



TUGAS AKHIR - SB-184830

**STUDI POTENSI JAMUR DARI HUTAN
MANGROVE WONOREJO DALAM
MENGHASILKAN BIOSURFAKTAN**

**Riva Ariny Elhaque
0131154000047**

**Dosen Pembimbing :
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019**



TUGAS AKHIR - SB-184830

**STUDI POTENSI JAMUR DARI HUTAN
MANGROVE WONOREJO DALAM
MENGHASILKAN BIOSURFAKTAN**

**RIVA ARINY ELHAQUE
0131154000047**

**Dosen Pembimbing
Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si.**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019**



FINAL PROJECT - SB-184830

**STUDY OF NEW ISOLATED MANGROVE
FOREST FUNGUS FOR BIOSURFACTANS
PRODUCER**

**RIVA ARINY ELHAQUE
0131154000047**

**Supervisor :
Nur Hidayatul Alami, S.Sl., M.Si.**

**DEPARTMENT OF BIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
INSTITUTE TECHNOLOGY OF SEPULUH NOPEMBER
SURABAYA 2019**

LEMBAR PENGESAHAN

STUDI POTENSI JAMUR DARI HUTAN MANGROVE WONOREJO DALAM MENGHASILKAN BIOSURFAKTAN

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains pada
Departemen S-1 Biologi
Fakultas Sains
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

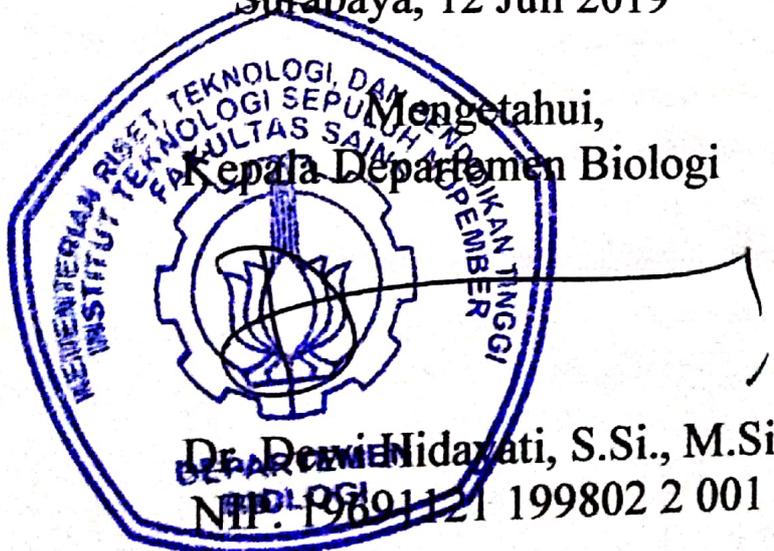
Oleh :

RIVA ARINY ELHAQUE
NRP. 0131154000047

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. (Pembimbing 1)

Surabaya, 12 Juli 2019



STUDI POTENSI JAMUR DARI HUTAN MANGROVE WONOREJO DALAM MENGHASILKAN BIOSURFAKTAN

Nama : Riva Ariny Elhaque
NRP : 01311540000047
Departemen : Biologi
Dosen Pembimbing : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

Abstrak

Hidrofobin adalah protein aktif permukaan yang setara dengan beberapa kelas surfaktan komersial hanya ditemukan pada jamur untuk bertahan hidup dan beradaptasi dengan lingkungan. Penempelan hifa jamur pada suatu substrat dibantu dengan adanya hidrofobin yang memiliki sifat ampifilik. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi jamur hutan mangrove Wonorejo dalam memproduksi hidrofobin serta mengetahui pengaruh komposisi medium dan pH terhadap produksi hidrofobin. Metode yang digunakan meliputi skrining isolat penghasil biosurfaktan, produksi hidrofobin, serta pengaruh medium dan pH dengan parameter aktivitas tegangan permukaan medium, berat kering biomassa jamur dan perubahan pH medium.

*Hasil menunjukkan bahwa jamur *A. terreus* memiliki potensi dalam memproduksi hidrofobin menggunakan metode analisis biosurfaktan dengan aktivitas biosurfaktan tertinggi dicapai pada nilai ODT sebesar 12,45 mm, ATP sebesar 54,01 dyne/cm, EA sebesar 0,9% dan hidrofobisitas permukaan sel sebesar 14,5%. Produksi hidrofobin yang dilakukan dengan SDS-Page hanya terlihat pita protein pada 43,05 kDa sehingga belum terlihat protein hidrofobin. Perlakuan variasi medium dan pH berpengaruh terhadap produksi hidrofobin. Produksi hidrofobin terbaik dicapai pada medium standar pH 6 dengan ATP sebesar 41,8 dyne/cm dengan berat kering biomassa jamur 0,075 gram.*

Kata kunci : Hidrofobin, Jamur, Medium, pH

STUDY OF NEW ISOLATED MANGROVE FOREST FUNGUS FOR BIOSURFACTANTS PRODUCER

Student Name : Riva Ariny Elhaque
NRP : 0131154000047
Departement : Biology
Supervisor : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

Abstract

Hydrophobin is a surface active protein containing several classes of commercial surfactants found only in fungi to survive and adapt to the environment. The attachment of fungal hyphae to a substrate is aided by the presence of hydrofobin which has an amphiphilic. This research was conducted to determine the potential of Wonorejo mangrove forest fungus in producing hydrophobin and to know the effect of the composition of the medium and pH on hydrophobin production. The method used include screeningbiosurfactant-producing isolates, hydrophobin production, and the effect of medium and pH with medium surface tension activity parameters, biomass dry weight and changes in pH medium.

The result showed that *A. Terreus* fungi had the potential to produce hydrophobin use biosurfactant analysis method with the highest biosurfactant activity achieved in the ODT of 12,45 mm, ATP was 54,01 dyne/cm, EA was 0,9% and the cell surface hydrophobicity was 14,5%. The production of hydrophobin carried out with SDS-*Page* only shows a protein band at 43,05 kDa so that hydrophobin protein is not seen. The treatment of medium and pH variations affect the production of hydrophobin. The best hydrophobin production was achieved in a standard medium pH 6 with ATP of 41,8 dyne/cm with a dry weight of 0,075 grams of fungi biomass.

Keywords : Fungi, Hydrophobin, Medium, pH

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas berkat dan hikmat yang diberikan, penulis dapat menyelesaikan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Studi Potensi Jamur dari Hutan Mangrove Wonorejo Dalam Menghasilkan Biosurfaktan**. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata I (S1) pada Departemen Biologi, Fakultas Ilmu Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Penulis mendapatkan banyak sekali doa dan bantuan berbagai pihak dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini. Atas berbagai bantuan dan dukungan tersebut, pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Nur Hidayatul Alami, S. Si., M. Si. dan Ibu Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si selaku pembimbing Tugas Akhir yang tidak kenal lelah memberikan ilmu, waktu, dan nasihat dalam proses penyusunan Tugas Akhir dari awal hingga selesai. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., MT dan Ibu Noor Nailis Sa'adah, S.Si., M.Sc selaku dosen penguji serta teman-teman dan pihak lain yang telah banyak membantu saya untuk menemani di dalam laboratorium hingga larut malam.

Surabaya, 12 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	vii
ABSTRAK.....	ix
<i>ABSTRACT</i>	xi
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Jamur.....	5
2.2 Jamur dari Wilayah Hutan Wonorejo.....	6
2.3 Hidrofobin.....	6
2.4 Jamur Penghasil Hidrofobin.....	7
2.4.1 Hidrofobin dari Askomisetes.....	9
2.4.2 Hidrofobin dari Basidiomisetes.....	10
2.5 Pengaruh Lingkungan terhadap Produksi Hidrofobin.....	10
2.6 Analisis Isolat Penghasil Biosurfaktan.....	11
BAB III METODOLOGI.....	17
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2 Cara Kerja.....	17
3.2.1 Subkultur Isolat.....	17
3.2.2 Pembuatan Medium.....	17
3.2.3 Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan.....	19
3.2.3.1 Tes Pemindahan Minyak (<i>Oil Displacement Test</i>).....	19

3.2.3.2 Aktivitas Tegangan Permukaan (ATP).....	19
3.2.3.3 Uji Kapasitas Emulsifikasi Biosurfaktan	20
3.2.4 Uji Hidrofobisitas Permukaan Sel Jamur	20
3.2.5 Ekstraksi Hidrofobin Kelas I dan II	21
3.2.6 Pengaruh pH dan Medium dalam Produksi Hidrofobin	22
3.2.6.1 Berat Kering Biomassa Jamur.....	22
3.2.6.2 Perubahan pH.....	22
3.3 Analisis Data.....	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan	25
4.2 Produksi Hidrofobin.....	30
4.3 Pengaruh pH dan Medium terhadap Produksi Hidrofobin ...	32
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
DAFTAR PUSTAKA	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Hidrofobin Jamur	7
Gambar 2.2 Gambaran Umum Hidrofobin Fungi.....	8
Gambar 2.3 Mekanisme Pengukuran Tegangan Permukaan Du Nouy.....	13
Gambar 4.1 Hasil <i>Oil Displacement Tets</i> Sebelum dan Setelah Penambahan Supernatan LM 1021 (<i>Aspergillus terreus</i>)	27
Gambar 4.2 Penampang Lapisan Emulsi oleh LM 1021 (<i>Aspergillus terreus</i>).....	29
Gambar 4.3 (a) Kultur Jamur pada Medium Standar dan (b) Busa yang dihasilkan oleh LM 1021 (<i>Aspergillus terreus</i>)	31
Gambar 4.4 Hasil Analisis SDS- <i>Page</i>	32
Gambar 4.5 Pertumbuhan Isolat Jamur pada Medium Standar dan MSM+Plastik	33
Gambar 4.6 Biomassa Jamur pada Perlakuan Variasi Komposisi Medium dan pH	35

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Komposisi Medium pada Uji Produksi Hidrofobin.....	15
Tabel 3.1	Rancangan Tabel Analisis Isolat Potensial Penghasil Hidrofobin	23
Tabel 4.1	Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan....	26
Tabel 4.2	Aktivitas Tegangan Permukaan (dyne/cm) <i>Aspergillus terreus</i> (LM 1021) pada Variasi Medium dan pH Perlakuan Setelah 10 Hari Masa Inkubasi.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Alur Penelitian	47
Lampiran 2. Hasil Uji Kapasitas Emulsifikasi.....	48
Lampiran 3. Hasil Uji Hidrofobisitas Permukaan Sel.	48
Lampiran 4. Hasil Uji Anova <i>Two Way</i>	48
Lampiran 5. Hasil Uji Lanjut Tukey	49
Lampiran 6. Uji Normalitas Anova <i>Two way</i>	50
Lampiran 7. Hasil Skrining Uji <i>Oil Displacement Test</i>	51
Lampiran 8. Biodata Penulis	60

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Jamur merupakan salah satu mikroorganisme yang berperan dalam proses degradasi limbah organik maupun anorganik dengan memanfaatkan sumber nutrisi dari substratnya sebagai sumber karbon (Muslih dkk., 2013). Jamur memperoleh makanan melalui penyerapan zat organik dari lingkungan melalui hifa dan miseliumnya (Gandjar, 2006). Hifa vegetatif jamur tumbuh ke dalam substrat atau menjalar di atas substrat, sehingga memperluas permukaan kontak dengan substrat (Tortotora *et al.*, 2013). Nutrien-nutrien dapat dimanfaatkan setelah jamur mensekresi enzim-enzim ekstraseluler atau senyawa polimer ekstraseluler yang disebut EPS yang membantu mikroorganisme dapat melekat pada permukaan substrat dan mengurai senyawa-senyawa kompleks dari substrat tersebut menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana (Madigan, 2006). Selain itu, menurut Joshi *et al.*, (2008) penempelan hifa jamur pada suatu substrat juga dibantu dengan adanya hidrofobin.

Hidrofobin, protein kecil sekitar 100 asam amino (Cicatiello *et al.*, 2016) merupakan protein yang diproduksi oleh jamur berfilamen yang memiliki sifat amfifilik. Hidrofobin memiliki bagian hidrofilik dan hidrofobik serta merupakan salah satu protein aktif permukaan yang paling dikenal (Linder *et al.*, 2005). Hidrofobin dapat disekresikan di sekitar tubuh buah atau miselium jamur. Fungsi biologis hidrofobin beragam, akan tetapi selalu berhubungan dengan interaksi antarmuka atau permukaan dan berperan sebagai zat pelapis atau pelindung, dalam adhesi dan modifikasi permukaan (Linder & Markus, 2009).

Peran hidrofobin pada jamur selain peran struktural, juga berperan dalam membantu jamur untuk bertahan hidup dan beradaptasi dengan lingkungan. Kedua peran ini terkait dengan fenomena permukaan yang berbeda. Hidrofobin berperan dalam mengendalikan tegangan permukaan air, sehingga jamur dengan

mudah dapat mengatasi gaya gravitasi. Dengan demikian, karakter fungsional terpenting dari hidrofobin untuk jamur adalah kemampuannya untuk berinteraksi dengan permukaan agar jamur mampu melekat erat pada substrat padat, melapisi permukaan dan menurunkan tegangan permukaan (Linder *et al.*, 2005). Produksi hidrofobin dipengaruhi oleh faktor-faktor lingkungan seperti jenis medium, pH, dan suhu. Komposisi medium yang berbeda akan mempengaruhi jenis dan jumlah surfaktan yang dihasilkan (Duvnjak *et al.*, 1982). Aktivitas permukaan hidrofobin yang setara dengan surfaktan komersial (Kulkarni *et al.*, 2017) disekresikan di sekitar tubuh buah atau miselium jamur untuk meningkatkan ketersediaan substrat yang hidrofobik. Dengan adanya hidrofobin, substrat yang berupa cairan akan teremulsi menjadi misel, dan menyebarkannya ke permukaan sel jamur dan substrat yang padat dipecah oleh biosurfaktan, sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel (Terziyski *et al.*, 2014) dan melakukan metabolisme. Sedangkan pH akan mempengaruhi waktu pertumbuhan miselium.

Berdasarkan perbedaan struktural dan sifat-sifat agregat yang dibentuk, hidrofobin terbagi menjadi dua kelas yaitu kelas I dan kelas II. Kelas I dan II ditemukan pada kelompok jamur Askomisetes, sedangkan pada kelompok Basidiomisetes termasuk kelas I (Linder & Markus, 2009). Kedua jenis hidrofobin telah digunakan untuk beberapa aplikasi bioteknologi, seperti penyebaran bahan hidrofobik, stabilisasi busa dalam produk makanan, imobilisasi enzim, peptida, antibodi dan nanomaterial pada berbagai permukaan (Cicatiello *et al.*, 2016).

Wonorejo merupakan kawasan hutan mangrove di pesisir pantai timur Surabaya, memiliki keanekaragaman tumbuhan mangrove yang didominasi oleh tegakan *Avicennia marina*, *Avicennia alba*, *Rhizophora mucronata* dan *Sonneratia alba* (Meiliawati & Kuswytasari., 2013). Telah diisolasi sebanyak 37 jenis jamur potensial pendegradasi bahan organik dari daerah Wonorejo. Lingkungan tersebut memungkinkan adanya pertumbuhan jamur pada tanah dan tegakan mangrove yang perlu

diketahui potensi jamur-jamur tersebut dalam menghasilkan hidrofobin.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dibahas dari penelitian ini adalah :

1. Bagaimana potensi jamur hutan mangrove Wonorejo dalam memproduksi hidrofobin?
2. Bagaimana pengaruh komposisi medium dan pH terhadap produksi hidrofobin?

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah skringing dilakukan pada 20 dari 37 isolat jamur Wonorejo koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi ITS dalam menghasilkan hidrofobin.

1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui potensi isolat jamur hutan mangrove Wonorejo dalam menghasilkan hidrofobin.
2. Mengetahui pengaruh komposisi medium dan pH terhadap pembentukan hidrofobin.

1.5 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk melihat potensi jamur Wonorejo dalam menghasilkan hidrofobin serta kondisi optimum pembentukannya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jamur

Jamur merupakan organisme yang bersifat eukariotik, menghasilkan spora, tidak berklorofil, dengan struktur somatik berupa filamen yang bercabang-cabang. Pada umumnya berkembang biak secara seksual dan aseksual. Karena jamur tidak mempunyai klorofil, maka untuk hidupnya tergantung kepada organisme lain atau dengan kata lain jamur bersifat heterotrof (Yulianty, 2005). Jamur memperoleh makanan melalui penyerapan zat organik dari lingkungan melalui hifa dan miseliumnya, kemudian menyimpannya dalam bentuk glikogen. Oleh karena jamur merupakan konsumen, maka jamur bergantung pada substrat yang menyediakan karbohidrat, protein, vitamin, dan senyawa kimia lainnya yang diperoleh dari lingkungannya (Gandjar, 2006).

Bagi fungi, hifa memiliki peran ganda sebagai akar dan daun pada tumbuhan sekaligus. Hifa tumbuh menyebar ke dalam tubuh atau semua bagian organisme. Bentuk hifa yang halus memperluas permukaan kontak dengan substrat (obyek makanannya). Hifa kemudian melepaskan enzim atau substansi lain (khususnya pada fungi yang hidup pada jaringan hidup) pada substrat agar kemudian dihasilkan senyawa-senyawa kimia tertentu (terutama karbohidrat). Hifa kemudian kembali menyerap senyawa-senyawa kimia ini untuk dimanfaatkannya dalam metabolisme internal (Tortotora *et al.*, 2013).

Substrat merupakan sumber nutrient utama bagi jamur. Nutrien-nutrien baru dapat dimanfaatkan sesudah jamur mensekresi enzim-enzim ekstraseluler yang dapat mengurai senyawa-senyawa kompleks dari substrat tersebut menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Pertumbuhan jamur pada suatu substrat dapat juga diketahui melalui penambahan massa sel, perubahan pada substrat karena proses metabolisme sehingga substrat menjadi lunak, basah-basah dan timbul bau

yang semula tidak tercium, timbulnya perubahan warna, atau kekeruhan pada suatu substrat cair (Gandjar, 2006).

2.2 Jamur dari Wilayah Hutan Wonorejo

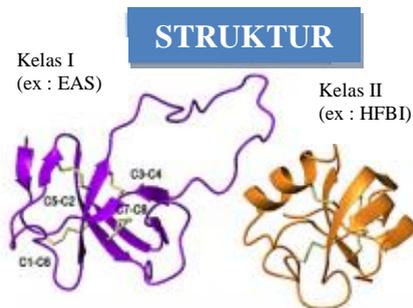
Wonorejo merupakan kawasan hutan mangrove di pesisir pantai timur Surabaya memiliki keanekaragaman tumbuhan mangrove yang didominasi oleh tegakan mangrove *Avicennia marina*, *Avicennia alba*, *Rhizophora mucronata* dan *Sonneratia alba* (Meiliawati & Kuswytasari, 2013). Lingkungan tersebut memungkinkan adanya pertumbuhan jamur pada tanah dan tegakan mangrove di vegetasi Wonorejo. Dalam penelitian Kuswytasari *et al* (2011) telah berhasil diisolasi dan dipurifikasi 37 isolat kapang tanah dari Wonorejo Surabaya. Isolat tersebut berasal dari genus *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Curvularia*, *Stachybotrys*, *Gliocladium*, *Gliomastix*, *Acremonium*, *Chaetomium*, *Mortierella*, *Absidia*, *Exophiala*, dan *Cephaliophora*.

2.3 Hidrofobin

Hidrofobin, protein kecil sekitar 100 asam amino (Cicatiello *et al.*, 2016) merupakan protein yang diproduksi oleh jamur berfilamen yang memiliki sifat ampifilik. Hidrofobin memiliki bagian hidrofilik dan hidrofobik serta merupakan salah satu protein aktif permukaan yang paling dikenal (Linder *et al.*, 2005). Hidrofobin dapat disekresikan di sekitar tubuh buah atau miselium jamur. Fungsi biologis hidrofobin beragam, selalu berhubungan dengan interaksi antarmuka atau permukaan dan berperan sebagai zat pelapis/pelindung, adhesi dan modifikasi permukaan (Linder & Markus, 2009).

Berdasarkan perbedaan struktural dan sifat-sifat agregat yang dibentuk, hidrofobin terbagi menjadi dua kelas yaitu kelas I dan kelas II. Kelas I membentuk agregat yang sangat tidak larut yang memiliki penampilan rodlet yang berbeda dan sama dengan fibril amiloid, yang dikarakterisasi oleh struktur-silang.

Rakitan ini menunjukkan stabilitas dan dapat didepolimerisasi dalam asam trifloroasetat 100% (TFA) sedangkan kelas II membentuk polimer kurang stabil yang larut dalam beberapa pelarut organik atau larutan SDS, dan tidak memiliki penampilan rodlet dari kelas I (Cicatiello *et al.*, 2016). Kelas I dan II ditemukan pada kelompok jamur Ascomisetes, sedangkan pada kelompok Basidiomisetes termasuk kelas I (Linder & Markus, 2009). Kedua jenis hidrofobin telah digunakan untuk beberapa aplikasi bioteknologi, seperti penyebaran bahan hidrofobik, stabilisasi busa dalam produk makanan, imobilisasi enzim, peptida, antibodi dan nanomaterial pada berbagai permukaan (Cicatiello *et al.*, 2016) (Gambar 2.1 dan 2.2).

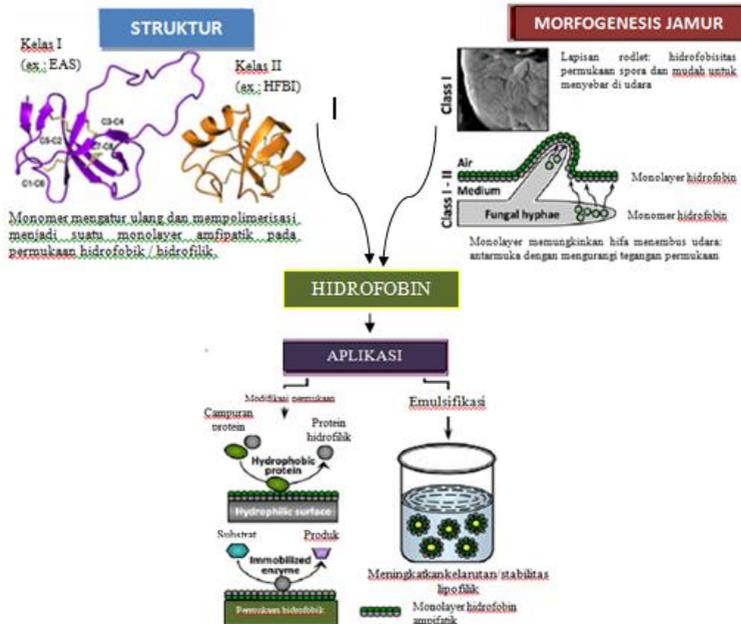


Gambar 2.1. Struktur Hidrofobin Jamur (Bayry *et al.*, 2012).

2.4 Jamur Penghasil Hidrofobin

Hidrofobin adalah protein aktif permukaan yang hanya ditemukan pada jamur. Aktivitas permukaan mereka setara dengan beberapa kelas surfaktan komersial. Hidrofobin yang ditemukan pada spesies jamur yang berbeda memiliki peran yang berbeda pula, seperti menembus lapisan air dengan mengurangi tegangan permukaan untuk pertumbuhan hifa, melekat dengan substrat hidrofobik dengan membuat lapisan spora dan tubuh buah hidrofobik, menyerang serangga dengan memunculkan sekresi enzim seperti kitinase, membantu menyembunyikan antigen dari sistem kekebalan mamalia, serta

asosiasi endofitik dengan tumbuhan. Sifat ampifatik dari hidrofobin adalah pusat dari banyak aplikasi industri. Aplikasi seperti bioavailabilitas obat, pelapisan permukaan, penyebaran bahan hidrofobik dalam larutan berair, busa stabil dalam produk makanan, biosensor, dan biomaterial antifouling dapat didaftar sebagai aplikasi hidrofobin terbaru (Kulkarni *et al.*, 2017).



Gambar 2.2. Gambaran Umum Hidrofobin Jamur (Bayry *et al.*, 2012).

Database Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) saat ini mencantumkan 1678 hidrofobin dimana 428 dari Ascomycetes dan 1250 dari Basidiomycetes. Beberapa bukti menunjukkan bahwa hidrofobin juga diproduksi oleh Zigomisetes. Pola hidropati mereka berbeda, begitu juga persyaratan pemurnian mereka. Kelas I hidrofobin membutuhkan perlakuan seperti penggunaan asam trifloroasetat (TFA) untuk melarutkan lapisan

protein rodlet mereka. Kelas II hidrofobin tidak memiliki lapisan rodlet antarmuka, akibatnya mereka dapat dengan mudah dibubarkan dengan bantuan etanol dan natrium dodesil sulfat (SDS). Spesies dari Askomisetes mengekspresikan hidrofobin dari kedua kelas I dan II. Basidiomisetes hanya menghasilkan kelas I hidrofobin (Kulkarni *et al.*, 2017).

2.4.1 Hidrofobin dari Askomisetes

Banyak spesies genera *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Penicillium*, dan *Neurospora* sudah dikenal untuk produksi industri asam, enzim, protein, dan produk-produk khusus. Beberapa spesies tercantum di atas juga menghasilkan satu atau lebih hidrofobin. Sekitar 74 hidrofobin dari kelas *Aspergillus* telah diidentifikasi dalam delapan spesies. Sebagian besar hidrofobin ini berasal dari kelas I kecuali *Aspergillus terreus* yang menghasilkan hidrofobin kelas II dan *Aspergillus clavatus* menghasilkan hidrofobin kelas I dan II (Kulkarni *et al.*, 2017).

Hidrofobin I dan II dari *Trichoderma reesei* telah berhasil diisolasi, dikarakterisasi dan diproduksi untuk banyak industri aplikasi (Kulkarni *et al.*, 2017) seperti uji aktivitas skrining untuk produksi hidrofobin pada penelitian Hungund *et al.*, 2016 menunjukkan bahwa *Trichoderma reesei* adalah produsen tertinggi menghasilkan busa stabil. Hasil dari SDS-PAGE menunjukkan bahwa hidrofobin yang dihasilkan berada di bawah protein dengan berat molekul rendah. Dengan demikian, penelitian telah mencapai produksi skala lab, karakterisasi dan pemurnian parsial hidrofobin dari *Trichoderma reesei* (Hungund *et al.*, 2016).

Pada penelitian Cicatiello *et al.*, (2016), enam jamur dipilih sebagai produsen terbaik dari hidrofobin yang memiliki karakteristik yang berbeda, yaitu *Rousoellaceae* sp. 2, *Acremonium sclerotigenum*, *Myceliophthora verrucosa*, *Arthopyrenia salicis*, *Penicillium roseopurpureum*, dan *Penicillium chrysogenum*. Kemampuan mereka untuk

membentuk film ampifilik yang stabil dan kapasitas emulsifikasinya dengan adanya minyak zaitun dievaluasi. *Penicillium chrysogenum* adalah satu dari 6 jamur memiliki kapasitas emulsifikasi luar biasa yang diuji pada campuran air dan minyak zaitun (Cicatiello *et al.*, 2016).

2.4.2 Hidrofobin dari Basidiomisetes

Telah dipelajari keberadaan hidrofobin pada spesies *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Dictyoynema glabratum* dan peran spesifiknya (Kulkarni *et al.*, 2017).

Hidrofobin pertama kali diisolasi dari *Schizophyllum*, ditemukan di lapisan tubuh buah spora. Temuan berturut-turut memberikan informasi tentang hidrofobin seperti Sc1 (*Schizophyllum commune* hydrophobin 1), Sc4 dan Sc6. Masing-masing dari tiga hidrofobin memiliki peran yang berbeda untuk digunakan, misalnya Sc3 diekspresikan baik dalam monokaryon dan dikaryons tetapi Sc4 hanya diekspresikan dalam dikaryons. Sc3 memiliki peran dalam menembus lapisan air untuk pertumbuhan hifa dan perlekatan dengan substrat. Sc4 mencegah saluran gas tubuh buah untuk diisi dengan air dalam kondisi basah (Kulkarni *et al.*, 2017).

2.5 Pengaruh Lingkungan Terhadap Produksi Hidrofobin

Peningkatan produksi hidrofobin dapat dilakukan dengan menggunakan jamur dari habitat alami. Hidrofobi: 11 permukaan jamur dapat ditingkatkan dengan menumbuhkannya di lingkungan yang sesuai (Kulkarni *et al.*, 2017).

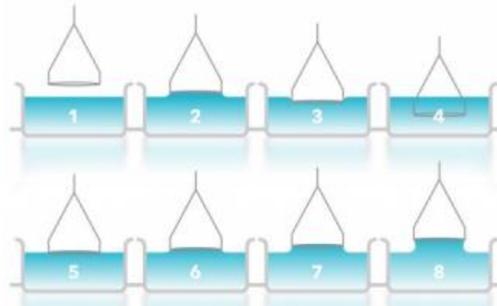
Penambahan sumber karbon yang menunjukkan aktivitas biosurfaktan tertinggi adalah yang memberikan nilai *Oil Displacement Test* maksimum dan nilai tegangan permukaan minimum. Sumber nitrogen organik dan anorganik digunakan untuk pertumbuhan dan produksi biosurfaktan dalam medium dengan sumber karbon optimal dimana pepton dipilih sebagai sumber nitrogen yang sesuai yang memberikan nilai aktivitas biosurfaktan yang tinggi (Leupongpattana *et al.*, 2014).

Bhardwaj *et al.*, (2013) ditunjukkan bahwa ketika hanya satu sumber karbon yang ditambahkan untuk produksi biosurfaktan, hasil biosurfaktannya sangat rendah. Akan tetapi ketika kedua sumber karbon digunakan, hasil tinggi diperoleh. *Fusarium solani* yang tumbuh pada media padat yang mengandung heksana menunjukkan lebih banyak kandungan hidrofobik dibandingkan dengan jamur yang sama yang tumbuh dalam kultur cair yang mengandung lebih sedikit senyawa hidrofobik. Ini menunjukkan bahwa hidrofobisitas permukaan jamur secara langsung tergantung pada lingkungan dari mana ia diisolasi atau diadaptasi untuk penggunaan selanjutnya (Fernandez *et al.*, 2006).

2.6 Analisis Isolat Penghasil Biosurfaktan

Analisis skrining isolat penghasil hidrofobin dilakukan dengan tiga metode yaitu *Oil Displacement Test* (ODT), aktivitas tegangan permukaan dan uji kapasitas emulsi. Pada metode ODT, jika dalam uji dihasilkan biosurfaktan dalam supernatan kultur jamur, akan terjadi perpindahan lapisan minyak membentuk zona bening yang menunjukkan aktivitas surfaktan. Kontrol negatif digunakan tanpa penambahan supernatan kultur jamur, di mana tidak ada perpindahan minyak atau zona bening yang diamati (Koriya *et al.*, 2018). Zona bening terbentuk karena supernatan yang diteteskan pada lapisan minyak mentah teremulsi membentuk misel-misel dan menyebar ke permukaan lapisan minyak. Misel terbentuk karena pada bagian hidrofobik dan hidrofilik yang terdapat di dalam supernatan menyatu, menyebabkan terjadinya tekanan antara bagian hidrofobik dan hidrofilik sehingga tegangan permukaannya turun (Gozan dkk., 2014). Zona bening yang terukur kemudian dihitung nilai ODA (*Oil Displacement Area*) (Gozan dkk., 2014). Aktivitas penyebaran minyak oleh biosurfaktan didefinisikan sebagai area perpindahan minyak dalam cm^2 (Pongthow & Suntornthiticharoen, 2018).

Pada metode aktivitas tegangan permukaan, metode Du-Nouy-Ring didasarkan pada pengukuran gaya yang diperlukan untuk melepaskan cincin kawat dari antarmuka atau permukaan dengan menggunakan tensiometer otomatis (Tadros, 2005). Cincin harus bebas dari kontaminan, yang biasanya dicapai dengan menggunakan cincin platinum. Cincin digerakkan secara bertahap ke dalam wadah sampel. Setelah cincin terlihat terendam, skala diputar sehingga cincin menarik meniskus cairan dan akan lepas. Sebelum terlepas, volume (dan dengan demikian gaya yang diberikan) dari meniskus melewati nilai maksimum dan mulai turun sebelum peristiwa lepas yang sebenarnya (Du Nouy, 1918). Proses ini dijelaskan pada Gambar 2.3. *The Du-Nouy-Ring assay* secara luas diterapkan untuk skrining mikroba memproduksi biosurfaktan. Produsen biosurfaktan yang baik didefinisikan sebagai salah satu yang mampu mengurangi tegangan permukaan air yaitu sebesar 72 dyne/cm (Siregar dkk, 2017). Semakin kecil nilai tegangan permukaan maka akan membuat emulsi suatu larutan semakin stabil dan campuran suatu larutan semakin homogen (Meizar dkk, 2017). Mekanisme penurunan tegangan permukaan oleh surfaktan dapat dipelajari dari mekanisme penetrasi molekul surfaktan ke dalam fase hidrofobik dan hidrofilik. Bagian kepala bersifat hidrofilik masuk ke fase hidrofil dan bagian ekor bersifat hidrofobik masuk ke fase hidrofobik. Interaksi dua gugus ke dalam dua fase menyebabkan penurunan tegangan permukaan antar fase (Mahreni, 2015).



Gambar 2.3. Mekanisme Pengukuran Tegangan Permukaan Du Nouy (Du Nouy, 1918).

Uji indeks kapasitas emulsifikasi merupakan proses pencampuran antara dua fase cair yang tidak dapat bercampur dengan bantuan agen emulsifikasi (surfaktan), sehingga dapat dijadikan salah satu standar dalam menguji kemampuan surfaktan (Gozan dkk., 2014), termasuk metode tidak langsung yang digunakan untuk menyaring produksi biosurfaktan. Uji ini diasumsikan bahwa jika kultur-kultur sel bebas yang digunakan dalam metode ini mengandung biosurfaktan maka akan mengemulsi hidrofobik yang ada dalam larutan uji. Pengukuran dilakukan setelah 24 jam. Reaksi emulsifikasi ditandai dengan adanya suatu lapisan emulsifikasi antara *crude oil* dan media yang berisi biosurfaktan. Aktivitas emulsifikasi ditentukan menggunakan rumus $EA (\%) = \text{ketinggian lapisan emulsi} / \text{tinggi total emulsi} \times 100\%$ (Koriya *et al.*, 2018). Sifat surfaktan yang paling baik didapatkan pada kondisi dengan harga indeks emulsi paling besar yang berarti mempunyai kestabilan emulsi yang besar (Gozan dkk., 2014).

Mikroba penghasil biosurfaktan akan meningkat metabolismenya karena dengan adanya biosurfaktan pada permukaan sel, akan membantu proses transport nutrisi melalui membran selnya, sehingga pada akhirnya akan meningkatkan laju pertumbuhannya (Gozan dkk., 2014). Biosurfaktan adalah

suatu senyawa hasil dari metabolit sekunder yang disekresikan ke luar sel. Biosurfaktan sengaja disekresikan ke dalam medium untuk meningkatkan ketersediaan substrat yang hidrofobik. Dengan adanya biosurfaktan, substrat yang berupa cairan akan teremulsi menjadi misel, dan menyebarkannya ke permukaan sel jamur dan substrat yang padat dipecah oleh biosurfaktan, sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel (Terziyski *et al.*, 2014). Pengaruh pertumbuhan dan aktivitas mikroba dalam memproduksi hidrofobin dilakukan pada jenis medium yang berbeda, antara lain medium XNST30, PDY15 (Cicatiello *et al.*, 2016), medium standar (Hungund *et al.*, 2016) dan MSM dengan komposisi sebagai berikut (Tabel 2.1).

Sumber karbon adalah sumber penting pada pertumbuhan mikroba dan produksi biosurfaktan. Oleh karena itu, dalam penelitian ini ditunjukkan sumber karbon dari plastik ditambahkan ke media produksi (MSM). Plastik adalah molekul polimer rantai panjang (Shah *et al.*, 2008). Plastik yang sering digunakan oleh masyarakat saat ini ialah plastik yang terbuat dari materi organik dan inorganik, seperti karbon, silikon, hidrogen, nitrogen, oksigen, dan klorida. Jenis polimer plastik yang paling umum di gunakan ialah *Polyethylene* (Shalini *et al.*, 2015). Menurut Khanam & AlMaadeed (2015) *Polyethylene* (PE) merupakan termoplastik yang tangguh, memiliki kemampuan menyerap kelembapan hampir nol, memiliki kelembapan kimia yang baik, koefisien gesekannya rendah, mudah dalam memprosesnya, dan konduktivitas listriknya yang rendah. Biosurfaktan yang dihasilkan oleh mikroorganisme, menyebabkan plastik yang memiliki rantai hidrokarbon dapat digunakan sebagai sumber karbon. Peran biosurfaktan adalah membantu pelekatan sel pada kondisi lingkungan yang baru (Joshi *et al.*, 2008). Substrat yang padat dipecah oleh biosurfaktan sehingga lebih mudah masuk ke dalam sel.

Tabel 2.1 Komposisi Medium Pada Uji Produksi Hidrofobin

	XNST30	PDY15	Medium Standar	MSM
Ekstrak malt	3 g/L			
Ekstrak yeast	3 g/L	5 g/L	1 g/L	0,007% (w/v)
NaCl	30g/L	15 g/L		0,5 g/L
Glukosa	10 g/L		20 g/L	
Pepton	5 g/L		4 g/L	0,003% (w/v)
Kentang dextrosa		24 g/L		
(NH ₄) ₂ SO ₄			2,8 g/L	
MgSO ₄ .7H ₂ O			0,6 g/L	0,5 g/L
KH ₂ PO ₄			4 g/L	3 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O			0,004 g/L	
CaCl ₂ .2H ₂ O			0,8 g/L	
MnSO ₄ .H ₂ O			0,0032 g/L	
ZnSO ₄ .7H ₂ O			0,0069 g/L	
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O				3 g/L
NH ₄ Cl				1 g/L
CaCl ₂				0,001 g/L
FeCl ₂ .2H ₂ O				0,001 g/L
Polietilen				0,0069 g

Keterangan :

-  : Senyawa nitrogen anorganik dan organik
 : Sumber karbon

(Leupongpattana *et al.*, 2014).

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2018 hingga bulan April 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Uji aktivitas tegangan permukaan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Subkultur Isolat

Spora isolat stok koleksi diambil dengan jarum tanam tajam dan disubkultur pada medium miring PDA yang baru (Maharani dkk., 2014) secara duplo. Satu kultur digunakan sebagai kultur stok baru, serta satu kultur lain digunakan sebagai kultur kerja. Kultur tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang dalam kondisi aerob (Maharani dkk., 2014). Kultur stok baru disimpan di kulkas sedangkan kultur kerja digunakan untuk uji berikutnya.

3.2.2 Pembuatan Medium

Medium yang digunakan dalam penelitian meliputi medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang digunakan untuk subkultur, medium Hua untuk skrining isolat penghasil hidrofobin serta medium XNST30, PDY15, medium standar dan MSM + plastik untuk medium produksi hidrofobin.

Pada pembuatan medium PDA, sebanyak 39 g medium PDA instan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades hingga volume 1000 ml (Bradson, 2006). Medium PDA dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer* (Bradson, 2006) serta dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml. Medium PDA disterilisasi dahulu di autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15

menit, kemudian medium PDA ditambahkan *chloramphenicol* sebanyak 100 mg/L. Suhu media saat siap untuk ditambah dengan *chloramphenicol* dan dituang ke tabung reaksi adalah 45°-60°C (Indriati dkk., 2010), kemudian didinginkan dalam keadaan miring (*slant agar*).

Medium Hua mengandung komposisi 40 g/L glukosa sebagai sumber karbon, 4 g/L NaNO₃, 0,2 g/L KH₂PO₄, 0,2 g/L MgSO₄·7H₂O, 1 g/L ekstrak *yeast* (Thaniyavarn *et al.*, 2008). Medium XNST30 memiliki komposisi ekstrak malt 3 g/L; ekstrak *yeast* 3 g/L; NaCl 30 g/L; 10 g/L glukosa dan 5 g/L pepton. Medium PDY15 memiliki komposisi 24 g/L kentang dekstrosa; 5 g/L ekstrak *yeast* dan 15 g/L NaCl (Cicatiello *et al.*, 2016). Medium Standar produksi hidrofobin memiliki komposisi 20 g/L glukosa; 4 g/L pepton; 2,8 g/L (NH₄)₂SO₄; 0,6 g/L MgSO₄; 4 g/L KH₂PO₄; 1 g/L ekstrak *yeast*; 0,8 g/L CaCl₂·2H₂O; 0,004 g/L CoCl₂·6H₂O; 0,0032 g/L MnSO₄·H₂O; 0,001 g/L ZnSO₄·7H₂O (Hungund *et al.*, 2016). Semua bahan setiap medium dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Medium diautoklaf pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

Medium MSM merupakan medium minimal yang mengandung komposisi Na₂HPO₄·7H₂O 3 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, NaCl 0,5 g/L, NH₄Cl 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/L, CaCl₂ 0,001 g/L, FeCl₂·2H₂O 0,001 g/L, *yeast* ekstrak 0,007% (w/v), Bacto-peptone 0,003% (w/v) (Maddela, *et al.*, 2015). Pada medium MSM, plastik uji yang digunakan merupakan plastik polietilen jenis HDPE (*High Density Polyethylene*). Sampel plastik dipotong dengan ukuran 1x1 cm. Plastik dibilas dengan akuades steril selama 20 menit (Pramila & Ramesh, 2011), disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama kurang lebih 30 menit (Devi *et al.*, 2015), kemudian plastik uji disinari UV pada *Laminar Air Flow* selama 30 menit (Pramila & Ramesh, 2011).

3.2.3 Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan

Skrining dilakukan pada 20 isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi ITS. Medium yang digunakan adalah modifikasi dari medium Hua sebanyak 99 ml (Thaniyavarn *et al.*, 2008). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang di *rotary shaker* dengan goyangan 200 rpm selama 15 hari. Kultur dipanen dengan sentrifugasi pada 8.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dari setiap isolat diukur aktivitas biosurfaktannya dengan menggunakan metode ODT, ATP dan uji kapasitas emulsifikasi (Leupongpattana *et al.*, 2014).

3.2.3.1 Tes Pemindahan Minyak (*Oil Displacement Test*)

Akuades sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan Petri dan ditambahkan 40 μ l *crude oil* pada permukaan akuades, sehingga terbentuk lapisan tipis pada permukaan air. Supernatan kultur jamur sebanyak 20 μ l diteteskan di tengah cawan Petri dan diamati berpindahnya lapisan minyak membentuk zona bening yang menggambarkan aktivitas surfaktan (Modifikasi dari Leupongpattana *et al.*, 2014).

3.2.3.2 Aktivitas Tegangan Permukaan (ATP)

Sebanyak 5 ml supernatan kultur jamur dimasukkan ke dalam cawan Petri. Tegangan permukaan diukur dengan metode Du Nouy pada suhu ruang menggunakan Tensiometer (Ring tensiometer K6, Hamburg, Germany) (Leupongpattana *et al.*, 2014). Nilai pengukuran dinyatakan dalam dyne/cm dengan menggunakan rumus $r = r_o \times \theta/\theta_o$, dimana r_o adalah tegangan permukaan akuades pada $t^\circ\text{C}$ dan θ adalah tegangan permukaan sampel yang terbaca pada alat (Putra, 2018).

3.2.3.3 Uji Kapasitas Emulsifikasi Biosurfaktan

Supernatan dan minyak tanah dicampurkan ke dalam tabung reaksi kering dengan perbandingan 1:1. Setelah itu dilakukan pengocokan menggunakan vortex selama 2 menit dan

dibiarkan hingga stabil selama 24 jam. Sebagai kontrol positif adalah tween 20 dan kontrol negatif adalah akuades yang masing-masing juga ditambahkan minyak tanah dengan perbandingan 1:1. Indeks emulsifikasi (E_{24}) ditetapkan dengan membagi tinggi lapisan larutan minyak teremulsi dengan tinggi kolom total larutan kemudian dikalikan 100% (Modifikasi Cooper & Goldenberg, 1987).

3.2.4 Uji Hidrofobisitas Permukaan Sel Jamur

Uji hidrofobisitas dilakukan pada isolat penghasil hidrofobin tertinggi yang dipilih berdasarkan skrining isolat penghasil hidrofobin. Konidia disuspensi dengan 3 ml *buffer* potasium fosfat 10 mM (K_2HPO_4 52500 mg/L; KH_2PO_4 95000 mg/L) pada pH 7. Suspensi ditambahkan dengan heksadekan sebanyak 0,4 ml dan diletakkan di *rotary shaker* selama 10 menit kemudian didiamkan selama 2 menit. Pengukuran absorbansi suspensi sebelum (A_0) dan sesudah (A_t) diukur pada panjang gelombang 470 nm. *Buffer* potasium fosfat tanpa konidia berfungsi sebagai blanko. Presentase hidrofobisitas dihitung menggunakan rumus $= (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$. Hidrofobisitas dinyatakan sebagai persentase sel yang dikeluarkan dari fase cair (suspensi) (Devi *et al.*, 2015). Hidrofobin sengaja disekresikan ke dalam medium untuk meningkatkan ketersediaan substrat yang hidrofobik. Dengan adanya hidrofobin, substrat yang berupa cairan akan teremulsi menjadi misel, dan menyebarkannya ke permukaan sel jamur (Terziyski *et al.*, 2014).

3.2.5 Ekstraksi Hidrofobin Kelas I dan II

Isolat penghasil hidrofobin tertinggi ditumbuhkan pada medium standar untuk memproduksi hidrofobin. Inkubasi dilakukan pada 150 rpm dengan suhu 25°C selama 4 hari. Sel dipanen dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit. Sel dilisiskan dengan cara pelet ditambahkan dengan akuabides kemudian disonikasi selama 40 menit untuk melepaskan

intraseluler dan hidrofobin. Suspensi sel dikocok untuk menghasilkan busa (Hungund *et al*, 2016).

Busa dikumpulkan dan ditambahkan dengan 20% TCA (*trichloroaceticacid*) kemudian diinkubasi selama 12 jam pada suhu 4°C dalam kondisi statis dan disentrifugasi pada 10.000 rpm. Ekstraksi hidrofobin kelas I, pelet yang diperoleh ditambahkan dengan 10 µl 100% TFA dan dimasukkan ke dalam sonikator selama 10 menit kemudian dikeringkan dengan nitrogen cair dan dilarutkan dengan 50 µl larutan etanol 60%. Sementara itu, ekstraksi hidrofobin kelas II pelet yang diperoleh langsung ditambahkan dengan 50 µl larutan etanol 60% untuk melarutkan hidrofobin kelas II. Setelah itu dilakukan analisis menggunakan SDS-PAGE. Bobot molekul protein yang diamati di sebagian besar hidrofobin berkisar antara 11 dan 35 kDa (Cicatiello *et al.*, 2016).

3.2.6 Pengaruh pH dan Medium Terhadap Produksi Hidrofobin

Suspensi jamur sebanyak 1 ml diinokulasi kedalam 9 ml medium XNST30, PDY15, medium standar dan MSM + plastik, diinkubasi dengan pH masing-masing 3, 4, 5, 6, 7 pada 200 rpm dengan suhu ruang selama 10 hari (Modifikasi dari Cicatiello *et al.*, 2016). Kemudian kultur uji disaring untuk mendapatkan supernatan dan diuji aktivitas tegangan permukaannya.

3.2.6.1 Berat Kering Biomassa Jamur

Kultur *Aspergillus terreus* yang telah berumur 10 hari dipanen. Kultur disaring menggunakan kertas saring dan dibungkus menggunakan alumunium foil yang sudah diketahui berat keringnya dan corong. Biomassa yang diperoleh dari hasil penyaringan dikeringkan dalam inkubator pada suhu 50°C selama 3 hari dengan dibungkus menggunakan alumunium foil, kemudian ditimbang berat keringnya (Modifikasi Herlina, 2009). Plastik dan miselia fungi dioven secara terpisah pada suhu 50°C

selama 24 jam. Hasil pengovenan ditimbang berat keringnya menggunakan neraca analitik.

3.2.6.2 Perubahan pH

Perubahan pH yang terjadi setelah produksi hidrofobin diukur menggunakan pH meter.

3.3 Analisis Data

Rancangan penelitian jamur penghasil hidrofobin menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan beberapa perlakuan yaitu pada medium MSM+plastik, XNST30, PDY15 dan medium standar masing-masing dengan pH 3, 4, 5, 6, dan 7 pada suhu ruang. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali sehingga diperoleh 60 unit percobaan (Tabel 3.1). Parameter yang diukur meliputi aktivitas tegangan permukaan medium, berat kering biomassa jamur dan perubahan pH medium. Hasil perhitungan berat kering plastik, biomassa jamur dan perubahan pH dianalisa menggunakan metode deskriptif kuantitatif.

Tabel 3.1 Rancangan Tabel Analisis Isolat Potensial Penghasil Hidrofobin.

Medium	pH				
	3	4	5	6	7
A	A3	A4	A5	A6	A7
B	B3	B4	B5	B6	B7
C	C3	C4	C5	C6	C7
D	D3	D4	D5	D6	D7

Keterangan :

A : Medium XNST30

C : Medium Standar

B : Medium PDY15

D : Medium MSM+plastik

Data hasil produksi hidrofobin yang diperoleh dari setiap perlakuan selanjutnya diuji dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) *Two Way* untuk mengetahui pengaruh komposisi

medium dan pH dalam menghasilkan hidrofobin dengan hipotesa sebagai berikut :

H_0 : tidak ada pengaruh komposisi medium dan pH dalam menghasilkan hidrofobin

H_1 : minimal ada satu pengaruh komposisi medium dan pH dalam menghasilkan hidrofobin

Jika H_1 diterima maka dilanjutkan dengan uji Tukey pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan

Dua puluh isolat jamur (Tabel 4.1) dari Hutan Mangrove Wonorejo koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Biologi ITS diseleksi menggunakan tiga metode penentuan potensi jamur dalam menghasilkan biosurfaktan yaitu area perpindahan minyak atau *Oil Displacement Test* (ODT), aktivitas emulsifikasi dan aktivitas tegangan permukaan (ATP) (Walter *et al*, 2010). Semua isolat diinkubasi pada medium Hua dan diukur aktivitas biosurfaktan.

Pada metode area perpindahan minyak, supernatan kultur jamur yang mengandung biosurfaktan pada permukaan minyak berkorelasi dengan aktivitas surfaktan (Walter *et al*, 2010). Luas lingkaran perpindahan minyak yang diukur dikatakan sebagai aktivitas surfaktan (Hashemi *et al*, 2016), tetesan supernatan tersebut menyebar karena adanya gaya atau tegangan antarmuka antara tetesan cairan serta terjadi penurunan permukaan hidrofobik (Walter *et al*, 2010). Pada Tabel 4.1, simbol positif menunjukkan bahwa aktivitas surfaktan menyebabkan terbentuknya zona bening akibat terdistribusinya tetesan minyak pada permukaan antara fase yaitu permukaan yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik, sedangkan simbol negatif tidak terbentuk zona bening. Berdasarkan Tabel 4.1, isolat LM 1021 (*Aspergillus terreus*) menunjukkan positif membentuk zona bening tertinggi yaitu 12,45 mm. Zona bening terbentuk karena supernatan yang ditetaskan pada lapisan minyak mentah teremulsi membentuk misel-misel dan menyebar ke permukaan lapisan minyak. Misel terbentuk karena pada bagian hidrofobik dan hidrofilik yang terdapat di dalam supernatan menyatu, menyebabkan terjadinya tekanan antara bagian hidrofobik dan hidrofilik sehingga tegangan permukaannya turun (Gozan dkk., 2014). Gambar 4.1 menunjukkan area perpindahan minyak dalam cawan petri.

Tabel 4.1 Skrining Isolat Penghasil Biosurfaktan

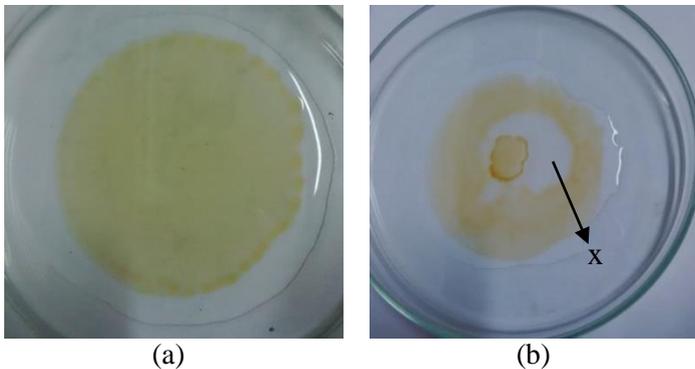
No	Isolat	ODT	ATP (dyne/cm)	EA (%)
1	LM 1025	+	60,33	0,62
2	LM 1002	-	68,13	-
3	LM 1102	+	54,51	-
4	LM 1105	+	51,3	-
5	LM 1015	-	53,84	-
6	LM 3008	+	64,93	-
7	LM 3002	-	54,37	-
8	LM 3013	-	51,18	-
9	LM 3020	+	54,01	-
10	LM 1018	+	50,65	-
11	LM 3011	-	62,95	-
12	LM 1020	+	56,86	2,2
13	LM 1021	+	54,01	0,9
14	LM 3010	+	58,69	-
15	LM 1031	+	54,07	-
16	LM 3003	+	59,63	-
17	LM 3001	-	54,97	-
18	LM 3023	+	60,08	-
19	LM 1041	+	56,46	1,5
20	LM 1107	-	52,12	1,03

Keterangan :

ODT :*Oil Displacement Test*.

ATP : Aktivitas Tegangan Permukaan.

EA :*Emulsification Activity*.



Gambar 4.1. Hasil *Oil Displacement Test* (a) Sebelum dan (b) Setelah Penambahan Supernatan LM 1021 (*Aspergillus terreus*) yang ditunjukkan pada simbol x.

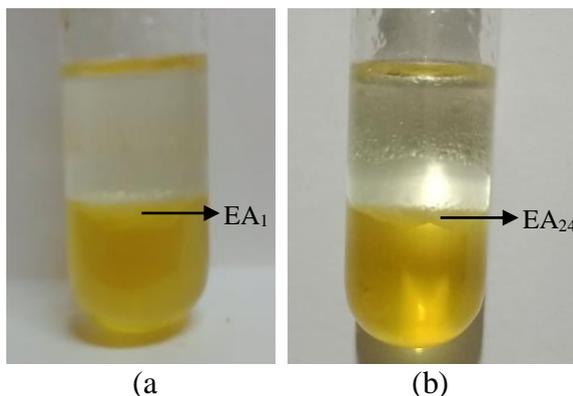
Karakter lain dari biosurfaktan yaitu kemampuannya menurunkan tegangan permukaan dan stabilitas emulsi pada berbagai hidrokarbon (Duvnjak *et al*, 1982). Pada metode tegangan permukaan digunakan alat Du Nouy Tensiometer, dimana prinsip kerja alat ini adalah gaya yang diperlukan untuk melepaskan cincin platinum iridium yang tercelup pada permukaan atau antar permukaan sebanding dengan tegangan permukaan atau antar permukaan (Wahyuni dkk, 2014). Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh nilai tegangan permukaan supernatan kultur pada masing-masing isolat setelah diinkubasi pada medium Hua berkisar 50,65-68,13 dyne/cm yang berarti mampu menurunkan tegangan permukaan air dari 72 dyne/cm (Siregar dkk, 2017). Semakin banyak molekul surfaktan yang terbentuk maka gaya kohesi air akan menurun dan menyebabkan tegangan permukaan semakin menurun (Putra, 2018). Bagian kepala bersifat hidrofilik masuk ke fase hidofil dan bagian ekor bersifat hidrofobik masuk ke fase hidrofobik. Interaksi dua gugus ke dalam dua fase menyebabkan penurunan tegangan permukaan antar fase (Mahreni, 2015). Molekul-molekul surfaktan mempunyai kecenderungan untuk berada pada permukaan sebuah

cairan dan menyebabkan penurunan jumlah total kerja untuk memperluas permukaan karena molekulnya mengikat fasa polar, yaitu air, dan non-polar, yaitu udara (Putra, 2018).

Biosurfaktan juga memiliki sifat yang dapat menghasilkan buih atau busa membuat emulsi minyak dalam air atau air dalam minyak yang berperan seperti surfaktan sintesis (Duvnjak *et al*, 1982) dimana diasumsikan bahwa kultur-kultur sel bebas yang digunakan dalam metode ini menghasilkan biosurfaktanyang akan mengemulsi molekul atau bagian hidrofobik pada larutan uji. Menurut Koriya *et al*, (2018), reaksi emulsifikasi ditandai dengan adanya suatu lapisan emulsi antara *crude oil* dan media yang berisi biosurfaktan. Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh nilai aktivitas emulsifikasi setelah 24 jam pada beberapa isolat yang berkisar 0,62-2,2%. Menurut Putra (2018), penambahan bahan pengemulsi yang cukup ke dalam campuran dua larutan akan terbentuk lapisan utuh antara kedua cairan tersebut yang dapat menurunkan tegangan permukaan, sehingga tetap stabil dalam waktu yang lama. Kestabilan emulsi pada suatu surfaktan adalah kesetimbangan antara gaya tarikmenarik dan gaya tolak-menolak yang terjadi antar partikel dalam sistem emulsi.

Semakin kecil nilai tegangan permukaan maka akan membuat emulsi suatu larutan semakin stabil dan campuran suatu larutan semakin homogen (Meizar dkk, 2017), namun aktivitas permukaan dan kemampuan emulsifikasi biosurfaktan tidak selalu berhubungan secara linier (Walter *et al*, 2010). Cooper and Goldenberg (1987) membagi biosurfaktan menjadi dua kelompok yaitu surfaktan dengan berat molekul rendah (glikolipid, soforolipid, trehalosalipid, asam lemak, dan fosfolipid) yang terdiri atas molekul hidrofobik dan hidrofilik. Kelompok ini bersifat aktif permukaan yang ditandai dengan adanya penurunan tegangan permukaan medium cair. Kelompok kedua adalah polimer dengan berat molekul besar yang dikenal dengan bioemulsifier. Dalam medium cair, bioemulsifer mempengaruhi pembentukan emulsi serta kestabilannya.

Dalam penelitian ini, berdasarkan Tabel 4.1, terdapat 4 isolat yang memiliki ketiga sifat karakter dari biosurfaktan yaitu mampu memberikan aktivitas perpindahan minyak, menurunkan tegangan permukaan dan memiliki aktivitas stabilitas emulsifikasi antara lain LM 1025, LM 1020, LM 1021 dan LM 1041, namun dipilih 1 isolat yaitu LM 1021 untuk dilakukan uji lanjutan yang didasarkan pada nilai aktivitas tegangan permukaan yang lebih rendah yaitu 54,01 dyne/cm. Hal ini berdasarkan Hungund *et al* (2016) bahwa biosurfaktan yang dihasilkan jamur memainkan peran penting untuk pertumbuhan dan perkembangan jamur dimana biosurfaktan mampu menurunkan tegangan permukaan medium tempat tumbuh jamur dan mempertahankan permeabilitas yang baik untuk pertukaran gas. Hasil skrining bahwa menunjukkan isolat LM 1021 juga memiliki aktivitas biosurfaktan tertinggi yaitu memberikan aktivitas perpindahan minyak sebesar 12,45 mm dan adanya lapisan emulsi sebesar 0,9%, dimana telah mengalami penurunan kemampuan emulsifikasi dari 1,04% pada jam pertama (Lampiran 2) yang ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Penampang Lapisan Emulsi oleh LM 1021 (*Aspergillus terreus*); (a) Pada Jam Ke-1 (EA₁); (b) Pada Jam Ke-24 (EA₂₄).

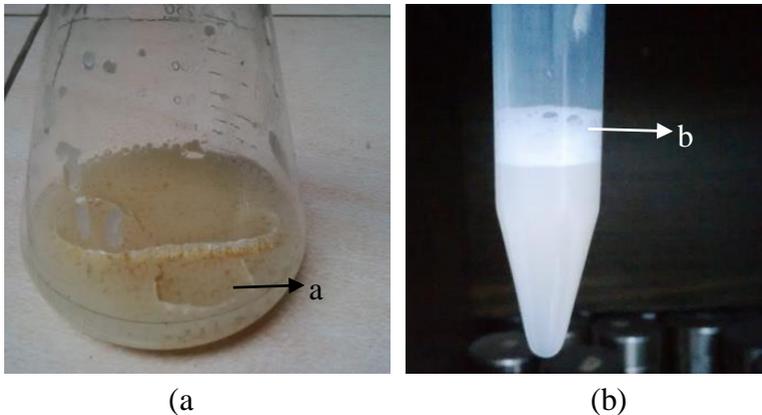
Berdasarkan Tabel 4.1, hasil karakteristik biosurfaktan ini memiliki kemampuan emulsifikasi yang tergolong rendah bila dibandingkan dengan aktivitas *biobased surfactant* yang bersifat *emulsifier* yang memiliki kisaran nilai EA antara 42,27-66,72% (Ni'matuzahroh *et al.*, 2010) walaupun dapat menurunkan tegangan yang dengan nilai tinggi (mampu menurunkan tegangan permukaan mencapai 54,01 dyne/cm) maka biosurfaktan dari isolat LM 1021 tergolong surfaktan dengan berat molekul rendah. Oleh karena itu, uji emulsifikasi hanya digunakan sebagai indikasi awal adanya biosurfaktan (Walter *et al.*, 2010).

Metode selanjutnya didasarkan pada hidrofobisitas permukaan sel. Metode ini merupakan metode tidak langsung untuk skrining mikroba penghasil biosurfaktan. Biosurfaktan merupakan produk metabolisme ekstraseluler yang terikat pada bagian-bagian sel. Kemampuan mereka untuk melekat pada permukaan biotik dan abiotik tergantung pada beberapa faktor, termasuk hidrofobisitas (Walter *et al.*, 2010). Dari penelitian ini, suspensi sel mikroba yang keruh dan berair dicampur dengan heksadekan selama dua menit dan dibiarkan bereaksi dengan heksadekan sehingga terjadi penurunan kekeruhan fase cair, diperoleh persentase hidrofobisitas dari isolat LM 1021 sebesar 14,5% (Lampiran 3). Hal ini dikarenakan sel-sel hidrofobik terikat pada hidrokarbon. Penurunan kekeruhan fase berair berkorelasi dengan hidrofobisitas sel (Walter *et al.*, 2010).

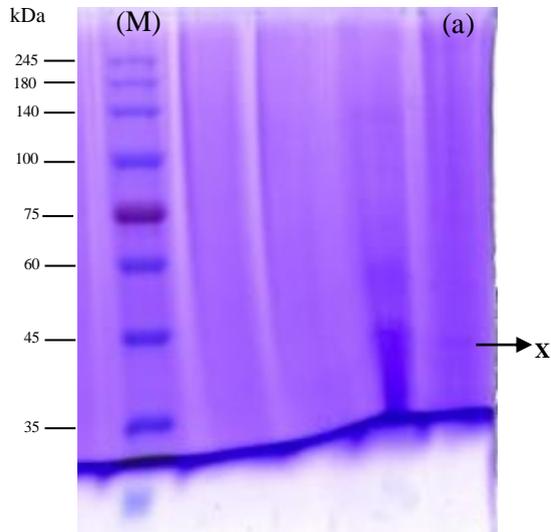
4.2 Produksi Hidrofobin

Isolat LM 1021 (*Aspergillus terreus*) ditumbuhkan pada medium standar (Hungund *et al.*, 2016) selama 10 hari (Gambar 4.3a). Hidrofobin membentuk lapisan yang tidak larut pada antarmuka air dan udara sehingga membentuk busa didalam medium (Gambar 4.3b). Busa dikumpulkan dan ditambahkan larutan etanol 60% untuk diuji pada SDS-PAGE (Armenante, 2008). Spesies dari Askomisetes mengekspresikan hidrofobin dari kedua kelas I dan II. Jamur *Aspergillus terreus* menghasilkan hidrofobin kelas II (Kulkarni *et al.*, 2017) sehingga dilakukan uji pada kelas II dengan SDS-Page.

Gambar 4.3 merupakan hasil SDS-Pagemenggunakan marker *ExactPro Broad Range* (10-245 kDa) *Prestained Protein Ladder* (C/No: BIO-5150) dari ekstraksi kultur cair LM 1021. Gambar 4.4a merupakan hasil dari uji hidrofobin kelas II terlihat pita protein yang samar pada 43,05 kDa. Menurut Cicatiello *et al*, (2016), bobot molekul protein yang diamati di sebagian besar hidrofobin berkisar antara 11 dan 35 kDa. Hasil penelitian ini diperoleh molekul protein >35 kDa sehingga masih belum bisa menentukan protein hidrofobin, Sebagian besar hidrofobin dari kelas *Aspergillus* berasal dari kelas I kecuali *Aspergillus terreus* yang menghasilkan hidrofobin kelas II (Kulkarni *et al.*, 2017).



Gambar 4.3.(a) Kultur Jamur Pada Medium Standar yang ditunjukkan pada simbol a; (b) Busa yang Dihasilkan oleh LM 1021(*Aspergillus terreus*) yang ditunjukkan pada simbol b.



Gambar 4.4. Hasil Analisis SDS-PAGE; (M) marker dan (a) Sampel *Aspergillus terreus* (LM 1021).

4.3 Pengaruh pH dan Medium Terhadap Produksi Hidrofobin

Biosurfaktan yang dihasilkan masing-masing mikroorganisme berbeda tergantung pada jenis mikroorganisme dan nutrisi yang dikonsumsinya (Duvnjak *et al.*, 1982). Isolat LM 1021 (*Aspergillus terreus*) dikultur pada medium dengan sumber karbon atau sumber nitrogen yang berbeda yaitu XNST30, PDY15, Medium Standar dan MSM+plastik selama 10 hari dengan variasi pH yaitu 3, 4, 5, 6 dan 7. Pertumbuhan kultur LM 1021 pada medium XNST30, PDY15 dan Medium Standar membentuk miselium berupa granul yang melayang-layang seperti pada Gambar 4.5. Biomassa sel dalam medium cair akan terlihat memiliki bentuk seperti granul atau kapas kecil yang melayang-layang dalam medium. Bentuk seperti granul tersebut merupakan spora yang telah tumbuh menjadi miselium (Gandjar, 2006).



Gambar 4.5. Pertumbuhan Isolat Jamur pada (a) Medium Standar dan (b) Medium MSM+Plastik Setelah 10 Hari Masa Inkubasi yang ditunjukkan pada simbol x.

Biosurfaktan adalah produk metabolisme ekstraseluler yang terikat pada bagian-bagian sel. Salah satu peran fisiologis biosurfaktan bagi mikroba adalah membantu pelekatan sel pada kondisi lingkungan yang baru (Joshi *et al.*, 2008). Dengan adanya biosurfaktan, substrat yang berupa cairan akan teremulsi dibentuk menjadi misel-misel dan menyebarkannya ke permukaan sel (Putra, 2018). Hasil aktivitas tegangan permukaan LM 1021 pada berbagai perlakuan pada Tabel 4.2.

Berdasarkan hasil uji ANOVA *two way* (Lampiran 4) dengan interaksi antara perlakuan variasi medium dengan pH menunjukkan berpengaruh signifikan terhadap nilai tegangan permukaan, dengan ditunjukkan nilai *p-value* sebesar 0,008 yang berarti nilai alpha kurang dari 0,05 sehingga dilakukan uji lanjutan. Berdasarkan uji Tukey (Lampiran 5), terlihat bahwa perlakuan interaksi dari Medium Standar pada pH 6 berpengaruh signifikan terhadap seluruh kelompok kombinasi perlakuan kecuali pada kelompok kombinasi perlakuan Medium Standar dengan pH 7. Salah satu parameter yang mempengaruhi proses produksi biosurfaktan adalah pH medium (Duvnjak *et al.*, 1982)

yaitu umumnya jamur *Aspergillus* tubuh pada kisaran pH 4-8 (Coppin *et al.*, 1997; Poggeler *et al.*, 2006).

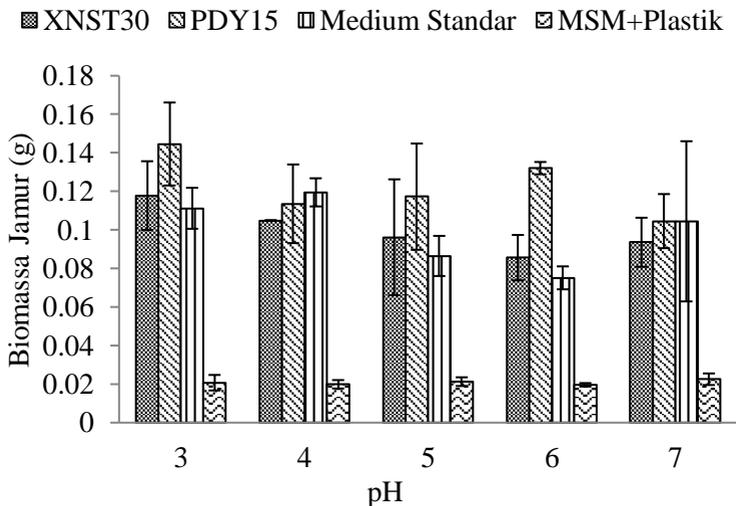
Tabel 4.2 Aktivitas Tegangan Permukaan (dyne/cm) *Aspergillus terreus* (LM 1021) Pada Variasi Medium dan pH Perlakuan Setelah 10 Hari Masa Inkubasi

Medium	pH				
	3	4	5	6	7
XNST30	51.96 ± 2,60 ^b	52.49 ± 2,73 ^b	52.82 ± 1,24 ^b	50.90 ± 2,57 ^b	50.10 ± 1,83 ^b
PDY15	52.85 ± 1,14 ^b	50.83 ± 1,29 ^b	53.01 ± 3,16 ^b	51.42 ± 1,54 ^b	52.03 ± 1,96 ^b
Medium Standar	52.05 ± 0,80 ^b	53.21 ± 1,31 ^b	51.98 ± 1,08 ^b	41.88 ± 1,75 ^c	46.96 ± 4,44 ^{bc}
MSM+Plastik	68.52 ± 1,46 ^a	65.09 ± 2,56 ^a	69.35 ± 0,82 ^a	65.82 ± 3,74 ^a	66.87 ± 4,15 ^a

Keterangan : Huruf yang berbeda menunjukkan hasil berbeda nyata berdasarkan Uji Tukey dengan taraf kepercayaan 95%.

Berdasarkan Tabel 4.2, LM 1021 yang dikultur pada Medium Standar dengan pH 6 menghasilkan nilai aktivitas tegangan permukaan yang terbaik yaitu 41,8 dyne/cm dengan total biomassa jamur adalah 0,075 gram (Gambar 4.6). Sedangkan biomassa jamur terendah pada medium MSM+Plastik memiliki rata-rata aktivitas tegangan permukaan yang tinggi. Hal ini terkait komposisi Medium Standar dengan glukosa sebagai sumber karbon, yang merupakan substrat hidrofilik yang digunakan oleh mikroorganisme untuk metabolisme sel dan sintesis bagian polar biosurfaktan. Substrat hidrofilik seperti glukosa terdegradasi hingga membentuk perantara jalur glikolitik seperti glukosa 6-fosfat yang merupakan salah satu prekursor utama karbohidrat yang ditemukan dalam gugus hidrofilik dari biosurfaktan. Untuk produksi lipid, glukosa dioksidasi menjadi piruvat melalui glikolisis dan piruvat kemudian diubah menjadi asetil KoA, yang

dihasilkan malonil KoA ketika disatukan dengan oksaloasetat, diikuti oleh konversi menjadi asam lemak yang merupakan salah satu prekursor untuk sintesis lipid (Santos *et al.*, 2016). Rasio C/N yang tinggi (dengan kadar nitrogen yang rendah) mendukung metabolisme sel menuju produksi metabolit, namun sebaliknya kadar nitrogen yang berlebihan mengarah pada sintesis bahan seluler dan membatasi penumpukan produk (Santos *et al.*, 2016). Sedangkan pada medium MSM mengandung garam mineral juga mengandung ekstrak yeast dan Bacto-pepton. Ekstrak yeast dan Bacto-Pepton merupakan sumber nitrogen yang dapat digunakan untuk inisiasi pertumbuhan miselia (Kim *et al.*, 2005), namun pada penelitian ini hanya digunakan 0,007% ekstrak yeast sebagai inisiasi pertumbuhan dalam medium minimal. Nutrien-nutrien tersebut dapat dimanfaatkan setelah jamur mensekresi senyawa polimer ekstraseluler yang dapat membantu pelekatan pada permukaan substrat plastik (Medison, 2006).



Gambar 4.6. Biomassa Jamur Pada Perlakuan Variasi Komposisi Medium dan pH.

Biomassa adalah indikator adanya aktivitas metabolisme jamur (Jakovljevic & Vrvic, 2017). Berdasarkan Gambar 4.6, jamur yang dikultur pada medium XNST30, PDY15 dan Medium Standar memiliki rata-rata biomassa kering yang tinggi daripada medium MSM+Plastik. Hal ini terkait dengan kandungan karbon yang digunakan berupa substrat hidrofilik (karbohidrat) yang mengarah pada jamur glikolisis sedangkan pada medium MSM sumber karbon berupa polimer hidrokarbon dengan mekanisme utama jalur lipolitik dan glukoneogenesis (Santos *et al.*, 2016). Polimer plastik yang merupakan substrat potensial bagi mikroorganisme heterotrofik ditambahkan pada medium MSM didepolimerisasi menjadi monomer kemudian diserap dan diurai dalam sel mikroba (Shah *et al.*, 2008).

Jenis mikroba yang sama, jumlah surfaktan yang dihasilkan berbeda berdasarkan nutrisi yang dikonsumsi. Hal ini terkait dengan parameter-parameter yang mempengaruhi proses produksi baik jenis maupun jumlah biosurfaktan adalah sumber karbon alami, kemungkinan keterbatasan nutrisi, parameter fisika dan kimia seperti aerasi, temperatur dan pH (Duvnjak *et al.*, 1982). Sumber nitrogen organik dan anorganik digunakan untuk pertumbuhan jamur dan produksi biosurfaktan dalam medium dengan sumber karbon optimal. Namun ketika hanya satu sumber karbon yang ditambahkan untuk pertumbuhan dan produksi biosurfaktan menghasilkan aktivitas biosurfaktan yang rendah (tidak memiliki kemampuan untuk mengurangi tegangan permukaan). Akan tetapi ketika kedua sumber karbon digunakan memperoleh hasil aktivitas biosurfaktan yang tinggi yang mampu mengurangi tegangan permukaan air (Bhardwaj *et al.*, 2013).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jamur *Aspergillus terreus* memiliki potensi dalam memproduksi hidrofobin dengan aktivitas biosurfaktan tertinggi dicapai pada metode *Oil Displacement Test* sebesar 12,45 mm, aktivitas tegangan permukaan sebesar 54,01 dyne/cm, kapasitas emulsifikasi sebesar 0,9% dan hidrofobitas permukaan sel sebesar 14,5%. Produksi hidrofobin yang dilakukan dengan SDS-*Page* hanya terlihat pita protein pada 43,05 kDa sehingga belum terlihat protein hidrofobin. Perlakuan variasi medium dan pH berpengaruh terhadap produksi hidrofobin. Produksi hidrofobin terbaik dicapai pada medium standar pH 6 dengan aktivitas tegangan permukaan sebesar 41,8 dyne/cm dengan berat kering biomassa jamur 0,075 gram.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya dilakukan pengukuran aktivitas emulsifikasi pada pengaruh variasi medium dan pH untuk mengetahui kelompok biosurfaktan pada jamur. Selain itu biosurfaktan jamur dilakukan karakterisasi molekuler untuk membuktikan adanya protein hidrofobin.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, Elis N.H., dan Eti, A.O. 2013. Pengaruh pH, Penggoyangan Media, dan Penambahan Serbuk Gergaji Terhadap Pertumbuhan Jamur *Xylaria* sp. **Jurnal Silvikultur Tropika**, Vol 4, No 2 : 57-61.
- Armenante, A. 2008. *Pleurotus ostreatus* – **Hydrophobins: Surface Active Proteins**. Napoli Federico II : Indirizzo Biotecnologie Industriali Universita.
- Bradson, E.Y. 2006. **Oxoid Manual, 9th Edition**. England : OXOID Limited
- Bayry, Jagadeesh., Amanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., Latge, JP. 2012. Hydrophobins – Unique Fungal Proteins. **PLoS Pathog**, 8(5) : 1-4.
- Bhardwaj, G., Cameotra, SS., dan Chopra HK. 2013. Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. **AMB Express**, 1-5.
- Cicatiello, P., Gravagnuolo, A. M., Gnani, Giorgio., Varese, G. C., and Giardina, P. 2016. Marine Fungi As Source of New Hydrophobins. **Intentional Journal of Biological Macromolecules**, 92, 1229-1233.
- Cooper, D. G and Goldenberg, B. G. 1987. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied and Environmental Microbiology** 53(2) : 224-229.
- Coppin, E., Robert D., Sylvine A., and Marguerite P. 1997. Mating Types and Sexual Development in Filamentous Ascomysetes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** Vol.61 (4). Hal : 411-428.

Chang, R. 2003. **General Chemistry : The Essential Concept**. New York : The McGraw-Hill Companies.

Chenoweth, P.J. and Lorton, S.P. 2014. **Animal Andrology : Theories and Applications**. India : CAB International.

Du Noüy, P. L. 1918. A New Apparatus for Measuring Surface Tension. **Journal of Genetic Physiology**, 521.

Duvnjak, Z., Cooper, D. G. and Kosaric, N. 1982. Production of Surfactant by *Arthrobacter parafineus* ATCC 19558. **Biotechnology and Bioengineering**, XXIV : 165-175.

Devi, R.S., Velu R.K., Duraisamy N., Kanthaiah K. and Sekar C. 2015. Biodegradation of HDPE by *Aspergillus* spp. from marine ecosystem of Gulf of Mannar, India. **Marine Pollution Bulletin**, 96 : 32-40.

Fernandez, AV., Haaren, B.V and Revah, S. 2006. Phase Partition of Gaseous Hexane and Surface Hydrophobicity of *Fusarium solani* When Grown in Liquid and Solid Media with Hexanol and Hexane. **Biotechnol Lett**, 28 : 2011-2017.

Gandjar, Indrawati. 2006. **Mikologi Dasar dan Terapan**. Jakarta : Yayasan Obor Indonesia.

Gozan, M., Fatimah, I. N., Nanda, C., dan Haris, A. 2014. Produksi Biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan Substrat Limbah Biodiesel Terozonasi untuk Peningkatan Perolehan Minyak Bumi. **Journal of Agro-based Industry**, Vol. 31(2) : 39-44.

Hashemi, S. Z., Fooladi, J., Ebrahimipour, G. and Khodayari, S. 2016. Isolation and Identification of Crude Oil Degrading and

Biosurfactant Producing Bacteria from the Oil-Contaminated Soils of Gachsaran. **Applied Food Biotechnology**, 3(2) : 83-89.

Hungund, B., Habib, C., Hiregoudar, V., Umloti, S., Wandkar, S and Tennalli, G. 2016. **Production and Characterization of Hydrophobins from Fungal Sources**. India : Springer.

Herlina, Lina. 2009. Potensi *Trichoderma harzianum* sebagai Biofungisida pada Tanaman Tomat. **Biosaintifika**, Vol. 1, No. 1 : 62-69.

Indriati, Ninoek., Priyanto, N dan Triwibowo, R. 2010. Penggunaan *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (DRBC) Sebagai Media Tumbuh Kapang Pada Produk Perikanan. **Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan**, Vol. 5, No. 2 : 117-121.

Jakovljevic, V. D and Vrvic, M. M. 2017. **The Potential Application of Selected Fungi Strains in Removal of Commercial Detergents and Biotechnology**. Intech : Application and Characterization of Surfactant.

Joshi, S., Bharucha, C., Jha, S., Yadav, S., Nerurkar, A., and Desai, A. J. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresour. Technol**, 99(1): 195–199.

Kim H.O, Lim J.M, Joo J.H, Kim S.W, Hwang H.J, Choi J.W, Yun J.W. 2005. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technology**. 96:1175-1182.

Kulkarni, Shraddha., Nene, Sanjay., Joshi, Kalpana. 2017. **Production of Hydrophobins from Fungi**. India : Innovation Biologicals Private Limited.

Kuswytasari, N. D., Shovitri, M., and Andriyadi, R. D. 2011. Soil Molds Diversity in The Coastal Wonorejo Surabaya. **Proceeding International Conference on Mathematics and Science (ICOMS)**. Surabaya.

Koriya, T., Khulat, D., Patel, A., Prajapati, K., Pardhi, D., Panchal, R., and Rajput, K. 2018. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Contaminate Site. **Research Paper** ISSN: 2321-1520.

Khanam, P. N and AlMaadeed, A. A. 2015. Processing and Characterization of Polyethylenen-based Composite. **Advanced Manufacturing: Polymer & Composites Science**, 1: 63-79.

Linder, M. B., Szilvay, G. R., Nakari-Setälä, T., and Penttilä, M. E. 2005. Hydrophobins: The Protein-Amphiphiles of Filamentous Fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 877-896.

Linder and Markus B. 2009. Hydrophobins: Protein That Self Assemble at Interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 14, 356-363.

Luepongpatana, S., Jindamarakot, S., Thaniyavarn, S., and Thaniyavarn, J. 2014. Screening of Biosurfactant Production Yeast and Yeast-like Fungi Isolated From The Coastal Areas of Koh Si Chang. **The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference**.

Maddela, N.R., L. Schalvenzi, M. Perez, C. Montero, and J.M. Gooty. 2015. Efficiency of Indigenous Filamentous fungi For Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon in Medium and Soil: Laboratory Study from Ecuador. **Springer: Bulletin Environmental Contamination Toxicology**.

Madigan, MT., Martinko, JM., dan Brock, TD. 2006. **Brock Biology of Microorganisms. 11th Ed.** New Jersey : Pearson Prentice Hall.

Maharani, M.M., Nuniek I.R., dan Slamet P. 2014. Penggunaan Beberapa Medium Semisintetik Untuk Produksi Miselium jamur Maitake (*Grifola frondosa* (Dickson:Fr.) S.F. Gray) Isolat Cianjur dan Ekstrak Kasarnya. **Scripta Biologica**. Vol 1, No 1. Hal : 20-25.

Mahreni, Renung R. 2015. Biosurfaktan. **Eksergi**, 12(02), 12-22.

Meiliawati, D dan Kuswytasari, N. D. 2013. Isolasi dan Identifikasi Jamur Kayu Lignolitik dari Vegetasi Mangrove Wonorejo. **Jurnal Sains dan Seni Pomits**, Vol. 2, No. 1.

Meizar, D. V., Suryani, A., dan Hambali, E. 2017. Sintesis Surfaktan Dietanolamida (DEA) dari Metil Ester Olein Sawit Menggunakan Reaktor 25 Liter. **Jurnal Teknologi Industri Pertanian**, 27(3) : 328-335.

Muslih, A., Yulianto, B., dan Ashari, A. 2013. Penggunaan Jamur Untuk Mereduksi Sampah Rumah Tangga di Tempat Pembuangan Sampah Sementara. **Bhakti Kencana Medika**, Vol. 3, No. 7 : 312-316.

Ni'matuzahroh, Alami, N., Thoha, A. F. K., dan Nurhayati, T. 2010. Studi Kinetika Produksi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP pada Substrat Molase. **Journal of Biological Reseaches** 16. 33-38.

Nurdin, M. 2013. Wisata Hutan Mangrove Wonorejo : Potensi Ekoturisme dan Edoturisme Di Surabaya. **Jurnal Kelautan**, Vol. 2, No. 1.

Putra, S. A. 2018. Peran Biosurfaktan dari Proses *Composting* untuk Desorpsi Hidrokarbon Pada Tanah Terkontaminasi Minyak Bumi. **Tesis**. Surabaya: Fakultas Teknik Sipil, Lingkungan dan Kebumihan. Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

Pramila, R. dan Ramesh, K.V. 2011. Biodegradation of Low Density polyethylene (LDPE) by Fungi Isolated from Municipal Landfill Area. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. Vol. 1(4). Hal. 131-136.

Purnomo, B. 2005. **Bahan Bacaan Kuliah : Dasar-dasar Mikrobiologi**. PS. IHPT. Faperta Unib.

Poggeler, S., M. Nowrousian, and U. Kock. 2006. **The Mycota I Growth, Differentiation and Sexuality**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Powthong, P and Suntornthiticharoen, P. 2018. Isolation and characterization of biosurfactant-producing bacteria isolated from agriculture area in Thailand. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 24 (No 4): 623–630.

Santos, Danyelle K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A and Sarubbo, L. A. 2016. Biosurfactant: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **Int. J. Mol. Sci**, 17(3) : 401.

Siregar, N. C., Loebis, E. H. dan Arianingsih, S. 2017. Kinerja Dietanolamida dengan Scale-up Reaktor Amidasi dan Perbaikan Kondisi Operasi. **Journal of Agro-based Industry**, Vol. 34(2) : 65-71.

Sena, Hellen H., Sanches, M. A., Rocha, Diego F. S., Sugondo, Walter O. P. F., Souza, Erica S, and Souza, Joao V. B. 2018. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. **International Journal of Microbiology** : 1-8.

Shah, AA., Hasan, F., Hameed, A and Ahmed, S. 2008. Biological Degradation of Plastic : A Comprehensive Review. **Biotechnol Adv**, 26(3) : 246-265.

Shalini, R and Sasikumar, C. 2015. Biodegradation of Low Density Polythene Materials Using Microbial Consortiun – An Overview. **International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences**, Vol. 4(4) : 507-514.

Tadros T. 2005. **Adsorption of Surfactants at The Air/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces. In: Applied Surfactants: Principles and Applications.** Weinheim : Wiley VCH.

Thaniyavarn J, Chianguthai T, Sangvanich P, Roongsawang N, Washio k, Morikawa M, and Thaniyavarn S. 2008. Production of sophorolipid biosurfasctant by *Pichia anomala*. **Biosci Biotechnol Biochem** 72:2061-2068.

Terziyski, I., Alexandrova, L., Stoineva, I., Christova, N., Todorov, R., & Cohen, R. 2014. Foam and wetting films from rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* BN10. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 460 : 299–305.

Tortotora, Gerard J., Funke, B. R., and Case, C. 2013. **Microbiology: an Introduction (edisi ke-7).** USA: Pearson

Vidueras, G., Shirai, K., Martins, D., Franco, TT., Fleuri, LF and Revah, S. 2008. Toluene Gas Phase Biofiltration by *Paecilomyces lilacinus* and Isolation and Identification of a Hydrophobin Protein Produced Thereof. **Appl Microbiol Biotechnol**, 80 : 147-154.

Wahyuni, R., Halim, A. dan Trifarmila, R. 2014. Uji Pengaruh Surfaktan Tween 80 dan Span 80 Terhadap Solubilisasi

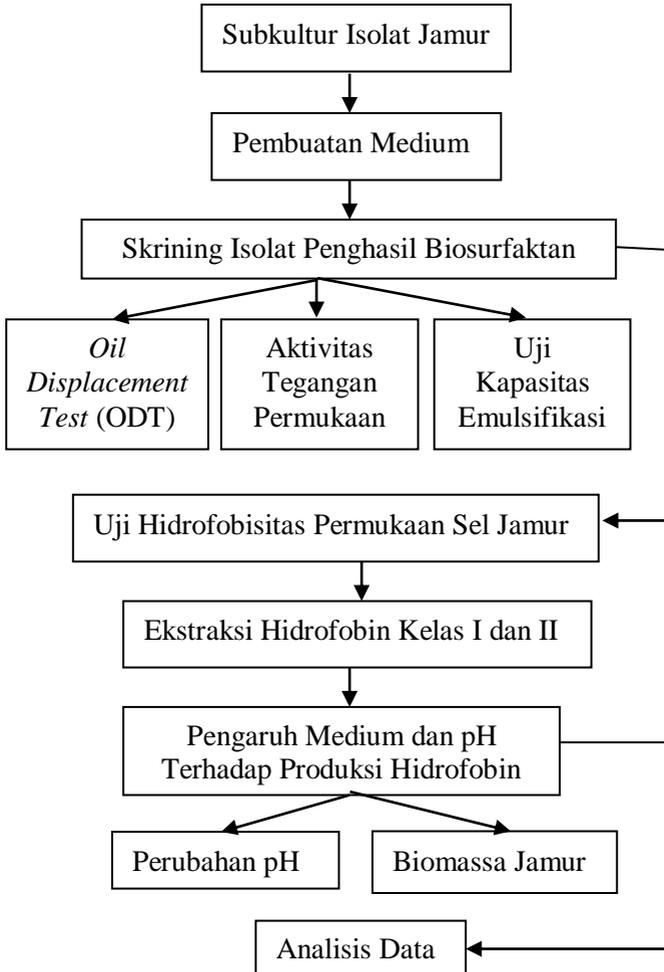
Dekstrometorfan Hidrobromida. **Jurnal Farmasi Higea**, 6(1) : 1-10.

Walter, V., Syldatk, C. and Hausmann, R. 2010. Screening Concept for the Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms. **Adv Exp Med Biol**, 672 : 1-13.

Yulianty. 2005. Keanekaragaman Jenis-jenis Jamur Pada Daun Suku Araceae yang Terdapat di Beberapa Daerah di Indonesia. **J. Sains Tek**, Vol. 11, No. 2 : 89-92.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Hasil Perhitungan Uji Kapasitas Emulsifikasi *Aspergillus terreus* (LM 1021).

$$E_1 = \frac{0,3}{28,7} \times 100\% \\ = 1,04\%$$

$$E_{24} = \frac{0,27}{28,15} \times 100\% \\ = 1,04\%$$

Lampiran 3. Hasil Perhitungan Uji Hidrofobisitas Permukaan Sel Jamur *Aspergillus terreus* (LM 1021).

Ulangan	Absorbansi	
	Ao	At
1	1,422	1,213
2	1,421	1,211
3	1,411	1,212
Rata-rata	1,418	1,212

$$\% \text{ Hidrofobisitas} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \times 100\% \\ = \frac{(1,418 - 1,212)}{1,212} \times 100\% \\ = 14,5\%$$

Lampiran 4. Uji Anova *Two Way* Pengaruh Medium dan pH Terhadap Aktivitas Tegangan Permukaan.

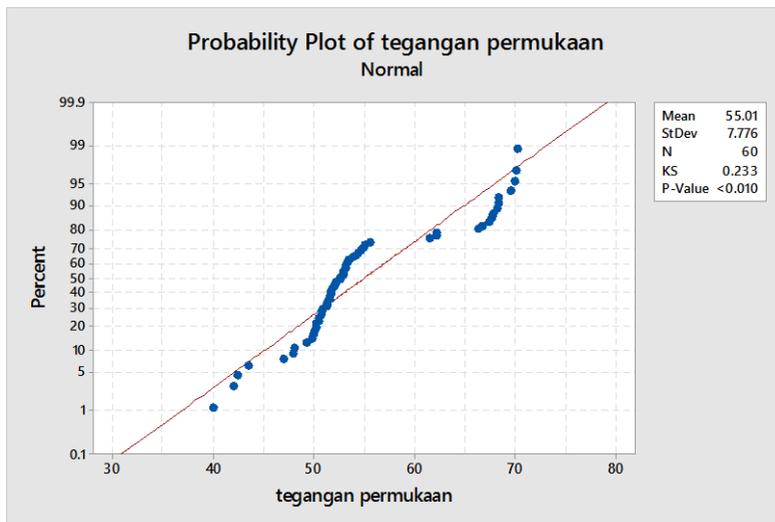
Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
medium	3	3008.1	1002.69	179.00	0.000
ph	4	148.9	37.23	6.65	0.000
medium*ph	12	186.7	15.56	2.78	0.008
Error	40	224.1	5.60		
Total	59	3567.8			

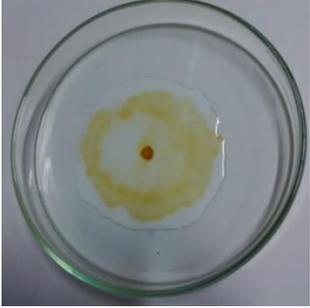
Lampiran 5. Uji Lanjut Tukey Pengaruh Interaksi Antara Pengaruh Medium dan pH.

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

medium*ph	N	Mean	Grouping
4 3	3	69.3500	A
4 1	3	68.5200	A
4 5	3	66.8733	A
4 4	3	65.8200	A
4 2	3	65.0900	A
3 2	3	53.2133	B
2 3	3	53.0100	B
2 1	3	52.8533	B
1 3	3	52.8233	B
1 2	3	52.4900	B
3 1	3	52.0533	B
2 5	3	52.0367	B
3 3	3	51.9833	B
1 1	3	51.9667	B
2 4	3	51.4233	B
1 4	3	50.9067	B
2 2	3	50.8333	B
1 5	3	50.1067	B
3 5	3	46.9667	B C
3 4	3	41.8833	C

Lampiran 6. Uji Normalitas Anova *Two Way*

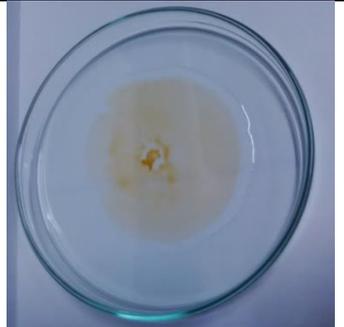
Lampiran 7. Hasil Skrining Uji *Oil Displacement Test*

No	Nama Isolat	ODT	Foto (ODT) Akuades + Crude Oil + Supernatan
1	LM 1025	(+)	
2	LM 1002	(-)	
3	LM 1102	(+)	

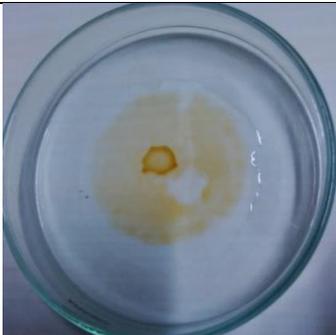
4	LM 1105	(+)	
5	LM 1015	(-)	
6	LM 1020	(-)	

		(+)	
		(+)	
7	LM 1021	(+)	

		(+)	
		(+)	
8	LM 3010	(+)	

		(+)	
		(+)	
9	LM 3008	(+)	

10	LM 3002	(-)	
11	LM 3013	(-)	
12	LM 3020	(+)	

13	LM 1018	(-)	
14	LM 3011	(+)	
15	LM 1031	(+)	

16	LM 3003	(+)	
17	LM 3001	(-)	
18	LM 3023	(+)	

19	LM 1041	(+)	
20	LM 1107	(-)	

Lampiran 8 . Biodata Penulis



Penulis dilahirkan di Kota Gresik pada tanggal 2 Desember 1996 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara, pasangan Bapak Abdullah Yazid dan Ibu Siti Mariyam. Penulis lulus dari SMP Negeri 1 Gresik pada tahun 2012 dan lulus dari SMA Negeri 1 Gresik pada tahun 2015, kemudian langsung melanjutkan studinya di Biologi Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. Selama kuliah di ITS, penulis aktif di berbagai acara kepanitiaan seperti Panitia Pengawas Pemilu ITS 2018, Panitia Pemilihan Umum ITS 2016, Fasilitator Konsumsi Gerigi ITS 2016, Sie Acara Pekan Semi Mahasiswa ITS 2016, dan *Organizing Committee* BOF IX Biologi ITS 2015/2016.