UJI AKTIVITAS PERMUKAAN DAN EMULSIFIKASI *CELL-FREE SUPERNATANT* HASIL FERMENTASI MINYAK JELANTAH OLEH *Bacillus subtilis*

SKRIPSI

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi (S.Farm.)

Oleh:

Fey Ananda Nasywa Putri

NIM: F42022267

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI

SEKOLAH TINGGI ILMU KESEHATAN NOTOKUSUMO

YOGYAKARTA

2026

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Minyak jelantah merupakan limbah hasil proses penggorengan berulang kali pada suhu tinggi yang menyebabkan terjadinya degradasi kimia pada struktur lipidnya. Kondisi tersebut menyebabkan minyak jelantah dikategorikan sebagai limbah yang berpotensi mencemari lingkungan jika tidak dikelola dengan benar. Pembuangan minyak jelantah secara langsung dapat mencemari perairan dan menurunkan kualitas lingkungan. Meskipun telah mengalami penurunan mutu, minyak jelantah masih memiliki kandungan senyawa lipid yang berpotensi dimanfaatkan sebagai substrat atau sumber karbon dalam produksi biosurfaktan (Maia dkk., 2022).

Salah satu pemanfaatan minyak jelantah yang dapat dilakukan adalah menggunakannya sebagai bahan baku dalam produksi biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan senyawa aktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme dan memiliki kemampuan menurunkan tegangan permukaan. Dibandingkan dengan surfaktan sintetis, biosurfaktan memiliki keunggulan seperti mudah terurai dan lebih ramah lingkungan (Rosi dkk, 2021). Namun, pemanfaatan biosurfaktan secara luas masih terbatas karena biaya produksi yang relatif tinggi. Oleh karena itu, pemilihan substrat yang murah seperti minyak jelantah bisa menjadi strategi untuk menekan biaya produksi. Dengan demikian, pemanfaatan minyak jelantah untuk memproduksi biosurfaktan berpotensi menekan pencemaran limbah minyak sekaligus meningkatkan nilai guna limbah tersebut (Mardiah dkk., 2022).

Produksi biosurfaktan berbasis minyak jelantah tersebut dapat dilakukan melalui proses fermentasi oleh mikroorganisme. Fermentasi merupakan proses metabolisme mikroorganisme dalam memanfaatkan substrat organik, termasuk minyak jelantah. Melalui aktivitas enzimatik mikroorganisme selama proses fermentasi akan menghasilkan metabolit sekunder berupa biosurfaktan yang memiliki sifat aktif permukaan (Sarubbo

dkk., 2022). Salah satu mikroorganisme yang dapat digunakan dalam produksi biosurfaktan adalah *Bacillus subtilis*. Mikroorganisme ini diketahui sebagai salah satu penghasil biosurfaktan, terutama golongan lipopeptida yang memiliki sifat aktif permukaan dan berpotensi membentuk emulsi (Ciurko dkk., 2022).

Salah satu parameter yang digunakan untuk menguji aktivitas emulsifikasi biosurfaktan adalah indeks emulsifikasi (E24). Parameter ini digunakan untuk menilai kemampuan biosurfaktan dalam membentuk dan mempertahankan emulsi antara fase air dan minyak (Gorrieri dkk., 2025). Prinsip pengujian E24 didasarkan pada perbandingan tinggi lapisan emulsi terhadap tinggi total cairan setelah didiamkan selama 24 jam. Menurut Mardiah dkk (2022), nilai indeks emulsifikasi (E24) di atas 50% menunjukkan aktivitas emulsifikasi yang tinggi. Pada penelitian tersebut, biosurfaktan diproduksi oleh *Bacillus cereus* yang menggunakan minyak jelantah sebagai sumber karbon dan menghasilkan nilai E24 sebesar 61,67%. Penelitian Umar dkk (2021) juga menunjukkan bahwa *Bacillus subtilis* SNW3 mampu menghasilkan biosurfaktan dengan minyak jelantah sebagai substrat dan memiliki nilai indeks emulsifikasi sebesar 56,3%.

Selain aktivitas emulsifikasi, aktivitas permukaan biosurfaktan dapat dievaluasi melalui uji tetes (*drop-collapse test)* dan uji *oil spreading*. Uji tetes merupakan metode skrining kualitatif yang digunakan untuk mendeteksi aktivitas permukaan biosurfaktan berdasarkan perubahan bentuk tetesan yang terjadi akibat penurunan tegangan permukaan. Sementara itu, uji *oil spreading* merupakan metode kuantitatif yang digunakan untuk mengevaluasi aktivitas permukaan biosurfaktan berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk akibat penyebaran minyak pada permukaan air. Penelitian Rosi dkk (2022) menggunakan bakteri indigen *Bacillus* sp. PKT D4 dengan minyak zaitun sebagai sumber karbon memperoleh hasil positif pada uji tetes dan uji *oil spreading* dengan zona bening sebesar 1 mm serta nilai E24 mencapai 79,31%.

Hasil dari beberapa penelitian tersebut menunjukkan bahwa penggunaan minyak jelantah sebagai substrat berpotensi mendukung produksi biosurfaktan oleh bakteri genus *Bacillus*. Namun, hasil aktivitas permukaan dan emulsifikasi yang diperoleh dapat berbeda-beda. Hal tersebut menunjukkan bahwa aktivitas permukaan dan emulsifikasi biosurfaktan masih perlu diketahui lebih lanjut pada kondisi fermentasi yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Namun, berdasarkan penelitian terdahulu, belum terdapat penelitian yang secara khusus mengevaluasi aktivitas permukaan dan emulsifikasi *cell-free supernatant* hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* menggunakan kombinasi uji tetes (*drop-collapse test*), uji *oil spreading*, dan indeks emulsifikasi (E24). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas permukaan *cell-free supernatant* melalui uji tetes (*drop-collapse test*) sebagai metode skrining kualitatif dan uji *oil spreading* sebagai metode kuantitatif, serta aktivitas emulsifikasi melalui indeks emulsifikasi (E24).

B. Rumusan Masalah

1. Apakah supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* menunjukkan aktivitas permukaan berdasarkan uji tetes (*drop-collapse test*) dan uji *oil spreading*?
2. Berapakah nilai indeks emulsifikasi (E24) supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*?
3. Apakah terdapat perbedaan aktivitas *oil spreading* dan indeks emulsifikasi (E24) antara supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* dan Tween 80 sebagai kontrol positif?

C. Keaslian Penelitian

Berdasarkan penelusuran literatur, terdapat beberapa penelitian terkait pengujian aktivitas permukaan dan emulsifikasi hasil fermentasi menggunakan berbagai jenis substrat dan mikroorganisme. Berikut penelitian mengenai pengujian dalam lima tahun terakhir yang disajikan pada Tabel I.

Tabel I. Penelitian yang Pernah Dilakukan

No	Penulis & tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian	Perbedaan
1	Albuquerque dkk (2025)	**"***Biosurfactant Produced by Bacillus subtilis UCP 1533 Isolated from Brazilian Semiarid Region: Characterization and Antimicrobial Potential***"**	Biosurfaktan diproduksi menggunakan *Bacillus subtilis* UCP 1533 dengan minyak kedelai 2% sebagai sumber karbon dan *corn steep liquor* 0,12% sebagai sumber nitrogen. Produksi dilakukan pada media MSM menggunakan *orbital shaker* 200 rpm pada suhu 35°C selama 120 jam. Aktivitas emulsifikasi diuji menggunakan E24 dengan oli bekas, minyak kedelai, dan minyak bunga matahari sebagai fase minyak.	Nilai E24 sebesar 100% menggunakan oli bekas, 50-55% menggunakan minyak kedelai, dan 35-40% menggunakan minyak bunga matahari.	Penelitian tersebut menggunakan minyak kedelai sebagai sumber karbon dan *corn steep liquor* sebagai sumber nitrogen, sedangkan penelitian ini menggunakan minyak jelantah sebagai substrat. Kondisi fermentasi juga berbeda, yaitu 35°C selama 120 jam pada 200 rpm, sedangkan penelitian ini menggunakan kondisi fermentasi 37°C selama 72 jam. Evaluasi aktivitas pada penelitian ini meliputi uji tetes dan *oil spreading* selain E24.
2	Mardiah dkk (2022)	"Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri *Bacillus cereus* Menggunakan Minyak Jelantah"	Biosurfaktan diproduksi menggunakan *Bacillus cereus* dengan minyak jelantah sebagai substrat. Minyak jelantah disaring menggunakan filter PTFE 0,22 µm. Fermentasi dilakukan pada media MSM menggunakan *shaker* 160 rpm selama 6 hari. Aktivitas permukaan dan emulsifikasi diuji menggunakan uji tetes serta E24 dengan minyak kelapa sawit sebagai fase minyak.	Nilai E24 yang diperoleh sebesar 69,78% menggunakan minyak kelapa sawit sebagai fase minyak.	Penelitian tersebut menggunakan *Bacillus cereus*, sedangkan penelitian ini menggunakan *Bacillus subtilis*. Selain itu, penelitian tersebut melakukan penyaringan minyak jelantah menggunakan filter PTFE 0,22 µm, sedangkan penelitian ini menggunakan minyak jelantah sebagai substrat dengan perlakuan menggunakan karbon aktif. Kondisi fermentasi juga berbeda, yaitu 160 rpm selama 6 hari, sedangkan penelitian ini menggunakan 37°C selama 72 jam. Penelitian ini juga menambahkan uji *oil spreading* dalam evaluasi aktivitas permukaan.
3	Ciurko dkk (2022)	"*Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil*	Biosurfaktan diproduksi menggunakan *Bacillus subtilis* #309 dengan	Nilai E24 sebesar 62,2% pada *sunflower cake* dan	Penelitian tersebut menggunakan limbah agroindustri berupa *sunflower cake* dan *rapeseed cake* sebagai substrat,

No	Penulis & tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian	Perbedaan
		Wastes by Bacillus subtilis and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor"	*sunflower cake* dan *rapeseed cake* sebagai substrat. Fermentasi dilakukan menggunakan *shaker* 160 rpm selama 168 jam pada suhu 37°C. Aktivitas emulsifikasi diuji menggunakan E24 dengan *n-heksadekan* sebagai fase minyak.	63,2% pada *rapeseed cake*.	sedangkan penelitian ini menggunakan minyak jelantah. Meskipun sama-sama menggunakan *Bacillus subtilis* dan suhu 37°C, waktu fermentasi penelitian tersebut lebih lama, yaitu 168 jam, sedangkan penelitian ini 72 jam. Penelitian ini juga mengevaluasi aktivitas permukaan dan emulsifikasi menggunakan uji tetes**,** *oil spreading***,** dan E24.
4	Rosi & Satria (2022)	"Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen *Bacillus sp*. PKT D4 dengan variasi sumber Nitrogen"	Biosurfaktan diproduksi menggunakan isolat indigen *Bacillus* sp. PKT D4 dengan minyak zaitun 10% sebagai sumber karbon dan urea 0,35% sebagai sumber nitrogen pada media MSM. Fermentasi dilakukan menggunakan *shaker* 110 rpm pada suhu 30°C selama 72 jam. Aktivitas permukaan dan emulsifikasi dievaluasi menggunakan uji tetes, *oil spreading*, dan E24 dengan fase minyak yang berbeda.	Uji tetes menunjukkan hasil positif menggunakan minyak pelumas. Uji *oil spreading* menggunakan oli bekas menghasilkan zona bening sebesar 1 mm, sedangkan E24 menggunakan benzena menghasilkan nilai 62,06%**.**	Penelitian tersebut menggunakan *Bacillus* sp. PKT D4 dan minyak zaitun 10%, sedangkan penelitian ini menggunakan *Bacillus subtilis* dan minyak jelantah. Kondisi fermentasi juga berbeda, terutama suhu (30°C dibandingkan 37°C) dan kecepatan *shaker* (110 rpm dibandingkan kondisi penelitian ini). Meskipun sama-sama menggunakan uji tetes, *oil spreading*, dan E24, fase minyak yang digunakan pada pengujian berbeda.
5	Maia dkk (2022)	"*Production of Biosurfactant by Bacillus subtilis UCP 0999 Using Canava Wastewater (CWW) and Waste Frying Oil (WFO) as Renewable Substrates*"	Biosurfaktan diproduksi menggunakan *Bacillus subtilis* UCP 0999 dengan limbah cair singkong dan minyak jelantah sebagai substrat. Fermentasi dilakukan menggunakan *shaker* 150 rpm pada suhu 30°C selama 96 jam. Aktivitas	Nilai E24 yang diperoleh sebesar 94,3% menggunakan minyak mesin bekas sebagai fase minyak.	Penelitian tersebut sama-sama menggunakan *Bacillus subtilis* dan minyak jelantah, tetapi menggunakan kombinasi limbah cair singkong dan minyak jelantah, sedangkan penelitian ini menggunakan minyak jelantah sebagai substrat. Kondisi fermentasi juga berbeda, yaitu 30°C selama 96 jam pada 150 rpm, sedangkan penelitian ini menggunakan 37°C selama

No	Penulis & tahun	Judul Penelitian	Metode Penelitian	Hasil Penelitian	Perbedaan
			emulsifikasi dievaluasi menggunakan uji E24 dengan minyak mesin bekas sebagai fase minyak.		72 jam. Penelitian ini juga melakukan evaluasi aktivitas menggunakan uji tetes dan *oil spreading* selain E24.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, produksi biosurfaktan oleh genus *Bacillus* menggunakan berbagai substrat limbah maupun minyak nabati telah banyak diteliti. Penelitian terdahulu juga telah menunjukkan potensi penggunaan minyak jelantah sebagai substrat dalam produksi biosurfaktan oleh *Bacillus*. Namun, terdapat perbedaan pada jenis mikroorganisme, jenis dan konsentrasi substrat, kondisi fermentasi, metode pengujian aktivitas, serta fase minyak yang digunakan pada masing-masing pengujian. Oleh karena itu, penelitian ini berfokus pada evaluasi aktivitas permukaan dan emulsifikasi supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* melalui uji tetes (*drop-collapse test*), *oil spreading*, dan indeks emulsifikasi (E24) pada kondisi fermentasi yang digunakan dalam penelitian ini.

D. Tujuan Penelitian

1. Tujuan Umum

Mengetahui aktivitas permukaan dan emulsifikasi supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*.

2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui aktivitas permukaan supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* berdasarkan uji tetes (*drop-collapse test*) dan uji *oil spreading*.
2. Menentukan nilai indeks emulsifikasi (E24) supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*.
3. Mengetahui perbedaan aktivitas *oil spreading* dan indeks emulsifikasi (E24) antara supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* dan Tween 80 sebagai kontrol positif.

E. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini menambah pengetahuan mengenai aktivitas permukaan dan emulsifikasi supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*.

2. Manfaat Metodologis

Penelitian ini memberikan gambaran penerapan uji tetes (*drop-collapse test*), uji *oil spreading*, dan uji indeks emulsifikasi (E24) untuk mengevaluasi aktivitas permukaan dan emulsifikasi hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*.

3. Manfaat Praktis

Penelitian ini memberikan informasi mengenai potensi pemanfaatan *cell-free supernatant* hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis*.

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* menunjukkan aktivitas permukaan, yang ditunjukkan oleh hasil positif pada uji tetes (*drop-collapse test*) dan terbentuknya zona bening pada uji *oil spreading* dengan diameter 3,06±0,40 cm.
2. Supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* menunjukkan aktivitas emulsifikasi dengan nilai indeks emulsifikasi (E24) sebesar 38,5±4,77%.
3. Terdapat perbedaan yang signifikan antara supernatan hasil fermentasi minyak jelantah oleh *Bacillus subtilis* dan Tween 80 pada uji *Oil spreading* dan indeks emulsifikasi (E24) dengan nilai *p* masing-masing sebesar 0,003 dan 0,004 ($p < 0,05$)

B. Saran

1. Penelitian selanjutnya disarankan melakukan isolasi, pemurnian dan karakterisasi senyawa aktif dari *cell-free supernatan* yang dihasilkan untuk mengidentifikasi komponen yang berperan terhadap aktivitas permukaan dan emulsifikasi secara lebih spesifik.
2. Penelitian selanjutnya disarankan melakukan optimasi kondisi fermentasi, seperti pH, konsentrasi inokulum, konsentrasi sumber karbon, suhu, dan waktu fermentasi, untuk memperoleh kondisi yang dapat menghasilkan aktivitas biosurfaktan.

DAFTAR PUSTAKA

Akpor, O.B., Ezekudo, E.O., Sobajo, O.A., Edoh, P.A., & Mabayoje. (2023). *Optimization and antimicrobial properties of biosurfactant production byfour indigenous soil bacterial species*. *Asian Journal of Agriculture and Biology*. https://doi.org/10.35495/ajab.2022.146

Al Hawaj, M. A., Farid, A., Al Mohaini, M., J. Alsalman, A., Muzammal, M., Hashim Khan, M., Dadrasnia, A., N. Alhashem, Y., Ghazanfar, S., M. Almusalami, E., G. Kharboush, T., & Ismail, S. (2022). *Biosurfactant Screening and Antibiotic Analysis of Bacillus salmalaya*. *International Journal of Current Research and Review*, *14*(12), 56–64. https://doi.org/10.31782/IJCRR.2022.141209

Albuquerque, A. P. D. C., Ferreira, H. D. S., Silva, Y. A. D., Silva, R. R. D., Lima, C. V. A. D., 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), 1548. https://doi.org/10.3390/microorganisms13071548

Ali, F., Das, S., Hossain, T. J., Chowdhury, S. I., Zedny, S. A., Das, T., Ahmed Chowdhury, M. N., & Uddin, M. S. (2021). *Production optimization, stability and oil emulsifying potential of biosurfactants from selected bacteria isolated from oil-contaminated sites*. *Royal Society Open Science*, *8*(10), 211003. https://doi.org/10.1098/rsos.211003

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

Ashagrie, Y. N., Tadesse, M. G., Bachheti, R. K., Nijhawan, G., Tyagi, S., & Bachheti, A. (2025). *Formulation and characterization of Caesalpinia decapetala seed oil nanoemulsion: Physicochemical properties, stability, and antibacterial activity*. *Scientific Reports*, *15*(1), 14598. https://doi.org/10.1038/s41598-025-87732-y

Barauah, V., Parsa, S., Chowdhury, N. R., Milner, T. E., & Rylander, H. G. (2022). *Scattering angle resolved optical coherence tomography measures morphological changes in Bacillus subtilis colonies*. *Journal of Biomedical Optics*, *27*(12), 1–11. https://doi.org/10.1117/1.JBO.27.12.126004

Begum, W., Saha, B., & Mandal, U. (2023). *A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: An approach towards sustainable development*. *RSC Advances*, *13*(36), 25599–25615. https://doi.org/10.1039/D3RA05051C

Ciurko, D., Czyżnikowska, Ż., Kancelista, A., Łaba, W., & Janek, T. (2022). *Sustainable Production of Biosurfactant from Agro-Industrial Oil Wastes by Bacillus subtilis and Its Potential Application as Antioxidant and ACE Inhibitor*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(18), 10824. https://doi.org/10.3390/ijms231810824

Durval, I. J. B., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Rufino, R. D., Converti, A., & Sarubbo, L. 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), 189. https://doi.org/10.3390/fermentation7030189

Ghazi Faisal, Z., Sallal Mahdi, M., & Alobaidi, K. H. (2023). *Optimization and Chemical Characterization of Biosurfactant Produced from a Novel Pseudomonas guguanensis Strain Iraqi ZG.K.M*. *International Journal of Microbiology*, *2023*, 1–16. https://doi.org/10.1155/2023/1571991

Gorrieri, S., Buonocore, C., Donà, G., Pezzoli, C., Vakarelova, M., Coppola, D., Palma Esposito, F., De Pascale, D., Della Sala, G., Zanoni, F., & Tedesco, P. (2025). *Evaluation of the Emulsification Properties of Marine-Derived Rhamnolipids for Encapsulation: A Comparison with Commercial Surfactants*. *Biomolecules*, *15*(10), 1451. https://doi.org/10.3390/biom15101451

Hakim, R., Wrasiati, L. P., & Arnata, I. W. (2021). Karakteristik Minyak Jelantah Hasil dari Proses Pemurnian dengan Ampas Tebu pada berbagai Variasi Suhu dan Waktu Pengadukan. *JURNAL REKAYASA DAN MANAJEMEN AGROINDUSTRI*, *9*(4), 427. https://doi.org/10.24843/JRMA.2021.v09.i04.p01

Jumiati, E., & Nanda, M. (2024). Pemurnian Minyak Goreng Jelantah Menggunakan Karbon Aktif Tempurung Kelapa dengan Aktivasi Fisika. *Jurnal Fisika Unand*, *13*(2), 254–260. https://doi.org/10.25077/jfu.13.2.254-260.2024

Kalaimurugan, D., Balamuralikrishnan, B., Govindarajan, R. K., Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Vadivalagan, C., Venkatesan, S., Kamyab, H., Chelliapan, S., & Khanongnuch, C. (2022). *Production and Characterization of a Novel Biosurfactant Molecule from Bacillus safensis YKS2 and Assessment of Its Efficiencies in Wastewater Treatment by a Directed Metagenomic Approach*. *Sustainability*, *14*(4), 2142. https://doi.org/10.3390/su14042142

Kaundal, T., Sharma, A., & Batra, N. (2022). *Isolation of Biosurfactant Producing Pediococcus pentosacaeus from Laboratory Controlled (Simulated) Fermentation of Indian Wheat-based Seera*. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 12–23. https://doi.org/10.9734/cjast/2022/v41i2631778

Koim-Puchowska, B., Kłosowski, G., Dróżdż-Afelt, J. M., Mikulski, D., & Zielińska, A. (2021). *Influence of the Medium Composition and the Culture Conditions on Surfactin Biosynthesis by a Native Bacillus subtilis natto BS19 Strain*. *Molecules*, *26*(10), 2985. https://doi.org/10.3390/molecules26102985

Lamilla, C., Troncoso, D., Martínez-Cisterna, D., Hermosilla, E., Diez, M. C., Schalchli, H., Briceño, G., & Rubilar, O. (2026). *Production of Biosurfactant by Streptomyces luridus So3.2 Using Commercial and Recycled Frying Oils in a Stirred-Tank Bioreactor*. *International Journal*

of Molecular Sciences, *27*(15), 6672. https://doi.org/10.3390/ijms27156672

Mahesh, P. P., Kolape, J., Sultana, H., & Neelakanta, G. (2025). *McFarland Standards-Based Spectrophotometry Method for Calculating Approximate Multiplicity of Infection for an Obligate Intracellular Bacterium Anaplasma phagocytophilum*. *Microorganisms*, *13*(3), 662. https://doi.org/10.3390/microorganisms13030662

Maia, P. C. D. V. S., Rodríguez, D. M., Souza, A. F. D., Andrade, R. F. D. 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

Manfaati, R., Humairoh, G. W., & Sari, I. P. (2023). Fermentasi Minyak Jelantah Menggunakan *Rhizopus Oryzae* untuk Menghasilkan Protein Biomassa. *Chemica Isola*, *3*(1).

Marchut-Mikołajczyk, O., Drożdżyński, P., Polewczyk, A., Smułek, W., & Antczak, T. (2021). *Biosurfactant from endophytic Bacillus pumilus 2A: Physicochemical characterization, production and optimization and potential for plant growth promotion*. *Microbial Cell Factories*, *20*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01533-2

Mardiah, I., Hamdani, S., Fatimah, I., Setiani, N. A., Hamdani, S., & Astriany, D. (2022). Optimasi produksi biosurfaktan dari bakteri *Bacillus cereus* menggunakan minyak jelantah. *Jurnal Biologi Udayana*, *26*(2), 238. https://doi.org/10.24843/JBIOUNUD.2022.v26.i02.p09

Mazhar, S., Khokhlova, E., Colom, J., Simon, A., Deaton, J., & Rea, K. (2023). *In vitro and in silico assessment of probiotic and functional properties of Bacillus subtilis DE111®*. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1101144. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1101144

Miao, Y., To, M. H., Siddiqui, M. A., Wang, H., Lodens, S., Chopra, S. S., Kaur, G., Roelants, S. L. K. W., & Lin, C. S. K. (2024). *Sustainable biosurfactant production from secondary feedstock—Recent advances, process optimization and perspectives*. *Frontiers in Chemistry*, *12*, 1327113. https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1327113

Mohamed, H. I., Eid, A. W., Khalaf, K. E., Joseph, K. K., Mohamed, M. A., Mohamed, M. M., & Ghanaim, A. M. (2026). *Harnessing plant growth-promoting microorganisms to improve drought resilience in common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. *BMC Plant Biology*, *26*(1), 1078. https://doi.org/10.1186/s12870-026-09245-8

Mosa, M. A., Youssef, K., Hamed, S. F., & Hashim, A. F. (2023). *Antifungal activity of eco-safe nanoemulsions based on Nigella sativa oil against Penicillium verrucosum infecting maize seeds: Biochemical and physiological traits*. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1108733. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1108733

Mishra, N., Agsar, D., Deepthi, S., Kattegouda, U., Shetty, P., & Pandey, V. (2021). *Novel application of Nerium leaf and Image J software in drop collapse assay for rapid screening of biosurfactant producing*

microorganisms. *Indian Journal of Experimental Biology*. https://doi.org/10.56042/ijeb.v59i07.53159

Rezaeimalidareh, R., Ahmadi, M., & Shahidi, S. (2025). *Lactobacillus -Derived Biosurfactants: Emulsification and Antioxidant Properties in Oil Emulsions*. *Food Science & Nutrition*, *13*(6), e70334. https://doi.org/10.1002/fsn3.70334

Rosi, R. M., & Satria, H. (2022). Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen *Bacillus* sp. PKT D4 dengan Variasi Sumber Nitrogen. *Prosiding. Seminar Nasional Sains Matematika Informatika dan Aplikasinya (SN SMIAP) VI*. Bandar Lampung: FMIPA Universitas Lampung.

Sarubbo, L. A., Silva, M. D. 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*. *Biochemical Engineering Journal*, *181*, 108377. https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377

Sharma, J., Sundar, D., & Srivastava, P. (2021). *Biosurfactants: Potential Agents for Controlling Cellular Communication, Motility, and Antagonism*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*, 727070. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.727070

Simões, L. C., Oliveira, I., Borges, A., Gomes, I. B., & Simões, M. (2023). *A procedure to harmonize the hydrodynamic force during microbial cultivation in shaking flasks*. *Journal of Microbiology & Biology Education*, *24*(3), e00099-23. https://doi.org/10.1128/jmbe.00099-23

Sugihartuti, R., Pradana, M., Maslachah, L., Chusniati, S., Tyaningsih, W., Rahardjo, D., & Soeharsono, S. (2024). *Isolation and Identification of Bacterial Biosurfactant Activity from Mangrove Sediments*. *Journal of Basic Medical Veterinary*, *13*(1), 38–48. https://doi.org/10.20473/jbmv.v13i1.58266

Trindade, M., Sithole, N., Kubicki, S., Thies, S., & Burger, A. (2021). *Screening Strategies for Biosurfactant Discovery. Dalam R. Hausmann & M. Henkel (Ed.), Biosurfactants for the Biobased Economy* (Vol. 181, hlm. 17–52). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2021_174

Umar, A., Zafar, A., Wali, H., Siddique, M. P., Qazi, M. A., Naeem, A. H., Malik, Z. A., & Ahmed, S. (2021). *Low-cost production and application of lipopeptide for bioremediation and plant growth by Bacillus subtilis SNW3*. *AMB Express*, *11*(1), 165. https://doi.org/10.1186/s13568-021-01327-0

Wang, Y., Li, H., Mao, Y., Li, P., Wu, H., Ye, J., & Zhang, H. (2026). *Metabolic engineering of Bacillus subtilis for high-yield surfactin production*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, *19*(1), 43. https://doi.org/10.1186/s13068-026-02762-6

Wong, J.-Y., Ngieng, N.-S., Husaini, A., Saat, R., & Hussain, H. (2025). *Influence of pH on the biodegradation efficiency of fats, oils, and grease by biosurfactant-producing bacterial consortia*. *Biodegradation*, *36*(4), 50. https://doi.org/10.1007/s10532-025-10146-0

Xu, X., Zeng, W., Du, M., Elbarbary, A., Jin, J., & Wang, X. (2026). *Effects of Oil Properties on Stability Behavior of High-Energy-Density Fat Emulsions*. *Foods*, *15*(4), 621. https://doi.org/10.3390/foods15040621

Zia, K. Z., & Linda, T. M. (2023). Potensi *Bacillus* spp. Sebagai Penghasil Biosurfaktan untuk Pengolahan Limbah Minyak Pelumas. *Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*, 69–78. https://doi.org/10.24002/biota.v8i2.6360