

OPTIMASI PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 MENGGUNAKAN LIMBAH PULPA BIJI KAKAO DENGAN PENDEKATAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)

(Skripsi)

Oleh

ANISA

2017011032



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

OPTIMASI PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 MENGGUNAKAN LIMBAH PULPA BIJI KAKAO DENGAN PENDEKATAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)

Oleh

Anisa

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG**

2025

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI BIOSURFAKTAN DARI BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 MENGGUNAKAN LIMBAH PULPA BIJI KAKAO DENGAN PENDEKATAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)

Oleh

ANISA

Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang disintesis secara ekstraselular oleh mikroorganisme, seperti bakteri, jamur, atau ragi. Pada penelitian ini bertujuan untuk mempelajari manfaat limbah pulpa biji kakao sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1, mengetahui kondisi optimum konsentrasi sumber karbon pulpa biji kakao (%), pH dan kadar salinitas (%) dalam produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 melalui pendekatan RSM, mendapatkan ekstrak kasar dari biosurfaktan dan karakterisasi menggunakan metode FTIR.

Tahapan optimasi diawali dengan preparasi limbah pulpa biji kakao, peremajaan bakteri, dilanjutkan dengan pembuatan kurva pertumbuhan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dalam memproduksi biosurfaktannya dengan mengukur nilai *optical density* (OD) dan indeks emulsifikasi, selanjutnya optimasi biosurfaktan menggunakan metode RSM dengan parameter sumber karbon pulpa biji kakao dalam rentang 10%, 20% dan 30%, pH dalam rentang 6, 7 dan 8, dan kadar salinitas dalam rentang 4%, 5% dan 6% , pengujian biosurfaktan dilakukan dengan metode uji emulsifikasi, *oil spreading test* dan uji *drop collapse*.

Hasil penelitian diperoleh kondisi optimum produksi biosurfaktan pada sumber karbon pulpa biji kakao sebesar 20%, pH 7, kadar salinitas 4% dengan hasil indeks emulsi 70% serta didapatkan persamaan polinomial dengan model *quadratic* yaitu $Y = 44.83 + 3.00A + 1.00B - 3.00C - 0.5000AB + 3.50AC - 4.50BC - 9.32A^2 - 9.32B^2 + 20.68C^2$. Produksi biosurfaktan dari kondisi optimum

yang telah didapatkan diperoleh ekstrak kering berwarna putih sebanyak 1,632 mg/L dengan indeks emulsi sebesar 75%. Berdasarkan hasil analisis FT-IR yang telah dilakukan diperoleh pada puncak karakteristik biosurfaktan pada rentang 3600-3200 cm^{-1} tersebut yang mengindikasikan golongan lipopeptida.

Kata kunci: Biosurfaktan, *Response Surface Methodology* (RSM), indeks emulsi, *oil spreading test*, *drop collapse test*, *Lysinibacillus boronitolerans*
LKM G1

ABSTRACT

OPTIMIZATION PRODUCTION OF BIOSURFACTANT FROM THE BACTERIA *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 USING COCOA BEAN PULPA WASTE WITH A RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM) APPROACH

By

ANISA

Biosurfactants are surface active compounds that are synthesized extracellularly by microorganisms, such as bacteria, fungi or yeast. This research aims to study the benefits of cocoa bean pulp waste as a carbon source in the production of biosurfactant from the bacteria *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1, to determine the optimum conditions for the concentration of carbon source cocoa bean pulp (%), pH and salinity levels (%) in the production of biosurfactant from the bacteria *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 using the RSM approach, obtaining crude extracts from biosurfactants and characterization using the FTIR method.

The optimization stage begins with preparation of cocoa bean pulp waste, bacterial rejuvenation, followed by creating a growth curve for the *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 bacteria in producing biosurfactant by measuring the optical density (OD) value and emulsification index, then optimizing the biosurfactant using the RSM method with cocoa bean pulp carbon source parameters in the range of 10% , 20% and 30%, pH in the range of 6, 7 and 8, and salinity levels in the range of 4%, 5% and 6%, biosurfactant testing was carried out using the emulsification test method, oil spreading test and drop collapse test.

The results of the research obtained optimum conditions for biosurfactant production from cocoa bean pulp carbon sources of 20%, pH 7, salinity level 4% with an emulsion index result of 70% and obtained a polynomial equation with a quadratic model, namely $Y = 44.83 + 3.00A + 1.00 B - 3.00 C - 0.5000AB + 3.50 AC - 4.50 BC - 9.32 A^2 - 9.32 B^2 + 20.68 C^2$. Biosurfactant production from the optimum conditions obtained resulted in a white dry extract of 1.632 mg/L with

an emulsion index of 75%. Based on the results of the FT-IR analysis that was carried out, it was found that the characteristic peak of biosurfactant in the range 3600-3200 cm^{-1} indicated the lipopeptide group.

Keywords: Biosurfactant, Response Surface Methodology (RSM), emulsion index, oil spreading test, drop collapse test, *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1

Judul Skripsi : **OPTIMASI PRODUKSI BIOSURFAKTAN
DARI BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans*
LKM G1 MENGGUNAKAN LIMBAH
PULPA BIJI KAKAO DENGAN
PENDEKATAN *RESPONSE SURFACE
METHODOLOGY* (RSM)**


Nama Mahasiswa : **Anisa**
Nomor Induk Mahasiswa : 2017011032
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




1. Komisi Pembimbing

Pembimbing 1

Pembimbing 2


Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.
NIP. 1974121119988022001


Idris, M.Si.
NIP. 198702092018011001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung


Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

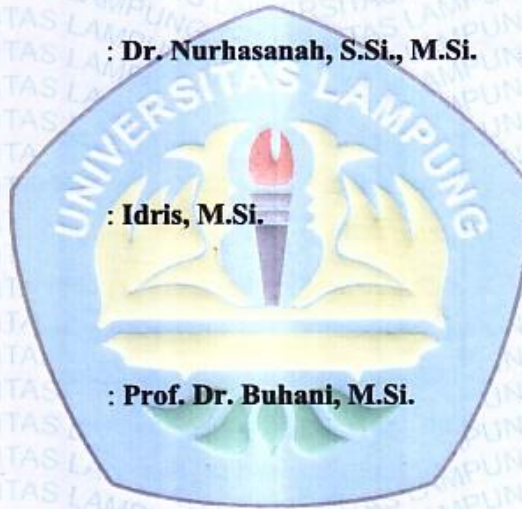
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.

Sekretaris : Idris, M.Si.

Anggota : Prof. Dr. Buhani, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.

NIP. 197110012005011002

Tanggal lulus ujian skripsi : 18 Desember 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Anisa
Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011032
Jurusan : S1-Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan sesungguhnya bahwa skripsi ini yang berjudul **“Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 Menggunakan Limbah Pulpa Biji Kakao dengan Pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM)”** adalah benar karya sendiri dan tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis tercantum dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Saya tidak keberatan jika seluruh data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan dengan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 07 Januari 2025

Yang menyatakan



Anisa

NPM. 2017011032

RIWAYAT HIDUP



Penulis yang bernama lengkap Anisa dilahirkan di Desa Teluk Dalem pada tanggal 16 Desember 2002, sebagai anak kelima dari lima bersaudara, dari Bapak Agus Mustofa dan Ibu Helwah Halid. Penulis menyelesaikan Pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Teluk Dalem pada 2014. Penulis melanjutkan Pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Mataram Baru, Kabupaten Lampung Timur pada tahun 2014-2017 dan Sekolah Menengah Atas pada tahun 2017-2020 di SMA Negeri 1 Way Jepara. Pada tahun 2020, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia aktif sebagai anggota Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI), penulis juga pernah mengikuti kegiatan MBKM pertukaran pelajar ke Institut Pertanian Bogor (IPB) pada semester 5, kemudian mengikuti kegiatan KKN Desa Mulang Maya Periode I tahun 2023. Pada kuliah tahun ke-3 penulis juga mengikuti Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Badan Riset Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong Bogor dengan judul “Skrining dan Produksi Biosurfaktan dari Isolat Bakteri Sedimen Mangrove, Desa Segara Anakan, Kabupaten Cilacap, Provinsi Jawa Tengah”. Penulis pernah menjadi Asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa Jurusan Pendidikan Kimia semester 4.

MOTTO

“Tempatmu untuk pulang adalah dimana ada seseorang yang memikirkanmu”

(Uzumaki Naruto)

“Sampai matipun aku akan mengejar cita-citaku”

(Uzumaki Naruto)

“Dongeng bukanlah halusinogen yang menanamkan mimpi, akan tetapi stimulan untuk membuka realitas”

(Ko Moon Young - It's Okay to Not Be Okay)

“Tuhan tidak bermain dadu!”

(Albert Einstein)

“While there's life, there is hope”

(Stephen Hawking)

“Nothing impossible, the word itself say I'm possible”

(Audrey Hepburn)

“Tidaklah mungkin bagi matahari mengejar bulan dan malam tidak dapat mendahului siang semuanya beredar melalui garis edarnya masing-masing”

(QS. Yasin: 40)

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Atas izin Allah dan keridhaan Allah SWT yang telah memberikan Rahmat dan Hidayah-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.

Kupersembahkan karya sederhana ini sebagai wujud cinta, bakti dan sayangku kepada:

Kedua Orang Tua Ku Tercinta

Umi Helwah Halid dan Abah Agus Mustofa

Saudara dan Saudari Ku Tersayang

Siti Aisyah, Anang Prayogi, Adi Setiawan dan Azizah Wulandari

Rasa hormat saya kepada:

Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. | Bapak Idris M.Si. |

Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si.

Serta seluruh dosen Jurusan Kimia

Terimakasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama penulis menempuh pendidikan di kampus hingga mendapat gelar sarjana. Semoga Allah SWT membalas kebaikan Ibu dan Bapak sekalian. *Aamiin.*

Keluarga besar dan sahabat seperjuangan, yang senantiasa memberikan doa, motivasi, nasihat dan dukungan kepada penulis.
Almamater tercinta Universitas Lampung.

SANWACANA

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah atas segala limpahan rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 Menggunakan Limbah Pulpa Biji Kakao dengan Pendekatan *Response Surface Methodology (RSM)*”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Pada pelaksanaan dan penulisan skripsi ini penulis tidak terlepas dalam menghadapi kesulitan dan rintangan, namun semua itu dapat teralui berkat Rahmat dan Ridha Allah SWT, serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rasulullah *Shalallahu ‘alaihi wasallam*. Manusia tauladan yang luar biasa dan mendoakanku, manusia yang semoga senantiasa terlintas dalam pikiran dan hatiku, semoga benih cinta ini sampai akhir hayat nanti. *Aamiin*.
2. Kedua orang tua dan saudara-saudariku, yang selalu memberikan doa dan dukungan baik secara moril dan finansial. Terima kasih untuk segala doa, nasihat, support, pengorbanan, perjuangan, kesabaran, dan kasih sayang yang kalian berikan selama ini. Semoga Allah SWT selalu melindungi kalian dan membalas dengan *Jannah-Nya* yang terbaik, *Aamiin*.
3. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing I yang senantiasa memberikan bimbingan, ilmu, saran dan kesabarannya dalam menghadapi penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

4. Bapak Idris, M.Si., selaku pembimbing II yang senantiasa memberikan bimbingan, ilmu, dan sarannya dalam membimbing penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si., selaku dosen pembahas yang telah memberikan saran dan arahan kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
6. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan nasihat, motivasi, saran dan arahan selama penulis menjalani masa perkuliahan.
7. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., selaku ketua jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis. Semoga Bapak dan Ibu selalu dalam lindungan Allah dan semoga Allah membalas kebaikan kepada Bapak dan Ibu.
10. Seluruh laboran, staff administrasi, dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan studi.
11. Keluarga besar Umi dan Abah yang telah memberikan doa, dukungan moral dan finansial kepada penulis selama menempuh pendidikan.
12. *Nurhasanah's Research Group 2020*: Anggun Nahdifahmia Aziza, Leoni Wulandari, Umi Latifah, Agil Sriwahyuni dan Najla Shauma Zahra. Terima kasih sudah senantiasa hadir menemani penelitian, memberikan dukungan, nasihat, dan motivasi kepada penulis.
13. Kakak-kakak *Nurhasanah's Research Group*: Kak Astin, Kak Yori, Kak Verin dan Kak Puspita yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, dan motivasi kepada penulis. Terima kasih Kak sudah bersedia mendengar keluhan, direpotkan, dan mengganggu waktu kakak-kakak.
14. Teman-teman dan adik-adik *Peer Group* Biokimia. Terima kasih telah memberikan semangat dan dukungan kepada penulis.

15. Semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian skripsi ini, terima kasih atas semua bantuan dan dukungan dalam penyusunan skripsi ini.
16. Teman-teman Kimia Universitas Lampung Angkatan 2020.
17. Almamater tercinta Universitas Lampung.
18. Kepada semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis mohon maaf apabila skripsi ini masih banyak kurangnya dan jauh dari kata sempurna. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat sebagaimana mestinya. *Aamiin Allahumma Aamiin.*

Bandar Lampung, 07 Januari 2025

Penulis,

Anisa

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xviii
DAFTAR GAMBAR	xix
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan	4
1.3. Manfaat	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Biosurfaktan dan Aplikasi Biosurfaktan	5
2.2. Jenis-Jenis Biosurfaktan.....	7
2.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan	8
2.3.1. Suhu	8
2.3.2. pH	9
2.3.3. Sumber Karbon.....	9
2.3.4. Kadar Salinitas.....	9
2.4. Kurva Pertumbuhan	10
2.4.1. Fase Adaptasi (<i>Lag Phase</i>).....	11
2.4.2. Fase Perbanyakan (<i>Logaritmic or Ekponential Phase</i>)	11
2.4.3. Fase Statis (<i>Stationer Phase</i>).....	11
2.4.4. Fase Kematian (<i>Death Phase</i>).....	12
2.5. Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>).....	12

2.6. Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	13
2.7. <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	14
2.8. Uji Biosurfaktan	15
2.8.1. Uji Emulsifikasi	15
2.8.2. <i>Oil Spreading Test</i>	16
2.8.3. Uji <i>Drop Collapse</i>	17
2.9. Analisis Karakterisasi FT-IR	17
III. METODOLOGI PENELITIAN	20
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2. Alat dan Bahan.....	20
3.3. Metode Penelitian	21
3.3.1. Pembuatan Media	21
3.3.1.1. Media <i>Nutrient Agar</i> (NA)	21
3.3.1.2. Media <i>Nutrient Broth</i> (NB)	21
3.3.1.3. Media <i>Mineral Salt Medium</i> (MSM).....	21
3.3.2. Preparasi Limbah Pulpa Biji Kakao	22
3.3.3. Peremajaan Isolat Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	22
3.3.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan	23
3.3.5. Uji Biosurfaktan	23
3.3.5.1. Uji Emulsifikasi	23
3.3.5.2. Uji Penyebaran Minyak (<i>Oil Spreading Test</i>)	24
3.3.5.3. Uji <i>Drop Collapse</i>	24
3.3.6. Desain Eksperimen RSM-CCD	25
3.3.7. Produksi Biosurfaktan	25
3.3.8. Ekstraksi Biosurfaktan.....	26
3.3.9. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FT-IR).....	26
3.3.10. Skema Alur Penelitian	27
3.3.11. Skema <i>Response Surface Methodology</i> (RSM).....	28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1. Limbah Pulpa Biji Kakao.....	29
4.2. Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1.....	31
4.3. Kurva Pertumbuhan Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1.....	31
4.4. Kondisi Optimum RSM.....	33
4.5. Analisis Statistik.....	38
4.6. Interaksi Kondisi Optimasi dengan Hasil Uji Emulsifikasi.....	39
4.7. Penentuan Kondisi Optimum dan Verifikasi Model.....	43
4.8. Biosurfaktan Isolat Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1.....	45
4.9. Ekstrak Kasar Biosurfaktan.....	46
4.10. Karakterisasi FT-IR.....	47
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	50
5.1. Simpulan.....	50
5.2. Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....	52
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Jenis-Jenis Biosurfaktan (Desai <i>and</i> Desai, 1993).....	7
2. Rentang dan tingkatan parameter dari optimasi biosurfaktan isolat bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	25
3. Faktor yang digunakan untuk pendekatan RSM menggunakan variabel respon uji emulsifikasi	34
4. Uji analisa ragam model ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>)	37
5. Kriteria optimasi produksi biosurfaktan	44
6. Verifikasi model.....	44
7. Hasil pengujian biosurfaktan tahap produksi yang dihasilkan oleh isolat bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	45
8. Data absorbansi kurva pertumbuhan bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	63
9. Data ulangan 1, uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) kurva pertumbuhan.....	63
10. Data ulangan 2, uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) kurva pertumbuhan...	64
11. Data rerata uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) kurva pertumbuhan	64
12. Data ulangan 1, uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) untuk RSM	67
13. Data ulangan 2, uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) untuk RSM	68
14. Data rerata uji indeks emulsifikasi (%IE ₂₄) untuk RSM.....	69
15. Data hasil rerata <i>oil spreading test</i>	70
16. Data hasil optimasi uji emulsi, <i>oil spreading test</i> dan <i>drop collapse</i> ...	71

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur biosurfaktan fosfolipida (Takahashi <i>et al.</i> , 2010)	5
2. Struktur dari C15-surfactin- <i>O</i> -methyl ester (Kowall <i>et al.</i> , 1998)	6
3. Kurva pertumbuhan (Purwoko, 2007).....	10
4. Buah kakao (Siregar, 1898).....	12
5. Uji emulsifikasi (Da Silva <i>et al.</i> , 2021).....	16
6. <i>Oil spreading test</i> (Da Silva <i>et al.</i> , 2021).....	16
7. Uji <i>drop collapse</i> (Da Silva <i>et al.</i> , 2021)	17
8. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP D1 (Citra, 2021)	18
9. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP E1 (Yusnidar, 2021).....	19
10. Skema alur penelitian.....	27
11. Skema <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	28
12. (a) buah kakao, (b) buah kakao yang sudah dikupas, (c) pulpa biji kakao, (d) cairan limbah pulpa biji kakao.....	30
13. Kultur peremajaan bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1 pada media <i>nutrient agar</i>	31
14. Kurva pertumbuhan bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1	32
15. Kondisi optimum RSM	35
16. Distribusi sebaran nilai aktual dan prediksi optimasi biosurfaktan	36
17. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi konsentrasi sumber	

karbon dan pH	40
18. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi konsentrasi sumber karbon dan Kadar salinitas	41
19. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi pH dan Kadar salinitas.....	42
20. Spektrum FT-IR biosurfaktan: (a) spektrum dari bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1, (b) spektrum dari bakteri <i>Bacillus subtilis</i> strain 311 (pareira <i>et al.</i> , 2013)	48
21. Produksi biosurfaktan	78
22. Uji emulsi produksi biosurfaktan.....	78
23. Ekstraksi dengan HCl 6 N.....	79
24. Ekstrak kasar biosurfaktan	79
25. Uji emulsi ekstrak kasar biosurfaktan	79

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Limbah agroindustri merupakan sisa olahan tanaman seperti, kulit, biji-bijian, sisa produk samping pasca panen, yang memiliki kandungan karbohidrat dan lipid yang tinggi contohnya glukosa, pektin, dekstrin, selulosa dan sebagainya. Limbah agroindustri tersebut dapat menjadi agen pencemar jika tidak diolah dengan baik sedangkan jika dikonsumsi tanpa diolah terlebih dahulu dapat menyebabkan gangguan kesehatan bagi manusia, hewan dan makhluk hidup lainnya (Agustono dkk., 2017). Wilayah pertanian Kabupaten Lampung Timur memiliki limbah agroindustri dari sisa olahan tanaman kakao (*Theobroma Cacao L.*) yakni berupa pulpa biji kakao yang memiliki kandungan asam organik yakni asam sitrat sejumlah 9,14 mg/l (Wijaya, 2020). Pulpa biji kakao memiliki kandungan asam asetat, asam laktat dan alkohol sehingga berpotensi untuk dijadikan substrat media produksi biosurfaktan (Lopez, 1986). Pada penelitian ini limbah pulpa biji kakao dimanfaatkan sebagai sumber karbon untuk produksi biosurfaktan. Penggunaan limbah olahan samping dari pertanian kakao ini diharapkan dapat menjadi media alternatif untuk produksi dari biosurfaktan yang relatif mahal (Rahmanto., 2011).

Produksi biosurfaktan menggunakan limbah agroindustri terbukti menghasilkan biosurfaktan yang menambah nilai ekonomis dan hasil yang lebih melimpah dengan adanya pemanfaatan produk samping hasil pertanian agroindustri seperti limbah cair kelapa sawit (POME) (Yudono dkk., 2022), limbah tetes tebu (*molase*) (Ni'matuzahroh dkk., 2010), limbah cair tahu (Kamallia dkk., 2021), limbah minyak jelantah (Mardiah dkk., 2022), limbah cair singkong (onggok)

(Schmidt *et al.*, 2023) yang digunakan sebagai sumber substrat pada media produksi biosurfaktan (Ani *et al.*, 2022). Saat ini, media produksi biosurfaktan membutuhkan biaya produksi yang sangat tinggi, sehingga harganya relatif lebih mahal. Hal ini menyebabkan banyak sekali industri memilih menggunakan surfaktan sintesis dengan harga yang relatif murah. Oleh karena itu, diperlukan alternatif media produksi yang relatif murah seperti substrat media produksi yang berasal dari industri pertanian yang dapat mengurangi biaya produksi biosurfaktan serta meningkatkan efektivitas dan kualitas dari biosurfaktan yang dihasilkan (Silva *et al.*, 2013).

Biosurfaktan terdiri dari molekul *amphipatic* atau *amphiphilic* yang mengandung gugus hidrofobik (tidak suka air) dan hidrofilik (suka air) sehingga biosurfaktan memiliki kemampuan dalam menurunkan tegangan permukaan suatu cairan (Mulligan, 2005). Biosurfaktan banyak diminati karena sifatnya yang ramah lingkungan atau dapat terdegradasi secara alami (*biodegradable*) dan tidak toksik (*non toxic*). Biosurfaktan memiliki beberapa keunggulan antara lain detoksikasi pencemaran logam pada air, kontrol limbah pembuangan minyak, mudah didegradasi oleh lingkungan, efektif pada suhu ekstrim, salinitas ekstrim serta mudah disintesis. Berdasarkan keunggulan tersebut biosurfaktan dapat diaplikasikan terhadap lingkungan untuk bioremediasi minyak tanah, pengambilan minyak mentah, industri makanan, kosmetik, industri perawatan (farmasi), pembersih bahan kimia beracun, sebagai agen pengemulsi seperti detergen dan masih banyak lagi (Banat *et al.*, 2010).

Response Surface Methodology (RSM) merupakan salah satu pendekatan statistika yang digunakan untuk menentukan kondisi optimal suatu proses. Metode RSM ini telah efektif digunakan dalam menekan atau mengurangi biaya produksi melalui pemilihan variabel-variabel yang akan dioptimasi. Variabel parameter yang divariasikan diantaranya pH, salinitas, sumber nitrogen, sumber karbon, temperatur, waktu inkubasi, mineral dan sebagainya. Selain itu, metode ini memiliki keunggulan yaitu dapat menentukan interaksi antar variabel secara independen, menghemat waktu penelitian, mengurangi biaya produksi dan

mengurangi percobaan secara eksperimental (Mouafi, 2016). Pada riset sebelumnya telah dilaporkan penggunaan metode RSM untuk menentukan efek dan interaksi empat faktor untuk produksi biosurfaktan antara lain tetes tebu, minuman keras curam jagung, konsentrasi minyak jelantah dan ukuran inokulum adalah variabel independen. Uji emulsifikasi, *oil spreading test* dan hasil biosurfaktan adalah variabel respon (Almeida *et al.*, 2017).

Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 merupakan salah satu bakteri indigen isolat lokal yang telah berhasil diisolasi dari proses pengomposan limbah domestik (Fransiska, 2019). Bakteri ini sudah dilakukan studi terkait kemampuannya menghasilkan enzim lipase dengan aktivitas unit sebesar 0,1666U/mL dan diperoleh ketahanan yang relatif lebih baik terhadap metanol, *n*-heksana dan benzena dengan zona bening berturut turut sebanyak 20 mm, 20 mm dan 24 mm serta isolat tersebut menunjukkan hasil paling baik pada penambahan pelarut *n*-heksana 3% dengan zona bening sebesar 26 mm (Husna, dkk. 2022). Namun kemampuan bakteri tersebut dalam menghasilkan biosurfaktan belum dipelajari lebih lanjut.

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini dilakukan optimasi produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD). Adapun parameter yang dilakukan untuk optimasi yaitu pH, kadar salinitas dan substrat sumber karbon limbah pulpa biji kakao, kondisi optimum yang diperoleh melalui RSM digunakan pada tahap produksi biosurfaktan.

1.2. Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mempelajari manfaat limbah pulpa biji kakao sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1.
2. Mengetahui kondisi optimum konsentrasi sumber karbon pulpa biji kakao, pH dan kadar salinitas dalam produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 melalui pendekatan RSM.
3. Mendapatkan ekstrak kasar biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1.
4. Mengkarakterisasi biosurfaktan yang dihasilkan oleh bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR).

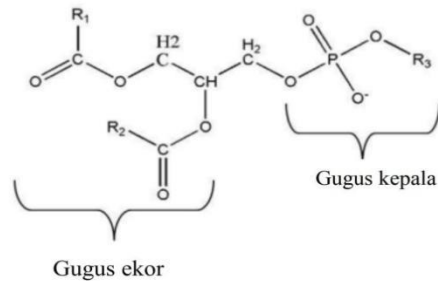
1.3. Manfaat

Limbah agroindustri pulpa biji kakao dapat dimanfaatkan sebagai alternatif sumber karbon untuk pertumbuhan bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dalam menghasilkan biosurfaktan, biosurfaktan yang dihasilkan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dapat diaplikasikan diberbagai bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biosurfaktan dan Aplikasi Biosurfaktan

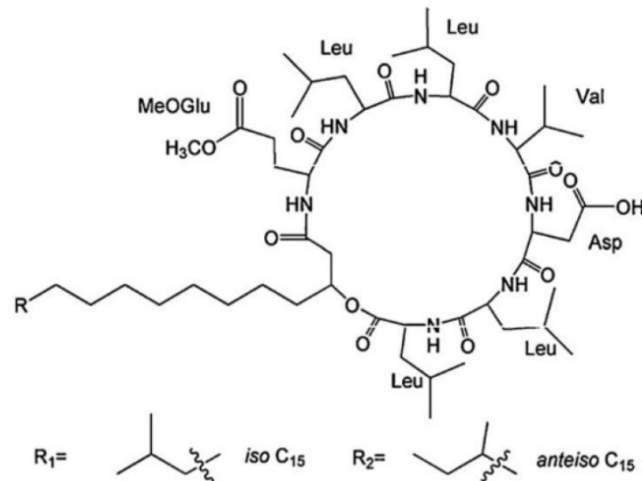
Biosurfaktan merupakan senyawa aktif permukaan yang disintesis secara ekstraselular oleh mikroba (Takahashi *et al.*, 2010). Berdasarkan struktur, molekul surfaktan mengandung gugus hidrofilik dan hidrofobik, yaitu suatu sifat yang mampu mengkonsentrasikan molekul-molekul interpermukaan yang berbeda derajat polaritasnya, seperti interpermukaan minyak dalam air (Rau *et al.*, 2005).



Gambar 1. Struktur biosurfaktan fosfolipida (Takahashi *et al.*, 2010)

Biosurfaktan merupakan struktur biomolekul kompleks terdiri atas tipe glikolipid, lipopeptida, lipoprotein, fosfolipid, dan polimerik surfaktan (Takahashi *et al.*, 2010). Pada umumnya mikrobial surfaktan banyak ditemukan dalam bentuk surfaktan glikolipid. Biosurfaktan glikolipid merupakan senyawa gula yang berikatan kompleks dengan asam alifatik rantai panjang (asam alifatik hidroksi). Biosurfaktan glikolipid memiliki sifat potensi industri dan aplikasi lingkungan yang baik, seperti sebagai detoksifikasi cemaran logam di aliran sungai, kontrol limbah pembuangan minyak, dan bioremediasi tanah yang terkontaminasi (Mukherjee *et al.*, 2006). Biosurfaktan dapat dihasilkan oleh mikroorganisme

prokariot maupun eukariot. Mikroorganisme penghasil biosurfaktan dari golongan bakteri sangat variatif jenisnya, antara lain *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus licheniformis*, *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus* (Fukuoka *et al.*, 2007).



Gambar 2. Struktur dari C15-surfactin-O-methyl ester (Liu *et al.*, 2009)

Bahan biosurfaktan telah lama dipakai oleh industri minyak untuk membantu proses bioremediasi limbah minyak serta digunakan dalam proses *Enhanced Oil Recovery* (EOR). Proses bioremediasi biosurfaktan digunakan untuk meningkatkan kelarutan polutan sehingga lebih mudah untuk didegradasi oleh mikroba. Proses EOR, biosurfaktan dapat digunakan untuk mengekstrak kembali minyak yang terjebak dalam substansi lain sehingga dapat meningkatkan produksi minyak dalam sumur minyak. Biosurfaktan memiliki keunggulan dibandingkan dengan surfaktan yang disintesis secara kimiawi karena mempunyai kadar toksisitas yang rendah, dapat didegradasi secara biologis, efektif terhadap suhu, pH dan salinitas ekstrim, serta mudah disintesis. Biosurfaktan merupakan calon potensial untuk aplikasi komersial dalam industri obat-obatan dan makanan serta dalam industri pengambilan minyak (Fukuoka *et al.*, 2007).

2.2. Jenis-Jenis Biosurfaktan

Biosurfaktan diklasifikasikan berdasarkan komponenen kimiawinya dan jenis mikroba penghasil biosurfaktannya. Terdapat lima kelompok utama dalam biosurfaktan, yaitu glikolipida, lipopeptida dan lipoprotein, asam lemak dan fosfolipida, surfaktan polimer dan biosurfaktan partikular. Berikut merupakan Tabel 1 klasifikasi biosurfaktan dan jenis mikroba yang dihasilkan.

Tabel 1. Jenis-Jenis Biosurfaktan (Desai *and* Desai, 1993)

Jenis Biosurfaktan	Jenis Mikroba
A. Glikolipida	
Trehalosa mykolat	<i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i> <i>Rhodococcus crythropolis</i>
Trehalosa ester	<i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora sp</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i>
Mono-, Di-, dan Trisakarida mykolat	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter sp.</i>
Rhamnolipida	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sophorolipida	<i>Candida spp.</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis bombicola</i>
B. Fosfolipida dan Asam lemak	
Fosfolipida dan asam lemak	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>
Fosfolipida	<i>Acinetobacter spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Thiobacillus thioxidans</i>
C. Lipopeptida dan Lipoprotein	
Gramiciden	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxin	<i>Bacillus polymyxa</i>

Ornithin – lipida Ceripilin Lysin – lipida Surfaktin – subtilysin Peptida lipida Viscosin Serrawettin	<i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i>
D. Surfaktan Polimer	
Lipo hetero polisakarida Hetero polisakarida Polisakarida protein	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> RAG-1 <i>Arthrobacter calcoaceticus</i> A2 <i>Arthrobacter calcoaceticus strains</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida petrophilum</i> <i>Endomycopsis lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i>
Manno – protein Karbohidrat protein	<i>Shizonella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i>
Mannan – komplek lipida Mannosa/erythrosa-lipida	<i>Debaryomyces polymorphus</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Kompleks karbohidrat-protein-lipida Debaryomyces polymorphus Pseudomonas spp. Pseudomonas fluorescens	
E. Biosurfaktan Partikular	
Membran vesikula H01-N Fimbriae Seluruh bagian sel	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Berbagai jenis mikroba

2.3. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Produksi Biosurfaktan

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi optimasi produksi biosurfaktan antara lain adalah sebagai berikut:

2.3.1. Suhu

Optimalisasi faktor lingkungan yakni suhu diyakini mampu menurunkan tegangan permukaan dan meningkatkan aktivitas emulsifikasi, optimasi suhu dengan dilakukan variasi suhu pada saat melakukan inkubasi pada shaker inkubator

dengan begitu mendapatkan suhu optimumnya, suhu mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme penghasil biosurfaktan, suhu optimal memungkinkan pertumbuhan yang cepat, yang ada pada produksi biosurfaktan (Rodrigues *et al.*, 2006).

2.3.2. pH

pH media pertumbuhan juga mempengaruhi produksi dan aktivitas biosurfaktan. Mikroorganisme membutuhkan pH yang sesuai untuk pertumbuhan sel dan produksi metabolit sekunder seperti biosurfaktan. Biosurfaktan memiliki pH optimal kisaran pH 5-9. Mikroorganisme yang memproduksi biosurfaktan memiliki rentang pH optimal untuk pertumbuhannya. pH diluar rentang ini dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme akibatnya menurunkan produksi biosurfaktan (Sanches *et al.*, 2021).

2.3.3. Sumber Karbon

Sumber karbon digunakan sebagai substrat pertumbuhan pada media biosurfaktan dikarenakan memiliki kandungan glukosa yang cukup tinggi, selain itu juga memiliki kandungan bahan organik yang tinggi antara lain seperti asam asetat, alkohol dan asam laktat dan membantu mempercepat pertumbuhan dari biosurfaktan yang ingin dihasilkan (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

2.3.4. Kadar Salinitas

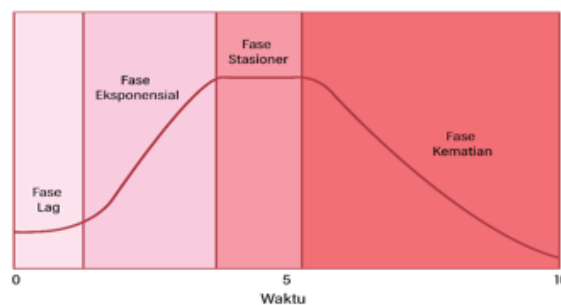
Kadar salinitas dapat menjadi faktor optimasi produksi biosurfaktan, dikarenakan beberapa jenis biosurfaktan tahan pada rentang salinitas yang cukup ekstrim, akan tetapi ada mikroorganisme yang dapat mengalami plasmolisis apabila ditambahkan kadar NaCl yang cukup tinggi, plasmolisis terjadi akibat dari peristiwa

osmosis. Produksi biosurfaktan memiliki kadar salinitas garam (NaCl) yang optimal pada kisaran 2-12% (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

2.4. Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan merupakan gambaran fase pertumbuhan bakteri yang diperlukan oleh mikroorganisme dalam meningkatkan jumlah sel menjadi dua kali lipat dari jumlah semula. Kurva pertumbuhan mikroorganisme terdiri atas empat fase yaitu fase adaptasi (fase lag), fase eksponensial atau fase logaritme, fase stasioner dan fase kematian. Pada fase eksponensial terjadi peningkatan jumlah sel dan digunakan untuk menentukan waktu regenerasi (Purwoko, 2007).

Pertumbuhan mikroorganisme diartikan sebagai penambahan jumlah atau total massa sel yang melebihi inokulum asalnya. Sistem reproduksi bakteri adalah dengan cara pembelahan biner melintang, satu sel membelah menjadi dua sel anakan yang identik dan terpisah. Selang waktu yang dibutuhkan bagi sel untuk membelah diri menjadi dua kali lipat disebut dengan waktu pertumbuhan. Membuat kurva pertumbuhan dilakukan dengan menginokulasikan kedalam medium baru, pembiakan tidak segera terjadi tetapi ada periode penyesuaian pada lingkungan yang dikenal fase pertumbuhan. Selanjutnya, akan memperbanyak diri dengan laju konstan, yang nantinya akan didapatkan kurva pertumbuhan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva pertumbuhan (Purwoko, 2007)

2.4.1. Fase Adaptasi (*Lag Phase*)

Pada fase ini tidak terjadi penambahan koloni atau populasi mikroba, tetapi terjadi adanya penambahan pada volume sel, karena pada fase adaptasi biasanya sel melakukan pembesaran ukuran. Sel mengalami perombakan komposisi kimia dan bertambahnya ukuran. Fase adaptasi atau *lag phase* terjadi sesaat setelah sel dipindahkan ke media baru, sel bakteri mengalami penyesuaian dengan lingkungan kondisi pada media baru yang digunakan (Parlezar, 2001).

2.4.2. Fase Perbanyakan (*Logarithmic or Ekponential Phase*)

Pada fase ini terjadi pertumbuhan atau pembelahan sel bakteri yang berlangsung sangat cepat dan paling baik digunakan untuk proses inokulum atau untuk mencari fase pertumbuhan yang paling optimal (Dwidjuseputro, 1998). Pembelahan sel yaitu persamaan dari ekponensial, pada fase ini terjadi perbanyakan sel mikroorganisme sangat meningkat pesat sampai ke fase stasioner. Pada fase log ini didapatkan senyawa yang diinginkan antara lain seperti etanol, asam laktat dan asam organik. Pada fase ini didapatkan enzim atau produk supernatan yang diinginkan (Gandjar dan Sjamsuridzal, 2006).

2.4.3. Fase Statis (*Stationer Phase*)

Pada fase statis ini pembelahan sel bakteri atau mikroorganisme mulai berkurang dan mulai terjadinya banyak kematian pada sel bakteri diakibatkan oleh produk nutrisi yang terdapat dalam media sudah mulai berkurang atau habis. Hal ini juga disebabkan terdapatnya adanya penumpukan metabolit pada media pertumbuhan bakteri yang menjadi racun bagi mikroorganisme tersebut, sel akan berhenti membelah dan mulai terjadi kesetimbangan antara sel yang mati dengan sel yang mengalami pembelahan. Selain itu fase statis disebabkan terjadinya pengurangan

kadar oksigen, *nutrient*, akumulasi metabolit toksik (alkohol, asam dan basa) dan penurunan kadar air (Purwoko, 2007).

2.4.4. Fase Kematian (*Death Phase*)

Pada fase ini mulai banyak sel yang mati dibanding sel-sel baru yang membelah, semua sel mati dalam beberapa bulan dikarenakan sudah kehabisan *nutrient* pada media pertumbuhan dan telah melampaui laju pembiakan, maka jumlah sel sebenarnya menurun. Penyebab utama lain yaitu autolisis sel dan penurunan energi seluler (Purwoko, 2007).

2.5. Kakao (*Theobroma cacao* L.)



Gambar 4. Buah kakao (Siregar, 1898)

Kakao merupakan salah satu komoditas ekspor non migas Indonesia, baik sebagai sumber penghidupan bagi petani, produsen maupun penyumbang devisa negara dari subsektor perkebunan (Sunarto, 1992). Pengembangan tanaman kakao di Indonesia sampai dengan tahun 2010 luas areal telah mencapai 1.651.539 ha dengan produksi mencapai 844.626 ton biji kakao kering (Sunarto, 2004). Limbah pulpa diperoleh dari pemerasan biji kakao yang dipisahkan dari kulitnya dan direndam atau difermentasi dengan menggunakan air selama beberapa waktu. Limbah ini, jika tidak diolah menjadi produk baru akan mencemari lingkungan dan menimbulkan bau yang tidak sedap dan menjadi sumber penyakit bagi

mahluk hidup. Pemanfaatan limbah pulpa berupa produk pupuk dan olahan pangan terfermentasi seperti sumber mikroorganisme untuk produk *nata de coco*. Oleh karena itu, pemanfaatan limbah pulpa kakao dapat menambah nilai mutu dan nilai jual dari limbah tersebut. Pulpa biji kakao adalah cairan berlendir yang berwarna putih yang membungkus seluruh permukaan biji kakao, kandungan pulpa sendiri sebanyak 25-30% dibanding dengan keseluruhan berat biji buah kakao, didalamnya mengandung glukosa cukup tinggi sebanyak 10-13% (Lopez, 1986). Produksi kakao yang besar memerlukan penanganan pasca panen yang baik agar diperoleh biji kakao dengan kualitas yang baik dan bermutu. Salah satu tahapan penting dalam penanganan pasca panen kakao adalah proses fermentasi (Widyotomo dan Mulato, 2008). Fermentasi biji kakao bertujuan untuk menghancurkan pulpa dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi biokimia dalam keping biji, yang berperan bagi pembentukan cita rasa, warna dan aroma coklat. Pulpa yang telah hancur akan mudah lepas dari biji, membentuk cairan pulpa. Cairan pulpa sebagai limbah hasil samping selama fermentasi biji kakao, diantaranya mengandung asam asetat atau asam cuka, asam laktat dan alkohol. Asam-asam organik tersebut terbentuk dari fermentasi gula yang terkandung dalam pulpa biji kakao. Pulpa merupakan jaringan halus yang berlendir yang membungkus biji kakao, keadaan zat yang menyusun pulpa terdiri dari 80-90% air dan 8-14% gula. Kondisi ini sangat baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi (Bintoro, 1977). Aktivitas mikroorganisme dalam proses fermentasi meliputi peragian gula menjadi alkohol dan alkohol menjadi asam cuka. Di samping itu, aroma pun meningkat selama proses fermentasi dan pH biji mengalami perubahan (Siregar *et al.*, 2010).

2.6. Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1

Lysinibacillus boronitolerans LKM G1 merupakan isolat lokal yang dihasilkan dari proses pengomposan limbah domestik dengan karakteristik morfologi sel berbentuk basil (batang) (Fransiska, 2019). Isolat ini salah satu jenis dari bakteri

gram negatif, memiliki kemampuan hidup pada suhu 29°C-45°C menjadikannya kedalam jenis kelompok mikroorganisme mesofilik. Analisis molekul menggunakan 16s-rRNA dengan isolat bakteri lokal tersebut dikategorikan kedalam *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dengan 99,08% identitasnya terhadap bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* strain NRBRC 103108. Pada penelitian studi terkait lipase, terhadap bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 yang memiliki aktifitas unit sebesar 0,1666 U/mL dan diperoleh ketahanan yang relatif lebih baik terhadap metanol, *n*-heksana dan benzena dengan zona bening berturut-turut sebanyak 20 mm, 20 mm dan 24 mm serta bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 menunjukkan aktivitas paling baik pada media dengan penambahan pelarut organik *n*-heksana 3% yang menghasilkan terbentuknya zona bening sebesar 26 mm (Husna dkk., 2022).

2.7. Response Surface Methodology (RSM)

Metode RSM (*Response Surface Methodology*) adalah pendekatan matematika statistik yang paling umum digunakan untuk tata letak eksperimen, menilai pengaruh variabel, membangun model, dan mencari nilai optimal. Teknik RSM disesuaikan dengan fungsi kuadrat untuk proses optimasi, pada literatur menunjukkan bahwa RSM telah digunakan secara efektif untuk produksi biosurfaktan. Metode RSM digunakan untuk membangun model empiris, karena memungkinkan untuk mengevaluasi efek dari beberapa faktor dan interaksinya pada satu atau lebih karakter. Tujuan dari metode RSM yaitu untuk menyiapkan serangkaian desain eksperimen untuk prediksi respon (*y*) yang memadai, menyesuaikan model empiris yang dihipotesiskan dengan data yang diperoleh menggunakan desain yang terpilih, menentukan kondisi optimal pada variabel *input* (kontrol) model yang menghasilkan respon maksimum atau minimum wilayah yang diinginkan. *Box-Behnken Design* (BBD) dan *Central Composite Design* (CCD) adalah dua desain eksperimen utama yang digunakan dalam RSM. *Central Composite Design* (CCD) pada metode RSM didalam *software design expert* berfungsi untuk mengukur faktor numerik yang divariasikan dengan tiga

atau lima tingkatan plus (+ α) dan minus (- α) pada titik axial plus (+1) dan minus (-1) pada titik faktorial dan *center point*. Pada tahap awal penelitian dilakukan skrining terlebih dahulu terhadap variabel-variabel yang memiliki kemungkinan untuk dapat berpengaruh terhadap respon yang dihasilkan. RSM memiliki keunggulan dari desain penelitian lainnya antara lain dapat menentukan antara interaksi antar variabel independen, pemodelan sistem secara matematis, serta menghemat waktu dan biaya dengan mengurangi jumlah percobaan. Penelitian ini dilakukan dengan melakukan optimasi produksi biosurfaktan dengan teknik RSM pada isolat bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dengan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD) pada parameter pH, kadar salinitas (NaCl) dan sumber karbon limbah pulpa biji kakao (Yaraguppi *et al.*, 2020). Penelitian mengenai optimasi biosurfaktan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) menunjukkan hasil yang signifikan oleh (Ikhwani *et al.*, 2017) biosurfaktan dari *Pseudomonas aeruginosa* dioptimalkan dengan pH 7.54 dan konsentrasi minyak mentah 3.25%, menghasilkan indeks emulsifikasi sebesar 55.66% dan tegangan permukaan 51.06 mN/m. Sementara itu penelitian lain oleh Nugraha menemukan kondisi optimum pada pH 4 dan laju air 3L/menit, menghasilkan biosurfaktan dari limbah biodiesel menunjukkan potensi biosurfaktan dalam aplikasi industri dan lingkungan.

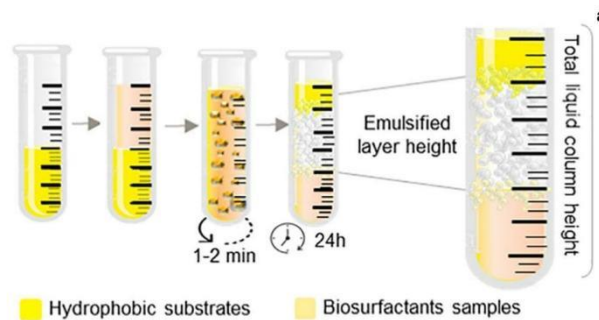
2.8. Uji Biosurfaktan

Uji biosurfaktan dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan yang didapatkan. Uji ini diantaranya yaitu uji emulsifikasi, *oil spreading test*, uji *drop collapse*, seperti sebagai berikut:

2.8.1. Uji Emulsifikasi

Uji emulsifikasi merupakan suatu proses pencampuran (*mixing*) antara dua buah fase cair pelarut dan zat terlarut yang tidak dapat bercampur dengan bantuan agen

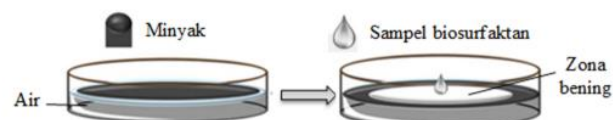
emulsifikasi (biosurfaktan) (Bicca *et al.*, 1999). Faktor-faktor yang menentukan kestabilan suatu emulsi adalah ukuran partikel dan distribusi, jenis emulsifier yang digunakan, rasio antara fasa terdispersi dan fasa pendispersi serta perbedaan tegangan antara dua fasa. Emulsi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu penambahan air atau minyak dan penambahan elektrolit (Rahmawati, 2002). Menurut Willumsen and Karlson (1997), nilai indeks emulsi di atas 50% dinyatakan sebagai penghasil biosurfaktan yang baik.



Gambar 5. Uji emulsifikasi (Da Silva *et al.*, 2021)

2.8.2. Oil Spreading Test

Uji *oil spreading* dilakukan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam menghilangkan lapisan minyak pada permukaan air dengan prinsip penurunan tegangan permukaan antara fasa air dan minyak. Teknik ini dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk ketika setetes larutan yang mengandung biosurfaktan ditempatkan pada permukaan minyak-air (Morikawa *et al.*, 2000).



Gambar 6. Oil spreading test (Da Silva *et al.*, 2021)

2.8.3. Uji *Drop Collapse*

Uji *drop collapse* didasarkan pada mendatarnya permukaan minyak ketika ditetesi oleh biosurfaktan. Metode ini adalah cara yang sensitif dan mudah untuk dilakukan karena hanya membutuhkan volume kecil ($\sim 5 \mu\text{L}$) larutan biosurfaktan untuk menguji sifat biosurfaktan (Shokouhfard *et al.*, 2015).



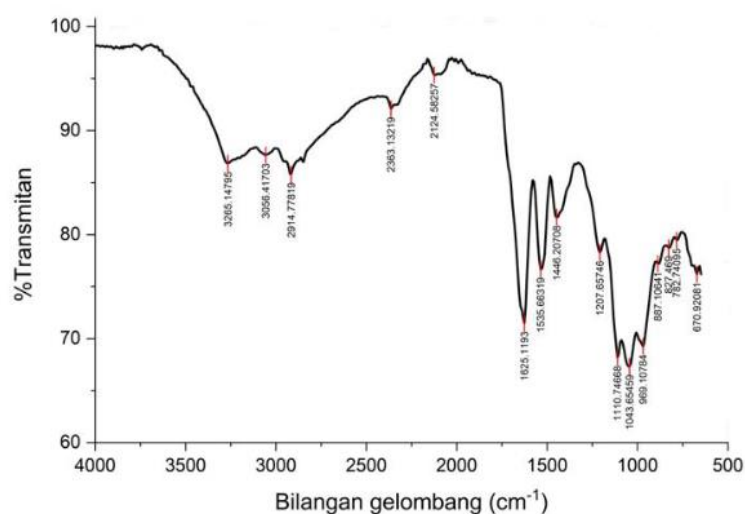
Gambar 7. Uji *drop collapse* (Da Silva *et al.*, 2021)

2.9. Analisis Karakterisasi FT-IR

Karakterisasi melalui teknik FT-IR dilakukan untuk mengidentifikasi dan menganalisis sifat kimia dan struktur suatu sampel melalui spektrum inframerahnya. Saat sampel terkena radiasi inframerah, FT-IR mengukur getaran ikatan kimianya yang menghasilkan spektrum unik yang berfungsi untuk mempelajari dan mengkarakterisasi berbagai aspek dari sampel. Karakterisasi biosurfaktan melalui FT-IR digunakan untuk mengidentifikasi jenis biosurfaktan yang dihasilkan melalui gugus fungsi yang terdapat dalam suatu senyawa biosurfaktan. Metode ini memungkinkan analisis spektrum absorbansi yang menunjukkan interaksi antara informasi vibrasi ikatan kimia. Analisis ini dapat mengidentifikasi gugus fungsi seperti O-H, C=O dan C≡C dalam bilangan gelombang cm^{-1} yang penting untuk memahami sifat dan potensi aplikasi biosurfaktan dalam berbagai bidang, termasuk bioteknologi dan industri.

Biosurfaktan lipopeptida yang dihasilkan oleh mikroorganisme seperti *Bacillus*, memiliki struktur amfipatik dengan bagian hidrofilik dan hidrofobik, Karakterisasi biosurfaktan ini dapat dilakukan melalui metode FT-IR. Metode FT-

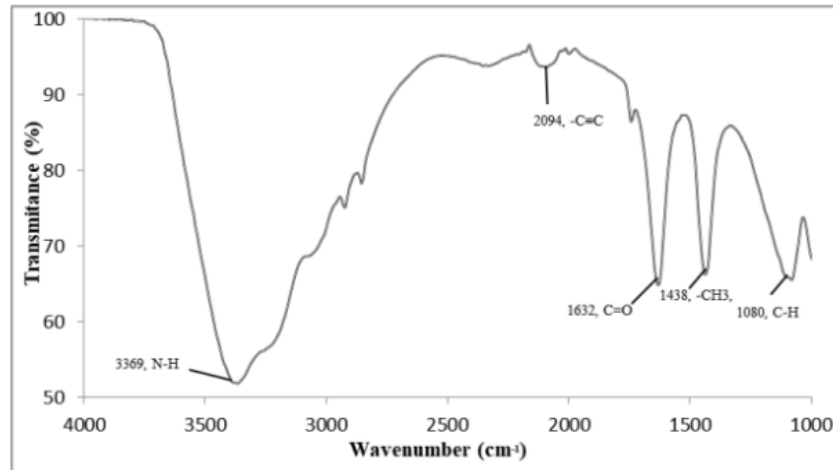
IR mengidentifikasi gugus fungsi, seperti ikatan N-H pada sekitar 3272 cm^{-1} , yang menunjukkan keberadaan peptida. Beberapa penelitian telah terbukti menghasilkan biosurfaktan lipopeptida berdasarkan hasil analisis seperti analisis FT-IR. Penelitian yang dilakukan oleh Citra (2021) memproduksi biosurfaktan lipopeptida dari bakteri ALP D1 asal air laut Pelabuhan Panjang dari hasil karakterisasi dengan FT-IR. Berdasarkan hasil karakterisasi FT-IR, pada pita serapan 3265 cm^{-1} menunjukkan adanya vibrasi peregangan N-H yang berasal dari gugus peptida. Spektrum pada serapan 2914 cm^{-1} menunjukkan adanya peregangan rantai -C-H alifatik. Pita serapan pada 1625 cm^{-1} menunjukkan adanya peregangan CO-N. Pada 1535 cm^{-1} menunjukkan adanya deformasi ikatan N-H dan vibrasi peregangan C-N. Pada pita serapan 1390^{-1} menunjukkan adanya rantai alifatik dari gugus -C-H dan pada serapan 1207 cm^{-1} menunjukkan adanya peregangan -C-O. Hasil FT-IR biosurfaktan lipopeptida dari bakteri ALP D1 dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP D1 (Citra, 2021)

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yusnidar (2021), memperoleh biosurfaktan jenis lipopeptida dari hasil karakterisasi dengan FT-IR. Berdasarkan hasil analisis FT-IR, biosurfaktan yang diproduksi dari bakteri ALP E1 asal air laut Pelabuhan Panjang menghasilkan spektrum pada rentang $4000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Spektrum IR yang terbentuk yaitu pada puncak karakteristik 3369 cm^{-1} yang

menunjukkan adanya ikatan N-H. Puncak spektrum pada 2094 cm^{-1} menunjukkan adanya intensitas $\text{C}\equiv\text{C}$. Sementara itu, spektrum pada bilangan gelombang 1632 cm^{-1} menunjukkan keberadaan ikatan $\text{C}=\text{O}$. Pita serapan pada bilangan gelombang 1438 cm^{-1} masing-masing mewakili $-\text{CH}_3$ dan ikatan C-H. Spektrum FT-IR biosurfaktan yang dihasilkan oleh ALP E1 dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Spektrum FT-IR biosurfaktan dari isolat bakteri ALP E1 (Yusnidar, 2021)

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 s.d. September 2024 di Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Jurusan Kimia, Universitas Lampung dan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR) di Laboratorium Teknik Kimia, Institut Teknologi Sumatra.

3.2. Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *coolbox*, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), shaker inkubator, pipet tetes, oven, hot plate, *micropipet*, *autoclave*, tabung reaksi, labu enlenmeyer, *vortex*, tabung ependorf, botol kaca, *petridish*, plastik wrap, aluminium foil, timbangan analitik, gelas beaker, jarum ose, *magnetic stirrer*, kaca preparat, lemari es, mikrotip, pH indikator, sentrifuga model 225 Fisher Scientific dan tabung Eppendorf.

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat bakteri *Lisynibacillus boronitolerans* LKM G1 (Husna *et al.*, 2022), kain kasa, kapas, aquades, *Nutrien Agar* (NA), *Nutrien Broth* (NB), *Mineral Salt Medium* (MSM) dengan komposisi 2.0 g/L KH_2PO_4 , 5.0 g/L K_2HPO_4 , 3.0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10,0 g/L NaCl, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.002 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, media juga diberi 0,3 g/L *yeast extract* sebagai sumber

nitrogen organik semua bahan tersebut berasal dari *Merck* dan limbah pulpa biji kakao diperoleh dari wilayah pertanian di Kabupaten Lampung Timur.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Pembuatan Media

3.3.1.1. Media *Nutrient Agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* digunakan untuk peremajaan isolat bakteri. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 0,56 g *Nutrient Agar* ke dalam 20 mL akuades. Kemudian media tersebut dipanaskan hingga larut seluruhnya dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3 mL dan ditutup dengan sumbat. Selanjutnya media disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Kemudian media dalam tabung reaksi diletakkan dengan posisi miring (Sujaya, 2014).

3.3.1.2. Media *Nutrient Broth* (NB)

Media *Nutrient Broth* adalah media yang digunakan untuk media inokulum atau media adaptasi bakteri. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 0,26 g *Nutrient Broth* dalam 20 mL akuades dan dipanaskan hingga larut seluruhnya. Selanjutnya media ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit. Kemudian media disimpan pada suhu ruang dan siap digunakan (Sujaya, 2014).

3.3.1.3. Media *Mineral Salt Medium* (MSM)

Media *Mineral Salt Medium* (MSM) adalah media selektif yang digunakan untuk produksi biosurfaktan. Pembuatan media ini dilakukan dengan cara menyiapkan

terlebih dahulu bahan-bahan pembuatan media yaitu KH_2PO_4 0,2 gram, K_2HPO_4 0,5 gram, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,3 gram, NaCl 0,01 gram, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 gram, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 gram, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,001 gram, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0002 gram, glukosa 0,03 gram dan yeast extract 0,003 gram. Selanjutnya media ini ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dihomogenkan menggunakan *stirrer*. Media kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu ditutup dengan sumbat dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C , tekanan 1 atm, selama 15 menit. Selanjutnya media disimpan pada suhu ruang dan siap digunakan (Francy *et al.*, 1991).

3.3.2. Preparasi Limbah Pulpa Biji Kakao

Disiapkan sebanyak 30 buah kakao yang telah dipetik dari pohon, lalu dikupas kulit terluar dari buah kakao, kemudian biji kakao yang telah dikupas dikumpulkan diatas karung bersih untuk diperas sari pati pulpa biji kakao (bagian lendir terluar dari biji buah kakao), selanjutnya diperas menggunakan karung tadi dan dibiarkan terfermentasi dengan digantung selama semalam supaya semua sari pati pulpa biji kakao keluar seluruhnya pada baskom yang tersedia, yang terakhir masukan cairan pulpa biji kakao yang terkumpul ke dalam wadah botol bekas.

3.3.3. Peremajaan Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1

Peremajaan isolat dilakukan dalam media *Nutrient Agar* miring. Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan ke permukaan media secara zig-zag dan diinkubasi selama 24-48 jam pada temperatur 37°C . Selanjutnya biakan hasil peremajaan ini dapat digunakan sebagai stok kultur dan disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4°C (Wijayati dkk., 2014).

3.3.4. Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk mengetahui fase pertumbuhan dari bakteri penghasil biosurfaktan. Satu ose bakteri yang sudah diremajakan diinokulasikan ke dalam 20 mL media cair NB, lalu diinkubasi pada shaker inkubator di suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Selanjutnya biakan dipindahkan sebanyak 1% (v/v) dari media NB ke dalam media MSM. Kemudian biakan bakteri diinkubasi dengan shaker inkubator pada suhu 30°C pada kecepatan 110 rpm selama 120 jam. Nilai OD (*Optical Density*) diukur setiap 12 jam sekali dengan cara sebanyak 0,3 mL kultur ditambahkan 2,7 mL akuades dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm dan aktivitas biosurfaktan diukur dengan menghitung indeks emulsifikasi (IE_{24}).

3.3.5. Uji Biosurfaktan

Uji biosurfaktan dilakukan dengan 3 jenis uji yang berbeda yaitu uji emulsifikasi, uji *oil spreading* dan Uji *drop collapse*. uji emulsifikasi berfungsi untuk mengetahui kemampuan emulsi biosurfaktan, uji *oil spreading* untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam mendegradasi minyak, dan Uji *drop collapse* digunakan untuk mengetahui kemampuan biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan.

3.3.5.1. Uji Emulsifikasi

Oli mesin sebanyak 2 mL dimasukan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL supernatan, kemudian divortex dengan kecepatan tinggi selama 2 menit. Selanjutnya, campuran didiamkan selama 24 jam untuk melihat kestabilan emulsi. Pengamatan dilakukan secara visual dengan melihat lapisan emulsi yang terbentuk. Reaksi emulsifikasi ditandai dengan adanya suatu *layer* emulsifikasi antara *crude oil* dan media yang berisi biosurfaktan. kontrol positif yang

digunakan yaitu dengan SDS dan akuades, sedangkan kontrol negatif menggunakan oli dan akuades. Selanjutnya dihitung nilai indeks emulsifikasi (IE_{24}) yang merupakan persentase dari tinggi lapisan emulsi dibagi dengan tinggi total larutan. (Da Silva *et al.*, 2021). dengan rumus:

$$\text{Indeks Emulsifikasi (IE}_{24}\text{)} = \frac{\text{tinggi lapisan emulsi}}{\text{tinggi total larutan}} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

3.3.5.2. Uji Penyebaran Minyak (*Oil Spreading Test*)

Cawan petri (diameter 14 cm) yang telah berisi 40 mL air suling ditambahkan 1 mL oli mesin ke permukaan air. Selanjutnya, 10 μ L supernatan dari media MSM diteteskan di permukaan oli mesin dan didiamkan selama 30 detik. Selanjutnya diukur diameter zona bening yang terbentuk pada permukaan oli, dibandingkan dengan kontrol yaitu 40 mL air suling tanpa diinokulasi dengan supernatan bakteri (Desai & Banat, 1997; Morikawa *et al.*, 2011).

3.3.5.3. Uji *Drop Collapse*

Uji *drop collapse* merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas biosurfaktan dalam menurunkan tegangan permukaan senyawa. Sebelum melakukan pengujian, kultur cair bakteri terlebih dahulu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 20 menit hingga pelet dan supernatan terpisah (Da Silva *et al.*, 2021). Uji ini dilakukan dengan cara oli mesin diteteskan sebanyak 20 μ L pada cawan petri dan didiamkan hingga 1 jam agar stabil kemudian ditambahkan dengan supernatan sebanyak 10 μ L. Hasil positif uji ini yaitu apabila tetesan supernatan di atas oli berbentuk datar jika mengandung biosurfaktan (Bodour *and* Maier, 1998).

3.3.6. Desain Eksperimen RSM-CCD

Pada penelitian ini, parameter produksi seperti konsentrasi sumber karbon, pH, dan kadar salinitas dilakukan menggunakan rancangan desain RSM-CCD (*Central Composite Design*) (Yaraguppi *et al.*, 2020). Parameter yang digunakan pada percobaan ini antara lain konsentrasi sumber karbon (%), pH dan kadar salinitas NaCl (%). Sedangkan rentang dan tingkatan pada konsentrasi sumber karbon (%) yaitu 10, 20 dan 30, pada pH menunjukkan rentang kisaran 6,7 dan 8, pada kadar salinitas NaCl (%) menunjukkan rentang sebesar 4, 5 dan 6. Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan rentang dan tingkatan parameter dari optimasi biosurfaktan bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1.

Tabel 2. Rentang dan tingkatan parameter dari optimasi biosurfaktan bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1

Parameter	Rentang dan Tingkatan		
	-1	0	+1
Konsentrasi sumber karbon (%)	10	20	30
pH	6	7	8
Kadar Salinitas NaCl (%)	4	5	6

3.3.7. Produksi Biosurfaktan

Produksi biosurfaktan dilakukan berdasarkan hasil yang diperoleh dari tahap optimasi menggunakan metode RSM. Sebanyak 3% (v/v) bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dari media cair NB dimasukkan ke dalam campuran media MSM dengan konsentrasi sumber karbon (%), kadar salinitas (%), dan pH optimum. Kultur diinkubasi menggunakan shaker inkubator dengan kecepatan 110 rpm selama masa inkubasi optimum. Terakhir, dilakukan pengujian biosurfaktan menggunakan uji emulsifikasi, uji *oil spreading* dan uji *drop collapse* (Batubara, 2011).

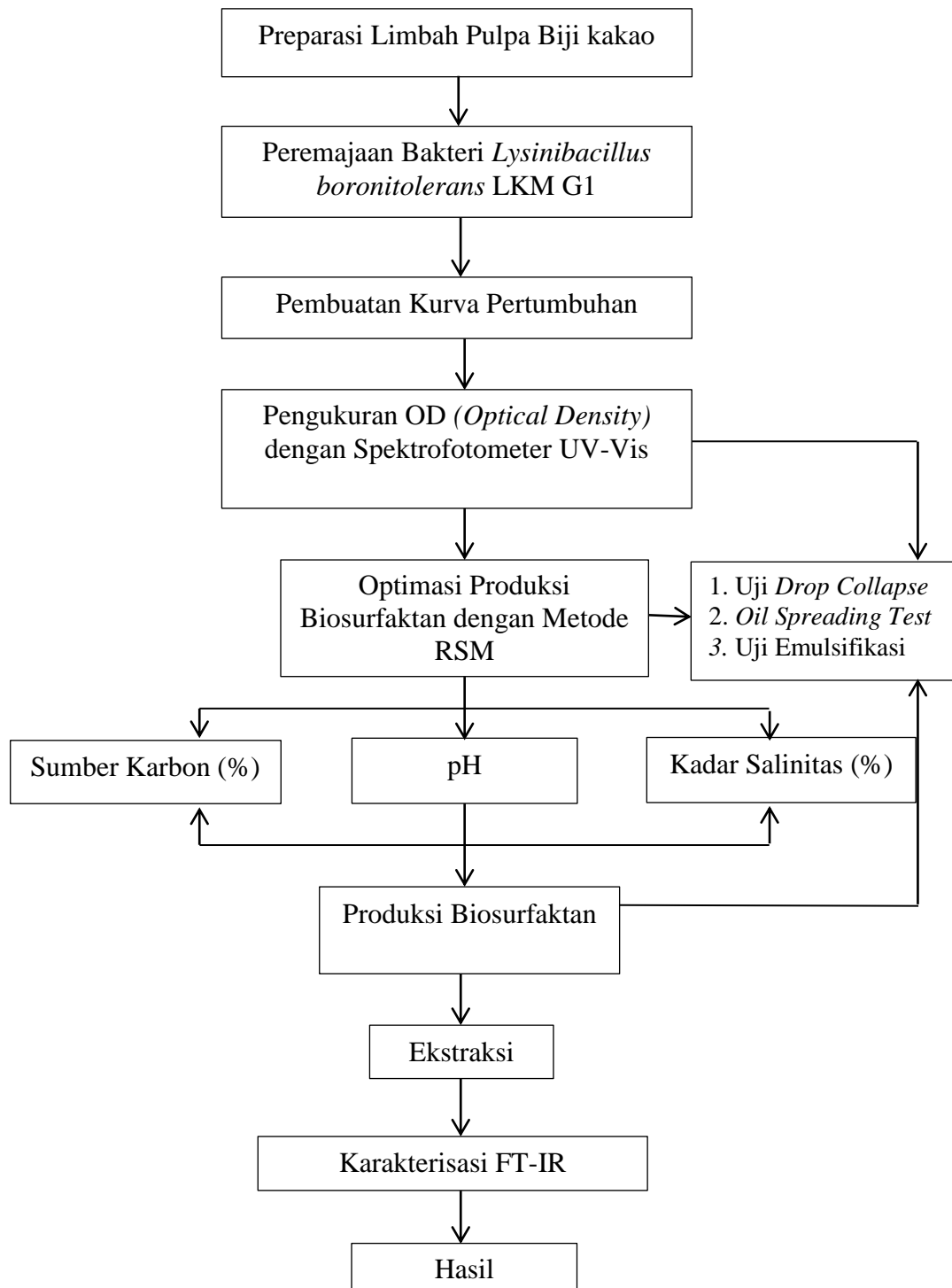
3.3.8. Ekstraksi Biosurfaktan

Ekstraksi biosurfaktan menggunakan metode presipitasi asam. Supernatan biosurfaktan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan bebas sel. Supernatan selanjutnya ditambahkan HCl 6N hingga diperoleh pH 2 kemudian didiamkan pada temperatur 4°C selama 24 jam. Kemudian disentrifugasi kembali selama 20 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk memisahkan ekstrak kasar biosurfaktan dengan filtrat. Selanjutnya ekstrak kasar biosurfaktan dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga didapatkan biosurfaktan kering (Nitschke *and* Pastore, 2006; Mnif *et al.*, 2016).

3.3.9. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR)

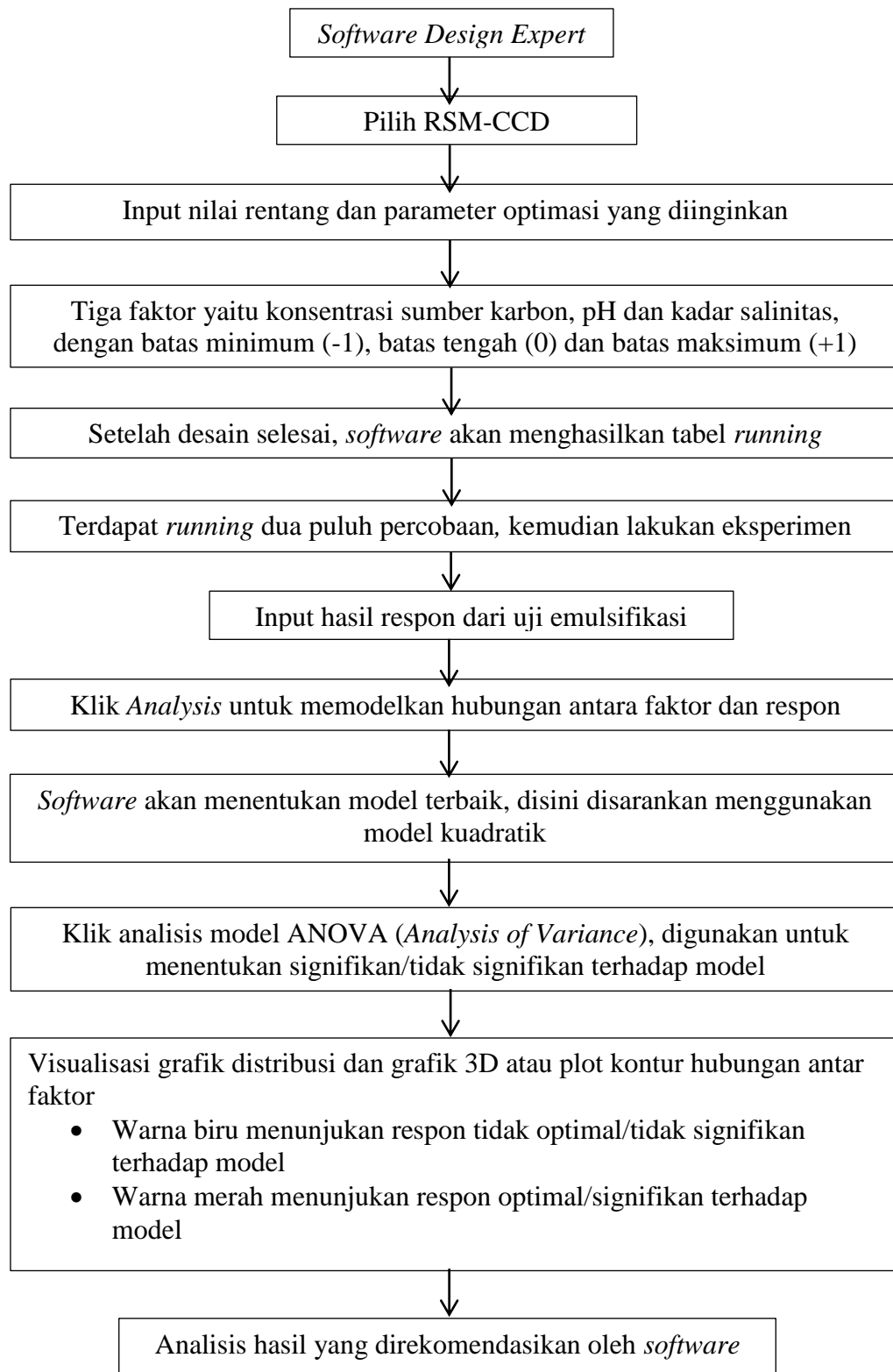
Karakterisasi biosurfaktan menggunakan FT-IR dilakukan agar mengetahui gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam molekul biosurfaktan. Karakterisasi dengan cara ekstrak kasar biosurfaktan dicampurkan dengan KBr murni. Setelah itu campuran dimasukkan ke dalam cetakan pelet dan ditekan dengan press hidrolik. Selanjutnya sampel dikeluarkan dan dianalisis dengan menggunakan FT-IR (Pavan dan Andrew, 2021). Spektrum IR yang terbentuk dapat dijadikan sebagai acuan untuk menentukan jenis biosurfaktan.

3.3.10. Skema Alur Penelitian



Gambar 10. Skema alur penelitian

3.3.11. Skema *Response Surface Methodology* (RSM)



Gambar 11. Skema *Response Surface Methodology* (RSM)

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Limbah pulpa biji kakao dapat dijadikan sebagai sumber karbon dalam produksi biosurfaktan, kondisi optimum produksi biosurfaktan yang didapat pada konsentrasi sumber karbon sebesar 20%, pH 7 dan kadar salinitas 4% dengan indeks emulsifikasi 73% pada waktu optimum 108 jam.
2. Isolat bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 memiliki kemampuan dalam memproduksi biosurfaktan pada kondisi optimum yaitu dengan indeks emulsifikasi sebesar 73%, *oil spreading test* sebesar 5,5 cm serta pada uji *drop collapse* menunjukkan hasil positif.
3. Produksi biosurfaktan dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dalam penelitian ini diperoleh ekstrak kering berwarna putih sebanyak 1,632 mg/L dengan indeks emulsifikasi sebesar 75%.
4. Berdasarkan hasil analisis FT-IR mengindikasikan puncak pita karakteristik $3600-3200\text{ cm}^{-1}$ tersebut diduga merupakan biosurfaktan dengan ciri khusus lipopeptida.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, maka pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan optimasi dengan kondisi produksi biosurfaktan

dengan substrat pertumbuhan limbah agroindustri lainnya yang melibatkan parameter variasi kadar salin, sumber nitrogen, pH, parameter agitasi, dan aerasi serta melakukan karakterisasi seperti KLT, GC-MS, LC-MS, menguji aktivitas anti mikroba dan instrumen lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins *and* roles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 May;86(5):1323-36. doi: 10.1007/s00253-010-2498-2. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20336292; PMCID: PMC2854365.
- Agustono, B., Lamid, M., Ma'ruf, A., dan Purnama, M.T.E. 2017. Identifikasi Limbah Pertanian dan Perkebunan Sebagai Bahan Pakan Inkonvensional di Bayuwangi. *Jurnal Medik Vortiner*. 1(1): 12-22.
- Almeida, D. G., Soares da Silva, R. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M. 2016. Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front. Microbiol*. 7:1718. doi: 10.3389/fmicb.2016.01718.
- Ani. (2022). *Ilmu Kesehatan Masyarakat*. Padang: PT. Global Eksekutif Teknologi.
- Banat IM, Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti MG, Fracchia L., Smyth TJ, Marchant R. Produksi, aplikasi, dan potensi biosurfaktan mikroba di masa mendatang. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010; 87 :427–444. [PubMed] [Google Scholar].
- Banat, I. M., Makkar, R. S., *and* Cameotra, S. S. 2000. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53(5):495-508.
- Batubara, N. R. 2011. *Optimasi produksi biosurfaktan oleh Pseudomonas aeruginosa dengan variasi sumber karbon dan nitrogen medium*. (Skripsi). Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Bhatia V, Saharan Singh B. 2016. Isolation and Partial Structural & Functional Characterization of Glycolipid Biosurfactant producing *Pichia*

sorbotophila WG1 from Rotten Grapes. *J. Chem. Pharm. Res.*, 8(7): 357-367.

Bicca, F. C., Fleck, L. C., and Ayub, M. A. Z. 1999. Production of Biosurfactant by Hydrocarbon Degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*. 30(3):231– 236.

Bintoro, M.H. 1977. Periode Cukup Panen, Panen dan Periode Setelah PanenCoklat. *IPB-Press*. Bogor.

Bodour AA. 2004. Applied and environmental microbiology.;70:114. [PMC free article] [*PubMed*] [*Google Scholar*].

Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), 273-280. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(98\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(98)00031-1).

Citra, S. 2021. *Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Lokal Air Laut Pelabuhan Panjang Menggunakan Sumber Karbon Minyak Bumi*. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung. Hal. 23-30.

Dachniar, H., 2012. Isolasi Bakteri Pendegradasi Minyak Solar Dari Perairan Teluk Pare-Pare. *Makasar: Jurnal Biologi UIN Alauddin Makassar*. Vol. 4, No. 1:41-46.

Darne G. Almeida., Rita de Cássia F. Soares da Silva., Juliana M. Luna., Raquel D. Rufino, Valdemir A. Santos ., and Leonie A. Sarubbo. 2017. Response Surface Methodology for Optimizing the Production of Biosurfactant by *Canadia tropicalis* on Industrial Waste Substrate. *Frontiers in Microbiology*. 8(157):1-13.

Darwesh, O. M., Mahmoud, M. S., Barakat, K. M., Abuellil, A., and Ahmad, M. E. 2021. Improving the Bioremediation Technology of Contaminated Wastewater Using Biosurfactants Produced by Novel *Bacillus* Isolates. *Heliyon*. Vol.7 (12): 2-12.

Da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., and Robl, D. 2021. Fungal Biosurfactants, from Nature to Biotechnological Product: Bioprospection, Production and Potential Applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 44(10).

- Desai J.D. and Desai A.J. 1993. Production of Biosurfactant. In :Biosurfactant : Production, Properties, Application. Kosaric (ed). Marcel Dekker Inc. New York.
- Desai, J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and Molecular Reviews*. 61(01): 47-64.
- Dwidjoseputro. (1998). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djambatan.
- Dwipayana. A., 2005. Identification of Bacterial Diversity in Waste Recycling Paint Sludge by Conventional Microbiological Technique. *Environmental Engineering Study Program*. Bandung: ANDI OFFSET.
- Elazzazy, A. M., Abdelmoneim, T. S., and Almaghrabi, O. A. 2015. Isolation and Characterization of Biosurfactant Production Under Extreme Environmental Conditions by Alkali-Halo-Thermophilic Bacteria from Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 22 (4): 466-475.
- Francy, D.S, J.M .Thomas, R.L. Raymond and C.H. Ward, 2007. Emulsification of Hydrocarbons by Surface Bacteria. *J ind Microbiol* 8: 234–246.
- Gautam, K. K. and Tyagi, V.K. 2006. Microbial Surfactant: A Review. *J. Oleo Sci*. 55 (4): 155-166.
- Francy D S, Thomas JM, Raymond R L, Ward CH. 1991. Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. *J Industrial Microbiol*, 8: 237-46.
- Fransiska, L. 2019. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Lipolitik Pada Proses Pengomposan Limbah Domestik*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Uuniversitas Lampung.
- Fukuoka, S., M. Tojo, H. Hachiya, M. Aminaka, and K. Hasegawa. 2007. Green and sustainable chemistry in practice: Development and industrialization of a novel process for polycarbonate production from CO₂ without using phosgene. *Polymer Journal*. 39:91. doi: 10.1295/polymj.PJ2006140.
- Gandjar, I., Sjamsuridzal, W. (2006). *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- George, S., and Jayachandran, K. 2009. Analysis of Rhamnolipid Biosurfactants Produced Through Submerged Fermentation Using Orange Fruit Peelings

- as Sole Carbon Source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 158 (3): 694-705.
- Ghazali, R. dan Ahmad, S. (1997). Biosurfactants-A Review. *Elaeis Journal*, 9(1), 34-54.
- Gosalam, S., Tahir, A., dan Silviana, J. L. 2008. Uji Kemampuan Bakteri dari Perairan dalam Mendegradasi Senyawa Minyak Solar. *J. Torani*. Vol. 18 (2): 171-178.
- Himeoka, Y. and Kaneko, K. 2016. Theory for Transition Between Log and Stationary Phases: Universal Laws for Lag Time. *J. Biol Phys*. 1-17.
- H.S. El-Sheshtawy, M.M. Doheim. 2014. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. *Egyptian Journal of Petroleum* (2014) 23, 1–6.
www.elsevier.com/locate/egyjp www.sciencedirect.com.
- Husna Q.N., Nurhasanah, dan Laila A. 2022. Skrining Bakteri Isolat Lokal Sebagai Penghasil Lipase Toleran pelarut Organik. *Prosiding*. 160-167.
- Ikhwani, Azra Zahrah Nadhirah Hasan, Akhmad Endang Zainal Yani, Mohamad. 2017. *Optimasi Produksi Biosurfaktan dari Pseudomonas aeruginosa dengan Perbedaan pH Media dan Sumber Karbon Minyak Mentah*. Tesis. Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam. IPB University.
- I Nengah Sujaya. 2014. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Denpasar. Universitas Udayana. Bali.
- Iriawan, N. dan Astuti, S.P., (2006), *Mengolah data statistik dengan mudah menggunakan Minitab* 14, Penerbit ANDI Yogyakarta.
- Kamallia S, Hasbi M, Budijono. 2021. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Biosurfaktan Asal Limbah Cair Tahu UD, Dika Putra, Provinsi Riau. *Jurnal Ilmu Perairan*. 9(1): 16-22.
- Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L, Kokare C. 2012. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* B4. *Desalination*. 285:198–204.
- Kim S. J, D. H. Choi, D. S Sim and Y. S. Oh, 2005, Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *ChemoSphere*. 59: 845-852.

- Kiran G.S., Priyadharsini S, Sajayan A, Priyadharsini G.B., Poulouse N. and Selvin J. 2017 Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia sp.* and Its Application in Food Industry. *Front. Microbiol.* Vol.8:1138.
- Kowall M., Vater J., Kluge B., Stein T., Franke P., Ziessow D. 1998. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* okb 105. *J. Colloid Interface Sci.* 204:1–8. doi: 10.1006/jcis.1998.5558. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
- Kubicki S, Bollinger A, Katzke N, Jaeger KE, Loeschke A, Thies S. 2019. Marine biosurfactants: biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. *Marine Drugs*.17 (7):1–30.
- Kurniati TH, Rahayu S, Sukmawati D, Maharani W. Screening of biosurfactant producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Physics: Conference Series*. 2019;1402(5):1–6.
- Leahy, J. G and R. R. Colwel. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbial Reviews* 54 (3): 305-315.
- Liu, X.Y.; Yang, S.Z.; Mu, B.Z. 2009. Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochem.* 2009, 44, 1144–1151. [Google Scholar] [CrossRef].
- Lopez A.Z, 1986. *Chemical Change Occurring During the Processing of Cacao, Proceeding of the Cacao Biotechnology symposium. Department of Food Science Colege of Agriculuture, The Pennsylvania State University. Pennsylvania. USA.*
- Mahalingam PU, Sampath N. Isolation, characterization and identification of bacterial biosurfactant. *European Journal of Experimental Biology*. 2014;4(6):59–64.
- Mardiah I, Fatimah I, Hamdani S dan Asni Setiani N. 2022. Pemanfaatan Minyak Goreng Limbah Untuk Optimalisasi Produksi Biosurfaktan dari Bakteri *Brevundimonas terraе*. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada: Jurnal Ilmu Ilmu Keperawatan, Analis Kesehatan dan Farmasi*. Vol. 22 (1): 29-36.

- Martienssen, M., O. Reichel,., and M. Scheimer,. 2003. Use of surfactants to improve the biological degradability of petroleum hydrocarbons. *Chemie Ingenieur Teck.* 75 (11): 1749-1755.
- Mnif, 1., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., and Ghribi, D. 2016. Purification and Identification of *Bacillus subtilis* SPB1 Lipopeptide Biosurfactant Exhibiting Antifungal Activity Against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. Environmental Science and Pollution Research, *Peptide Science.* Vol. 23 (7): 1-10.
- Morikawa, M., Hirata, Y., and Imanaka, T. 2000. A Study on the Structure-Function Relationship of Lipopeptide Biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids.* 1488 (3): 211–18.
- Mulligan, C.N. (2005) Environmental Applications for Biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>.
- Monica, P., 2015. Isolasi Bakteri Pendegradasi Limbah Cair Industri Minyak Sawit. Padang: *Jurnal Biologi Universitas Andalas.* Vol. 4, No. 1:71-76.
- Montgomery, DC, (2001), *Desain dan Analisis Eksperimen*, edisi ke-5 , John Wiley & Sons, Inc.Baru York.
- Mouafi, F.E.; Abo, E.M.M.; Moharam, M.E. 2016, Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnol. Rep.* 9, 31–37. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
- Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging.* 2006;1(4):327-48. doi: 10.2147/ciia.2006.1.4.327. PMID: 18046911; PMCID: PMC2699641.
- Nitschke, M., and Pastore, G. 2006. Production and Properties of A Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown On Cassava Wastewater. *Bioresource Technology*, Vol. 97: 336-341.
- Ni'matuzahroh, Alami, N.H., Khudlari, A.F.T., Fatimah, dan Nurhariyati, T. 2010. Studi Kinetika Produksi Biosurfaktan *Bacillus subtilis* 3KP Pada Substrat Molase. Berk. *Penel. Hayati:* 16 (33–38).

- Pavan, M. V., and Andrew, R. B. 2021. *IR Spectroscopy: Chemistry LibreTexts*. Hal. 177-178. Rice University. Texas. Hal: 371-380.
- Pereira, J. F. B., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A. P., and Rodrigues, L. R. 2013. Optimization and Characterization of Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Isolates Towards Microbial Enhanced Oil Recovery Applications. *Fuel*. Vol. 111:259-68.
- Praadina, S.A. 2023. *Peningkatan Produksi Biosurfaktan Lipopeptida dari Bakteri Bacillus cereus ALP E1 Menggunakan Substrat Limbah Cair Minyak Kelapa Sawit*. Skripsi. Universitas Lampung.
- Peele KA, Ch VRT, Kodali VP. Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium. *3 Biotech*. 2016;6(2):2–7.
- Pelczar, Michael. (2005). *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Purwoko, Tjahjadi. (2007). *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Rahmawati, F. 2002. *Pedoman Perkuliahan Kimia Koloid dan Permukaan*. Universitas Sebelas Maret. Solo.
- Rahmanto, M., I. (2011). Identifikasi dan Pemanfaatan Limbah Pertanian di Kabupaten Bekasi. *CEFARS : Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*. Vol. 2 No. 2 Juni 2011.
- Rath K, Singh AB, Chandan S, Vatsala RS. Isolation and characterization of a biosurfactant producing strain *Pseudomonas aeruginosa* SMVIT 1 from oil contaminated soil. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2016;75 (11): 681.
- Rau, V.J.P., De Cola, M.S. 2005. Fanselow Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder *Neurosci. Biobehav Rev.*, 29 (2005), pp. 1207-1223.
- Riyanto, C. L. R., Sumardi, S., Farisi, S., Ekowati, C. N., dan Arifiyanto, A. 2021. Aktivitas Biosurfaktan *Serratia Marcescens* strain MBC1 dalam Mengemulsikan Solar dengan Variasi pH dan Media. *Jurnal Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, Vol. 8 (3): 114-122.
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Van De Mei, H.C., & Oliveira, R. (2006c). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant

produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 78–85. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.03.003.

- Roongsawang, N., Washio, K. Morikawa, M. 2011. Review : Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactant. *International Journal of Molecular Sciences*. 12: 141-172.
- Safitriani, Thontowi A, Yetti E, Suryani, Yopi. Pertumbuhan Optimal Bakteri Laut *Pseudomonas aeruginosa* LBF-1-0132 dalam Senyawa Piren. *Jurnal Biologi Indonesia*. 2017;13(1):107–16.
- Sagge A, Culurciello R, Casillo A, Corsaro MM, Ricca E, Baccigalupi L. A marine isolate of *Bacillus pumilus* secretes a pumilacidin active against *Staphylococcus aureus*. *Marine Drugs*. 2018;16(6):1–13.
- Sanchez-Sanchez, J., Ramirez-Campillo, R., Carretero, M., Martín, V., Hernández, D., & Nakamura, F. Y. (2018). Soccer small-sided games activities vary according to the interval regime and their order of presentation within the session. *Journal of Human Kinetics*, 62, 167–175. <https://doi.org/10.1515/hukin-2017-0168>.
- Schmidt V, Grazielly Maria Didier de Vasconcelos, Renata Vicentel, Jackelyne de Souza Carvalh, Isabela Karina Della-Floral, Lucas Degang, Débora de Oliveira and Cristiano José de Andrade. 2023. Cassava wastewater valorization for the production of biosurfactants: surfactin, rhamnolipids, and mannosileritritol lipids. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 39:65.
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Shahandashti, R. V., Feizabadi, M. M., and Teimourian, S. 2015. The Inhibitory Effect of a *Lactobacillus acidophilus* Derived Biosurfactant on Biofilm Producer *Serratia marcescens*. *Iran J Basic Med Sci*. 18:1001-1007.
- Sena, H. H., Sanches, M. A., Rocha, D. F. S., Segundo, W. O. P. F., de Souza, É. S., and de Souza, J. V. B. 2018. Production of Biosurfactants by Soil Fungi Isolated from the Amazon Forest. *International Journal of Microbiology*, Vol. 2018: 1-8.
- Silva, N.M.P., Rocha, E., Rufino R. D., Luna J. M., Santos V.A. 2013. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactante production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1, 1-8.

- Silva, V. L.; Rogerio, M. C. P.; Bomfim, M. A. D.; Leite, E. R.; Landim, A. V.; Alves, A. A.; Costa, H. H. A.; Freire, A. P. A., 2013. Intake and digestibility of dietary nutrients in lambs of different genetic groups fed with cashew nut meal. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, 14 (4): 695-709.
- Siregar, T. H. S., Slamet R., dan Laeli N., 2010. *Budidaya Cokelat*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sumathi R, Yogananth N. 2016. Isolation and identification of biosurfactant producing *Pseudomonas aeruginosa* from marine sediment samples and its antimicrobial properties. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. 3 (12): 200–12.
- Sunanto, Hatta. 1992. *Budidaya Cokelat, Pengolahan Hasil, dan Aspek Ekonominya*. Kanisius:Yogyakarta.
- Sunarto. 2004. *Peranan Dekomposisi Produksi Pada Ekosistem*. <http://rudyc.com/topcities.com/paps/702-71034/sunarto.html>. [20 Maret 2007].
- Tahzibi, A., Kamal, F., and Mazaheri Assadi, M. 2004. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. *Iranian Biomedical Journal*. Vol. 8 (1): 25-31.
- Takahashi M, Saga N, Mikami K (2010) Photosynthesis-dependent extracellular Ca²⁺ influx triggers an asexual reproductive cycle in the marine red macroalga *Porphyra yezoensis*. *Am J Plant Sci*. 1: 1-11.
- Verschuuren, G. (2014). *Excel 2013 for Scientists*. Chicago (US).Holy Macro Books.
- White DA, Hird LC, Ali ST. Production and characterization of a Trehalolipid biosurfactant produced by the novel marine bacterium *Rhodococcus sp.*, strain PML026. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;115(3):744–55.
- Widyotomo, S., dan S. Mulato. 2008. *Teknologi Fermentasi dan Diversifikasi Pulpa Kakao menjadi Produk yang Bermutu dan Bernilai Tambah*. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Jember.
- Wijaya, M. 2020, *Kakao Fisiologi Tumbuhan & Biokimia Biji*. Badan Penerbit Universitas Negeri Makassar. Makassar.

- Wijayati N, Astutiningsih C, Mulyati S. 2014. Transformasi α -Piena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika*. 6(1): 25-28.
- Willumsen, P. A., and Karlson, U. 2008. Screening of Bacteria Isolated From PAH Contaminated Soils for Production of Biosurfactant and Bioemulsifiers. *Journal of Biodegradation*. Vol. 7: 415-423.
- Yaraguppi, D.A., Bagewadi, Z.K., Muddapur, U.M. 2020. Response surface methodology-based optimization of biosurfactant production from isolated *Bacillus aryabhatai* strain ZDY2. *J Petrol Explor Prod Technol* 10, 2483–2498 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13202-020-00866-9>.
- Yoga Nugraha; Misri Gozan, supervisor; Anondho Wijanarko, examiner; Heri Hermansyah, examiner; Nelson Saksono, examiner (Fakultas Teknik Universitas Indonesia. 2015. *Optimasi produksi biosurfaktan dari limbah biodiesel menggunakan response surface methodology (RSM)*. Tesis. Universitas Indonesia.
- Yudono B , Ulfariani S, Fatma F, Parwiyanti dan Lidiasari E. 2022. POME Processing with Bioremediation Using Indigenous Bacteria (*Bacillus toyonensis* and *Stenotrophomonas rhizophila*), and Bioremediation Assisted with Electrocoagulation Methods. *Indones. J. Fundam. Appl. Chem.*, 7(3): 122-135.
- Yusnidar, M. 2021. *Produksi dan Karakterisasi Biosurfaktan dari Bakteri Indigen ALP E1 Asal Air Laut Pelabuhan Panjang Serta Uji Antibakteri dan Antijamur*. Skripsi. Universitas Lampung. Lampung. Hal: 31-36.