



## Pengaruh Jenis Sumber Nitrogen Pada Produksi Biosurfaktan Oleh Bakteri Halofil

Mieke Alvionita <sup>a</sup>, Rukman Hertadi <sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang

<sup>b</sup>Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Bandung

\*corresponding author: [rukman@chem.itb.ac.id](mailto:rukman@chem.itb.ac.id)

DOI : [10.20885/ijca.vol4.iss1.art2](https://doi.org/10.20885/ijca.vol4.iss1.art2)

### ARTIKEL INFO

Diterima : 20 Februari 2021

Direvisi : 02 Maret 2021

Diterbitkan: 07 Maret 2021

Kata kunci : sumber nitrogen,  
biosurfaktan, halofil

### ABSTRAK

Bakteri halofil merupakan bakteri yang membutuhkan NaCl untuk pertumbuhannya. Salah satu potensi bakteri halofil adalah dapat menghasilkan biosurfaktan yang aktif pada konsentrasi garam yang tinggi. Oleh karena itu, biosurfaktan tersebut dapat diaplikasikan dalam industri minyak terutama pada bidang *enhanced oil recovery* (EOR). Selain itu, biosurfaktan diketahui secara luas diaplikasikan dalam industri farmasi dan makanan. Sifatnya yang lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan surfaktan sintesis menyebabkan ketertarikan untuk produksi biosurfaktan dalam skala besar semakin meningkat. Salah satu cara untuk meningkatkan produksi biosurfaktan adalah dengan melakukan optimasi sumber nitrogen pada medium produksi. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sumber nitrogen terbaik yang dapat digunakan untuk produksi biosurfaktan secara optimal. Penelitian ini menggunakan lima jenis sumber nitrogen antara lain urea,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dan  $\text{KNO}_3$  sedangkan jenis bakteri halofil yang digunakan adalah *Halomonas elongata* BK-AG18. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa urea merupakan sumber nitrogen terbaik yang digunakan untuk medium produksi biosurfaktan. Hal ini ditunjukkan dari hasil yang diperoleh dari diameter penyebaran minyak sebesar 3 cm.

### ARTICLE INFO

Received : 20 February 2021

Revised : 02 March 2021

Published : 07 March 2021

Keywords : nitrogen source,  
biosurfactant, halophile

### ABSTRACT

*Halophylic bacterium is categorized bacterium that requires NaCl for their growth. One of their potentials is that they can produce biosurfactants that can be active at high salt concentrations. Thus, they may be applicable to petroleum industry especially in enhanced oil recovery (EOR). In addition, biosurfactants have been widely known in their application on pharmaceutical and food industry. Their more environmentally friendly compared to synthetic surfactants has led to increased interest in the production of biosurfactants on a large scale. One way to increase the production of biosurfactants is to optimize the nitrogen source in the production medium. Therefore, this study aims to determine the best nitrogen source that can be used to optimize the*



---

*biosurfactant production. This study used five types of nitrogen sources, namely urea, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and KNO<sub>3</sub>, while the type of halophylic bacterium used was Halomonas elongata BK-AG18. The results of this study indicate that urea is the best nitrogen source used for the biosurfactant production medium. This can be shown from the result obtained of spreading oil diameter that is about 3 cm.*

---

## 1. PENDAHULUAN

Surfaktan merupakan molekul ampifilik yang tersusun atas bagian hidrofobik dan hidrofilik dan terdapat pada antarmuka cairan yang memiliki perbedaan polaritas [1]. Surfaktan diketahui mampu menurunkan tegangan permukaan dan antarmuka serta membentuk mikroemulsi dimana senyawa hidrokarbon dapat larut dalam air. Karakteristik tersebut menyebabkan surfaktan banyak digunakan pada berbagai industri sebagai agen detergensi, pendispersi, pengemulsi dan foaming. Meskipun diketahui sebagai bahan kimia yang serbaguna, surfaktan memiliki dampak negatif terhadap lingkungan karena tidak mudah terdegradasi dan bersifat toksik [2].

Adanya perkembangan teknologi bioproses meningkatkan ketertarikan untuk melakukan isolasi biosurfaktan dari mikroorganisme. Biosurfaktan diketahui memiliki karakter yang jauh lebih menguntungkan dibandingkan dengan surfaktan kimiawi. Kelebihan biosurfaktan antara lain biodegradabilitas yang tinggi, toksisitas yang rendah, stabil pada berbagai temperatur dan pH yang ekstrim, dan dapat diproduksi dengan menggunakan bahan baku yang dapat diperbaharui [3,4,5].

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri halofil, yaitu bakteri yang mempunyai habitat dengan konsentrasi garam yang cukup tinggi. Pemanfaatan bakteri halofil diharapkan dapat menghasilkan biosurfaktan yang memiliki kestabilan pada konsentrasi garam yang tinggi sehingga dapat berpotensi untuk diaplikasikan dalam industri minyak terutama pada proses *Enhanced Oil Recovery* (EOR) untuk mengambil residu minyak bumi yang masih tertinggal dalam reservoir [6,7].

Pasar dari “green” surfaktan menunjukkan bahwa sebanyak 344 kilo ton biosurfaktan digunakan pada 2013 dan diperkirakan mencapai 462 kilo ton dan 2308 juta USD pada 2020 [8]. Beberapa penelitian dilakukan dengan tujuan untuk mengoptimalkan produksi biosurfaktan melalui perubahan variabel-variabel yang dapat mempengaruhi produksinya, salah satunya adalah sumber nitrogen. Oleh karena itu, produksi biosurfaktan pada beberapa jenis sumber nitrogen penting untuk dilakukan terutama untuk memperoleh biosurfaktan secara optimal.

## 2. METODE

### 2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: gelas kimia, tabung reaksi, cawan petri, corong, gelas ukur, batang pengaduk, erlenmeyer, lampu spiritus, pipet tetes, spatula, jarum ose, pengaduk magnetik, autoklaf, penangas air, vortex, *rotatory evaporator*, pH meter, inkubator, dan sentrifuga. Bahan yang digunakan antara lain: NaCl, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, gliserol dan sumber nitrogen (urea, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>) yang merupakan produk Merck. Sedangkan ekstrak daging sapi, agar, dan pepton dari Difco. Bakteri halofil yang digunakan pada penelitian ini adalah *Halomonas elongata* BK-AG18 yang merupakan salah satu koleksi bakteri dari grup riset halofilik Bidang Keahlian Biokimia Jurusan Kimia, Institut Teknologi Bandung.

### 2.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh peralatan dan bahan yang tahan panas disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>o</sup>C selama 15 menit sedangkan untuk alat yang tidak tahan panas disterilkan dengan cara diredam dalam alkohol 70%.

### 2.3 Persiapan Media Pertumbuhan dan Produksi Biosurfaktan

Media Luria Bertani (LB) padat digunakan sebagai tempat pertumbuhan bakteri. Pembuatan media ini menggunakan bahan seperti NaCl 10% (b/v), pepton 1% (b/v), ekstrak ragi 0,5% (w/v) dan agar 2% (b/v). Bahan dilarutkan dalam buffer pH 7 kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Sedangkan media LB cair dibuat dengan bahan yang sama tanpa penambahan agar. Media untuk produksi biosurfaktan terdiri dari 3% gliserol (v/v), 0,3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (b/v), 0,1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (b/v), 0,5% NaCl (b/v), 0,05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (b/v), 0,001% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (b/v), 0,001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (b/v), dan 0,1% ekstrak ragi (b/v). Sumber nitrogen yang divariasikan dalam media produksi antara lain urea, NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan KNO<sub>3</sub>. Semua bahan kecuali gliserol dilarutkan dengan akuades sampai homogen kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah temperatur medium mencapai suhu ruang, gliserol yang sudah disterilkan ditambahkan dalam medium.

### 2.4 Inokulasi Bakteri pada Medium Produksi Biosurfaktan

Sebelum ditumbuhkan dalam medium produksi, *H. elongata* BK-AG18 ditumbuhkan dalam medium LB padat dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Prekultur disiapkan dengan cara satu koloni dari medium padat dipindahkan ke LB cair dan diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm. Satu persen prekultur baru dimasukkan dalam masing-masing media produksi biosurfaktan yang mengandung sumber nitrogen yang berbeda. Isolat diinkubasi selama 4 hari pada suhu 37 °C dengan kecepatan 150 rpm. Pertumbuhan bakteri dapat diketahui melalui nilai *optical density* (OD) yang diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm. Sedangkan aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan dapat diketahui melalui diameter penyebaran minyak. Pengukuran *optical density* dan penyebaran minyak dilakukan setiap 24 jam.

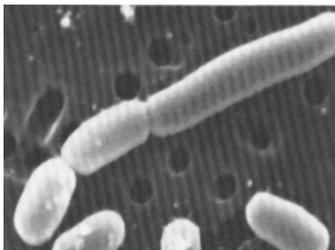
### 2.5 Uji Penyebaran Minyak

Diameter penyebaran minyak menunjukkan aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan oleh *H. elongata* BK-AG18. Diameter penyebaran minyak dapat diketahui melalui uji penyebaran minyak yang mengacu pada metode Mounira dan Abdelhadi (2015) [9]. Sebanyak 1,0 ml minyak kelapa sawit ditambahkan ke cawan petri yang berisi 40 mL air suling. Sebelumnya medium produksi yang mengandung biosurfaktan dengan kecepatan 8000 x g selama 30 menit sampai diperoleh supernatan yang terpisah dari sel bakteri. Kemudian sebanyak 10 µL supernatan diteteskan pada permukaan minyak dan dibiarkan selama satu menit. Diameter sebaran minyak yang terbentuk pada permukaan minyak diukur dan dibandingkan dengan 10 µl medium produksi sebagai kontrol negatif.

## 3. HASIL PENELITIAN

### 3.1 Pertumbuhan Bakteri *Halomonas elongata* BK-AG18 pada Medium LB

Pada penelitian ini digunakan bakteri halofil yaitu *Halomonas elongata* BK-AG18. *H. elongata* merupakan bakteri gram negatif dengan morfologi berbentuk batang seperti pada Gambar 1. Selain itu, bakteri tersebut membentuk koloni berwarna putih, mampu hidup pada salinitas optimum 3-8% (/v), rentang pH 5-10, dan temperatur mencapai 45 °C.



Gambar 1. Morfologi *H. elongata* [10]

Bakteri halofil merupakan bakteri yang pertumbuhannya bergantung dengan adanya NaCl. Oleh karena itu, dalam persiapan prekultur, bakteri uji ditumbuhkan dalam medium LB mengandung 10% NaCl (b/v). Bakteri diketahui dapat tumbuh dengan baik pada media tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji merupakan jenis halofil yang memang membutuhkan NaCl dalam pertumbuhannya. Kondisi hipersalin pada medium diketahui dapat menyebabkan kerusakan sel akibat terjadinya pergerakan air menuju medium sampai tercapai kesetimbangan osmosis. Namun bakteri halofil umumnya dapat menghasilkan *compatible solute* atau osmolit sehingga mencegah hilangnya air dalam sel. *Compatible solute* yang terakumulasi dalam halofil biasanya merupakan asam amino dan poliol, sukrosa, trehalosa dan menunjukkan



misalnya glisin, betain, ektoin, gliserol [11]. Gambar 2 pertumbuhan *H. elongata* BK-LB yang mengandung 10% NaCl.

(A)

(B)

Gambar 2. Pertumbuhan *H. elongata* BK-AG18 dalam Medium LB Padat (A) dan Cair (B)

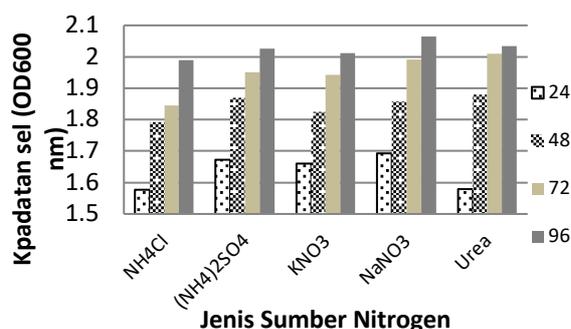
### 3.2 Pengaruh Jenis Sumber Nitrogen pada Produksi Biosurfaktan

Pada penelitian ini dilakukan investigasi pengaruh jenis sumber nitrogen terhadap produksi biosurfaktan oleh bakteri *H. elongata* BK-AG18. Ada 5 jenis sumber nitrogen yang digunakan, yaitu urea, ammonium klorida, ammonium sulfat, kalium nitrat dan natrium nitrat. Pemilihan sumber nitrogen tersebut dikarenakan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Makkar dan Cameotra (1997) menunjukkan bahwa produksi biosurfaktan tertinggi oleh bakteri *Bacillus subtilis* berasal dari medium produksi yang menggunakan sumber nitrogen urea, kalium nitrat, dan natrium nitrat [12]. Sedangkan medium yang mengandung ammonium sulfat menunjukkan pertumbuhan bakteri dan produksi biosurfaktan yang paling rendah. Hal ini juga terjadi ketika sumber nitrogen yang digunakan berupa ammonium nitrat meskipun dari segi pertumbuhan, *B. subtilis* mampu hidup dengan baik menggunakan sumber nitrogen tersebut. Produksi biosurfaktan pada masing-masing sumber nitrogen tersebut terdapat pada Tabel 1. Selain itu, dari data pada tabel tersebut juga dapat diperoleh informasi bahwa memang sumber nitrogen sangat diperlukan untuk produksi biosurfaktan. Hal ini dapat dilihat berdasarkan jumlah biosurfaktan yang dihasilkan dalam medium tanpa sumber nitrogen yang hanya mampu menghasilkan biosurfaktan sebanyak 0,090 gram dalam 1 liter medium.

TABEL I. Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri *B. Subtilis* pada Beberapa Jenis Sumber Nitrogen [12]

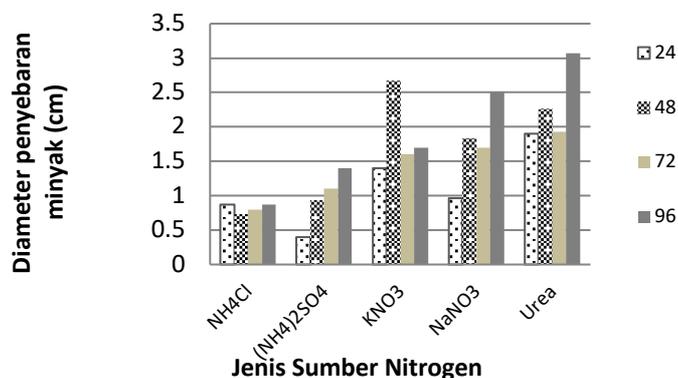
Sumber Nitrogen	Produksi Biosurfaktan (g/L)
Urea	1,012
Natrium nitrat	0,724
Kalium nitrat	0,731
Ammonium sulfat	0,170
Ammonium nitrat	0,317
Tanpa sumber nitrogen	0,090

Meskipun penelitian Makkar dan Cameotra menunjukkan bahwa ammonium sulfat dan ammonium nitrat bukan merupakan sumber nitrogen terbaik, namun sebaliknya yang ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Haddad dkk (2009). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut merupakan sumber nitrogen terbaik [13]. Padahal kedua penelitian tersebut menggunakan spesies bakteri yang sama, yaitu *B. subtilis*. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan investigasi pengaruh kelima jenis sumber nitrogen terhadap pertumbuhan dan produksi biosurfaktan oleh bakteri *H. elongata* BK-AG18. Kepadatan sel yang menunjukkan pertumbuhan bakteri tersebut pada masing-masing sumber nitrogen setiap 24 jam ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kepadatan Sel dalam Beberapa Jenis Sumber Nitrogen

Berdasarkan data kepadatan sel, bakteri *H. elongata* BK-AG18 mampu tumbuh dengan baik pada kelima jenis sumber nitrogen yang berbeda. Perbedaan yang dapat diamati dari Gambar 3 adalah bahwa pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh waktu inkubasi. Hal ini didasarkan pada nilai OD yang semakin meningkat setiap 24 jam masa inkubasi. Selain itu, dapat juga diamati bahwa pertumbuhan bakteri yang paling baik ditunjukkan pada medium mengandung  $\text{NaNO}_3$  setelah masa inkubasi 96 jam. Sumber nitrogen merupakan komponen yang digunakan untuk sintesis protein dan enzim. Oleh karena itu nitrogen sangat penting dalam medium produksi biosurfaktan.



Gambar 4. Aktivitas Biosurfaktan pada Sumber Nitrogen yang Berbeda

Optimasi medium produksi dibutuhkan untuk memaksimalkan produksi dan aktivitas dari senyawa metabolit yang diinginkan. Optimasi komponen medium masih merupakan fenomena yang perlu diteliti dan merupakan suatu tantangan. Sumber nitrogen merupakan salah satu komponen yang dapat divariasikan untuk mendapatkan produksi biosurfaktan yang optimal. Peningkatan produktivitas melalui proses optimasi medium produksi, dapat mengurangi biaya produksi. Pada penelitian ini aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan dari masing-masing sumber nitrogen ditunjukkan pada Gambar 4. Diameter penyebaran minyak menunjukkan aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan. Semakin lebar diameternya maka semakin baik aktivitas biosurfaktan tersebut. Berdasarkan Gambar 4, urea merupakan sumber nitrogen terbaik untuk produksi biosurfaktan oleh *H. elongata* BK-AG18

dengan aktivitas penyebaran minyak sebesar 3 cm. Sedangkan sumber nitrogen berupa ammonium memberikan aktivitas penyebaran minyak yang paling kecil dibandingkan dengan urea dan nitrat. Diameter penyebaran minyak yang dihasilkan oleh biosurfaktan yang dihasilkan oleh *H. elongata* BK-AG18 ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Diameter Penyebaran Minyak oleh Biosurfaktan (Ket: tanda panah merah menunjukkan diameter sebaran minyak)

Aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri pada penelitian ini menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan biosurfaktan yang dihasilkan oleh *Basillus sp.* dan *Staphylococcus sp.* pada penelitian Nayariserri dkk (2018) [14]. Namun, pada penelitian lain yang menggunakan bakteri *Pseudomonas sp.* CQ2 menunjukkan diameter penyebaran minyak yang sangat tinggi yaitu sebesar 11,7 cm [15]. Data diameter penyebaran minyak terdapat pada Tabel 2.

TABEL II. Aktivitas Penyebaran Minyak oleh Biosurfaktan yang Dihasilkan dari Beberapa Jenis Bakteri

Bakteri	Diameter Penyebaran Minyak (cm)
<i>Basillus sp.</i>	2,5
<i>Staphylococcus sp.</i>	1,8
<i>Pseudomonas sp.</i> CQ2	11,7
<i>H. elongata</i> BK-AG18 (riset ini)	3,0

Maneerat (2005) melaporkan bahwa produksi senyawa aktif permukaan sering terjadi ketika sumber nitrogen habis dalam medium kultur, selama fasa stasioner dari pertumbuhan sel [16]. Dalam kondisi sumber nitrogen yang terbatas, hal tersebut dapat menyebabkan penurunan aktivitas spesifik dari isositrat dehidrogenase yang tergantung NAD dan NADP yang mengkatalisis oksidasi isositrat menjadi 2-oksooglutarat dalam siklus asam sitrat. Dengan penurunan aktivitas enzim tersebut, isositrat mengakumulasi sitrat dalam mitokondria. Sitrat dan isositrat kemudian ditransfer ke sitosol dimana sitrat akan diubah menjadi asetil co-A oleh sitrat sintase yang merupakan prosesor untuk mensintesis asam lemak sehingga produksi biosurfaktan meningkat. Selain kelima jenis sumber nitrogen tersebut, beberapa penelitian sebelumnya menggunakan sumber nitrogen lain dalam produksi biosurfaktan yaitu ekstrak ragi, pepton, ekstrak daging dan gandum. Ekstrak ragi merupakan sumber nitrogen yang paling banyak digunakan untuk produksi biosurfaktan, garam ammonium dan urea merupakan sumber nitrogen yang lebih dipilih dalam memproduksi biosurfaktan oleh *Arthrobacter paraffineus*, sedangkan nitrat mendukung produksi biosurfaktan secara maksimal oleh *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 4. KESIMPULAN

Diameter penyebaran minyak menunjukkan besarnya aktivitas biosurfaktan yang dihasilkan pada masing-masing medium produksi dengan variasi sumber nitrogen. Sumber nitrogen berupa garam ammonium menunjukkan nilai aktivitas biosurfaktan terkecil dibandingkan sumber nitrogen

lainnya. Aktivitas terbaik ditunjukkan dengan menggunakan urea. Oleh karena itu produksi biosurfaktan oleh *H. elongata* BK-AG18 secara optimal dapat diperoleh dengan menggunakan media produksi yang mengandung urea.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan yang telah memberikan dana untuk penelitian ini.

### Daftar Pustaka

- [1] N. Dave and Joshi, T, "A Concise Review on Surfactants and Its Significance," *Int. J. Appl. Chem.*, vol. 13, no.3, pp. 663-672, 2017.
- [2] I.W.L.D. Franca, A.P. Lima, ....., and L.R.B. Goncalves "Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils," *Catalysis Today*, vol. 255, pp. 10-15, 2015.
- [3] R.D. Rufino, J.M.D. Luna, G.M.D.C. Takaki, and L.A. Sarubbo, "Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 17, no. 1, pp. 34-38, 2014.
- [4] M.D. Sousa, I.T. Dantas, A. Kamilly, N. Felix, B.D.S. Ana, V. Maria, ... and B. Gonçalves, "Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633," *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 57, pp. 295–301, 2014.
- [5] D.K.F. Santos, A.H.M. Resende, D.G.D. Almeida, .....and L.A. Sarubbo, "*Candida lipolytica* UCP0988 Biosurfactant: Potential as a Bioremediation Agent and in Formulating a Commercial Related Product," *Front. microbiol.*, vol. 8, no. 767, 2017.
- [6] S.J. Geetha, I.M. Banat, and S.J. Joshic, "Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR)," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 14, pp. 23-32, 2018.
- [7] I.A. Phulpoto, B.A. Jakhmani, A.H. Phulpoto, A.A. Panhyar, N.A. Kanhar, S. Ahmed, and M.A. Qazi, "Enhanced Oil Recovery by Potential Biosurfactant Producing Halo thermotolerant Bacteria Using Soil Washing and Sand Packed Glass Column Techniques," *Curr. Microbiol.*, vol. 77, no. 11, 2020.
- [8] E.J. Gudiña, E.C. Fernandes, A.I. Rodrigues, J.A. Teixeira, and L.R. Rodrigues, "Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium," *Front. microbiol.*, vol. 6, no. 59, 2015.
- [9] A. Mounira and G. Abdelhadi, "Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 14, no. 21, pp. 1764–1772, 2015.
- [10] R.H. Vreeland, C.D. Litchfield, S.E.L. Martin, and E. Elliot, "*Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely," *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 30, no. 2, pp. 485–495, 1980.
- [11] M. Roeßler and V. Müller, "Chloride, a New Environmental Signal Molecule Involved in Gene Regulation in a Moderately Halophilic Bacterium, *Halobacillus halophilus*," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 22, pp. 6207-6215, 2002.
- [12] R.S. Makkar dan S.S. Cameotra, "Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 37-42, 1997.
- [13] N.I.A. Haddad, J. Wang, dan B. Mu, "Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2," *Protein Pept. Lett.*, vo. 16, pp. 7-13, 2009.
- [14] A. Nayariserri, P. Singh, dan S.K. Singh, "Screening, isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus subtilis* strain ANSKLAB03," *Bioinformation*, vol. 14, no. 6, pp. 304-314, 2018.
- [15] W. Sun, W. Cao, M. Jiang, .....dan I. Naz, "Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. CQ2 from Changqing oil field China," *RSC. Adv.*, vol. 8, pp. 39710-39720, 2018.
- [16] S. Maneerat, "Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources," *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, vol. 27, no.3, pp. 675-683, 2005.