

## VARIASI SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI BIOSURFAKTAN OLEH BAKTERI HALOFILIK ISOLAT TAMBAK GARAM KAJHU ACEH BESAR

Rahmad Rizki Fazli<sup>1\*</sup>, Latifah Hanum<sup>1</sup>, Mieke Alvionita<sup>2</sup>, Said Ali Akbar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Kimia, FMIPA, Universitas Negeri Malang, Malang, Indonesia

<sup>3</sup>Program Studi Budidaya Perairan, FKP, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

\*Email: rahmadr.fazli@unsyiah.ac.id

### ABSTRACT

This research has isolated one type of halophilic bacterial strain from the salt pond of Kajhu Village with the code KJ-AB2. This bacterium grew optimally at 10% (w/v) NaCl so it was classified as moderate halophilic bacteria. Several types of halophilic bacteria are known to produce biosurfactants. Biosurfactants are surface active agents that are widely used in several pharmaceutical, food dan petroleum industries. The production of biosurfactants is strongly influenced by the type of carbon source used for bacterial growth. Olive oil, palm oil, sunflower oil, glucose dan glycerol are types of carbon sources used to see their effect in producing biosurfactants. This isolate grew well on the five carbon sources with an average OD<sub>600</sub> 2.001±0.293 at 72 hours of fermentation. Biosurfactant production was measured by oil spreading test (OST) every 24 hours until 120 hours of fermentation. The highest OST value was obtained when KJ-AB2 isolate was grown on biosurfactant production media using olive oil, sunflower oil dan palm oil with an average OST value of 5.6±0.6 cm, 4.7±0.6 cm, dan 4.6±0.7 cm, respectively.

**Keywords:** Halophilic Bacteria, Biosurfactant, Carbon Source, Fermentation, Isolate KJ-AB2.

### PENDAHULUAN

Bakteri halofilik merupakan bakteri yang hidup pada habitat dengan kadar garam yang tinggi. Bakteri ini memiliki keunikan tersendiri dibandingkan bakteri lainnya. Beberapa jenis bakteri lain cenderung akan mati jika lingkungan sekitar tempat tumbuh bakteri memiliki konsentrasi garam yang tinggi (Al-Wahaibi dkk., 2014). Akan tetapi tidak dengan bakteri halofilik, bakteri halofilik biasanya hidup di lingkungan dengan kadar garam bervariasi antara 5% hingga 40% (b/v) (Kivistö dan Karp 2011). Beberapa habitat bakteri halofilik seperti danau Laut Kaspia dan Laut Hitam yang berada di Timur Tengah, kawah lumpur Bledug Kuwu dan tambak garam yang berada di Indonesia.



**Gambar 1.** Lokasi Tambak Garam (sumber: id.wikipedia.org)

Tambak garam merupakan tempat masyarakat tradisional untuk memproduksi garam dari air laut. Tambak garam biasanya berada di daerah-daerah pesisir pantai seperti tambak garam Desa Kajhu, Aceh Besar. Penduduk daerah pesisir biasanya akan memindahkan air laut masuk ke dalam tambak-tambak tersebut. Air laut di dalam tambak nantinya akan dibiarkan beberapa hari hingga menguap dan mengering. Pada saat proses ini terjadi maka konsentrasi garam dalam tambak menjadi sangat tinggi. Sehingga terjadi seleksi alam terhadap mikroorganisme yang hidup dalam tambak tersebut (Budiharjo, dkk. 2017).

Mikroorganisme yang bertahan dalam tambak tersebut merupakan mikroorganisme yang toleran terhadap kadar garam tinggi termasuk bakteri halofilik. Beberapa jenis bakteri halofilik diketahui dapat menghasilkan beberapa metabolite sekunder (Al-Bahry, dkk., 2013). Metabolit sekunder ini dapat berupa ektoin, bioplastik, levan, dan biosurfaktan (Li. 2017).

Biosurfaktan merupakan agen aktif permukaan yang berfungsi untuk menurunkan tegangan antar muka dua cairan (HoŠková, dkk., 2013). Biosurfaktan adalah surfaktan mikroba yang mempunyai struktur molekul dengan dua sisi bagian yaitu hidrofilik dan hidrofobik (Joshi dkk., 2016). Biosurfaktan adalah molekul ekstraseluler dengan struktur beragam yang dihasilkan oleh permukaan sel mikroba. Secara garis besar biosurfaktan dikelompokkan menjadi lima kategori yaitu glikolipid, lipopolisakarida, lipopeptida, fosfolipid, dan asam lemak (Gudiña, *et al.*, 2016).

Biosurfaktan diproduksi oleh mikroba selama fase stasioner pada kurva pertumbuhan untuk membantu mikroba dalam bioavailabilitas substrat, adhesi dan de-adhesi ke permukaan,

pengikatan logam, *quorum sensing* dan pathogenesis (Bajaj dkk., 2014). Selain itu, biosurfaktan juga bersifat biodegradable, tidak beracun, agen aktif permukaan yang unik, dan sangat stabil pada kondisi lingkungan yang ekstrim seperti kadar pH, suhu, dan salinitas tinggi (Perfumo, Banat, dan Marchant 2018). Keunggulan biosurfaktan tersebut mengakibatkan biosurfaktan banyak dimanfaatkan dalam aplikasi bidang biomedis, pertanian, bioremediasi, *microbial enhanced oil recovery* (MEOR), pengelolaan limbah, dan pengolahan makanan (Fariq dan Yasmin 2020).

Biosurfaktan glikolipid dari bakteri laut seperti *Brevibacterium casei*, *Serratia marcescens*, *Streptomyces sp.*, dan *Aspergillus ustus* menunjukkan hasil yang bagus sebagai antimikroba, anti-biofilm, anti adesive yang berpotensi untuk melawan mikroba patogen dan mikroba oportunistik (Fariq, dkk., 2019). Biosurfaktan dari bakteri psikofilik dapat digunakan dalam formulasi produk-produk deterjen sehingga meningkatkan kinerja deterjen dalam membersihkan pakaian kotor yang dicuci pada temperatur rendah dalam industri binatu (Firdous, dkk., 2016).

Berdasarkan keunggulan tersebut maka penelitian ini bertujuan untuk melihat produksi biosurfaktan dari bakteri halofilik isolat tambak garam Desa Kajhu, Aceh Besar. Produksi biosurfaktan sangat dipengaruhi oleh jenis sumber karbon yang digunakan sebagai substrat pertumbuhan bakteri (Abdel-Mawgoud, *et al.*, 2010). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan variasi beberapa jenis sumber karbon yang digunakan sebagai substrat untuk menghasilkan biosurfaktan dan diamati pengaruh jenis sumber karbon tersebut terhadap pertumbuhan bakteri dan produksi biosurfaktan yang dihasilkan.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, tabung reaksi, cawan petri, corong gelas, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, lampu spiritus, kawat ose, spatula, batang L, pengaduk magnetik, autoklaf, vortex, penangas air, inkubator goyang, inkubator dan sentrifuga. Bahan-bahan yang digunakan antara lain media LB, agar, minyak zaitun, minyak sawit, minyak biji bunga matahari, glukosa, gliserol, NaCl,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ , dan  $KNO_3$  yang merupakan produk Merck. Bakteri yang digunakan adalah bakteri isolat KJ-AB2 dari tambak garam Desa Kajhu Aceh Besar, koleksi laboratorium biokimia FKIP Universitas Syiah Kuala.

## **Sterilisasi Alat dan Bahan**

Proses sterilisasi media dilakukan dengan menggunakan autoklaf yang diatur pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm dan waktu selama 15 menit. Untuk alat-alat yang tidak tahan panas dilakukan sterilisasi dengan merendam atau menyemprotkan alkohol 70% (v/v).

## **Isolasi Bakteri Halofilik**

Sebanyak 5 L sampel air dari tambak garam diambil dari beberapa titik lokasi tambak yang berbeda. Kemudian diukur kadar garam dengan alat refraktometer. Analisis fisikokimia dilakukan dengan metode yang sesuai menurut Das dan Ting (2017) dan Firdous, Begum, dan Yasmin (2016). Sampel air laut kemudian diperkaya dengan LB medium dan diinkubasi pada inkubator pengocok dengan suhu 37°C, 150 rpm selama 48-72 jam. Bakteri halofilik didapatkan dengan melakukan teknik spreading ke dalam cawan petri berisi media agar LB dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam. Koloni yang tumbuh kemudian dilakukan teknik striking pada media agar padat baru sehingga didapatkan koloni tunggal seperti yang dijelaskan oleh Fariq dan Yasmin (2020). Koloni yang didapatkan selanjutnya diberi kode KJ-AB2.

## **Persiapan Media Tumbuh Bakteri dan Media Produksi Biosurfaktan**

Satu loop koloni tunggal KJ-AB2 dari cawan petri ditotol dan dimasukkan ke dalam media pertumbuhan yang mengandung komponen LB dengan kadar NaCl 10% (b/v). Pertumbuhan bakteri diukur dengan melihat nilai densitas optik ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) setiap jam selama 24 jam sehingga didapatkan kurva pertumbuhan bakteri. Sebelum digunakan semua media tumbuh dan media produksi biosurfaktan telah disterilisasi dengan menggunakan alat autoklaf.

Media produksi biosurfaktan mengandung 2% (v/v) larutan starter bakteri, 10% (b/v) NaCl, 0,05% (b/v)  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,001% (b/v)  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 0,05% (b/v)  $KH_2PO_4$ , 0,05% (b/v)  $K_2HPO_4$ , 0,001% (v/v) *trace element* (0,00005% (b/v)  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,00005% (b/v)  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,000025% (b/v)  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ ), 0,2% (b/v)  $KNO_3$ , dan 2% (v/v) sumber karbon yaitu minyak zaitun, minyak sawit, minyak biji bunga matahari, glukosa dan gliserol. Hal ini merupakan sedikit modifikasi dari Fazli dan Hertadi (2018) yang hanya menggunakan sumber karbon berupa limbah cair kelapa sawit (POME).

## **Kurva Pertumbuhan dan Produksi Biosurfaktan selama Fermentasi**

Pertumbuhan bakteri selama fermentasi diukur dengan melihat densitas optik ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) selama 24 jam hingga 120 jam. Hasil monitoring tersebut selanjutnya dibuat kurva produksi biosurfaktan. Produksi biosurfaktan dimonitor dengan uji sebaran minyak (OST).

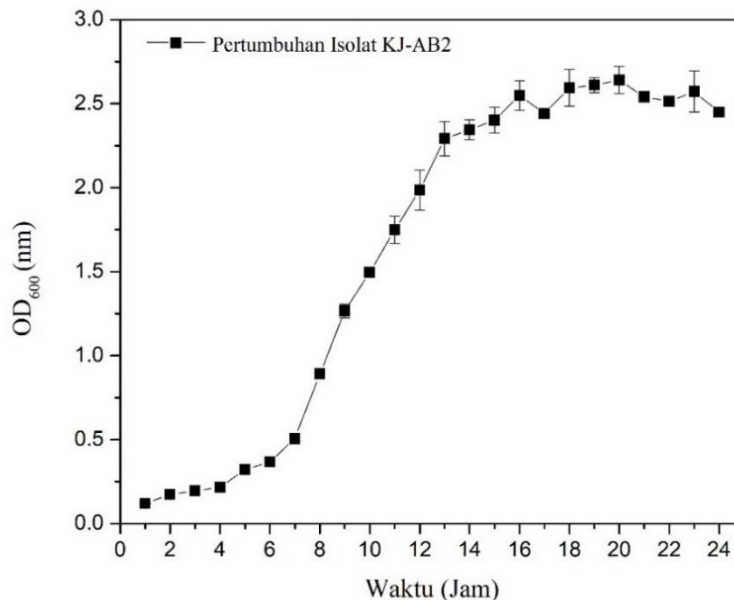
## Uji Sebaran Minyak (OST)

Uji sebaran minyak dilakukan untuk melihat kinerja dari biosurfaktan hasil fermentasi. Uji sebaran minyak dilakukan dengan cara mengambil 1 mL minyak dan diteteskan di atas permukaan air pada cawan petri berdiameter 15 cm. Kemudian diambil sebanyak 20  $\mu$ L supernatan dan diteteskan ke atas permukaan minyak tersebut sehingga terbentuk sebaran minyak dan diukur menggunakan penggaris panjang diameter sebaran minyak yang terbentuk, teknik OST ini sesuai dengan penelitian Tiwary dan Dubey (2018). Larutan supernatan disiapkan dengan mengambil 1 mL dari medium fermentasi setiap 24 jam kemudian disentrifugasi selama 10 menit sehingga terbentuk 2 lapisan, biosurfaktan berada pada fase supernatan (Tugrul dan Cansunar 2005).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pertumbuhan Bakteri Isolat KJ-AB2 pada Medium LB

Pertumbuhan bakteri halofilik isolat KJ-AB2 diamati setiap jam selama 24 jam. Hal ini dilakukan untuk mendapatkan kurva pertumbuhan isolat KJ-AB2, kurva pertumbuhan berfungsi untuk menentukan fase tumbuh dari bakteri (Christova dkk., 2004). Ada 3 fase dalam kurva pertumbuhan bakteri yaitu fase lag atau fase awal, fase log atau fase eksponensial dan fase stasioner atau fase akhir. Kurva pertumbuhan isolat KJ-AB2 dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini.

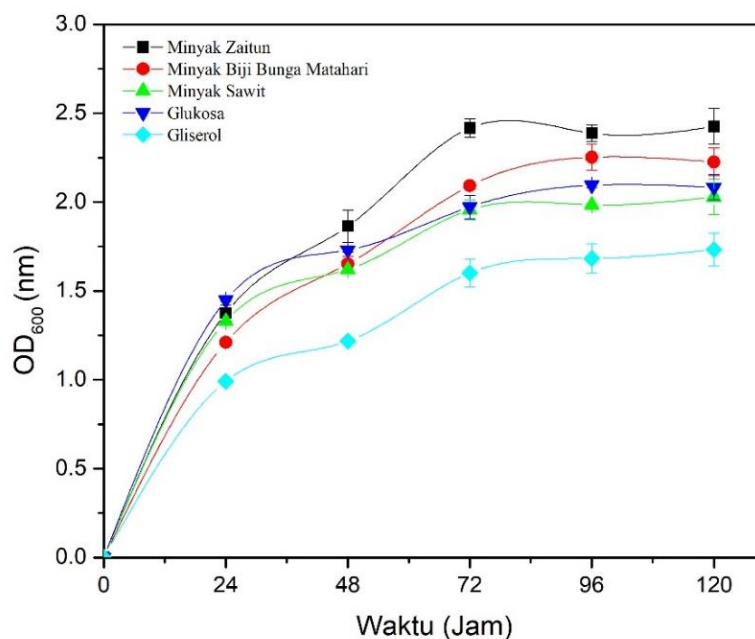


**Gambar 2.** Kurva Pertumbuhan Bakteri Isolat KJ-AB2 dari Tambak Garam Kajhu

Berdasarkan Gambar 2, fase lac dari bakteri isolat KJ-AB2 dimulai pada saat awal fermentasi hingga masuk jam ke-6. Pada fase lac bakteri cenderung beradaptasi dengan lingkungan atau medium sekitar. Fase log dimulai pada jam ke-6 hingga jam ke-14. Pada fase log bakteri sangat aktif membelah dan memperbanyak jumlah sel, hal ini dapat diketahui dengan nilai kepadatan sel ( $OD_{600}$ ) yang meningkat tajam dalam rentang waktu tersebut. Fase stasioner dimulai pada jam ke-14 hingga 24 jam. Pada fase stasioner bakteri cenderung tidak aktif membelah namun sudah mulai masuk ke dalam fase persiapan untuk menghasilkan metabolit sekunder (Celik, Aslim, dan Beyatli 2008). Kurva pertumbuhan ini mirip dengan beberapa kurva pertumbuhan bakteri halofilik dari penelitian Joshi dkk. (2016) dan Putu Parwata dkk. (2018) yang menggunakan bakteri *Bacillus licheniformis* dan *Halomonas elongata*. Garis kurva telah menunjukkan perbedaan fase yang jelas antara lac, log dan stasioner, sehingga dapat mengkonfirmasi bahwa isolat KJ-AB2 merupakan golongan bakteri halofilik.

### Pengaruh Variasi Sumber Karbon pada Pertumbuhan Bakteri Selama Fermentasi

Terdapat 5 Jenis sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini yaitu minyak zaitun, minyak biji bunga matahari, minyak sawit, glukosa dan gliserol. Setiap sumber karbon tersebut digunakan untuk melihat masing-masing pertumbuhan bakteri halofilik isolat KJ-AB2. Pengaruh variasi sumber karbon terhadap pertumbuhan bakteri halofil isolat KJ-AB2 selama fermentasi dapat dilihat pada Gambar 3 berikut ini.



**Gambar 3.** Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat KJ-AB2 dengan Variasi Sumber Karbon Selama Proses Fermentasi Produksi Biosurfaktan.

Berdasarkan Gambar 3, dapat dilihat bahwa setelah 24 jam fermentasi bakteri tumbuh dengan baik pada kelima sumber karbon. Nilai densitas optik ( $OD_{600}$ ) melebihi 0,3 nm menyatakan bahwa bakteri berhasil tumbuh dan beradaptasi terhadap medium pertumbuhan yang digunakan (Radzuan, Banat, dan Winterburn 2017). Dalam penelitian ini hampir seluruh jenis sumber karbon yang digunakan mencapai  $OD_{600}$  melebihi angka 0,3 nm sehingga dapat digolongkan isolat KJ-AB2 toleran terhadap kelima jenis sumber karbon tersebut. Namun, seiring meningkatnya waktu fermentasi bakteri yang tumbuh pada medium minyak zaitun menghasilkan nilai  $OD_{600}$  tertinggi. Hal ini dimungkinkan karena setelah 72 jam pertumbuhan bakteri telah masuk fase stasioner, dan bakteri mulai memproduksi biosurfaktan dalam rentang waktu tersebut (Fazli dan Hertadi 2018).

Biosurfaktan merupakan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai cadangan makanan dan dapat meningkatkan jumlah sel bakteri selama proses fermentasi (Tiwary dan Dubei 2018). Minyak zaitun, minyak biji bunga matahari dan minyak sawit menduduki peringkat ketiga terbaik dengan nilai  $OD_{600}$  yang tinggi sehingga menggunakan senyawa turunan dari minyak sangat mempengaruhi pertumbuhan dan produksi biosurfaktan.

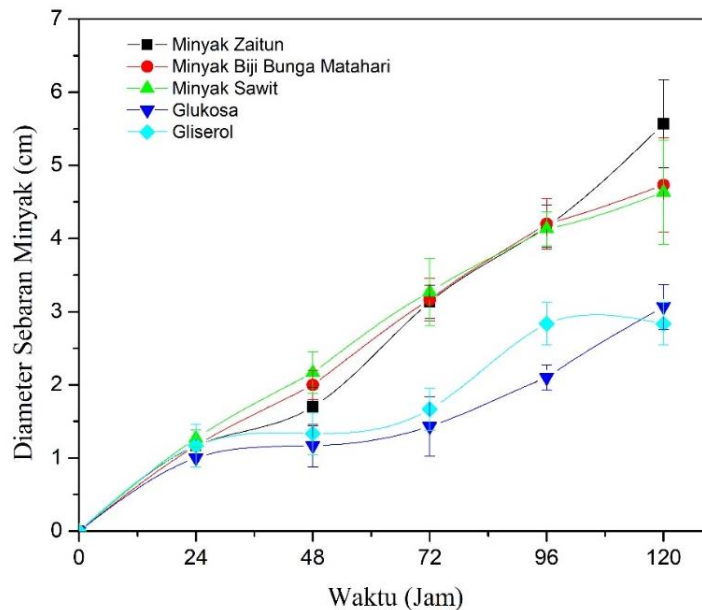


**Gambar 4.** Pertumbuhan Koloni Bakteri Isolat KJ-AB2 pada Cawan Petri

### **Pengaruh Variasi Sumber Karbon pada Produksi Biosurfaktan**

Produksi biosurfaktan sangat dipengaruhi oleh jenis sumber karbon yang digunakan selama fermentasi (Putri dan Hertadi 2015). Penelitian ini mengamati pengaruh 5 jenis sumber karbon tersebut dalam produksi biosurfaktan oleh isolat KJ-AB2. Jumlah biosurfaktan yang dihasilkan diamati dengan diameter sebaran minyak yang terbentuk melalui uji sebaran minyak

(OST). Pengaruh variasi sumber karbon terhadap produksi biosurfaktan dapat dilihat pada Gambar 5 berikut ini.



**Gambar 5.** Uji Sebaran Minyak dari Supernatan Isolat KJ-AB2

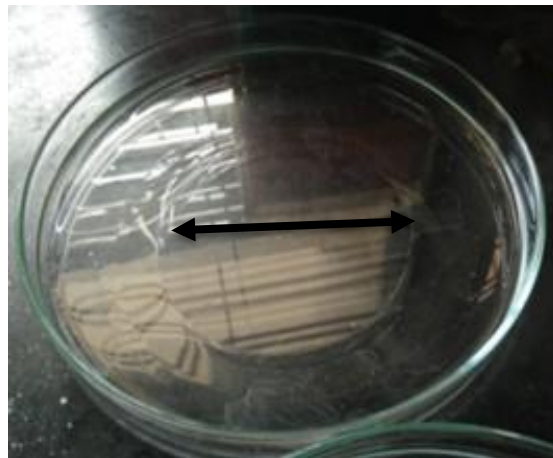
Berdasarkan Gambar 5, dapat diamati bahwa biosurfaktan lebih banyak dihasilkan apabila isolat KJ-AB2 ditumbuhkan dengan menggunakan sumber karbon minyak zaitun, minyak biji bunga matahari dan minyak sawit dengan nilai rata-rata diameter sebaran minyak mencapai  $5 \pm 0,6$  cm. Sedangkan sumber karbon glukosa dan gliserol menghasilkan diameter sebaran minyak dengan nilai rata-rata  $3 \pm 0,5$  cm. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan sifat kelarutan dalam media produksi dari sumber karbon tersebut (Onwosi, *et al.*, 2012).

Minyak zaitun, minyak biji bunga matahari dan minyak sawit bersifat hidrofobik sedangkan glukosa dan gliserol bersifat hidrofilik. Berdasarkan penelitian ini biosurfaktan lebih banyak dihasilkan apabila sumber karbon yang digunakan dari golongan hidrofobik karena untuk memecah tegangan permukaan molekul minyak dan air bakteri dapat memanfaatkan biosurfaktan yang telah disintesis oleh sel bakteri tersebut. Semakin banyak biosurfaktan maka akan semakin membantu bakteri untuk memecah molekul minyak menjadi lebih sederhana dan terdispersi dalam air. Hal ini dikarenakan sifat biosurfaktan yang memiliki dua sisi hidrofilik dan hidrofobik (Celik dkk., 2008). Penelitian yang sama juga dikemukakan oleh Sathi Reddy dkk. (2016) yang mengemukakan bahwa jumlah biosurfaktan meningkat apabila menggunakan minyak biji mangga dibandingkan gliserol.

Menggunakan glukosa atau gliserol sebagai sumber karbon juga tetap dapat menghasilkan biosurfaktan hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rooney dkk.



(2009) dan Rufino dkk. (2014). Namun, menggunakan jenis sumber karbon yang hidrofobik lebih disarankan jika ingin menghasilkan biosurfaktan yang melimpah.



**Gambar 6.** Pengukuran Diameter dari Uji Sebaran Minyak

## KESIMPULAN

Produksi biosurfaktan oleh bakteri halofilik isolat KJ-AB2 sangat dipengaruhi oleh jenis sumber karbon. Sumber karbon dari golongan hidrofobik menghasilkan diameter sebaran minyak yang lebih besar dibandingkan dari golongan hidrofilik. Sumber karbon hidrofobik yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak zaitun, minyak biji bunga matahari dan minyak sawit dengan rata-rata diameter sebaran minyak  $5\pm 0,6$  cm. Sedangkan sumber karbon hidrofilik yang digunakan dalam penelitian ini adalah glukosa dan gliserol dengan rata-rata diameter sebaran minyak  $3\pm 0,5$  cm. Pertumbuhan bakteri isolat KJ-AB2 terpantau baik disemua jenis sumber karbon yang digunakan dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Mawgoud, Ahmad Mohammad, François Lépine, dan Eric Déziel. 2010. "Rhamnolipids: Diversity of Structures, Microbial Origins dan Roles." *Applied Microbiology dan Biotechnology* 86(5): 1323–36.
- Al-Bahry, S. N. dkk. 2013. "Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* B20 Using Date Molasses dan Its Possible Application in Enhanced Oil Recovery." *International Biodeterioration dan Biodegradation* 81: 141–46.
- Al-Wahaibi, Yahya dkk. 2014. "Biosurfactant Production by *Bacillus Subtilis* B30 dan Its Application in Enhancing Oil Recovery." *Colloids dan Surfaces B: Biointerfaces* 114: 324–33.
- Bajaj, Abhay dkk. 2014. "Isolation dan Functional Analysis of a Glycolipid Producing *Rhodococcus* Sp. Strain IITR03 with Potential for Degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2-

Bis(4-Chlorophenyl)Ethane (DDT).” *Bioresource Technology* 167: 398–406.

- Budiharjo, Rahmad, Purbowatiningrum Ria Sarjono, dan Mukhammad Asy’ari. 2017. “Pengaruh Konsentrasi NaCl Terhadap Aktivitas Spesifik Protease Ekstraseluler Dan Pertumbuhan Bakteri Halofilik Isolat Bittern Tambak Garam Madura.” *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 20(3): 142–45.
- Celik, Gokcen Yuvali, Belma Aslim, dan Yavuz Beyatli. 2008. “Enhanced Crude Oil Biodegradation dan Rhamnolipid Production by *Pseudomonas Stutzeri* Strain G11 in the Presence of Tween-80 dan Triton X-100.” *Journal of Environmental Biology* 29(6): 867–70.
- Christova, Nelly dkk. 2004. “Rhamnolipid Biosurfactants Produced by *Renibacterium Salmoninarum* 27BN during Growth on N-Hexadecane.” *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 59(1–2): 70–74.
- Das, Subhabrata, dan Yen Peng Ting. 2017. “Evaluation of Wet Digestion Methods for Quantification of Metal Content in Electronic Scrap Material.” *Resources* 6(4).
- Fariq, Anila, dan Azra Yasmin. 2020. “Production, Characterization dan Bioactivities of Biosurfactants from Newly Isolatd Strictly Halophilic Bacteria.” *Process Biochemistry* 98(June): 1–10.
- Fariq, Anila, Azra Yasmin, dan Muhammad Jamil. 2019. “Production, Characterization dan Antimicrobial Activities of Bio-Pigments by *Aquisalibacillus Elongatus* MB592, *Salinicoccus Sesuvii* MB597, dan *Halomonas Aquamarina* MB598 Isolatd from Khewra Salt Range, Pakistan.” *Extremophiles* 23(4): 435–49.
- Fazli, Rahmad Rizki, dan Rukman Hertadi. 2018. “Production dan Characterization of Rhamnolipids from Bioconversion of Palm Oil Mill Effluent by the Halophilic Bacterium *Pseudomonas Stutzeri* BK-AB12.” *Environmental Progress dan Sustainable Energy*: 1–6.
- Firdous, Shahana, Shaheen Begum, dan Azra Yasmin. 2016. “Assessment of Soil Quality Parameters Using Multivariate Analysis in the Rawal Lake Watershed.” *Environmental Monitoring dan Assessment* 188(9).
- Gudiña, Eduardo J., José A. Teixeira, dan Lúgia R. Rodrigues. 2016. “Biosurfactants Produced by Marine Microorganisms with Therapeutic Applications.” *Marine Drugs* 14(2).
- HoŠková, Miriam dkk. 2013. “Characterization of Rhamnolipids Produced by Non-Pathogenic *Acinetobacter* dan *Enterobacter* Bacteria.” *Bioresource Technology* 130: 510–16.
- Joshi, Sanket J. dkk. 2016. “Production, Characterization, dan Application of *Bacillus Licheniformis* W16 Biosurfactant in Enhancing Oil Recovery.” *Frontiers in Microbiology* 7(NOV): 1–14.
- Kivistö, Anniina T., dan Matti T. Karp. 2011. “Halophilic Anaerobic Fermentative Bacteria.” *Journal of Biotechnology* 152(4): 114–24.
- Li, Qingxin. 2017. “Rhamnolipid Synthesis dan Production with Diverse Resources.” *Frontiers of Chemical Science dan Engineering* 11(1): 27–36.

- Onwosi, Chukwudi O., dan Frederick John C. Odibo. 2012. "Effects of Carbon dan Nitrogen Sources on Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas Nitroreducens* Isolatd from Soil." *World Journal of Microbiology dan Biotechnology* 28(3): 937–42.
- Perfumo, Amedea, Ibrahim M. Banat, dan Roger Marchant. 2018. "Going Green dan Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications." *Trends in Biotechnology* 36(3): 277–89.
- Putri, Monica, dan Rukman Hertadi. 2015. "Effect of Glycerol as Carbon Source for Biosurfactant Production by Halophilic Bacteria *Pseudomonas Stutzeri* BK-AB12." *Procedia Chemistry* 16: 321–27.
- Putu Parwata, I., Deana Wahyuningrum, Sony Suhdanono, dan Rukman Hertadi. 2018. "Production of Ectoine by *Halomonas Elongata* BK-AG25 Using Osmotic Shock Technique." *IOP Conference Series: Earth dan Environmental Science* 209(1).
- Radzuan, Mohd Nazren, Ibrahim M. Banat, dan James Winterburn. 2017. "Production dan Characterization of Rhamnolipid Using Palm Oil Agricultural Refinery Waste." *Bioresource Technology* 225: 99–105.
- Rooney, Alejdanro P., Neil P.J. Price, Karen J. Ray, dan Tsung Min Kuo. 2009. "Isolation dan Characterization of Rhamnolipid-Producing Bacterial Strains from a Biodiesel Facility." *FEMS Microbiology Letters* 295(1): 82–87.
- Rufino, Raquel D dkk. 2014. "Biosurfactants: Classification, Properties dan Environmental Applications 1104 Biosurfactants: Classification, Properties dan Environmental Applications." *Biotechnology* 11(August 2015).
- Sathi Reddy, K. dkk. 2016. "Utilization of Mango Kernel Oil for the Rhamnolipid Production by *Pseudomonas Aeruginosa* DR1 towards Its Application as Biocontrol Agent." *Bioresource Technology* 221: 291–99.
- Tiwary, Meenakshi, dan Ashok K. Dubey. 2018. "Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of *Pseudomonas Aeruginosa*, Isolat ADMT1." *Journal of Surfactants dan Detergents* 21(1): 113–25.
- Tugrul, Tugba, dan Emir Cansunar. 2005. "Detecting Surfactant-Producing Microorganisms by the Drop-Collapse Test." *World Journal of Microbiology dan Biotechnology* 21(6–7): 851–53.