PENENTUAN HASIL EKSTRAK KASAR BIOSURFAKTAN HASIL FERMENTASI MINYAK JELANTAH OLEH *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN METODE EKSTRAKSI CAIR-CAIR

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

(S.Farm.)

Diajukan oleh:

Annisa Wahyu Widyastuti

NIM: F42022251

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO

YOGYAKARTA

2026

HALAMAN JUDUL

PENENTUAN HASIL EKSTRAK KASAR BIOSURFAKTAN HASIL FERMENTASI MINYAK JELANTAH OLEH *Bacillus subtilis* MENGGUNAKAN METODE EKSTRAKSI CAIR-CAIR

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

(S.Farm.)

Diajukan oleh:

Annisa Wahyu Widyastuti

NIM: F42022251

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO

YOGYAKARTA

2026

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar belakang

Sebagian besar masyarakat Indonesia menyukai makanan yang diolah dengan cara digoreng. Penggunaan minyak goreng secara umum hanya dianjurkan sebanyak 3–4 kali proses penggorengan. Pemakaian minyak secara berulang dapat menyebabkan perubahan warna menjadi lebih gelap, timbulnya bau tengik, serta peningkatan kadar lemak jenuh. Minyak yang telah mengalami penurunan mutu tersebut dikenal sebagai minyak jelantah (Damayanti *et al*., 2020). Volume limbah minyak jelantah di Indonesia tergolong besar seiring dengan tingginya konsumsi minyak goreng. Berdasarkan kajian TNP2K dan *Traction Energy Asia* yang dikutip oleh Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral, konsumsi minyak goreng sawit nasional pada tahun 2019 mencapai sekitar 16,2 juta kiloliter. Sekitar 40–60% dari jumlah tersebut diperkirakan menjadi minyak jelantah, sehingga potensi minyak jelantah yang dihasilkan mencapai sekitar 6,46–9,72 juta kiloliter per tahun . Pembuangan minyak jelantah ke lingkungan dapat menimbulkan permasalahan serius karena minyak tidak dapat bercampur dengan air, melainkan membentuk lapisan film di permukaan yang menghambat pertukaran oksigen dan mengganggu keseimbangan ekosistem perairan. Selain itu, pembuangan minyak jelantah ke saluran *drainase* dapat menyebabkan penyumbatan dan meningkatkan risiko banjir (Ariyani Agustina & Piska, 2020). Kandungan lipid dalam minyak jelantah berpotensi dimanfaatkan sebagai karbon dalam proses fermentasi biosurfaktan.

Biosurfaktan dikembangkan sebagai senyawa aktif permukaan yang memiliki tingkat toksisitas yang rendah, mudah terdegradasi secara hayati, dan berasal dari sumber terbarukan (Fung *et al*., 2023). Biosurfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan dan tegangan antar muka, serta menstabilkan emulsi (Sundaram et al., 2024). Biosurfaktan memiliki fungsi yang sama dengan *Surface Active Agent* atau surfaktan yang merupakan molekul amfifilik yang memiliki gugus hidrofilik dan lipofilik sehingga memiliki fungsi menurunkan tegangan permukaan dan antarmuka antar fase (Nagtode et al., 2023).

Dalam industri kosmetik mulai mengembangkan biosurfaktan sebagai pengganti surfaktan sintetis karena memiliki karakteristik yang berpotensi mendukung penggunaannya dalam formulasi kosmetik karena karakteristiknya yang berpotensi mendukung pengembangan bahan formulasi yang kompatibel dengan kulit. Beberapa jenis biosurfaktan, seperti rhamnolipid, sophorolipid, mannosylerythritol lipid (MEL), dan lipopeptida, telah diteliti untuk digunakan dalam produk perawatan pribadi. Rhamnolipid dan sophorolipid antara lain dapat dimanfaatkan dalam formulasi lotion, krim, dan sampo. Sedangkan biosurfaktan lipopeptida yang banyak diproduksi oleh *Bacillus subtilis* telah dilaporkan penggunaannya dalam formulasi perawatan kulit, produk pembersih wajah, dan produk perawatan rambut. Biosurfaktan berpotensi dikembangkan dalam produk kosmetik yang ramah lingkungan karena karakteristiknya yang berpotensi mengurangi risiko iritasi kulit dibandingkan dengan surfaktan sintetis. Pengembangan dan pemanfaatan biosurfaktan dalam industri kosmetik telah banyak dilakukan di beberapa negara maju seperti Jepang, Amerika Serikat, dan Jerman yang telah mengintegrasikan biosurfaktan ke dalam formulasi produk perawatan kulit dan rambut (Nasser et al., 2024;Karnwal et al., 2023).

Surfaktan banyak digunakan dalam berbagai produk, seperti deterjen, sediaan farmasi, kosmetik, sampo, dan sabun. Pada tahun 2022, *CESIO* melaporkan bahwa produksi surfaktan di kawasan Eropa mencapai 2,8 juta ton. Namun, penggunaan surfaktan sintetis dalam jumlah besar dapat berdampak negatif terhadap lingkungan, khususnya ekosistem perairan, serta berpotensi menimbulkan iritasi kulit (Lechuga *et al*., 2025). Oleh karena itu, biosurfaktan menjadi alternatif yang lebih ramah lingkungan.

Dalam produksi biosurfaktan tidak hanya melibatkan bakteri dari genus *Bacillus* tetapi juga bisa dari mikroorganisme lain seperti *Pseudomonas aeruginosa* yang menghasilkan biosurfaktan golongan rhamnolipid*, Starmerella bombicola* yang mengasilkan biosurfaktan golongan sophorolipid*, Rhodococcus erythropolis* yang menghasilkan biosurfaktan golongan trehalolipid, dan *Pseudozyma antarctica* yang menghasilkan biosurfaktan golongan mannosileritritol lipid (Sarubbo et al., 2022). Meskipun demikian, bakteri dari genus *Bacillus* banyak dimanfaatkan dalam

produksi biosurfaktan karena kemampuannya yang efektif dalam menurunkan tegangan permukaan (Eras-Muñoz *et al*., 2022).

Salah satu biosurfaktan utama yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* melalui proses fermentasi dikenal sebagai surfaktin. Surfaktin termasuk golongan lipopeptida. Produksi surfaktin dilaporkan mencapai 5,5 – 6 g/L serta mampu menurunkan tegangan permukaan hingga 28 mN/m (Hu et al., 2022). Fermentasi merupakan proses pemanfaatan aktivitas metabolisme mikroorganisme pada kondisi yang dikendalikan untuk menghasilkan biomassa maupun metabolit tertentu. Dalam produksi biosurfaktan, fermentasi digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme penghasil biosurfaktan pada media yang sesuai sehingga senyawa tersebut dapat diproduksi (Eras-Muñoz et al., 2022). Untuk mengevaluasi keberhasilan proses fermentasi diperlukan tahap pemisahan dan penentuan hasil ekstrak kasar biosurfaktan. Salah satu metode yang umum digunakan adalah ekstraksi cair–cair yang didasarkan pada perbedaan kelarutan senyawa dalam dua fase cair yang tidak saling bercampur (Hu *et al*., 2022).

Selain tahap ekstraksi proses karakterisasi biosurfaktan menjadi langkah yang penting dalam memastikan keberadaan senyawa yang dihasilkan serta mengidentifikasi struktur gugus fungsionalnya. Salah satu teknik analisis yang digunakan adalah *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR). Metode FTIR digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi utama seperti gugus hidroksil, karbonil, amida dan rantai alifatik yang menjadi ciri khas biosurfaktan golongan lipopeptida. Spektrum FTIR umunya menunjukan pita serapan khas gugus amida. Pita Amida I umumnya berada pada daerah 1600–1700 cm^{-1} dan berkaitan dengan vibrasi stretching C=O, sedangkan Amida II berada pada 1480–1600 cm^{-1} yang berkaitan dengan vibrasi bending N–H dan stretching C–N. Selain itu, pita Amide A pada daerah 3100–3600 cm^{-1} menunjukkan vibrasi stretching N–H. Keberadaan pita-pita tersebut dapat menjadi salah satu parameter pendukung dalam mengidentifikasi biosurfaktan lipopeptida seperti surfaktin (Janek et al., 2021). Oleh karena itu analisis FTIR dapat dimanfaatkan dalam penelitian biosurfaktan untuk memverifikasi struktur kimia senyawa yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme (Shandookh, 2025).

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk menentukan nilai hasil ekstrak kasar biosurfaktan hasil fermentasi dari minyak jelantah dengan konsentrasi 2% sebagai sumber karbon oleh *Bacillus subtilis* menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Selain itu biosurfaktan yang dihasilkan akan dikarakterisasi menggunakan analisis FTIR untuk mengidentifikasi gugus fungsi utama yang terkandung dalam senyawa tersebut. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang diperoleh dari metode ekstraksi cair-cair serta karakteristik gugus fungsi yang mendukung keberadaan komponen lipopeptida.

B. Rumusan masalah

1. Berapa hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang diperoleh dari fermentasi minyak jelantah oleh *B.subtilis* menggunakan ekstraksi cair-cair?
2. Apa saja gugus fungsi yang teridentifikasi pada ekstrak kasar biosurfaktan hasil fermentasi berdasarkan analisis FTIR?

C. Keaslian penelitian

Penelitian ini berfokus pada penentuan hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Bacillus subtilis* menggunakan metode pemisahan yaitu ekstraksi cair–cair. Beberapa penelitian telah menggunakan minyak jelantah sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan, tetapi perbedaan metode pemisahan menyebabkan hasil ekstrak yang diperoleh bervariasi. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi hasil ekstrak kasar biosurfaktan hasil fermentasi minyak jelantah dengan konsentrasi 2% oleh *Bacillus subtilis* menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Biosurfaktan yang diperoleh selanjutnya dikarakterisasi menggunakan analisis *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat dalam hasil ekstraksi untuk mengkarakterisasi biosurfaktan golongan lipopeptida. Berikut penelitian dalam lima tahun terakhir pada Tabel 1.

Tabel I. Penelitian yang sudah pernah dilakukan

NO		Metode	Variabel penelitian dan Hasil	Perbedaan
1.	Dalhat *et al*, (2025)	Metode ekstraksi biosurfaktan menggunakan ekstraksi cair cair dengan pelarut kloroform dan etanol (2:1).	Variabel yang diteliti terkait dengan hasil produksi biosurfaktan perbandingan dari *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* yang diukur dari berat kering biosurfaktan yang dihasilkan. Hasil dari ekstraksinya didapatkan berat kering biosurfaktan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 1,2 ± 0,03 gram dan *Bacillus subtilis* 1,38 ± 0,02 gram.	Secara umum metode yang digunakan sama. Namun dalam penelitian ini hanya menggunakan bakteri *Bacillus subtilis* yang kemudian dikarakterisasi dengan analisis FTIR.
2.	Wu *et al*, (2022)	Metode ekstraksi biosurfaktan yang digunakan adalah presipitasi asam yang diikuti dengan ekstraksi pelarut.	Variabel diukur dari kultur bakteri B. subtlis diasamkan menggunakan HCl kemudian dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan sehingga didapatkan biosurfaktan kasar dengan berat 1320-1369 mg/L.	Pada penelitian ini difokuskan pada kondisi ekstraksi kemudian dikarakterisasi dengan FTIR.
3.	(Hiller et al., 2025)	Produksi surfaktin dilakukan menggunakan fermentasi *Bacillus subtilis* BMV9 dalam sistem	Produksi surfaktin dilakukan menggunakan *B. subtilis* BMV9 dalam bioreaktor fed-batch. Hasil	Penelitian ini menggunakan minyak jelantah 2% sebagai sumber karbon

NO		Metode	Variabel penelitian dan Hasil	Perbedaan
		bioreaktor fed-batch. Ekstraksi dilakukan menggunakan campuran kloroform:metanol (2:1) sebanyak tiga tahap, kemudian fase bawah diuapkan pada suhu 40°C. Kadar surfaktin dianalisis menggunakan HPTLC.	penelitian menunjukkan titer surfaktin sebesar 46,33 g/L.	dan berfokus pada penentuan hasil ekstrak kasar biosurfaktan serta karakterisasi FTIR

Dengan demikian, untuk memperoleh gambaran awal mengenai perolehan nilai hasil ekstrak kasar biosurfaktan dari hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* melalui metode ekstraksi cair-cair masih perlu dikembangkan. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan nilai hasil ekstrak kasar biosurfaktan hasil fermentasi menggunakan ekstraksi cair-cair serta melakukan karakterisasi gugus fungsi hasil ekstraksi menggunakan analisis FTIR.

D. Tujuan penelitian

1. Tujuan umum

Menentukan hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang diperoleh dari fermentasi minyak jelantah oleh *B.subtilis* menggunakan metode ekstraksi cair-cair.

2. Tujuan khusus

a. Menentukan hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang diperoleh dari fermentasi minyak jelantah oleh *B.subtilis* menggunakan ekstraksi cair-cair.

b. Mengidentifikasi gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak kasar biosurfaktan hasil fermentasi menggunakan FTIR

E. Manfaat penelitian

1. Manfaat teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu di bidang farmasi khususnya terkait pemanfaatan limbah minyak jelantah sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan serta memberikan informasi mengenai nilai hasil ekstrak kasar biosurfaktan dan karakterisasi gugus fungsi biosurfaktan yang diperoleh melalui metode ekstraksi cair-cair.

2. Manfaat metodologis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal mengenai penerapan metode ekstraksi cair–cair untuk memperoleh biosurfaktan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* serta hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang dihasilkan pada skala laboratorium.

3. Manfaat praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal mengenai metode ekstraksi cair-cair dalam memperoleh biosurfaktan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*. Hasil ekstrak kasar biosurfaktan dan karakteristik gugus fungsi yang diperoleh diharapkan menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut dalam pengembangan produksi biosurfaktan berbasis minyak jelantah pada skala yang lebih besar.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang diperoleh dari fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* menggunakan ekstraksi cair-cair pada 3 kali replikasi berturut-turut, 0,3963 g/L, 0,1988 g/L, dan 0,3238 g/L, dengan rata-rata sebesar 0,3063±0,0999 g/L.
2. Berdasarkan hasil analisis FTIR, ekstrak kasar menunjukkan adanya gugus fungsi yang berkaitan dengan senyawa yang memiliki gugus C-H alifatik dan gugus yang berkaitan dengan struktur peptida, sehingga hasil analisis mendukung keberadaan komponen yang memiliki karakteristik lipopeptida dalam ekstrak kasar biosurfaktan. Namun, hasil FTIR ini tidak dapat digunakan untuk memastikan identitas spesifik senyawa biosurfaktan, seperti surfaktin, karena ekstrak yang dianalisis masih berupa ekstrak kasar.

B. Saran

1. Perlu dilakukan optimasi kondisi fermentasi *Bacillus subtilis*, seperti konsentrasi minyak jelantah, pH, suhu, waktu fermentasi, kecepatan agitasi, dan komposisi media, untuk memperoleh hasil ekstrak kasar biosurfaktan yang lebih optimal
2. Proses ekstraksi perlu dioptimalkan, terutama pada tahap pengasaman, pemilihan dan perbandingan pelarut, serta proses pemisahan dan pengeringan ekstrak, sehingga dapat diketahui kondisi ekstraksi yang menghasilkan ekstrak kasar secara lebih optimal.
3. Karakterisasi ekstrak perlu dikembangkan dnegan metode analisis yang lebih spesifik untuk mengidentifikasi dan mengonfirmasi jenis biosurfaktan yang dihasilkan. Analisis FTIR dapat digunakan sebagai karakterisasi awal gugus fungsi, tetapi diperlukan metode analsis lanjutan apabila ingin menentukan identitas atau struktur senyawa yang lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

Aisha, Batool, I., Iftekhar, S., Taj, M. B., Carabineiro, S. A. C., Ahmad, F., Khan, M. I., Shanableh, A., & Alshater, H. (2025). Wetting the surface: A deep dive into chemistry and applications of surfactants. *Cleaner Chemical Engineering*, *11*, 100197. https://doi.org/10.1016/J.CLCE.2025.100197

Albuquerque, A. P. da C., Ferreira, H. de S., Silva, Y. A. da, Silva, R. R. da, Lima, C. V. A. de, Sarubbo, L. A., & Luna, J. M. (2025). Biosurfactant Produced by Bacillus subtilis UCP 1533 Isolated from the Brazilian Semiarid Region: Characterization and Antimicrobial Potential. *Microorganisms*, *13*(7). https://doi.org/10.3390/microorganisms13071548

Aritonang, B., Ritonga, A. H., Harefa, K., Wiratma, D. Y., & Herlina. (2024). Purification of used Cooking Oil using a Combination of Activated Carbon and Bentonite Adsorbents. *JURNAL FARMASIMED (JFM)*, *7*(1), 31–40. https://doi.org/10.35451/jfm.v7i1.2331

Bochynek, M., Lewińska, A., Witwicki, M., Dębczak, A., & Łukaszewicz, M. (2023). Formation and structural features of micelles formed by surfactin homologues. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1211319

Breil, C., Abert Vian, M., Zemb, T., Kunz, W., & Chemat, F. (2017). "Bligh and Dyer" and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. Comprehension of solvatation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4). https://doi.org/10.3390/ijms18040708

Caporusso, A., Radice, M., Biundo, A., Gorgoglione, R., Agrimi, G., & Pisano, I. (2025). Waste cooking oils as a sustainable feedstock for bio-based application: A systematic review. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 400, pp. 48–65). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.02.003

Durval, I. J. B., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Sarubbo, L. A., Rufino, R. D., & Converti, A. (2021). Application of a biosurfactant produced by bacillus cereus ucp 1615 from waste frying oil as an emulsifier in a cookie formulation. *Fermentation*, *7*(3). https://doi.org/10.3390/fermentation7030189

Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. In

Bioengineered (Vol. 13, Number 5, pp. 12365–12391). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621

Faturachman, G. F., Ramanda, A. A., Maharani, S., Latif, L. A., Belo, G. A. G., & Ayubi, S. G. Al. (2025). Application of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) for Quantitative Analysis of Pharmaceutical Compounds. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, *5*(1). https://doi.org/10.37311/ijpe.v5i1.23309

Guo, Z., Sun, J., Ma, Q., Li, M., Dou, Y., Yang, S., & Gao, X. (2024). Improving Surfactin Production in Bacillus subtilis 168 by Metabolic Engineering. *Microorganisms*, *12*(5). https://doi.org/10.3390/microorganisms12050998

Habib, S., Ahmad, S. A., Johari, W. L. W., Shukor, M. Y. A., Alias, S. A., Smykla, J., Saruni, N. H., Razak, N. S. A., & Yasid, N. A. (2020). Production of lipopeptide biosurfactant by a hydrocarbon-degrading antarctic rhodococcus. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–21. https://doi.org/10.3390/ijms21176138

Hammad, S. F., Abdallah, I. A., Bedair, A., & Mansour, F. R. (2022). Homogeneous liquid–liquid extraction as an alternative sample preparation technique for biomedical analysis. In *Journal of Separation Science* (Vol. 45, Number 1, pp. 185–209). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/jssc.202100452

Hiller, E., Off, M., Dittmann, H., Perino, E. H. B., Lilge, L., & Hausmann, R. (2025). Model-based process design for surfactin production with Bacillus subtilis. *AMB Express*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s13568-025-01978-3

Hu, M., Yu, J., Zhang, H., & Xu, Q. (2022). An efficient method for the recovery and separation of surfactin from fermentation broth by extraction-back extraction. *Process Biochemistry*, *114*, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.014

Hussain, S., Ali, M., Ghazy, A., Al-Doss, A. A., Attia, K. A., Shah, T. A., & Li, F. (2025). Identification of antifungal lipopeptides from Bacillus subtilis Sh-17 targeting Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *12*(1). https://doi.org/10.1186/s40538-025-00744-8

Janek, T., Gudiña, E. J., Połomska, X., Biniarz, P., Jama, D., Rodrigues, L. R., Rymowicz, W., & Lazar, Z. (2021). Sustainable surfactin production by bacillus subtilis using crude glycerol from different wastes. *Molecules*, *26*(12). https://doi.org/10.3390/molecules26123488

Karnwal, A., Shrivastava, S., Al-Tawaha, A. R. M. S., Kumar, G., Singh, R., Kumar, A., Mohan, A., Yogita, & Malik, T. (2023). Microbial Biosurfactant as an Alternate to Chemical Surfactants for Application in Cosmetics Industries in Personal and Skin Care Products: A Critical Review. *BioMed Research International*, *2023*. https://doi.org/10.1155/2023/2375223

Leow, Y. S., Abdullah, N., Biak, D. R. A., Jamali, N. S., Rosli, R., & Teh, H. F. (2023). Production of Biosurfactant Using Bacillus subtilis Natto Fermentation. *Pertanika Journal of Science and Technology*, *31*(2), 709–728. https://doi.org/10.47836/pjst.31.2.05

Mahareek, O., Mousa, N. O., Mamdouh, S., El-Zayat, E. M., & Okasha, H. (2026). Development of surfactin-based nanocarrier for targeted doxorubicin delivery. *Scientific Reports*, *16*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-026-54757-w

Maia, P. C. de V. S., Rodríguez, D. M., Souza, A. F. de, Andrade, R. F. da S., & Campos-Takaki, G. M. (2022). Production of biosurfactant by Bacillus subtilis UCP 0999 using cassava wastewater (CWW) and waste frying oil (WFO) as renewable substrates. *Research, Society and Development*, *11*(6), e17011628805. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28805

Nagtode, V. S., Cardoza, C., Yasin, H. K. A., Mali, S. N., Tambe, S. M., Roy, P., Singh, K., Goel, A., Amin, P. D., Thorat, B. R., Cruz, J. N., & Pratap, A. P. (2023). Green Surfactants (Biosurfactants): A Petroleum-Free Substitute for Sustainability─Comparison, Applications, Market, and Future Prospects. In *ACS Omega* (Vol. 8, Number 13, pp. 11674–11699). American Chemical Society. https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00591

Nasser, M., Sharma, M., & Kaur, G. (2024). Advances in the production of biosurfactants as green ingredients in home and personal care products. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 12). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1382547

Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L. L., Rahman, P. K. S. M., Murugan, K., & Rajasekar, A. (2017). Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium Bacillus subtilis A1. *Frontiers in Microbiology*, *8*(FEB). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193

Pathania, A. S., Jana, A. K., & Jana, M. M. (2022). Valorization of waste frying oil to lipopeptide biosurfactant by indigenous Bacillus licheniformis through co-utilization in mixed substrate fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *39*(2), 369–385. https://doi.org/10.1007/s43153-021-00170-x

Qiao, J., Borriss, R., Sun, K., Zhang, R., Chen, X., Liu, Y., & Liu, Y. (2024). Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by Bacillus: a review. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 23, Number 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02372-7

Rawal, N., & Ansari, R. (2024). Understanding Pathways, Substrates, and Media Optimization to Maximize Microbial Biosurfactant Production. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, *12*(4), 1342–1351. https://doi.org/10.22214/ijraset.2024.60043

Rocha, P. M., dos Santos Mendes, A. C., de Oliveira Júnior, S. D., de Araújo Padilha, C. E., de Sá Leitão, A. L. O., da Costa Nogueira, C., de Macedo, G. R., & dos Santos, E. S. (2021). Kinetic study and characterization of surfactin production by Bacillus subtilis UFPEDA 438 using sugarcane molasses as carbon source. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *51*(3), 300–308. https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1815055

Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., Vecino, X., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2020). Extraction, separation and characterization of lipopeptides and phospholipids from corn steep water. *Separation and Purification Technology*, *248*. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117076

Saiyam, D., Dubey, A., Malla, M. A., & Kumar, A. (2024). Lipopeptides from Bacillus: unveiling biotechnological prospects—sources, properties, and diverse applications. In *Brazilian Journal of Microbiology* (Vol. 55, Number 1, pp. 281–295). Springer Nature. https://doi.org/10.1007/s42770-023-01228-3

Sari, P. D., Hartati, R. S., Syahrorini, S., Setiawan, I. N., Budiandari, R. U., Sukerayasa, I. W., & Rafdiansyah, M. A. (2026). Quality Assessment of Used Palm Cooking Oil Processed by Microfiltration Using Whatman Filter Papers with Different Pore Sizes. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, *10*(1), 39–52. https://doi.org/10.55043/jaast.v10i1.496

Sarubbo, L. A., Silva, M. da G. C., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., Twigg, M. S., & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. In *Biochemical Engineering Journal* (Vol. 181). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377

Shaimerdenova, U., Kaiyrmanova, G., Lewandowska, W., Bartoszewicz, M., Swiecicka, I., & Yernazarova, A. (2024). Biosurfactant and biopolymer

producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield. *Scientific Reports*, *14*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-024-52906-7

Shandookh, F. K. (2025). FTIR characterization of biosurfactants that produced from Bacillus subtilis isolated from wastewater samples contaminated with organic pollutants. *International Journal of Chemical and Biological Sciences*, *7*(2), 102–105. https://doi.org/10.33545/26646765.2025.v7.i2b.158

Sharma, S., & Pandey, L. M. (2020). Production of biosurfactant by Bacillus subtilis RSL-2 isolated from sludge and biosurfactant mediated degradation of oil. *Bioresource Technology*, *307*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123261

Sonbhadra, S., & Pandey, L. M. (2025). Isolation, identification, and characterization of Bacillus subtilis SMP-2 from panitenga and exploring its potential for biosurfactant production. *Food and Bioproducts Processing*, *149*, 144–157. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.11.018

Sundaram, T., Govindarajan, R. K., Vinayagam, S., Krishnan, V., Nagarajan, S., Gnanasekaran, G. R., Baek, K. H., & Rajamani Sekar, S. K. (2024). Advancements in biosurfactant production using agro-industrial waste for industrial and environmental applications. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1357302

Yu, F., Du, Y., Deng, S., Jin, M., Zhang, D., Zhao, M., Yin, J., & Long, X. (2023). Efficient preparation of extremely high-purity surfactin from fermentation broth by ethanol extraction. *Separation and Purification Technology*, *304*, 122278. https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2022.122278

Zhao, Z. qun, Zhang, T., Shi, T. qing, Barceló, D., & Zheng, H. bao. (2024). Biodegradation and high-value utilization of waste cooking oil: Strategies and mechanisms for producing lipopeptide biosurfactants using Bacillus subtilis YZQ-2. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *12*(6), 114549. https://doi.org/10.1016/J.JECE.2024.114549

Ziwei, B., Hanning, W., Lusha, W., Zena, Z., & Yifei, W. (2023). Isolation and Characterization of Viscosity-Reducing and Biosurfactant-Producing Bacteria in Low-Permeability Reservoir. *International Journal of Energy Research*, *2023*. https://doi.org/10.1155/2023/3223516