Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati, Vol. 8(2): 179-188, Juni 2023
p-ISSN 2527-3221, e-ISSN 2527-323X, https://ojs.uajy.ac.id/index.php/biota
DOI: 10.24002/biota.v8i2.6360

Potensi *Bacillus* spp. sebagai Penghasil Biosurfaktan untuk Pengolahan Limbah Minyak Pelumas

Potency of *Bacillus* spp. as Biosurfactant Resources for Processing of Waste Lubricating Oil

Khaleeda Zia[1], Tetty Marta Linda[1*]

[1]Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau
Kampus Bina Widya, Jl. HR Soebrantas Km. 12,5 Simpang Baru, Pekanbaru 28293, Riau, Indonesia
Email: tetty.martalinda@gmail.com **Penulis Korespondensi*

Abstract

Biosurfactants are extracellular macromolecules produced by microorganisms that not only have environmentally friendly properties, but also have many functions, one of them is emulsification of oil waste. This study aims to determine the potency of isolates *Bacillus* spp in producing biosurfactant compounds for processing of waste lubricating oil. The research methods were determination of emulsification index and analyzing emulsification activity (drop collapse test, oil spreading technique and surface tension test) of *Bacillus* spp., culture supernatant, also characterization of biosurfactants with Thin Layer Chromatography (TLC). Supernatants of all three isolates of *Bacillus* spp. showed positive results with drop collapse test and oil spreading technique. The highest clear zone diameter and emulsification index (E24) was obtained from *Bacillus* sp 48 of 10.2 mm and 99.5%, respectively. Based on TLC results, it is known that biosurfactants produced by the three isolates of *Bacillus* spp bacteria are lipopeptide groups. *Bacillus* spp. which reduced surface tension of lubricating oil is *Bacillus* sp 48 (19.7 dyne/cm), *Bacillus* sp 34 (17.9 dyne/cm), and *Bacillus* sp 84 (15.7 dyne/cm). Biosurfactants of all three isolates of *Bacillus* spp. has potency to be developed in various industrial fields.

Keywords: *Bacillus* spp., Biosurfactant, Emulsification, Lipopeptide, Lubricating oil

Abstrak

Biosurfaktan adalah makromolekul ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang memiliki sifat ramah lingkungan serta memiliki berbagai fungsi salah satunya untuk emulsifikasi limbah minyak. Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi isolat *Bacillus* spp. dalam menghasilkan senyawa biosurfaktan untuk pengolahan limbah minyak pelumas. Metode yang digunakan adalah penetapan indeks emulsifikasi dan analisis aktivitas emulsifikasi (*drop collapse test*, *oil spreading technique*, uji tegangan muka) dari supernatan kultur *Bacillus* spp., serta karakterisasi biosurfaktan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Supernatan dari ketiga isolat *Bacillus* spp. menunjukkan hasil positif dengan uji *drop collapse test* dan *oil spreading technique* dengan diameter zona bening tertinggi diperoleh dari *Bacillus* sp 48 sebesar 10,2 mm, serta nilai indeks emulsifikasi (E24) sebesar 99,5%. Berdasarkan hasil KLT diketahui bahwa biosurfaktan yang dihasilkan oleh ketiga isolat bakteri *Bacillus* spp. adalah golongan lipopeptida. *Bacillus* spp. yang dapat menurunkan tegangan permukaan dari minyak pelumas adalah *Bacillus* sp 48 yaitu sebesar 19,7 dyne/cm, *Bacillus* sp 34 sebesar 17,9 dyne/cm dan *Bacillus* sp 84 sebesar 15,7 dyne/cm. Biosurfaktan dari ketiga isolat *Bacillus* spp. berpotensi dikembangkan dalam berbagai bidang industri.

Kata kunci: *Bacillus* spp., Biosurfaktan, Emulsifikasi, Lipopeptida, Minyak pelumas

Diterima: 28 Agustus 2022, Direvisi: 6 Januari 2023, Disetujui: 13 Februari 2023

Copyright© 2023. Khaleeda Zia, Tetty Martha Linda

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

How to Cite: Zia, K. & Linda, T. M. (2023). Potensi Bacillus spp. sebagai Penghasil Biosurfaktan untuk Pengolahan Limbah Minyak Pelumas. Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati 8(2): 179-188.

Pendahuluan

Permintaan pasar yang sangat besar untuk surfaktan saat ini dipenuhi oleh surfaktan kimia berbasis minyak bumi. Senyawa ini tidak ramah lingkungan dan sulit terurai. Peraturan lingkungan yang semakin ketat dan meningkatnya kesadaran akan perlunya melindungi ekosistem sehingga peningkatan minat pada biosurfaktan sebagai alternatif terus dikembangkan.

Biosurfaktan merupakan biomolekul kompleks yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti bakteri (El-Sheshtawy *et al.,* 2015; Santos *et al*., 2019), aktinomisetes (Chakrabortya *et. al*., 2015) dan jamur (Sena *et al*., 2018). Surfaktan yang disintesis oleh mikroorganisme memiliki sifat aktif permukaan yang berbeda dengan surfaktan yang disintesis secara kimiawi. Hal ini yang menyebabkan senyawa biosurfaktan menjadi salah satu sumber energi alternatif yang dapat digunakan sebagai penurun tegangan permukaan dan menstabilkan emulsi sehingga molekul-molekul hidrokarbon dapat larut dalam air (Sari *et al*., 2015). Biosurfaktan dapat mengurangi tegangan permukaan dalam campuran berair dan hidrokarbon. Menurut Takahashi *et al.,* (2011) biosurfaktan memiliki struktur penyusun biomolekul kompleks terdiri atas lipopeptida, glikolipid, fosfolipid, lipoprotein, dan polimerik surfaktan. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme memiliki sifat stabil secara fisika dan kimia, tidak toksik dan mudah terurai (Ciccyliona & Nawfa 2012). Biosurfaktan banyak digunakan pada berbagai industri diantaranya kosmetik dan farmasi (Adu *et. al*., 2020), bahan kimia dan makanan (Ali *et al*., 2022), pertanian sebagai bahan tambahan fungisida (Kurniadie *et al*., 2017) dan pemulihan minyak yang mencemari lingkungan (Deng *et al*., 2020).

Aplikasi untuk mengatasi cemaran hidrokarbon menarik diteliti karena hidrokarbon tersusun atas senyawa komplek yang sulit untuk diuraikan. Bioremediasi menggunakan mikroorganisme yang dapat memproduksi biosurfaktan dianggap sebagai alternatif untuk mengatasi cemaran hidrokabon. Stancu (2020) melaporkan bakteri *Bacillus megaterium* strain IBBPo17 memiliki kemampuan untuk menghasilkan biosurfaktan pada substrat n-heksadekane dan menunjukkan indeks emulsifikasi yang baik pada medium yang dilengkapi dengan pepton proteosa (52%), ekstrak ragi (50%), pati (48%), dan selulosa (45%). Penelitian Bukhori *et al.,* (2022) bakteri filosfer dari tanaman *Colocasia esculenta* L. yaitu *Bacillus cereus* dan *Alcaligenes faecalis* pada *Bushnell-Haas Broth medium* (BHB) dengan minyak zaitun (2%) sebagai substrat menurunkan nilai tegangan permukaan sebesar 35 hingga 39 mN/m. Phulpoto *et al*., (2020) juga telah melaporkan bahwa bakteri *Bacillus nealsonii* S2MT dapat menghasilkan salah satu jenis biosurfaktan yang termasuk golongan lipopeptida berdasarkan analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Bacillus nealsonii* S2MT mampu menurunkan tegangan permukaan sebesar 34,15 ± 0,6 dyne/cm. Penelitian Ghazala *et al*., (2017) berdasarkan uji KLT yang dilakukan menunjukkan biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus mojavensis* adalah jenis lipopeptida dan menunjukkan indeks emulsifikasi mencapai 62% dalam 3 hari inkubasi. Biosurfaktan memiliki beragam manfaat sehingga perlu dilakukan eksplorasi pada berbagai strain bakteri yang dapat memproduksi biosurfaktan dengan kemampuan terbaik. Bakteri B*acillu*s spp. diketahui menghasilkan biosurfaktan yang dapat dikembangkan untuk mengatasi cemaran hidrokarbon (El-Sheshtawy *et.al*., 2015) dan sebagai antibakteri (Setiani *et al.,* 2020).

Tempat pembuangan sampah terdapat berbagai macam limbah, salah satunya adalah limbah minyak yang berasal dari kegiatan rumah tangga dan bengkel kendaraan bermotor. Limbah minyak pada tempat pembuangan sampah mengandung berbagai macam mikroorganisme yang dapat mendegradasi minyak. Pada penelitian ini digunakan *Bacillus* spp. yang diisolasi dari Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Muara Fajar, Pekanbaru yang bertujuan untuk mengetahui potensinya dalam memproduksi biosurfaktan untuk pengolahan limbah minyak pelumas.

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah shaker inkubator (*LabTech*), tensiometer (*CSC-DuNouy*), sentrifus (*Benchmark*), vorteks (*Fisons; Whirli Mixer*), pH meter (*PH-009-A*), jangka sorong, tabung reaksi, labu erlenmeyer, cawan petri, tip mikro (ukuran 100 µl), pipet mikro (ukuran 100 µl), tabung falcon, parafilm, tips dan plat kromatografi lapis tipis. Penelitian ini menggunakan koleksi isolat bakteri *Bacillus* spp. di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA, UNRI yang diisolasi dari Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Muara Fajar Pekanbaru, yaitu: *Bacillus* sp 48, *Bacillus* sp 34 dan *Bacillus* sp 84 yang tersimpan di dalam gliserol, minyak pelumas baru dengan sampel Pertamina Prima Xp 20W-50, limbah minyak pelumas bekas dari kegiatan bengkel kendaraan bermotor (bengkel resmi Honda Jl. Soebrantas. Pekan Baru, Riau), *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), *minimal salt medium* (MSM), reagen ninhidrin, kloroform, metanol, aseton, akuades dan tisu.

Prosedur kerja

Penelitian dimulai dengan peremajaan masing-masing isolat bakteri *Bacillus* sp 48, *Bacillus* sp 34 dan *Bacillus* sp 84. Ketiga isolat *Bacillus* spp. Sebanyak 100 µL ditumbuhkan dalam 5 mL medium NB dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* kecepatan 150 *rpm* selama 24 jam. Selanjutnya, sebanyak 1 mL masing-masing kultur ditumbuhkan secara *pour plate* pada media NA. Koloni bakteri *Bacillus* spp. yang sudah tumbuh selanjutnya disimpan pada agar miring untuk digunakan pada penelitian tahap berikutnya.

Produksi biosurfaktan merujuk pada penelitian Nunal *et al.,* (2014). Masing-masing inokulum isolat bakteri *Bacillus* spp. diinokulasikan sebanyak 5 mL (populasi 10^8 cfu/mL) dalam 45 mL *nutrient broth* dan diinkubasi selama 24 jam menggunakan *shaker incubator* kecepatan 150 *rpm*. Selanjutnya hasil fermentasi kultur bakteri dipisahkan dengan sentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 rpm untuk memisahkan supernatan dari sel bakteri. Supernatan hasil fermentasi digunakan untuk uji aktivitas biosurfaktan yaitu: *Drop Collapse Test* sebagai skrining awal untuk melihat aktivitas emulsifikasi yang dianalisis melalui terbentuknya lapisan emulsi, *Oil Spreading Technique* dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk, karakterisasi biosurfaktan menggunakan KLT dengan melihat bercak warna yang terbentuk dari hasil supernatan saat ditotolkan pada plat KLT.

Aktivitas emulsifikasi pada penelitian ini merujuk pada Wibisana (2018). Masing-masing inokulum bakteri *Bacillus* spp. (populasi 10^8 cfu/mL) sebanyak 3 mL ditambahkan pada 3 mL minyak pelumas di dalam tabung reaksi dan divorteks selama 2 menit dengan kecepatan tinggi. Sebagai kontrol, 3 mL akuades steril ditambahkan dengan 3 mL minyak pelumas dan divorteks selama 2 menit. Minyak pelumas yang diujikan adalah minyak pelumas baru dan bekas yang berfungsi sebagai substrat. Masing-masing percobaan dibuat sebanyak tiga ulangan. Pengamatan dilakukan secara visual dan menghitung lapisan emulsi (E24) yang terbentuk selama 24 jam.

$$\text{Indeks emulsi} = \frac{\text{tinggi lapisan emulsi (X)}}{\text{tinggi total larutan (Y)}} \times 100\%$$

Uji *drop collapse test* dilakukan dengan meneteskan masing-masing 25 µL minyak pelumas bekas dan baru sebagai substrat di atas permukaan parafilm selama 1 jam hingga stabil. Kemudian, ditetesi dengan 10 µL supernatan kultur bakteri dan 10 µL akuades steril sebagai kontrol negatif. Pengamatan dilakukan 2-3 menit dengan melihat bentuk tetesan yang terbentuk pada permukaan (Wibisana, 2018).

Oil spreading technique dilakukan dengan menuangkan akuades steril sebanyak 25 mL ke cawan petri yang selanjutnya ditetesi masing-masing 50 µl minyak pelumas baru dan minyak pelumas bekas sebagai substrat. Selanjutnya ditetesi 10 µL supernatan kultur bakteri dan 10 µL akuades steril sebagai kontrol negatif (Wibisana, 2018). Diameter zona bening yang terbentuk kemudian diamati dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Karakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing *Bacillus* spp. di analisis secara kromatografi lapis tipis (KLT). Supernatan yang mengandung biosurfaktan sebanyak 10 µL diuji menggunakan plat KLT menggunakan eluen: metanol, kloroform dan air (25:65:4, v/v/v). Bercak warna yang terbentuk divisualisasikan dengan menyemprotkan reagen ninhidrin dan dihitung nilai Rf (Das *et al.* 2008). Uji tegangan permukaan menggunakan tensiometer sebagai uji kuantitatif yang merujuk pada Ni'matuzahroh, (2019). Masing-masing kultur isolat bakteri *Bacillus* spp. sebanyak 5 mL (populasi 10^8 cfu/mL) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi 45 mL medium MSM yang telah ditambahkan 0,5 mL minyak pelumas. Erlenmeyer diinkubasi selama 72 jam dengan suhu 30 °C menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 150 *rpm*. Diakhir inkubasi, masing-masing inokulum disentrifugasi dengan kecepatan 6000 *rpm* selama 15 menit. Sebanyak 10 ml supernatan hasil fermentasi diambil untuk dilakukan pengukuran nilai tegangan permukaan menggunakan tensiometer *CSC-DuNouy* dengan melihat gaya yang diperlukan cincin iridium untuk terlepas setelah dicelupkan pada permukaan sampel uji. Besar tegangan suatu permukaan dinyatakan dalam mN/m atau dyne/cm. Masing-masing perlakuan dibuat dengan tiga ulangan. Hasil pengukuran uji *oil spreading technique*, aktivitas emulsifikasi, dan tegangan permukaan dengan substrat pelumas bekas dan baru masing-masing dianalisa menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Hasil dan Pembahasan

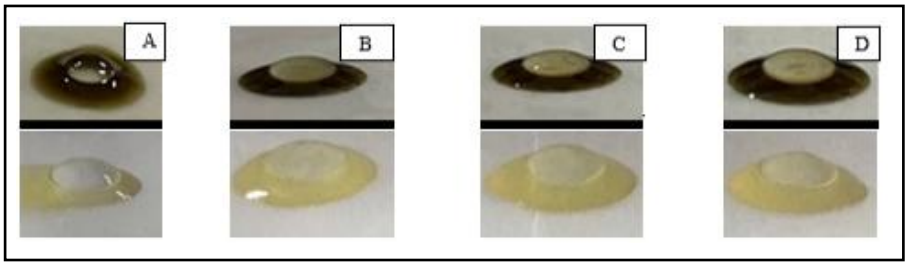
Hasil pengamatan uji kualitatif kemampuan isolat *Bacillus* sp 48, *Bacillus* sp 34 dan *Bacillus* sp 84 menghasilkan biosurfaktan pada substrat minyak pelumas bekas dan baru dilakukan dengan uji *drop collapse test, oil spreading technique* aktivitas emulsifikasi dan karakterisasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Uji *drop collapse*

Hasil uji *drop collapse* supernatan dari fermentasi kultur ketiga isolat bakteri *Bacillus* spp. pada Tabel 1 dan visualisasi pada Gambar 1 yang menunjukkan hasil positif pada substrat minyak pelumas bekas dan baru. Hasil positif menunjukkan adanya kandungan biosurfaktan pada supernatan yang dapat dilihat dari bentuk tetesan datar dan melebar, sedangkan pada kontrol dengan menggunakan akuades steril menunjukkan hasil negatif yang dilihat dari tetesan berbentuk bulat cembung. Bagian supernatan yang bersifat hidrofilik mampu berikatan dengan bagian parafilm yang bersifat hidrofilik, kemudian bagian supernatan yang bersifat hidrofobik berikatan dengan bagian hidrofobik minyak.

Tabel 1. Hasil *Drop collapse test* dari supernatan hasil fermentasi kultur bakteri *Bacillus* spp. menggunakan medium NB setelah inkubasi 24 jam.

Isolat	Minyak pelumas bekas	Minyak pelumas baru
Bacillus sp 48	positif	positif
Bacillus sp 34	positif	positif
Bacillus sp 84	positif	positif
Kontrol	negatif	negatif



Gambar 1. Perbandingan *drop collapse test* dari supernatan hasil fermentasi kultur ketiga isolat *Bacillus* spp. terhadap minyak pelumas bekas (bagian atas) dan baru (bagian bawah). (A): kontrol akuades (B): *Bacillus* sp 48, (C): *Bacillus* sp 34, (D): *Bacillus* sp 84.

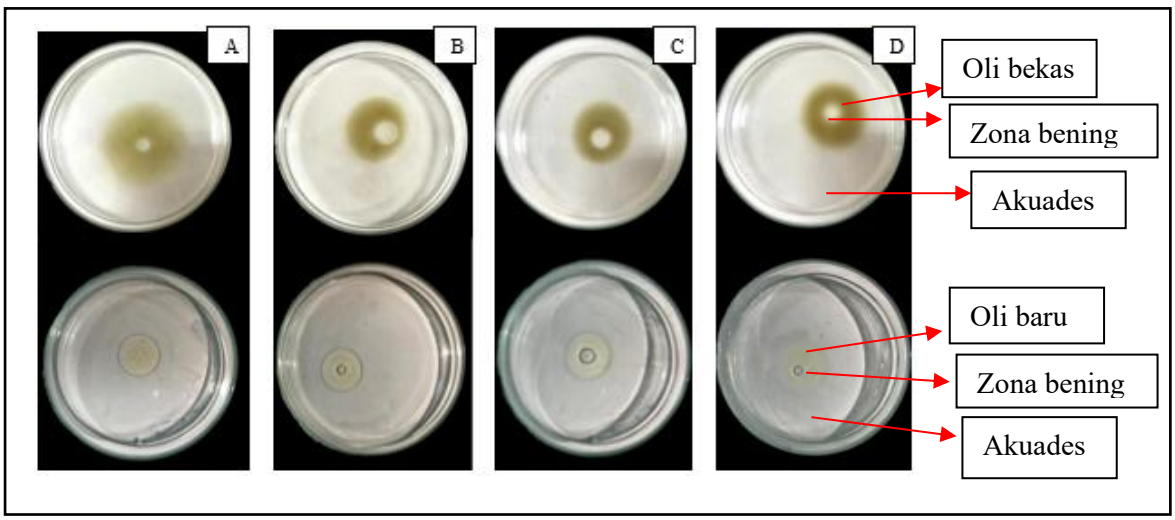
Menurut Rodriguez *et al.,* (2015) bentuk tetesan mendatar menandakan adanya penurunan tegangan permukaan yang disebabkan oleh gaya adhesi dan gaya kohesi sama besar antara biosurfaktan, minyak dan parafilm. Bentuk tetesan cembung menandakan tidak adanya penurunan nilai tegangan permukaan minyak pelumas yang diakibatkan oleh gaya kohesi yang lebih besar antara partikel sejenis dibandingkan gaya adhesi. Bentuk tetesan yang cembung dikarenakan bagian hidrofobik pada minyak tidak dapat terikat pada bagian parafilm yang bersifat hidrofilik (Wibisana, 2018). Hasil penelitian Citra & Nurhasanah (2021) 12 isolat bakteri yang diisolasi dari air laut yang tercemar minyak solar dan oli di Pelabuhan Panjang, Lampung menunjukkan positif uji *drop collaps*e yang dilihat dari bentuk tetesan supernatan sampel pada minyak pelumas bekas yang melebar dan mendatar, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades menghasilkan bentuk tetesan bulat dan tidak melebar. Menurut Riyanto *et al.,* (2021), metode *drop collapse* dinilai tidak terlalu sensitif dikarenakan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari bentuk tetesan masing-masing supernatan isolat. Namun destabilisasi dari tetesan yang terbentuk dapat digunakan sebagai skrining tahap awal keberadaan senyawa biosurfaktan.

Oil spreading technique (OST)

Hasil pengukuran diameter zona bening pada *oil spreading thecnique* (OST) menggunakan substrat minyak pelumas dari ketiga isolat bakteri *Bacillus* spp. dapat dilihat pada Tabel 2. Zona bening yang dihasilkan oleh supernatan dari ketiga isolat *Bacillus* spp. pada substrat minyak pelumas baru dan bekas berbeda nyata untuk setiap uji isolat *Bacillus* spp. Diameter zona bening tertinggi ditunjukkan oleh *Bacillus* sp 48 sebesar 10,2 ± 0,00 mm pada substrat minyak pelumas bekas. Perbedaan besar zona bening yang terbentuk untuk masing-masing isolat *Bacillus* uji diduga adanya perbedaan jumlah produksi biosurfaktan.

Tabel 2. Hasil Uji Kualitatif *Oil Spreading Technique* dari Supernatan Hasil Fermentasi Kultur Ketiga Isolat *Bacillus* spp. Setelah Inkubasi 24 jam

Isolat	Diameter zona bening (mm)	
	minyak pelumas bekas	minyak pelumas baru
Bacillus sp 48	$10,2 \pm 0,00^{d}$	$5,2 \pm 0,06^{d}$
Bacillus sp 34	$8,5 \pm 0,08^{c}$	$7,3 \pm 0,17^{c}$
Bacillus sp 84	$6,6 \pm 0,01^{b}$	$4,5 \pm 0,15^{b}$
Kontrol	$4,3 \pm 0,05^{a}$	0^{a}



Gambar 2. Zona bening pada uji *oil spreading technique* setelah ditetesi masing masing supernatan dari 3 isolat bakteri pada substrat minyak pelumas bekas (atas) pelumas baru (bawah). (A): Kontrol (B): *Bacillus* sp 48, (C): *Bacillus* sp 34, (D): *Bacillus* sp 84.

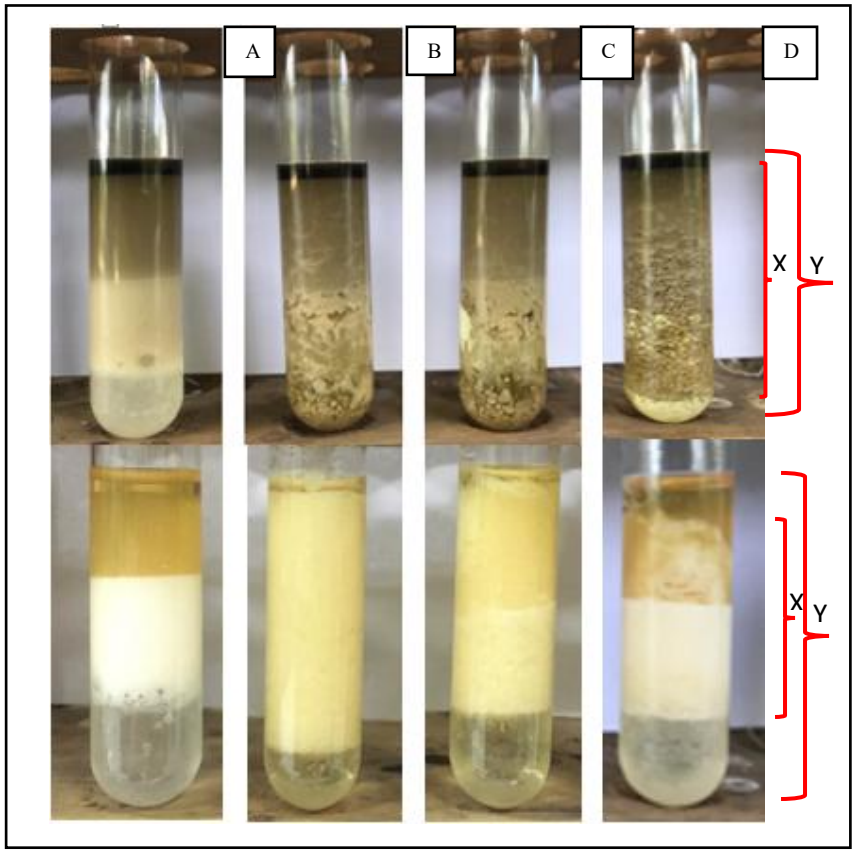
Nilai tegangan permukaan air lebih tinggi yaitu 72 dyne/cm (Desai & Banat, 1997) dibanding nilai tegangan permukaan minyak pelumas bekas pada penelitian ini yaitu sebesar 57,5 ± 0,2 dyne/cm. Hal ini mengakibatkan terjadi tekanan dari air yang diteteskan terhadap lapisan minyak pelumas bekas sehingga dapat membentuk zona bening pada kontrol negatif. Kontrol positif menggunakan minyak pelumas baru dengan nilai tegangan permukaan lebih besar dibanding air aquades steril, yaitu sebesar 103 ± 1 dyne/cm (Priyatno, 2015) menyebabkan tetesan air yang diberikan tidak dapat menekan lapisan minyak pelumas baru sehingga tidak terbentuk zona bening.

Aktivitas emulsifikasi

Nilai indeks emulsifikasi dapat dilihat pada Tabel 3 untuk ketiga isolat bakteri *Bacillus* spp. Aktivitas emulsifikasi dapat dilihat pada Gambar 3 yang ditandai dengan terbentuknya lapisan emulsi lebih tinggi yang menandakan adanya senyawa biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri.

Tabel 3. Nilai Indeks Emulsifikasi oleh Kultur Isolat *Bacillus* spp. Setelah Inkubasi Selama 24 jam

Isolat	Indeks emulsifikasi (E24)	
	minyak pelumas bekas	minyak pelumas baru
Bacillus sp 48	99,5 % ± 0,1^{b}	75,3 % ± 1,2^{d}
Bacillus sp 34	99,4 % ± 0,2^{b}	72,7 % ± 1,2^{c}
Bacillus sp 84	99,0 % ± 1,5^{b}	56,0 % ± 0,5^{b}
Kontrol	87,5 % ± 0,0^{a}	33,6 % ± 1,2^{a}



Gambar 3. Perbandingan lapisan emulsi dari ketiga isolat bakteri pada substrat minyak pelumas bekas (atas) dan baru (bawah) setelah inkubasi 42 jam. (A): kontrol, (B): *Bacillus* sp 48, (C): *Bacillus* sp 34, (D): *Bacillus* sp 84, (X): Tinggi emulsi, (Y): Total larutan.

Tabel 3 menunjukkan emulsifikasi *Bacillus* spp. berbeda nyata dengan kontrol pada substrat minyak pelumas bekas, tetapi aktivitas emulsifikasi pada masing-masing isolat tidak berbeda nyata. Isolat *Bacillus* spp pada substrat minyak pelumas baru menunjukkan *Bacillus* sp 48, *Bacillus* sp 34, *Bacillus* sp 84 berbeda nyata dengan kontrol. Emulsi (E24) dihasilkan oleh ketiga isolat pada substrat minyak pelumas bekas berbanding minyak pelumas baru (Gambar 3). Secara deskriptif dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan dari bentuk lapisan emulsi antara perlakuan dengan kontrol. Uji emulsifikasi dengan menggunakan ketiga isolat bakteri *Bacillus* spp. menunjukkan lapisan emulsi menggumpal, sedangkan kontrol negatif dengan menggunakan akuades steril menunjukkan lapisan yang halus dan tidak membentuk gumpalan-gumpalan.

Menurut Reningtyas & Mahreni (2015) struktur senyawa biosurfaktan tersusun atas dua bagian dengan jenis kepolaran yang berbeda yaitu bagian ekor bersifat hidrofobik dan bagian kepala bersifat hidrofilik. Interaksi yang terjadi antara bagian hidrofobik dan hidrofilik tersebut menyebabkan supernatan yang mengandung biosurfaktan mampu melarutkan minyak sehingga membentuk emulsi. Lapisan emulsi yang terbentuk dihitung indeks emulsifikasinya dengan menghitung tinggi lapisan emulsi terhadap tinggi total larutan yang sudah stabil setelah inkubasi selama 24 jam.

Karakterisasi biosurfaktan dengan KLT

Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) masing masing isolat bakteri *Bacillus* spp. menunjukkan adanya bercak warna ungu di atas pemukaan pelat silika gel setelah penyemprotan dengan reagen ninhidrin (Gambar 4). Menurut Zampolli (2022) uji KLT dengan reagen ninhidrin digunakan untuk mendeteksi keberadaan amina atau-asam amino. Kandungan senyawa dari biosurfaktan yang dihasulkan di duga lipopeptida. Ghazala *et al*., (2017) hasil KLT menunjukkan biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Bacillus mojavensis* adalah jenis lipopeptida. Menurut Das *et.al.,* (2008) lipopeptida adalah subkelompok biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroba contohnya surfaktin, *fengycin*, iturin, *lichenysin*, dan kurstakin.

Ketiga isolat menunjukkan nilai Rf yang tidak jauh berbeda, yaitu *Bacillus* sp 48 sebesar 0,89; *Bacillus* sp 34 sebesar 0,90; dan *Bacillus* sp 84 sebeasar 0,90. Ketika nilai Rf yang dihasilkan berbeda, maka senyawa tersebut dapat dikatakan berbeda. Sedangkan jika nilai Rf yang dihasilkan sama menandakan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa dengan karakteristik yang sama. Kamar (2021) melaporkan nilai Rf selalu menghasilkan nilai kurang dari 1,0 dan dikatakan baik apabila menghasilkan nilai pada rentang 0,2- 0,8.



Gambar 4. Hasil KLT menggunakan eluen: metanol:kloroform: air (25:65:4) dan penampak spot masing-masing *Bacillus* spp.

Tabel 4. Pengujian Tegangan Permukaan Biosurfaktan dari Bakteri *Bacillus* spp. pada Substrat Minyak Pelumas Setelah Inkubasi Selama 72 jam.

Isolat	Tegangan permukaan (dyne/cm)			
	pelumas bekas	penurunan	pelumas baru	penurunan
Bacillus sp 48	70,4 ± 0,4[a]	3,6 ± 0,4	66,9 ± 0,8[a]	19,7 ± 0,8
Bacillus sp 34	77,6 ± 0,5[c]	-	68,8 ± 0,6[b]	17,9 ± 0,6
Bacillus sp 84	78,3 ± 0,5[d]	-	71,0 ± 0,9[c]	15,7 ± 0,9
Kontrol	74 ± 0,1[b]	-	86,7 ± 1,2[d]	-

Hasil uji kuantitatif biosurfaktan: tegangan permukaan

Pengukuran nilai tegangan permukaan biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing ketiga isolat *Bacillus* spp menunjukkan hasil berbeda nyata terhadap ontrol menggunakan substrat minyak pelumas bekas dan baru (Tabel 4). Hasil penurunan tegangan permukaan menggunakan substrat minyak pelumas baru lebih tinggi dibanding pelumas bekas. *Bacillus* sp 48 mampu menurunkan tegangan permukaan paling tinggi pada penelitian ini. Menurut Desai & Banat, 1997 mikroorganisme yang berpotensi menghasilkan biosurfaktan dapat dikatakan baik apabila dapat menurukan nilai tegangan permukaan yang lebih dari 10 dyne/cm.

Supernatan *Bacillus* sp 34 dan *Bacillus* sp 84 pada substrat minyak pelumas bekas tidak mengalami penurunan nilai tegangan permukaan. Hal ini diduga karena komposisi pada minyak pelumas bekas sudah bercampur dengan sisa sisa proses pembakaran, dan mengandung aluminium, besi, tembaga dan lain-lain sehingga mempengaruhi proses produksi biosurfaktan oleh kedua bakteri tersebut. Menurut Sandri (2009) limbah oli bekas mengandung senyawa yang heterogen. Senyawa logam berat pada limbah oli bekas menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme yang memproduksi biosurfaktan berjalan lambat dan mempengaruhi proses produksi biosurfaktan.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan *Bacillus* sp 48, *Bacillus* sp 34 dan *Bacillus* sp 84 memiliki kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan pada substrat pelumas baru. Perbedaan tegangan permukaan yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh jumlah biosurfaktan yang dihasilkan oleh masing-masing isolat dan substrat yang digunakan. Hal ini didukung oleh isolat *Bacillus* memiliki karakterisasi bakteri Gram positif dan menunjukkan adanya perbedaan bentuk sel antara *Bacillus* sp 34 yang berbentuk bacil, sedangkan *Bacillus* sp 48 dan *Bacillus* sp 84 berbentuk streptobacil. Ketiga isolat juga memiliki bentuk tepian koloni yang berbeda-beda, yaitu: *Bacillus* sp 34 (*lobate*) *Bacillus* sp 48 (*serrate*) *Bacillus* sp 84 (*entire*). Menurut Ningsih *et al.,* (2018) Bacillus yang diisolasi dari TPA Muara Fajar, Pekanbaru memiliki aktivitas urease, penghasil kalsit dengan keragaman karakter fenotipik berbeda. Berbeda jenis isolat bakteri yang digunakan mempengaruhi produksi biosurfaktan.

Simpulan dan Saran

Ketiga isolat *Bacillus* spp. berpotensi sebagai penghasil biosurfaktan golongan lipopeptida dan mampu mengemulsi pada substrat minyak pelumas bekas maupun baru. Produksi biosurfaktan oleh *Bacillus* sp 48 sebesar 19,7 dyne/cm, *Bacillus* sp 34 sebesar 17,9 dyne/cm dan *Bacillus* sp 84 sebesar 15,7 dyne/cm dengan substrat minyak pelumas baru berbanding dengan kontrol.Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya dilakukan optimalisasi produksi biosurfaktan dari ketiga isolat *Bacillus* spp. dengan menggunakan variasi sumber karbon, pH dan waktu inkubasi. Biosurfaktan selanjutnya dikarakterisasi dan dianalisis dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) untuk mengetahui gugus fungsinya.

Daftar Pustaka

Adu, S. A., Naughton, P. J., Roger Marchant, R. & Banat, I. M. (2020). Microbial Biosurfactants in Cosmetic and Personal

Skincare Pharmaceutical Formulations. *Pharmaceutics* 12(11): 1099-1120.

Ali, N., Pang, Z., Wang, F., Xu, & El-Seedi, H. R. (2022). Lipopeptide Biosurfactants from Bacillusspp.: Types, Production, Biological Activities, and Applications in Food. *Hindawi Journal of Food Quality* 2022: 1-19.

Bukhori, A., Suryanto D., & Nurtjahja, K. (2022). Biosurfactant activity of phylloplane bacteria from an ornamental plant, *Colocasia esculenta L. Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 23(6): 3108-3114.

Chakrabortya, S., Ghosha, M., Chakraborti, S., Janaa, S., Sena, K. K., Kokare, C., & Zhangc, L. (2015). Biosurfactant produced from *Actinomycetes nocardiopsis* A17: Characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 79: 405-412.

Ciccyliona & Nawfa R. (2012). Pengaruh pH terhadap produksi biosurfaktan oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* lokal. *Jurnal Sains dan Pomits* 1(1): 1-6.

Citra, S. & Nurhasanah. (2021). Skrining bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut tercemar minyak di pelabuhan panjang lampung. *Rafflesia Journal of Natural and Applied Sciences* 1(1): 50-58.

Das, P., Mukherjee, S. & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans. Journal of applied microbiology* 104(6): 1675-1684.

Deng, Z., Jiang, Y., Chen, K., Li, J., Zheng, C., Gao, F., Liu, X. 2020. One Biosurfactant-Producing Bacteria *Achromobacter* sp. A-8 and its potential use in microbial enhanced oil recovery and bioremediation. Front. Microbiol 11: 247.

Desai, J. D. & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Molecular Biology* 61(1): 47-64.

El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A.S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum* 24:155-162.

Ghazala, I., Bouassida, M., Krichen, F., Manuel Benito, J., Ellouz-Chaabouni, S. & Haddar, A. (2017). Anionic lipopeptides from *Bacillus mojavensis* I4 as effective antihypertensive agents: Production, characterization, and identification. *Engineering in life sciences* 17(12): 1244-1253.

Kamar, I., Zahara, F., Yuniharni, D. & Umairah, R. (2021). Identifikasi parasetamol dalam jamu pegal linu menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). *QUIMICA: Jurnal Kimia Sains dan Terapan* 3(1): 24-29.

Kurniadie, D., Sumekar, Y., Buana, I. 2017. Pengaruh berbagai jenis surfaktan pada herbisida glufosınat terhadap pengendalian gulma dan hasıl tanaman jagung (Zea mays l.) di Jatınangor. *Jurnal Kultivasi* 16(2): 378- 381.

Ni'matuzahroh, N. M., Sari, S. K., Ningrum, I. P., Aprilla, D. P., Marjayandari, L., Trikurniadewi, N., Ibrahim, S. N. M. M., Fatimah, Nurhariyati, T., Surtiningsih, T. & Yuliani, H. (2019). The potential of indigenous bacteria from oil sludge for biosurfactant production using hydrolysate of agricultural waste. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity* 20(5): 1375-1379.

Ningsih, M. D. S., Linda, T. M. & Fibriarti, B. L. (2018). Isolasi dan keragaman bakteri ureolitik lokal riau yang berpotensi sebagai campuran beton *Al-Kauniyah* 11(1): 57-63.

Nunal, S. N., Santander-De S. M. S. L., Bacolod, E., Koyama, J., Uno, S., Hidaka, M., Yoshikawa, T. & Maeda, H. (2014). Bioremediation of heavily oil-polluted seawater by a bacterial consortium immobilized in cocopeat and rice hull powder. *Biocontrol Science* 19(1): 11-22.

Phulpoto, I. A., Yu, Z., Hu, B., Wang, Y., Ndayisenga, F., Li, J., Liang, H. & Qazi, M. A. (2020). Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and it's potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial cell factories* 19(1): 1-12.

Priyatno, A.N. (2015). *Pengaruh penambahan konsentrasi larutan surfaktan disosiumethylenediamineteraacetic Salt (Na2EDTA) terhadap tegangan permukaan dan viskositas oli mesin pertamina enduro 4 stroke* [Tesis]. Universitas Negeri Yogyakarta.

Reningtyas, R. & Mahreni, M. (2015). Biosurfactant. *Eksergi* 12(2): 12-22.

Riyanto, R., Sumardi, Farisi, S. & Ekowati, N. (2021). Aktivitas biosurfaktan *Serratia marcescens* strain MBC1 dalam mengemulsikan solar dengan variasi pH dan media. *Jurnal Sumberdaya Alam dan Lingkungan* 8(3): 114-122.

Rodriguez, Andrade, D., Ribeiro, S., Ribeaux, R., Lima, R., Araujo, A. & Takaki. (2015). Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low cost medium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4(7):550-562.

Sandri, D. (2009). *Bakteri hidrokarbonoklastik tanah tercemar penghasil biosurfaktan: skrining dan identifikasi bakteri, optimasi produksi dan karakterisasi produknya* [Tesis]. Universitas Brawijaya.

Santos, E.C. L., Miranda, D. A., Silva., A. L., & Lopez, A. M. Q. (2019). Biosurfactant production by *Bacillus* strains isolated from sugar cane mill wastewaters. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 62: 1-12

Sari M, Afiati F,. & Sharyoto W. (2015). Potensi bakteri lumpur minyak sebagai penghasil biosurfaktan dan antimikroba. *Jurnal Ilmu Pengetahuan dan Teknologi* 1(1): 85-88.

Sena, H. H., Sanches, M. A., Rocha, D. F. S., Segundo, W. O. P.F., de Souza,E. S. & de Souza, J. V. B. (2018). Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the Amazon Forest. Hindawi International Journal of Microbiology 2018: 1-8

Setiani NA, Octaviyani W, Hamdani S,. & Mardiah I. (2020). Studies on biosurfactant produced using *Exiguobacterium profundum*. *Acta Biochimica Indonesiana* 2(2): 39-44.

Stancu, M. M. (2020). Biosurfactant production by a *Bacillus megaterium* strain. *Open Life Sciences* 15(1): 629-637.

Takahashi M, Morita T, Wada K, Hirose N, Fukuoka T, Imura T,. & Kitamoto D. (2011). Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science* 60(5): 267-273.

Wibisana, A. (2018). Isolasi dan skrining mikroba penghasil biosurfaktan dari air laut yang tercemar minyak. *Jurnal Ilmiah Teknik Kimia* 2(2): 55-62.

Zampolli, J., Giani, A., Canito, A., Sello, G. & Gennaro, P. (2022). Identification of a novel biosurfactant with antimicrobial activity produced by *Rhodococcus opacus* R7. *Microorganisms* 10(2): 1-16.