37%	10%

Tabel 2. Uji *Drop Collapse*

Sumber Nitrogen	Drop Collapse	
	0,26 %	0,35%
Ammonium Sulfat	+	+
Ammonium Klorida	+	+
Urea	+	+

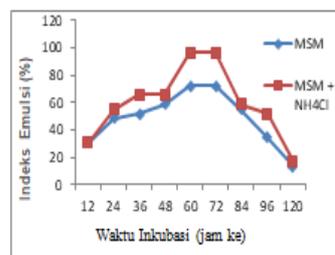
Tabel 3. Uji *Oil Spreading*

Sumber Nitrogen	Oil Spreading	
	0,26 %	0,35%
Ammonium Sulfat	5,4 cm	2,9 cm
Ammonium Klorida	5,2 cm	5,6 cm
Urea	6,3 cm	5,2 cm

Sumber nitrogen terbaik pada ammonium klorida 0,26%, dari semua variasi konsentrasi ammonium sulfat, ammonium klorida dan urea dengan indeks emulsifikasi optimum sebesar 51% pada (Tabel 1) serta membentuk zona bening dengan diameter 5,2 cm pada uji *oil spreading* ditunjukkan pada (Tabel 3). Sumber nitrogen seperti kalium nitrat, amonium klorida dan amonium sulfat dapat digunakan untuk produksi biosurfaktan. Kalium nitrat adalah sumber nitrogen sederhana terbaik dari enam yang sumber nitrogen (ammonium sulfat, urea, *yeast extract*, kalium nitrat, pepton, dan ammonium klorida) yang diuji, penurunan tegangann permukaan tertinggi tertinggi lainnya diikuti pada amonium klorida dan ammonium sulfat (Tayebeh *et al.*, 2013).

3.3. Produksi Optimum Isolat Indigen ALP E1 sebagai Penghasil Biosurfaktan

Optimasi waktu produksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1 bertujuan menentukan lamanya waktu inkubasi optimum untuk menghasilkan biosurfaktan. Optimasi produksi dilakukan dengan penambahan 0,26% ammonium klorida sebagai sumber nitrogen dan 10% minyak zaitun sebagai sumber karbon optimum, yang dicampurkan bersamaan pada media pertumbuhan *Mineral Salt Medium* (MSM) sebagai kontrol tanpa penambahan sumber nitrogen optimum. Pada penelitian ini waktu optimum produksi biosurfaktan dilakukan selama 120 jam dan dilakukan setiap 12 jam sekali selama waktu inkubasi. Sebagai parameter pengukuran dilakukan uji emulsifikasi yang mana nilai indeks emulsifikasi dapat dijadikan sebagai salah satu parameter produksi biosurfaktan dan dapat menentukan waktu optimum produksi. Penentuan waktu optimum produksi biosurfaktan isolat ALP E1 dapat dilihat pada (Gambar 4).

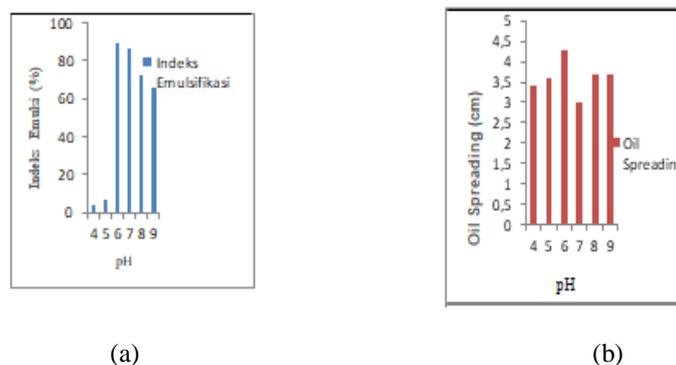


Gambar 4. Waktu Optimum Produksi Biosurfaktan dengan Indeks Emulsifikasi (IE₂₄)

Berdasarkan Indeks Emulsifikasi (IE₂₄) yang diperoleh (Gambar 4), bakteri isolat ALP E1 dengan sumber nitrogen ammonium klorida 0,26% serta penambahan minyak zaitun 10% sebagai sumber karbon optimumnya, diperoleh indeks emulsifikasi dengan waktu optimum pada jam ke-72 yaitu sebesar 96,55% dan nilai Indeks Emulsifikasi (IE₂₄) yang diperoleh dengan tanpa penambahan sumber nitrogen, diperoleh indeks emulsifikasi dengan waktu optimum pada jam ke-72 sebesar 72,41%.

3.4. pH Optimum Produksi Isolat Indigen ALP E1 sebagai Penghasil Biosurfaktan

Bakteri isolat ALP E1 ditumbuhkan pada media dengan berbagai perlakuan pH, yaitu 4;5;6;7;8, dan 9. Kondisi pH pada media adalah parameter penting untuk memproduksi biosurfaktan. Keenam perlakuan pH tersebut diinkubasi menggunakan waktu inkubasi optimum yaitu pada jam ke-72. Perlakuan yang digunakan berupa media selektif yang ditambahkan sumber nitrogen optimum ammonium klorida 0,26% dan sumber karbon optimum minyak zaitun 10%. Perlakuan pH pada media bertujuan menentukan kondisi pH optimum untuk menghasilkan biosurfaktan. Penentuan pH optimum ditentukan berdasarkan hasil uji biosurfaktan yaitu uji emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse*. Hasil pengamatan dapat dilihat pada (Gambar 5).

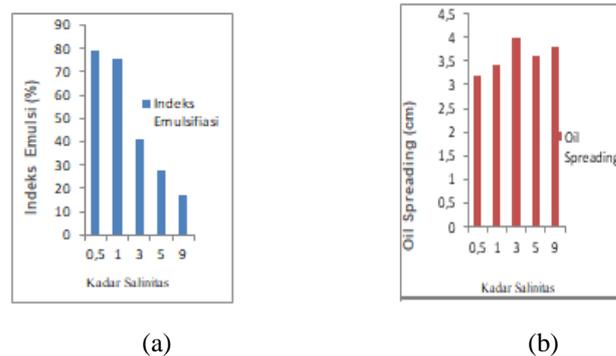


Gambar 5. (a) Indeks Emulsifikasi (IE₂₄) pada Optimasi Produksi pH Biosurfaktan (b) Uji *Oil Spreading* pada Optimasi Produksi pH Biosurfaktan

Berdasarkan data pH optimum pada (Gambar 5) (a) terlihat bahwa pH 6 menunjukkan pH optimum dengan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) yang dihasilkan mencapai 89,6% dan zona bening sebesar 4,3 cm. Kondisi optimum untuk produksi biosurfaktan ditunjukkan dengan tingginya indeks emulsifikasi yang dihasilkan (Suryanti *et al.*, 2009). Sedangkan pada (Gambar 5) (b), zona bening yang terbentuk paling besar yaitu 4,3 cm pada pH 6. Lingkungan asam adalah lingkungan terbaik bagi bakteri penghasil biosurfaktan yaitu berkisar pH 6,60- 6,71 pada suhu 35-36°C (Citra, 2019).

3.5. Kadar Salinitas Optimum Produksi Isolat Indigen ALP E1 sebagai Penghasil Biosurfaktan

Salinitas dapat berfungsi dalam membantu konsentrasi mineral di dalam sel. Kondisi salinitas yang terganggu akan berpengaruh juga terhadap pertumbuhan sel dan biosurfaktan yang dihasilkan (Budiarti, 2000). Penambahan konsentrasi NaCl ke dalam media kultur akan mempengaruhi biosurfaktan yang dihasilkan. Konsentrasi NaCl yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah 0,5;1;3;5, dan 9 %. Kelima perlakuan tersebut diinkubasi sesuai dengan waktu dan pH optimum pada isolat indigen ALP E1. Pengaruh konsentrasi NaCl pada media ditentukan berdasarkan hasil uji biosurfaktan yaitu uji emulsifikasi, uji *oil spreading*, dan uji *drop collapse* agar diperoleh kadar salinitas optimum untuk menghasilkan biosurfaktan. Kadar salinitas optimum produksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1 yang ditumbuhkan pada sumber nitrogen ammonium klorida 0,26% dan minyak zaitun 10% pada pH dan waktu inkubasi optimum dapat dilihat pada (Gambar 6).



Gambar 6. (a) Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) pada Optimasi Produksi Kadar Salinitas Biosurfaktan
(b) Uji Oil Spreading pada Optimasi Produksi Kadar Salinitas Biosurfaktan

Berdasarkan grafik diagram pada (Gambar 6) (a) dapat diketahui bahwa isolat ALP E1 mempunyai kemampuan dalam memproduksi biosurfaktan pada kadar salinitas optimum berada pada 0,5% yang memiliki nilai indeks emulsifikasi sebesar 79,31% dan membentuk zona bening uji oil spreading sebesar 3,2 cm yang ditunjukkan pada (Gambar 6) (b).

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 *Pseudomonas aeruginosa* (Kumar, 2012). Hal ini yang menyebabkan penambahan NaCl menurunkan produksi biosurfaktan pada bakteri ditandai dengan adanya penurunan nilai indeks emulsifikasi.

4. Kesimpulan

Bakteri isolat ALP E1 menggunakan sumber nitrogen terbaik ammonium klorida sebagai media pertumbuhannya berpotensi menghasilkan biosurfaktan. Kondisi optimum produksi biosurfaktan dari bakteri isolat ALP E1 yaitu selama 72 jam dengan sumber nitrogen ammonium klorida 0,26% dan sumber karbon minyak zaitun 10% pada pH 6 dan kadar salinitas sebesar 0,5% dengan Indeks Emulsifikasi (IE_{24}) 79,31% merupakan kondisi optimum terbaik untuk memproduksi biosurfaktan.

Daftar Pustaka

- Anandaraj B and Thivakaran P. 2010. Isolation and production of biosurfactant producing organism from oil spilled soil, *Journal Biosciens Technology*. 1:120-126
- Aparna A., Srinikethan G., and Hedge S. 2011. Effect of Addition of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas* spp. on Biodegradation of Crude Oil. In: *2nd International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering: 6IACSIT Press* Singapore. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.01.043>
- Banat IM., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti MG., Fracchia L., Smyth TJP., and Marchant R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol. Biotechnol.*87:427-444. doi:<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>
- Budiarti RS. 2000. Optimasi Konsentrasi Crude Oil dan Sumber Nitrogen Pada Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Hidrokarbonoklastik. Bandung.
- Bodour AA., Miller RM., and Maier,. 1998. Application of a modified drop collapsing test technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant producing microorganism. *Journal of Microbiology*. 32: 273-280. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00031-1)
- Cahyani VD. 2020. Seleksi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Dari Mikroba Indigen dan Optimasi Produksi Pada Sumber Karbon Yang Berbeda. Lampung.
- Citra S. 2019. Screening Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Air Laut Tercemar Minyak di Pelabuhan Panjang, Lampung.
- Kumar S. 2012. *Textbook of Microbiology*. Jaypee. New Delhi.
- Morikawa M., Hirata Y., and Imanaka T. 2000. A Study on the structure function relationship of lipopeptides biosurfactants. *Journal of Biochimica et Biophysica Acta*. 1488:211-218. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00124-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00124-4)
- Piróllo MP., Mariano AP., Lovaglio R., Costa SG., Walter V., Hausmann R., and Contiero J. 2000-2013. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon contaminated site. *J. Appl. Microbiol.* ISSN: 1516-294-X. 1484-1490.
- Plaza GAI., Zjawiony and Banat IM. 2006. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 50:71-77. doi: <https://doi.org/10.1016/J.PETROL.2005.10.005>
- Pereira JPB., Gudiña EJ., Cosra R., Vitorino JA., Teixeira, Coutinho LR., and Rodrigues. 2010. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery. *Appl. Fuel*, 111:259-268. doi: 10.1016/j.fuel.2013.04.040
- Suryanti V., Hastuti S, Wahyuningsih TD., Mudasir, and Muliawati DI. 2009. Biosurfactants production by *Pseudomonas aeruginosa* using soybean oil as substrate. *Indonesian Journal Chemistry*. 9(1):107-112. doi:<https://doi.org/10.22146/ijc.21570>
- Tayebeh F., Aidil B., Wan M., Wan F., Nasrin N and Zahra S. 2013. Production of biosurfactant by Indigenous Isolated Bacteria in Fermentation System. School of Biosciences and Biotechnology, Malaysia. *Molecular Microbiology Review*. 61: 47-64.
- Willumsen PA and Karlson U. 2008. Screening of bacteria isolated from PAH contaminated soils for production of biosurfactant and bioemulsifiers. *Journal Of Biodegradation*. 7:415-423 doi:10.1007/BF00056425
- Yakimov MM., Timmis KN., Wray, and Fredrickson HL. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *J Appl Environ Microbiol*. 61(5):1706-1713.
- Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., and McInerney MJ. 2004. Comparison of methods for detecting biosurfactant production by various microorganisms, *Journal of Microbiological Methods*. 56(3):339-347. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.11.001>
- Zuhri R., Anthoni A., and Yetria R. 2013. Effect of carbon and nitrogen sources on alkaline protease production from *Bacillus* sp. M1.2.3 thermophilic. *Journal of Biology*. 2(1):40-46.