

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI
LOKAL *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN LIMBAH KULIT ARI
BIJI KAKAO MELALUI PENDEKATAN *Response Surface Methodology***

(Skripsi)

Oleh

ALIF ZIDANE NUGRAHA

NPM 2117011001



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI LOKAL *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN LIMBAH KULIT ARI BIJI KAKAO MELALUI PENDEKATAN *Response Surface Methodology*

Oleh

ALIF ZIDANE NUGRAHA

Lipase adalah enzim hidrolase yang menguraikan trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas, dengan aplikasi luas di industri pangan, deterjen, kosmetik, dan pengolahan limbah. Limbah kulit ari biji kakao mengandung serat, protein, lemak, dan polifenol sebagai nutrisi mikroba sehingga dapat digunakan sebagai media bagi bakteri dalam memproduksi lipase. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari penggunaan limbah kulit ari biji kakao sebagai media pertumbuhan dan menentukan kondisi optimum produksi enzim lipase dari isolat *Bacillus cereus* ALP E1 melalui pendekatan RSM.

Penelitian dilakukan dengan tahap peremajaan isolat pada media *Nutrient Agar*, dan penentuan kurva aktivitas lipolitik pada variasi waktu produksi serta konsentrasi inokulum dan optimasi produksi enzim lipase pada variasi pH, konsentrasi limbah dan kecepatan agitasi menggunakan RSM. Aktivitas lipase diuji menggunakan *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) dengan spektrofotometer UV-Vis 410 nm, sedangkan kadar protein ditentukan dengan metode *Lowry*. Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan rancangan *Central Composite Design* (CCD) pada perangkat lunak *Design Expert 13*.

Hasil menunjukkan bahwa pada waktu optimum *Bacillus cereus* ALP E1 memproduksi enzim lipase pada jam ke 48, konsentrasi inokulum 5%, kemudian melalui pendekatan RSM diperoleh kondisi produksi lipase pada pH 8, konsentrasi limbah 1%, dan kecepatan agitasi 100 rpm dengan persamaan polinomial yaitu $Y = 31,06 + 9,38A - 8,42B - 9,30C$. Produksi enzim pada kondisi optimum diperoleh aktivitas lipase 58,3373 U/mL dengan kadar protein 1,0264 mg/mL dan aktivitas spesifik 56,8382 U/mg. Hasil ini menunjukkan bahwa limbah kulit ari biji kakao berpotensi sebagai alternatif media pertumbuhan bagi *Bacillus cereus* ALP E1 dalam produksi enzim lipase.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, limbah kulit ari biji kakao, industri, lipase, RSM

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF LIPASE ENZYME PRODUCTION FROM LOCAL *Bacillus cereus* ALP E1 ISOLATE USING COCOA BEAN SHELL WASTE THROUGH *Response Surface Methodology*

By

ALIF ZIDANE NUGRAHA

Lipase is a hydrolase enzyme that catalyzes the breakdown of triglycerides into glycerol and free fatty acids, with wide applications in the food, detergent, cosmetic, and wastewater treatment industries. Cocoa bean shell waste contains fiber, protein, lipids, and polyphenols that serve as nutrients for microbial growth, making it a potential alternative substrate for bacterial lipase production. This research aimed to evaluate the use of cocoa bean shell waste as a growth medium and to determine the optimum conditions for lipase production by the *Bacillus cereus* ALP E1 isolate using a Response Surface Methodology (RSM) approach.

The study was conducted through several stages, including rejuvenation of the bacterial isolate on Nutrient Agar, determination of the lipolytic activity curve at various production times and inoculum concentrations, followed by optimization of enzyme production under varying pH levels, substrate concentrations, and agitation speeds using RSM. Lipase activity was measured using *p*-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as a substrate and analyzed with a UV–Vis spectrophotometer at 410 nm, while protein content was determined using the Lowry method. The obtained data were analyzed using the Central Composite Design (CCD) approach in Design Expert 13 software.

The results indicated that the optimum production time for lipase by *Bacillus cereus* ALP E1 was at 48 hours with a 5% inoculum concentration. The RSM analysis further revealed that the optimal conditions for lipase production were pH 8, 1% substrate concentration, and 100 rpm agitation speed, with a polynomial regression equation of $Y = 31.06 + 9.38A - 8.42B - 9.30C$. Under these optimized conditions, lipase production yielded an activity of 58.3373 U/mL with a protein concentration of 1.0264 mg/mL and a specific activity of 56.8382 U/mg. These findings demonstrate that cocoa bean shell waste has strong potential as an alternative growth medium for *Bacillus cereus* ALP E1 in lipase enzyme production.

Keywords: *Bacillus cereus*, cocoa bean shell waste, industry, lipase, RSM

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI
LOKAL *Bacillus cereus* ALP E1 MENGGUNAKAN LIMBAH KULIT ARI
BIJI KAKAO MELALUI PENDEKATAN *Response Surface Methodology***

Oleh

ALIF ZIDANE NUGRAHA

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
BANDAR LAMPUNG**

2026

Judul Penelitian : OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI
ISOLAT BAKTERI LOKAL *Bacillus cereus* ALP
E1 MENGGUNAKAN LIMBAH KULIT ARI
BIJI KAKAO MELALUI PENDEKATAN
Response Surface Methodology

Nama Mahasiswa : **Alif Zidane Nugraha**


Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011001

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYUTUJUI

1. Komisi Pembimbing



Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.
NIP. 197412111998022001



Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih M.Si.
NIP. 197707132009122002

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila



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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : **Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**



Anggota : **Dr. Dian Herasari, M.Si.**




2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Penegtahan Alam



Dr. Eng Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 13 Januari 2026

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alif Zidane Nugraha
Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011001
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Optimasi Produksi Enzim Lipase Dari Isolat Bakteri Lokal *Bacillus cereus* ALP E1 Menggunakan Limbah Kulit Ari Biji Kakao Melalui Pendekatan *Response Surface Methodology*”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruhnya data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 13 Januari 2026

at Pernyataan,



Alif Zidane Nugraha
NPM 2117011001

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Alif Zidane Nugraha, lahir pada tanggal 31 Januari 2003 di Bandar Lampung. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Bapak Trans Kasiono dan Ibu Susy Apriyanti. Penulis menyelesaikan pendidikan di TK pada tahun 2009 dan dilanjutkan pendidikan dasar di SDN 1 Tanjung Gading hingga tahun 2015. Pada tahun yang sama, penulis melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Bandar Lampung hingga lulus pada tahun 2018. Kemudian penulis melanjutkan pendidikan di SMAN 1 Bandar Lampung dan lulus pada tahun 2021. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama masa perkuliahan, penulis aktif dalam berbagai organisasi, diantaranya sebagai kader muda dan anggota inti Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada tahun 2021 dan 2022. Pada tahun 2022, penulis menjabat sebagai anggota bidang Sains Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) HIMAKI. Penulis juga aktif dalam Unit Kegiatan Mahasiswa Fakultas (UKMF) menjabat sebagai anggota bidang (Akset) di Rohani Islam (Rois) pada tahun 2023. Penulis dikenal aktif dan bertanggung jawab dalam setiap kegiatan organisasi yang diikuti, serta tetap menunjukkan komitmen tinggi dalam bidang akademik. Penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) Membangun Desa di Desa Rejomulyo, Lampung Selatan pada tahun 2023. Setelah mengikuti program MBKM Membangun Desa, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Balai Veteriner Lampung, Laboratorium Parasitologi dari bulan Juli hingga

Agustus 2024. Selain itu, penulis juga pernah menjadi Asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa angkatan 2024 di Jurusan Kimia.

Penulis menyelesaikan penelitian di Laboratorium Biokimia dengan judul "*Optimasi Produksi Enzim Lipase Dari Isolat Bakteri Lokal Bacillus cereus ALP E1 Menggunakan Limbah Kulit Ari Biji Kakao Melalui Pendekatan Response Surface Methodology*" pada tahun 2026.

MOTTO

*“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.
Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.”
(QS. Al-Insyirah: 5-6)*

*“Wahai orang-orang yang beriman, mohonlah pertolongan (kepada
Allah) dengan sabar dan salat.
Sesungguhnya Allah bersama orang-orang yang sabar.”
(QS. Al-Baqarah: 153)*

*“Dan tidak ada keberhasilanku melainkan dengan pertolongan Allah.
Kepada-Nya aku bertawakal dan kepada-Nya aku kembali.”
(QS. Hud: 88)*

*“Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat kepada orang-orang yang
berbuat baik.”
(QS. Al-A'raf: 56)*

*“Dalam setiap proses selalu ada pelajaran yang tidak tertulis. Melalui
kesabaran, ketekunan, dan doa yang terus dipanjatkan, perjalanan ini
dijalani perlahan namun penuh keyakinan, hingga akhirnya menjadi
bagian dari pembelajaran dan kedewasaan diri.”
(Alif Zidane Nugraha)*



Segala puji bagi Allah SWT atas limpahan rahmat, kasih sayang, dan hidayah-Nya yang tiada henti, sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan di jenjang perguruan tinggi ini. Dengan penuh rasa syukur dan cinta, penulis mempersembahkan karya ini kepada:

Kedua Orang Tua Tercinta,
Ayahanda Trans Kasiono dan Ibunda Susy Apriyanti yang telah membimbingku dari kecil hingga menyelesaikan studi sarjana ini dan telah menjadi cahaya dalam setiap langkah, mencintai tanpa syarat, serta mendoakan tanpa lelah.

Keluarga Tersayang,
Aurelia Citra Ramadhani yang selalu mendoakan dan memberiku semangat.

Pembimbing Penelitianku, Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. dan Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. yang selalu sabar dalam membimbingku.

Bapak/Ibu Dosen Jurusan Kimia, yang telah membimbing, memberi ilmu, dan motivasi kepada penulis selama menjalankan studi ini.

Para sahabat dan semua orang yang hadir dalam perjalanan ini, yang telah menemani dalam suka dan duka, serta memberi kehangatan di saat sedih.

Almamater Tercinta

Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillahilabbil'alamin, Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Optimasi Produksi Enzim Lipase Dari Isolat Bakteri Lokal *Bacillus cereus* ALP E1 Menggunakan Limbah Kulit Ari Biji Kakao Melalui Pendekatan *Response Surface Methodology*”**. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada baginda Rasulullah Nabi Muhammad SAW, beserta keluarga dan para sahabat serta umatnya di akhir zaman. Semoga di yaumul akhir kelak mendapatkan syafa'atnya. *Aamiin*

Penulis menyadari laporan ini dapat tersusun dan diselesaikan dengan adanya bantuan, motivasi, dan doa dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua.
2. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku Pembimbing I sekaligus orang tua kedua bagi penulis atas segala bimbingan, nasehat, serta saran yang telah diberikan hingga selesainya penelitian ini.
3. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan masukan dan saran selama penulis mengerjakan penelitian ini.
4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku dosen pembahas I yang telah memberikan kritik dan saran.
5. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku dosen pembahas II yang telah bersedia menggantikan dosen pembahas I untuk memberikan kritik dan saran kepada penulis.

6. Ibu Devi Nur Anisa, S.Pd., M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik atas segala saran yang telah diberikan.
7. Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung beserta jajaran lainnya.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan FMIPA Unila beserta jajaran FMIPA lainnya.
9. Bapak Trans Kasiono dan Ibu Susy Apriyanti selaku kedua orang tua atas kasih sayang yang telah diberikan selama ini serta segala doa nasihat, motivasi dan dukungan finansial, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT membalas atas segala yang telah diberikan dengan Jannah-Nya, Aamiin.
10. Bapak Paiman S. dan Ibu Nurjanah, H.S. selaku kakek dan nenek penulis, terima kasih atas kasih sayang, doa, dan ketulusan yang tak pernah putus. Nasihat dan kesabaran Kakek dan Nenek menjadi bekal berharga dalam setiap langkah hidup saya. Semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan, umur panjang, dan keberkahan.
11. Adikku tersayang Aurelia Citra Ramadhani yang selalu hadir dalam setiap fase perjalananku. Terima kasih atas kebersamaan, semangat, serta waktu yang telah diberikan selama proses ini. Terima kasih atas pengalaman hidup untuk menjadi adik penulis yang penuh dengan cerita baik maupun buruk. Terima kasih telah hadir dengan penuh kasih sayang.
12. Sahabat terbaik Alvito Leonardi yang selalu hadir disaat penulis sedang penuh keluh kesah. Terima kasih atas segala perhatian dan bantuan yang telah diberikan selama ini. Terima kasih pula karena selalu bersedia menjadi pendengar yang baik, tempat berbagi cerita dan keluh kesah, serta senantiasa memberikan nasihat dan dukungan yang tulus.
13. Sayyid Ammanullah Gani dan Titis Okti yang senantiasa membantu dan membersamai penulis selama penulis menyelesaikan studinya.
14. Mba Virginia dan Mba Nindy Novita Sari penulis sampaikan terimakasih telah memberikan ilmu dan pengalaman kepada penulis serta selalu menjadi tempat mengeluh dan memberikan semangat kepada penulis hingga penulis menyelesaikan studinya.

15. Tim Nurhasanah *Research* 2021 Rani Rasmani, Niluh Indrya, Adelia Renta M.T, Debora Luciana, dan Siti Nurkholisoh yang selalu membersamai penelitian penulis hingga akhir dan menjadi saksi perjalanan penelitian penulis.
16. M. Diqa Anugrah P., Arkananta F. A., dan M. Qaessar K. yang telah menjadi sahabat sejati semenjak SMP bagi penulis. Terima kasih atas waktu untuk mendengarkan semua keluh kesah dan sebagai penghibur dengan penuh kehangatan walaupun terhalang jarak yang sangat jauh tetapi tetap menjadi sahabat terbaik sepanjang hidup.
17. Teman-teman Brenandi Wira Yudha, Aldora Ghifari, M. Rizky Wijaya, Ryu Samudra, Naufal Defiryan, Ernisa Deshela S., Nanda Triani P., Anggraini Ratu F., dan Fathul Aini S. yang telah menemani penulis sejak SMA hingga akhir masa studi.
18. Teman-teman Raisa Farah F., Alfindo Y. M., Felisia, Namira Azzahra, Lathifah, dan Jade Feilicia yang telah menjadi *partner game* bagi penulis untuk menghibur, memberikan kesenangan dan kebahagiaan saat sedang lelah.
19. Teman-teman MBKM Desa Rejomulyo dan Keluarga Bapak Hartono yang telah memberikan penulis pengalaman dan kenangan yang berharga.
20. Sahabat seperjuangan di Jurusan Kimia Adryan Daffa Dzulfikar, Aditya Anugrah Sahyani, Harry Firmanda, A. Whisnu Sakti A. G., dan Ramandhika Abi Karami yang telah menemani penulis hingga akhir studi.
21. Teman-teman Rois FMIPA 2023. Terima kasih karena telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menjadi bagian dari kalian dan memberikan kesan menyenangkan.
22. Teman-teman seperjuangan Kimia angkatan 2021 khususnya anggota kelas B. Terima kasih telah memberikan kesempatan bagi penulis untuk menjadi bagian dari kalian semua.
23. Teman-teman Himaki 2022 khususnya bidang Sains Penalaran Ilmu Kimia yang telah banyak memberikan penulis pengalaman dan pelajaran baru yang berharga.
24. Rekan-rekan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan bantuan dan saran kepada penulis.

25. Almamaterku tercinta serta semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas segala bantuan dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dan menyelesaikan studi sebagai mahasiswa S1 Kimia.
26. *Last but not least, I just wanna say thank to me*, Terima kasih telah bertahan dan hidup hingga saat ini. Ingat perjalanan mu masih panjang, *So lets start a new journey*.

Demikian yang dapat penulis sampaikan, penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini belum sempurna dan masih terdapat kekurangan serta kesalahan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar karya ini dapat diperbaiki dan dikembangkan lebih baik. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi penulis maupun bagi pembaca.

Bandar Lampung, 13 Januari
2026
Penulis

Alif Zidane Nugraha

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Kakao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	5
2.1.1. Sejarah Kakao	5
2.1.2. Klasifikasi Kakao	6
2.1.3. Manfaat Kakao	7
2.1.4. Limbah Kulit Ari Biji Kakao.....	7
2.2. Enzim Lipase.....	9
2.2.1. Jenis-jenis Enzim Lipase	9
2.3. Bakteri <i>Bacillus cereus</i>	10
2.4. Metode RSM	12
2.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase	13
2.6. Uji Protein Enzim.....	14

III. METODE PENELITIAN	16
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2. Alat dan Bahan	16
3.3 Prosedur	17
3.3.1 Tahap Persiapan.....	17
3.3.1.1. Pembuatan Media Padat.....	17
3.3.1.2. Pembuatan Media Cair.....	17
3.3.1.3. Preparasi Kulit Ari Biji Kakao	18
3.3.1.4. Peremajaan isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	18
3.3.1.5. Pembuatan Media Inokulum.....	18
3.3.1.6. Pembuatan Media Produksi	18
3.3.2. Penentuan Kurva Aktivitas Lipolitik Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 pada Media Produksi Lipase	19
3.3.3. Kondisi Optimum Produksi Enzim Lipase dengan Metode <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	19
3.3.4. Produksi Enzim.....	20
3.3.5. Pengujian Enzim Lipase	20
3.3.5.1. Uji Aktivitas Enzim Lipase.....	20
3.3.5.2. Uji Kadar Protein Enzim Lipase	21
3.3.6. Diagram Alir.....	22
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1. Isolat Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	23
4.2. Aktivitas Lipolitik Optimum Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	25
4.2.1. Kondisi Optimum Produksi Enzim Lipase dengan Metode <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	27
4.2.1.1. Analisis Statistik	28
4.2.1.2. Interaksi Kondisi Optimasi dengan Hasil Aktivitas Enzim	32
4.2.1.3. Penentuan Kondisi Optimum dan Verifikasi Model	36
4.3. Produksi Enzim Lipase	38

V. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1. Kesimpulan	40
5.2. Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	41
LAMPIRAN.....	46

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rentang dan tingkatan parameter optimasi enzim lipase dari bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	19
2. Hasil uji aktivitas enzim lipase	27
3. Hasil analisis varians.....	29
4. Kriteria optimasi produksi enzim lipase	37
5. Hasil solusi optimasi produksi enzim lipase	37
6. Hasil verifikasi model	38
7. Hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol pada pembuatan kurva standar p-nitrofenol	50
8. Hasil pengukuran absorbansi pada pembuatan kurva standar BSA.....	52
9. Hasil Pengukuran aktivitas unit lipase tanpa limbah kulit ari biji kakao	55
10. Hasil pengukuran aktivitas unit lipase konsentrasi inokulum 1%	55
11. Hasil pengukuran aktivitas unit lipase konsentrasi inokulum 3%.....	56
12. Hasil pengukuran aktivitas unit lipase konsentrasi inokulum 5%	56
13. Hasil uji aktivitas unit enzim lipase dengan RSM	58
14. Hasil produksi enzim.....	58

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Theobroma cacao</i> L.	6
2. Limbah kulit ari biji kakao	8
3. Bentuk <i>Bacillus cereus</i>	11
4. Diagram alir	22
5. Isolat Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	24
6. Hasil analisis mikroskop <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	24
7. Aktivitas enzim lipase pada variasi Waktu Produksi dan konsentrasi inokulum.	26
8. Plot distribusi normal residu	31
9. Plot perbandingan antara hasil percobaan dan prediksi	31
10. Plot residu vs percobaan	32
11. Plot (a) Kontur (b) 3D pengaruh interaksi pH dan konsentrasi substrat	34
12. Plot (a) Kontur (b) 3D pengaruh interaksi pH dan kecepatan agitasi	35
13. Plot (a) Kontur (b) 3D pengaruh interaksi konsentrasi substrat dan kecepatan agitasi	36
14. Kurva standar p-nitrofenol	50
15. Kurva standar BSA	52

16. Uji aktivitas unit enzim lipase.....	54
17. Uji protein enzim lipase	57

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao, L.*) dapat dikatakan sebagai salah satu komoditas yang sangat banyak dimanfaatkan dalam skala industri, salah satunya yaitu produksi makanan coklat. Selain pulp dan kulit buah kakao, biji kakao kering menghasilkan produk sampingan atau limbah yang tidak digunakan dengan baik. Selain itu, limbah kulit biji kakao dihasilkan dari proses pengolahan biji kakao kering menjadi produk coklat. Keping biji kakao ditutupi oleh kulit tipis, lembut, dan agak berlendir. Persentasenya berkisar antara 10% hingga 16% dari total bagian biji kakao kering (Fowler, 2009). Kulit biji kakao dipisahkan dari keping bijinya selama proses *winnowing* saat biji kakao diproses menjadi cokelat (Kayaputri *et al.*, 2014). Limbah kulit biji kakao dapat berupa kulit ari biji kakao atau disebut juga testa. Limbah kulit ari biji kakao memiliki kandungan gizi yang berupa serat kasar 25,10%, protein kasar 16,60%, kadar abu sekitar 6,64%, dan lemak sekitar 7,57% - 8,64% (Langkong *et al.*, 2019).

Penelitian terhadap penggunaan limbah-limbah agroindustri yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat pendukung untuk pertumbuhan mikroba dan menghasilkan enzim lipase banyak dilaporkan, diantaranya yaitu pemanfaatan bungkil biji jarak (Suwariani *et al.*, 2016), pemanfaatan limbah bungkil minyak kedelai dan bungkil minyak sawit (Szymczak *et al.*, 2021), dan pemanfaatan bekatul padi dalam produksi enzim lipase (Putri *et al.*, 2020).

Penelitian tersebut menghasilkan enzim lipase yang baik dan dapat memberi nilai jual dari limbah agroindustri. Dalam hal ini, limbah kulit ari biji kakao juga berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai substrat pendukung dalam produksi enzim lipase (Langkong *et al.*, 2019).

Enzim lipase adalah kelompok enzim hidrolase yang berfungsi menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak bebas. Enzim ini dapat dihasilkan dari beberapa organisme salah satunya yaitu bakteri (Simamora dan Sukmawati, 2020). Bakteri yang dapat menghasilkan enzim diantaranya yaitu bakteri *Bacillus subtilis* (El-Naga *et al.*, 2025) dan *Bacillus cereus* (Demirkan *et al.*, 2021). Enzim memiliki fungsi untuk mereduksi energi aktivasi, yaitu energi yang dibutuhkan untuk mencapai keadaan transisi atau bentuk tingkatan energi tertinggi (Putri *et al.*, 2024). Penerapan enzim lipase dalam bidang industri tergolong sangat luas, dikarenakan aplikasi industri yang potensial (Simamora dan Sukmawati, 2020) seperti bidang industri pangan, bahan aditif deterjen, pengolahan limbah air, serta industri kosmetik (Marliani *et al.*, 2023).

Untuk memproduksi enzim dari suatu sumber, dibutuhkan parameter kondisi optimal seperti suhu, pH, konsentrasi, waktu produksi dan kecepatan agitasi untuk mendapatkan aktivitas enzim yang tertinggi (Putra *et al.*, 2021). Penentuan parameter optimasi dapat dilakukan dengan pendekatan konvensional. Optimasi dengan pendekatan konvensional dapat memakan waktu hingga beberapa minggu dengan satu parameter pada satu waktu, sehingga metode ini tidak efektif (Onyeogaziri and Papaneophytou, 2019). Saat ini, digunakan salah satu metode yang populer di kalangan para peneliti yaitu metode *Response Surface Methodology* (RSM). Metode RSM adalah pendekatan yang digunakan untuk mengoptimalkan proses dengan cara memodelkan data eksperimen menggunakan persamaan kuadrat orde kedua untuk respons.

Metode ini dapat menemukan nilai maksimum atau minimum dalam area faktor kunci yang telah diidentifikasi. Keunggulan dari metode ini adalah dapat mengevaluasi efek dan signifikansi variabel eksperimen secara lebih cepat dibandingkan dengan pendekatan tradisional seperti metode satu faktor pada satu waktu (Onyeogaziri and Papaneophytou, 2019).

Beberapa penelitian dalam optimasi produksi enzim lipase menggunakan pendekatan RSM telah dilaporkan, diantaranya yaitu penelitian yang dilakukan oleh (Jia *et al.*, 2015) yang mengidentifikasi faktor-faktor yang paling berpengaruh terhadap produksi lipase, yaitu sumber karbon sekunder (tepung jagung), sumber nitrogen (tepung kedelai), dan lipid (minyak kedelai) menggunakan pendekatan RSM. Hasil yang diperoleh yaitu kondisi optimum dari 3 parameter yaitu, sumber karbon sekunder (10,5 g/L tepung jagung), sumber nitrogen (35,4 g/L tepung kedelai), dan lipid (10,9 g/L minyak kedelai) dan kondisi optimum tersebut digunakan dalam produksi enzim lipase. Aktivitas enzim lipase diperoleh sebesar 2,171 U/mL. Hasil tersebut meningkat sebesar 16.4% dibandingkan dengan hasil tanpa optimasi (Jia *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Azizah (2024) yang menentukan optimasi produksi enzim lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 dengan menggunakan POME melalui pendekatan RSM terhadap faktor pH, konsentrasi inokulum, dan kecepatan agitasi. Hasil yang diperoleh didapatkan kondisi optimum yaitu pH 7, konsentrasi inokulum 1%, dan kecepatan agitasi 155 rpm dan diperoleh aktivitas enzim lipase sebesar 55,8072 U/mL (Azizah *et al.*, 2024).

Studi pendahuluan tentang bakteri yang akan digunakan yaitu isolat bakteri *Bacillus cereus* yang diisolasi dari air laut Pelabuhan Panjang, Lampung dan dimana telah terkontaminasi limbah minyak dari proses bongkar muat minyak oleh kapal tanker (Citra dan Nurhasanah, 2020). Bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 memiliki kemampuan menghasilkan enzim lipase pada pH 7 dan konsentrasi substrat minyak zaitun 8% (Rachmawati, 2021). Enzim lipase dari bakteri ini juga dapat diproduksi menggunakan limbah POME dari isolat ALP E1 melalui

pendekatan RSM (Azizah *et al.*, 2024). Namun, untuk penggunaan limbah agroindustri yang berbeda seperti limbah kulit ari biji kakao sejauh ini belum dilaporkan. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dalam memproduksi enzim lipase dengan menggunakan substrat limbah padat kulit ari biji kakao dalam proses optimasi dengan pendekatan RSM.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Menentukan waktu produksi dan konsentrasi inokulum *Bacillus cereus* ALP E1 dengan menggunakan limbah kulit ari biji kakao dalam menghasilkan enzim lipase
2. Mendapatkan kondisi optimum pH, konsentrasi limbah, dan kecepatan agitasi dari *Bacillus cereus* ALP E1 dalam menghasilkan enzim lipase melalui pendekatan *Response Surface Methodology* (RSM).
3. Mendapatkan aktivitas ekstrak kasar enzim lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 pada kondisi optimum produksi.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah sebagai sumber informasi ilmiah pemanfaatan limbah agroindustri berupa limbah padat kulit ari biji kakao sebagai substrat pertumbuhan mikroba dalam menghasilkan enzim lipase dan memberi nilai tambah pada limbah kulit ari biji kakao sebagai limbah agroindustri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Kakao (*Theobroma cacao* L.) adalah tanaman tahunan atau perennial berbentuk pohon yang dapat mencapai ketinggian hingga 10 meter. Untuk dibudidayakan, tanaman ini diharuskan memiliki cabang produktif yang banyak dan tinggi tidak lebih dari 5 meter. *Theobroma cacao* L. adalah nama latin kakao, yang berarti minuman para dewa. Nama ini berasal dari dua kata, *Theos*, yang berarti dewa, dan *Broma*, yang berarti minuman. Kakao termasuk dalam kelompok tanaman caulifloris, yang berarti tanaman yang berbunga dan berbuah pada batang dan cabangnya (Matatula *et al*, 2011).

2.1.1. Sejarah Kakao

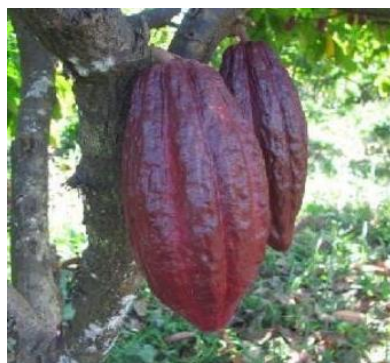
Tanaman kakao berasal dari benua Amerika Selatan dengan tempat tumbuhnya di hutan hujan tropis dan bukan tanaman asli Indonesia. Kakao masuk Indonesia tahun 1560 oleh orang Spanyol melalui Sulawesi (Minahasa). Sejak tahun 1930, kakao telah menjadi salah satu komoditas perkebunan yang sangat penting bagi ekonomi Indonesia, terutama sebagai penyedia lapangan kerja, pendapatan, dan devisa negara. Buah kakao digunakan sebagai bahan baku berbagai produk makanan, obat, dan kosmetik, sehingga membantu ekonomi keluarga petani dan menghasilkan devisa negara (Matatula *et al*, 2011).

2.1.2 Klasifikasi Kakao

Tanaman kakao memiliki klasifikasi yaitu sebagai berikut.

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> L.

Kakao sebelumnya termasuk dalam keluarga *Sterculiaceae*, tetapi studi taksonomi terbaru menempatkannya ke dalam keluarga *Malvaceae*. *Theobroma* genus terdiri dari beberapa spesies tanaman, tetapi *Theobroma cacao* L. adalah spesies yang paling terkenal karena bijinya digunakan untuk membuat cokelat dan kakao. Tiga varietas utama kakao adalah *Forastero*, *Criollo*, dan *Trinitario*. *Forastero* adalah varietas yang paling umum dan paling kuat, sementara *Criollo* terkenal karena biji yang lebih halus tetapi lebih rentan terhadap penyakit. *Trinitario* adalah persilangan antara *Forastero* dan *Criollo*, menggabungkan ketahanan *Forastero* dengan rasa *Criollo*. Klasifikasi ini sangat penting untuk memahami karakteristik genetik, morfologi, dan kualitas produk yang dihasilkan dari setiap jenis kakao (Defitri, 2024). Bentuk dari *Theobroma cacao* L. ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. *Theobroma cacao* L. (Defitri, 2024).

2.1.3. Manfaat Kakao

Konsumsi kakao dapat mengurangi berat badan, meningkatkan fungsi kognitif, membantu mengurangi risiko penyakit kardiovaskular, neurodegeneratif, obesitas, diabetes, kanker, dan penuaan. Kakao juga dapat membantu penyakit saluran cerna seperti alergi makanan dan radang usus. Selain itu, tanaman kakao hanya menghasilkan biji, dan kulit buahnya adalah produk sampingan dari pengolahan kakao yang dibuang oleh para petani kakao dapat mencemari lingkungan (Matatula *et al*, 2011).

2.1.4. Limbah Kulit Ari Biji Kakao

Limbah kulit ari biji kakao merupakan produk samping dari proses pengolahan biji kakao menjadi cokelat atau bubuk kakao. Setelah fermentasi dan pemisahan biji kakao dari daging buahnya, kulit ari biji yang tersisa seringkali dianggap sebagai limbah. Limbah kulit ari biji kakao memiliki kandungan gizi yang berupa serat kasar 25,10%, protein kasar 16,60%, kadar abu sekitar 6,64%, dan lemak sekitar 7,57% - 8,64% (Langkong *et al.*, 2019). Selain itu, senyawa aktif yang ditemukan pada kulit ari biji kakao sangat mirip dengan yang ditemukan pada biji kakao itu sendiri. Biji kakao mengandung polifenol 5-18%, katekin 33-42%, leukosianidin 23-25%, dan antosianin 5%, sedangkan kulit ari biji kakao mengandung polifenol, flavonoid, terpenoid/steroid, tanin terkondensasi, atau terpolimerisasi, seperti katekin dan antosianin, yang diketahui memiliki sifat antimikroba (Yumas, 2017). Bentuk dari limbah kulit ari biji kakao dapat ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Limbah kulit ari biji kakao (Octavia, 2022).

Selain memiliki kandungan senyawa bioaktif yang cukup beragam, limbah kulit ari biji kakao juga menunjukkan potensi aplikatif yang signifikan dalam bidang pangan, kesehatan, dan bioteknologi. Sejumlah penelitian melaporkan bahwa aktivitas antimikroba kulit ari biji kakao berkaitan dengan tingginya kandungan polifenol, terutama katekin dan tanin terkondensasi, yang mampu merusak integritas membran sel mikroorganisme. Purwanti *et al.*, (2023) mengungkapkan bahwa ekstrak etanol kulit ari biji kakao menghasilkan zona hambat terhadap *Streptococcus mutans*, sehingga berpotensi sebagai bahan aktif dalam formulasi antibakteri alami. Selain nilai gizi dan kandungan polifenol yang tinggi, limbah kulit ari kakao juga telah dieksplorasi secara ekstensif dalam konteks aktivitas antimikroba. Lebih jauh, ekstrak kulit ari biji kakao telah dilaporkan menunjukkan aktivitas antimikroba yang menjanjikan. Sebagai contoh, penelitian terkait ekstrak etanol kulit biji kakao yang diperoleh melalui sonikasi terbukti mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, dan saponin, dan menghasilkan zona hambat terhadap *Streptococcus mutans* sebesar rata-rata $8,44 \pm 1,53$ mm (Purwanti *et al.*, 2023). Selain aktivitas antibakteri, kulit ari biji kakao juga menunjukkan potensi antioksidan. Utami *et al.*, (2017) melaporkan bahwa ekstrak polifenol kulit biji kakao dari biji yang disangrai memiliki aktivitas menangkap radikal DPPH (IC_{50}) yang cukup rendah, serta kemampuan menghambat oksidasi asam linoleat. Kombinasi temuan ini menguatkan potensi limbah kulit ari biji kakao sebagai sumber senyawa fungsional untuk aplikasi antimikroba dan antioksidan dalam pengembangan produk pangan fungsional atau bahan aktif alami.

2.2. Enzim Lipase

Lipase (*triacylglycerol hydrolases*, E.C. 3.1.1.3) adalah enzim golongan hidrolase yang mengkatalisis proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas, kemampuan lipase untuk menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol, juga dikenal sebagai regioselektivitas, dimana lipase seringkali memilih posisi ikatan ester tertentu pada molekul trigliserida untuk dihidrolisis (Chandler, 2001). Lipase bekerja pada bagian antar-muka organik-air untuk mengkatalisis proses hidrolisis ikatan ester karboksilat dan melepaskan asam lemak dan alkohol organik apabila lipase berada di lingkungan dengan jumlah air yang cukup (Borrelli dan Trono, 2015). Pada lingkungan dengan jumlah air terbatas, lipase dapat menghasilkan reaksi balik (esterifikasi), atau bahkan transesterifikasi, yang merupakan pertukaran kelompok antara dua ester (interesterifikasi), antara ester dan asam (asidolisis), atau antara ester dan alkohol (alkoholisis) (Hiskia *et al.*, 2017). Lipase termasuk sebagai protein yang membuat aktivitasnya sangat bergantung pada suhu. Lipase memerlukan kondisi suhu yang cocok untuk dapat menghasilkan produk katalisis yang optimal. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak struktur protein lipase yang disebut dengan denaturasi (Sholeha dan Agustini, 2021).

2.2.1. Jenis-jenis Enzim Lipase

Lipase dapat diklasifikasikan menjadi 3 golongan berdasarkan pada kemampuannya dalam menghidrolisis ikatan ester. Tiga golongan enzim lipase dapat dijabarkan sebagai berikut.

1. Lipase non spesifik

Lipase non spesifik dapat mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol lengkap menjadi asam lemak dan gliserol secara acak. Lipase memiliki kemampuan yang sama dalam menghidrolisis gugus asil pada 3 nomor gugus, sehingga menunjukkan bahwa triasilgliserol lengkap yang dihidrolisis oleh lipase non spesifik memiliki 3 produk yang kemungkinan terbentuk (Albayati *et al.*, 2020).

2. Lipase spesifik 1,3

Lipase spesifik 1,3 dapat menghidrolisis triasilgliserol pada gugus asil nomor 1 dan 3. Produk-produk yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol oleh lipase spesifik 1,3 ini yaitu 2-monoasilgliserol dan 1,2- diasilgliserol atau 2,3- diasilgliserol (Albayati *et al.*, 2020).

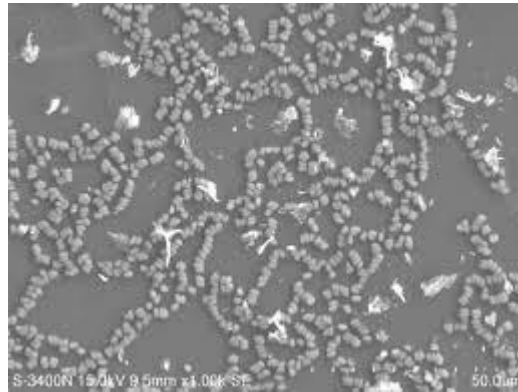
3. Lipase spesifik asam lemak

Lipase spesifik asam lemak merupakan lipase yang memutus asam lemak terutama pada tipe asam lemak spesifik dari molekul gliserida. Lipase ini menghidrolisis ester asam lemak yang terletak di posisi mana saja pada triasilgliserol (Barros *et al.*, 2010).

2.3. Bakteri *Bacillus cereus*

Bakteri *Bacillus cereus* merupakan bakteri yang memiliki bentuk berupa batang yang berspora dan memiliki sifat gram positif. *Bacillus cereus* memiliki ukuran sel yang lebih besar dibandingkan dengan bakteri batang lainnya dan bakteri ini tumbuh secara aerob fakultatif dan digolongkan sebagai bakteri patogen (Ekantini *et al.*, 2019).

Bakteri gram positif *Bacillus cereus* berbentuk seperti batang, ditampilkan pada Gambar 3. *Bacillus cereus* memiliki dua bentuk morfologi yang berbeda, baik sebagai endospora maupun sel vegetatif. Sel vegetatifnya adalah batang aerobik fakultatif dengan panjang 3,0–5,0 μm dan lebar 1,0–1,2 μm . Batang biasanya tumbuh di rantai panjang. *Flagella peritrikus* ditemukan pada *Bacillus cereus*. Bakteri ini dapat bertahan hidup di berbagai suhu, mulai dari 10-50°C, dan suhu pertumbuhan terbaiknya adalah 28-35°C (Ekantini *et al.*, 2019).



Gambar 3. Bentuk *Bacillus cereus*

Bakteri *Bacillus cereus* memiliki klasifikasi sebagai berikut.

Kingdom	: <i>Bacilli</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Bacillales</i>
Family	: <i>Bacillaceae</i>
Genus	: <i>Bacillus</i>
Spesies	: <i>Bacillus cereus</i>

Bacillus cereus memiliki peran dalam berbagai konteks, termasuk keamanan pangan, bioteknologi, dan kesehatan manusia. Salah satu fungsi utamanya adalah sebagai penyebab keracunan makanan. Bakteri ini menghasilkan dua jenis racun: racun emetik yang menyebabkan muntah dan racun enterotoksin yang menyebabkan diare. Infeksi *Bacillus cereus* umumnya terjadi akibat konsumsi makanan yang terkontaminasi, seperti nasi, pasta, atau makanan olahan yang disimpan pada suhu kamar.

Keracunan makanan akibat *Bacillus cereus* sering kali bersifat ringan dan *self-limiting*, namun dalam kasus yang parah, dapat menyebabkan gejala serius, terutama pada individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah (Granum and Lund, 1997). Selain itu, *Bacillus cereus* juga berperan dalam bioteknologi karena kemampuannya memproduksi enzim yang berguna seperti protease, lipase, dan amilase, yang penting dalam industri makanan, deterjen, dan farmasi (Slepecky and Hemphill, 2006).

Bacillus cereus ALP E1 merupakan bakteri yang berhasil diisolasi dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang, Provinsi Lampung. Berdasarkan karakterisasi biokimia, *B. cereus* ALP E1 digolongkan sebagai bakteri gram positif berbentuk basil, dan bersifat aerobik (Citra dan Nurhasanah, 2020). *B. cereus* ALP E1 dapat digunakan sebagai bakteri penghasil enzim lipase dikarenakan *B. cereus* merupakan pemakan lemak alami. Ia secara genetik diprogram untuk menghasilkan lipase, enzim yang berfungsi memecah trigliserida (lemak dan minyak) menjadi sumber energi yang lebih sederhana, lipase yang dihasilkan bersifat ekstraseluler dimana enzim tersebut dikeluarkan langsung dari media pertumbuhannya, dan *B. cereus* ALP E1 merupakan bakteri yang cepat tumbuh, sehingga lipase dapat diproduksi dalam jumlah besar. Oleh karena itu, *B. cereus* ALP E1 dapat dijadikan sebagai penghasil enzim lipase (Rachmawati, 2021).

2.4. Metode RSM

Response Surface Methodology atau disingkat dengan RSM merupakan Kumpulan teknik matematika dan statistik yang berfungsi untuk memodelkan dan menganalisa suatu masalah dimana respon yang diinginkan dipengaruhi oleh banyak variabel dan memiliki tujuan untuk mengoptimalkan respon tersebut (Kusumaningrum *et al.*, 2019). Metode RSM (*Response Surface Methodology*) digunakan dalam studi optimasi media untuk produksi lipase. Metode ini melibatkan desain eksperimen, seperti *Central Composite Design* (CCD), untuk menentukan interaksi antara variabel-variabel yang mempengaruhi produksi

lipase. Sebagai contoh, terdapat tiga parameter yang diuji adalah minyak zaitun sebagai inducer, sukrosa sebagai sumber karbon, dan pepton sebagai sumber nitrogen. RSM digunakan untuk mengembangkan model regresi yang memprediksi kombinasi optimum dari parameter-parameter tersebut berdasarkan hasil eksperimen (Tompang, *et.al*, 2012). Keunggulan dari metode *Response Surface Methodology* (RSM) termasuk kemampuannya untuk mengevaluasi dan mengoptimalkan pengaruh parameter proses dengan jumlah eksperimen yang minimal, serta kemampuannya untuk menentukan parameter yang paling berpengaruh terhadap suatu produksi, salah satunya produksi enzim (Jia *et al.*, 2015). Terdapat riset tentang penggunaan RSM dalam produksi enzim, yaitu Penggunaan RSM sebagai optimasi komponen media untuk produksi enzim lipase dari *Bacillus subtilis*. Hasil yang diperoleh yaitu didapatkan hasil optimal dari beberapa variabel seperti temperature, konsentrasi inokulum, dan waktu inkubasi. Hal ini menunjukkan bahwa , RSM dapat mengoptimalkan parameter yang akan digunakan untuk produksi enzim (Nadaf. *et al.*, 2024).

2.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim merupakan kemampuan enzim untuk mengkatalisis reaksi kimia, yang biasanya dinyatakan sebagai jumlah produk yang dihasilkan dalam satu satuan waktu. Pada enzim lipase, aktivitas ini diukur dalam satuan unit (U), di mana satu unit setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dilepaskan dari hidrolisis substrat oleh lipase setiap menit. Penentuan kondisi optimum aktivitas lipase dilakukan dengan mengukur kinerjanya pada berbagai variasi suhu dan pH. Secara kuantitatif, aktivitas lipase dapat dianalisis menggunakan beberapa metode seperti titrimetri, spektrofotometri, kromatografi, dan konduktometri (Pliego *et al.*, 2015). Metode titrimetri dikenal cukup akurat, namun memiliki keterbatasan karena membutuhkan indikator dan menuntut reaksi berlangsung secara stoikiometri. Sementara itu, metode spektrofotometri lebih unggul karena hasil absorbansi langsung dibaca oleh detektor dan ditampilkan dalam bentuk angka digital, sehingga lebih selektif dan sensitif terhadap senyawa dalam konsentrasi sangat kecil (Palacios *et al.*, 2014).

Dalam pengujian aktivitas lipase dengan spektrofotometri digunakan substrat *p*-nitrofenil palmitat. Pelepasan *p*-nitrofenol dari substrat terdeteksi sebagai peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 410 nm, yang menyebabkan larutan berubah menjadi kuning. Intensitas warna kuning mencerminkan tingkat aktivitas lipase. Aktivitas enzim kemudian dinyatakan dalam unit/mg, yaitu jumlah μmol *p*-nitrofenol yang terbentuk per menit per mg enzim (Lestari *et al.*, 2023). Pada penggunaan spektrofotometri UV-Vis untuk analisis enzim, perlu diperhatikan adanya potensi gangguan seperti warna alami sampel, autofluoresensi, atau kekeruhan akibat kelarutan yang buruk. Faktor-faktor tersebut dapat meningkatkan nilai absorbansi dan menghasilkan pengukuran yang tidak akurat. Oleh karena itu, penggunaan blanko serta reagen yang tepat sangat penting untuk meminimalkan interferensi dalam proses pengukuran (Lankatillake *et al.*, 2021).

2.6. Uji Protein Enzim

Untuk mengukur kadar protein enzim secara akurat, salah satu metode yang paling banyak digunakan adalah metode Lowry. Metode ini merupakan pengembangan dari metode biuret yang klasik, namun menawarkan sensitivitas yang jauh lebih tinggi sehingga mampu mendeteksi protein pada konsentrasi yang rendah. Prinsip dasar metode Lowry melibatkan dua tahapan reaksi utama. Tahap pertama adalah reaksi biuret, di mana ion Cu (II) dalam larutan alkalis berinteraksi dengan ikatan peptida protein sehingga mengalami reduksi menjadi Cu (I). Tahap kedua adalah reaksi reduksi reagen *Folin–Ciocalteu* oleh ion Cu (I) dan gugus aromatik tertentu pada asam amino, seperti tirosin, triptofan, dan sebagian fenilalanin. Reagen *Folin–Ciocalteu* sendiri merupakan kompleks *phosphomolybdate–phosphotungstate* yang akan tereduksi dan menghasilkan warna biru intens yang dikenal sebagai *hetero-polymolybdenum blue* (Lowry *et al.*, 1951 ; Subroto *et al.*, 2020). Warna biru yang terbentuk bersifat stabil dan dapat dianalisis secara kolorimetrik pada panjang gelombang 750 nm. Intensitas warna ini bersifat proporsional terhadap jumlah protein dalam sampel; semakin tinggi konsentrasi protein, semakin pekat pula warna biru yang dihasilkan. Oleh

karena itu, pengukuran absorbansi pada λ_{maks} 750 nm menjadi indikator kuantitatif yang sangat andal untuk menentukan konsentrasi protein. Agar hasil perhitungan lebih akurat, metode Lowry selalu memerlukan kurva standar. *Bovine Serum Albumin* (BSA) biasanya digunakan sebagai standar karena sifatnya yang stabil, mudah diperoleh, dan representatif sebagai protein model. Kurva standar ini menggambarkan hubungan linier antara konsentrasi BSA dan nilai absorbansi yang diperoleh, sehingga konsentrasi protein dalam sampel dapat dihitung berdasarkan posisi nilai absorbansi pada kurva tersebut (Lowry *et al.*, 1951 ; Subrivto *et al.*, 2020).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi Spektrofotometer UV-Vis *Shimadzu UV-1780*, *Laminar Air Flow (LAF) Airtech*, *incubator Precistern P Selecta*, oven *T60 Heraeus*, neraca analitik *Lucky*, spatula, *hot plate AgroLab M3-D*, *magnetic stirrer*, jarum ose, bunsen, autoklaf *Gea LS-35L EDAM 63*, *waterbath Memmert W-350*, pH meter *pH mobile 827 Metrohm*, mikropipet *DragonLab TopPette Pipettor*, mikrotip, sentrifugasi *Hermle Z 327K*, tabung sentrifugasi, alat-alat gelas, mortar dan alu, rak tabung reaksi, *Shaker LabTech LSI 1 EDAM 97*, dan perangkat lunak *Design-Expert 13*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1, limbah padat kulit ari biji kakao di pabrik yang berlokasi di Bandar Lampung, *Nutrient Agar (NA)*, *Nutrient Broth (NB)*, kapas, kassa, kertas saring, akuades, Na_2CO_3 , NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K-tartrat , reagen *Folin-ciocalteu*, *Bovine Serum Albumin (BSA)*, p-nitrofenol, p-nitrofenil palmitat, gom arab, Triton-X-100, buffer Tris HCl pH 8, buffer asetat pH 4, buffer fosfat pH 6 dan 7, buffer fosfat pH 8, aseton, etanol, dan isopropanol.

3.3 Prosedur

3.3.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan dengan pembuatan media padat, media cair, preparasi limbah kulit ari biji kakao, peremajaan isolate *B. cereus* ALP E1, pembuatan media inokulum, dan pembuatan media produksi.

3.3.1.1. Pembuatan Media Padat

Media padat yang akan digunakan pada prosedur ini yaitu medium *Nutrient Agar* (NA) yang akan digunakan untuk meremajakan isolat bakteri dengan teknik agar miring. Pembuatan media NA dilakukan dengan cara menimbang *Nutrient Agar* sebanyak 2 gram. 100 ml akuades dimasukkan ke dalam wadah yang sudah berisi *Nutrient Agar* dipanaskan hingga larut. Media yang sudah larut dituangkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Media NA dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah steril, kemudian ditutup dengan kapas. Prosedur ini dilakukan di LAF untuk menghindari terjadinya kontaminasi. Setelah selesai, tabung reaksi dimiringkan dengan kemiringan 5° (Susanti *et al.*, 2022).

3.3.1.2. Pembuatan Media Cair

Pada prosedur ini, media yang digunakan yaitu medium NB untuk media pertumbuhan bakteri. Media cair ini dibuat dengan cara *Nutrient Broth* 0,8 gram ditimbang dan ditambahkan 100 mL akuades di dalam Erlenmeyer dan dipanaskan hingga larut. Media cair ditutupi dengan sumbat kapas agar tidak terkontaminasi dan disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah steril, media *Nutrient Broth* didinginkan pada LAF (Napitupulu *et al.*, 2019).

3.3.1.3. Preparasi Kulit Ari Biji Kakao

Pada penelitian ini, limbah kulit ari biji kakao dalam keadaan kering sebanyak 20 gram digiling halus dan dicampurkan ke dalam 100 mL akuades dan direbus selama 10-15 menit, kemudian disaring untuk memisahkan padatan dan diambil filtratnya (Soares and Oliveira, 2022).

3.3.1.4. Peremajaan isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1

Pada penelitian ini, isolat *Bacillus cereus* ALP E1 diambil sebanyak 1 ose dan digoreskan secara zig-zag ke dalam media NA secara aseptis. Lalu, diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu inkubator sebesar 37°C.

3.3.1.5. Pembuatan Media Inokulum

Bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 yang telah diremajakan dalam media NA diambil sebanyak 2 ose dan diinokulasikan ke dalam 50 mL NB, kemudian diinkubasi di dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

3.3.1.6. Pembuatan Media Produksi

Pada penelitian ini, *Nutrient Broth* 0,8 gram ditimbang dan ditambahkan 100 mL akuades di dalam Erlenmeyer dan dipanaskan hingga larut. Media NB kemudian ditambahkan filtrat cair limbah kulit ari biji kakao sebanyak 1% (v/v) dan disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit, lalu, media disimpan di LAF dalam keadaan aseptik.

3.3.2. Penentuan Kurva Aktivitas Lipolitik Bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 pada Media Produksi Lipase

Pada penelitian ini, dilakukan produksi enzim lipase dengan menambahkan inokulum dengan variasi konsentrasi 1%, 3%, dan 5% (v/v) pada media kultur yang mengandung limbah kulit ari biji kakao dan dibuat tanpa limbah sebagai kontrol. Inkubasi dilakukan dengan variasi waktu selama 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, dan 96 jam pada suhu 37°C. Pengujian ekstrak kasar enzim dilakukan secara kuantitatif dengan substrat p-nitrofenil palmitat menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 410 nm untuk mendapatkan aktivitas unit enzim lipase (Napitupulu *et al.*, 2019).

3.3.3. Kondisi Optimum Produksi Enzim Lipase dengan Metode *Response Surface Methodology* (RSM)

Pada penelitian ini, parameter produksi seperti pH, kecepatan agitasi dan konsentrasi limbah kulit ari biji kakao dilakukan dengan menggunakan desain RSM-CCD di dalam perangkat lunak *Desain Expert* 13.0, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir munculnya multivariat pada rancangan desain CCD tersebut. Optimasi dengan RSM dilakukan dalam kondisi optimum variabel waktu produksi dan konsentrasi inokulum dibuat tetap.

Tabel 1. Rentang dan tingkatan parameter optimasi enzim lipase dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1

Variabel Independen	Rentang dan Level		
	-1	0	+1
pH	4	6	8
Konsentrasi Limbah (%)	1	3	5
Kecepatan Agitasi (rpm)	100	150	200

3.3.4. Produksi Enzim

Produksi enzim lipase dilakukan setelah diketahui kondisi optimumnya, seperti pH, kecepatan agitasi, konsentrasi limbah, konsentrasi inokulum, dan waktu produksi. Isolat *Bacillus cereus* ALP E1 diambil sebanyak 2 ose pada media agar miring dan dimasukkan ke dalam 50 mL *starter* dan diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Sebanyak konsentrasi inokulum optimum % (w/v) diinokulasikan ke media kultur dan diinkubasi pada kondisi optimumnya, kemudian media produksi dilakukan sentrifugasi selama 15-20 menit dengan kecepatan 5000 rpm agar didapatkan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim tersebut akan ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya (Sheira and Bahri, 2022).

3.3.5. Pengujian Enzim Lipase

3.3.5.1. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan menggunakan substrat p-nitrofenil palmitat dan dibuat kurva standar menggunakan 14 mg p-nitrofenol yang dilarutkan dalam buffer Tris-HCl pH 8 sebanyak 10 mL dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm.

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan dengan mencampurkan 5 mL larutan A (15 mg p-nitrofenil palmitat dilarutkan dalam 5 mL isopropanol) dengan 45 mL larutan B (0,05 gram gom arab dan 0,2 mL Triton X-100 dan dilarutkan ke dalam 50 Mm buffer Tris-HCl) Pembuatan larutan buffer dapat dilihat pada Lampiran 1. Penentuan aktivitas diukur dengan mencampurkan 1,8 mL substrat dengan 0,2 mL larutan enzim yang diinkubasi pada suhu optimum dengan menggunakan *waterbath* selama 15 menit. Untuk menginaktivasi enzim, larutan tersebut ditambahkan 0,2 mL aseton:etanol (1:1). Larutan kontrol substrat dibuat dengan menambahkan 0,2 mL aseton:etanol (1:1) ke dalam 0,2 mL enzim untuk mengaktivasi sebelum dilakukan inkubasi. Absorbansi diukur menggunakan

spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007). Aktivitas enzim kemudian dihitung dengan berdasarkan kurva p-nitrofenol pada Lampiran 2 dan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{[\text{pNP}] (\mu\text{M}) \times \text{volume total}}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{volume enzim}}$$

3.3.5.2. Uji Kadar Protein Enzim Lipase

Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Adapun pereaksi yang digunakan untuk pengujian kadar protein diantaranya yaitu:

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N

Pereaksi B : 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dan 5 mL larutan Na/K tartrat 1%

Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A

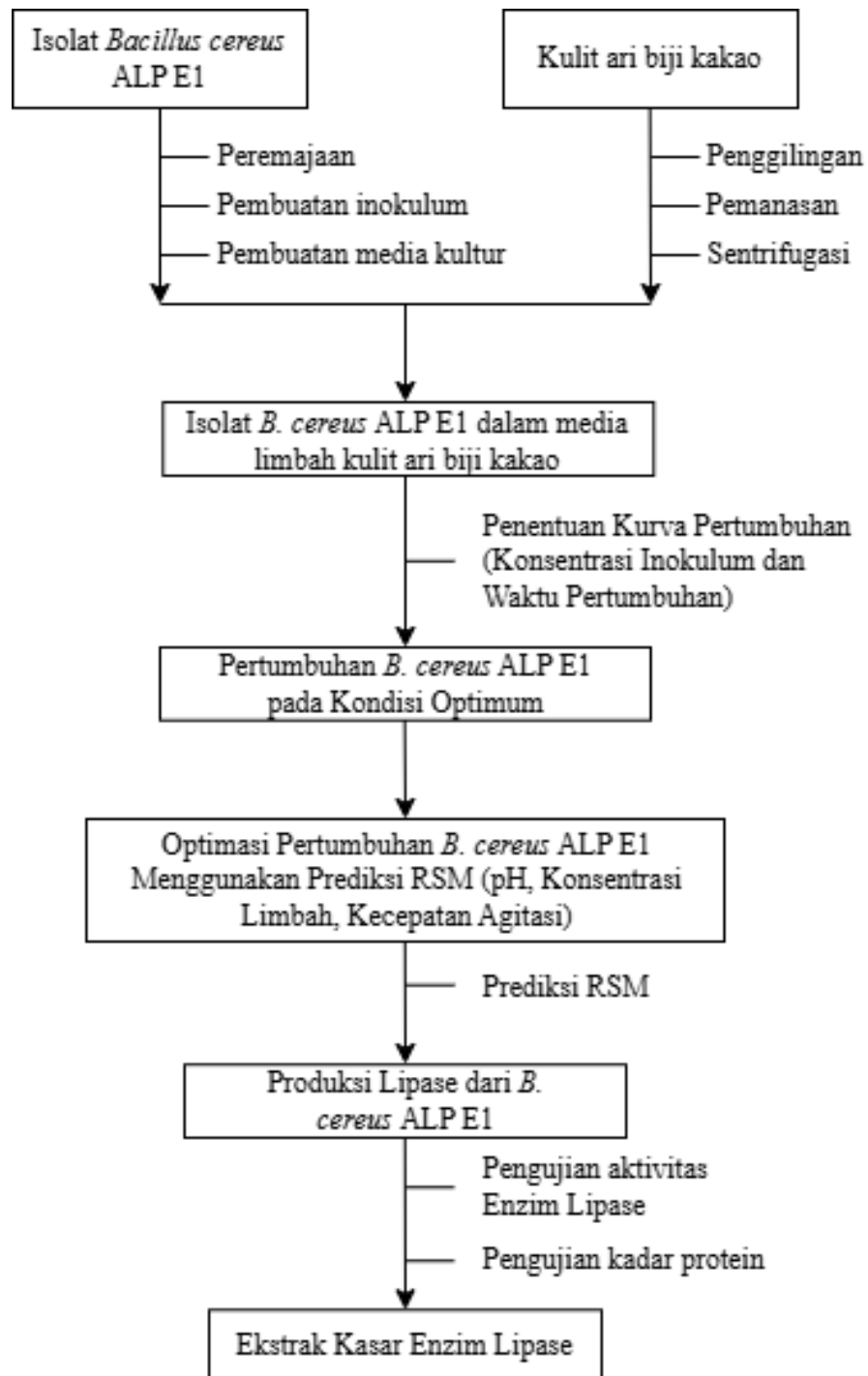
Pereaksi D : Reagen *Folin-ciocalteu* diencerkan dengan aquades 1:1

Enzim lipase sebanyak 0,1 mL ditambahkan 0,9 mL aquades dan 5 mL pereaksi C. Campuran kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, campuran ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D. Campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit, lalu diukur pada λ_{maks} 750 nm. Kontrol disiapkan sebanyak 0,1 mL akuades dengan perlakuan yang sama seperti sampel. Penentuan konsentrasi protein enzim menggunakan kurva standar BSA yang dapat dilihat pada Lampiran 3 dan perhitungan kadar protein dapat dilihat pada Lampiran 6. Aktivitas spesifik dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mL)} = \frac{\text{Aktivitas unit } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right)}{\text{Kadar Protein } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)}$$

3.3.6. Diagram Alir

Adapun diagram alir dari penelitian yang dilakukan yaitu sebagai berikut.



Gambar 4. Diagram alir

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Waktu produksi enzim lipase dari bakteri ALP E1 pada media yang ditambah limbah kulit ari biji kakao yaitu pada 48 jam dan konsentrasi inokulum sebesar 5%.
2. Kondisi optimum pertumbuhan bakteri *B. cereus* ALP E1 dengan menggunakan RSM untuk memproduksi enzim lipase pada media dengan pH 8, konsentrasi limbah 1%, dan kecepatan agitasi 100 rpm. Hasil plot 3D dan analisis varian, interaksi pH signifikan dalam mempengaruhi aktivitas enzim lipase.
3. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim lipase bakteri ALP E1 hasil produksi diperoleh sebesar 56,84 U/mg.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan optimasi produksi enzim lipase dengan menggunakan limbah agroindustri lain, seperti jerami padi, sekam padi, ampas tahu, dan lain sebagainya untuk meningkatkan aktivitas enzim lipase. .

DAFTAR PUSTAKA

- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N. H., Ali, M. S. B. M., Thean, A. L., Shariff, F. B. M., Noor, N. D. B. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Specificity, S., Albayati, S. H., Masomian, M., Nor, S., Ishak, H., Shukuri, M., Thean, A. L., Shari, M., Dina, N., Noor, R., Raja, Z., Rahman, R. N. Z. R. A. 2020. Main Structural Targets for Engineering Lipase. *Catalysts*, **10**(7):1–34.
- Ali, U., Anwar, Z., Hasan, S., Zafar, M., Ain, N. ul, Afzal, F., Khalid, W., Rahim, M. A., Mrabti, H. N., AL-Farga, A., and Eljeam, H. A. R. A. 2023. Bioprocessing and Screening of Indigenous Wastes for Hyper Production of Fungal Lipase. *Catalysts*, **13**(5):1–29.
- Amin, M., Bhatti, H. N., Sadaf, S., and Bilal, M. 2021. Optimization of Lipase Production by Response Surface Methodology and Its Application for Efficient Biodegradation of Polyester vylon-200. *Catalysis Letters*, **151**(12):3603–3616.
- Azizah, A. N., Nurhasanah., Laila, A., and Pandiangan, K. D. 2024. Optimization of Lipase Production from Indigenous Bacteria in Seawater Panjang Port , Lampung using Response Surface Methodology (RSM) Approach. *Basistora*:8072
- Barros, M., Fleuri, L. F., and MacEdo, G. A. 2010. Seed lipases: Sources, Applications and Properties - A Review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **27**(1):15–29.
- Borrelli, G. M., and Trono, D. 2015. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, **16**(9):20774–20840.
- Chandler, I. C. 2001. Determining The Regioselectivity of Immobilized Lipases in Triacylglycerol Acidolysis Reactions. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**(7):737–742.
- Citra, S, N., dan Nurhasanah. 2020. Skrining Bakteri Penghasil Biosurfaktan dari Air Laut Tercemar Minyak di Pelabuhan Panjang Lampung. *Rafflesia Journal of Natural and Applied Sciences*, **1**(1):50–58.
- Defitri, I. Y. 2024. *Tanaman Kakao (Theobroma Cacao) dan Produksi Biji Kering Kakao*. Eureka Media Aksara. Jambi.

- Demirkan, E., Aybey Çetinkaya, A., and Abdou, M. 2021. Lipase from New Isolate *Bacillus cereus* ATA179: Optimization of Production Conditions, Partial Purification, Characterization and its Potential in the Detergent Industry. *Turkish Journal of Biology*, **45**(3):287–300.
- Devika, C., Singhalage, I. D., and Seneviratne, G. 2021. Modification of Nutrient Agar Medium to Culture Yet-Unculturable Bacteria Living in Unsanitary Landfills. *Ceylon Journal of Science*, **50**(4):505–512.
- Ekantini, P. R. R. I., Mega, K. T., dan Prasajo, P. 2019. Identifikasi Bakteri *Bacillus cereus* Pada Mie Basah Di Pasar Kebonpolo Magelang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*:1–5.
- El-Naga, M. Y. A., Khan, M. A., Abu-Hussien, S. H., Mahdy, S. M., AL-Farga, A., and Hegazy, A. A. 2025. Correction to: Optimizing Lipase Production by *Bacillus subtilis* on Cheese Whey and Evaluating its Antimicrobial, Antibiofilm, Anti Virulence and Biosafety Properties. *Scientific Reports*, **15**(1):1–21.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., and Takaç, S. 2007. Isolation of Lipase Producing *Bacillus sp.* from Olive Mill Wastewater and Improving its Enzyme Activity. *Journal of Hazardous Materials*, **149**(3):720–724.
- Granum, P. E., and Lund, T. 1997. *Bacillus cereus* and its Food Poisoning Toxins. *FEMS Microbiology Letters*, **157**(2):223–228.
- Hassan, S. W. M., El Latif, H. H. A., and Ali, S. M. 2018. Production of Cold-Active Lipase by Free and Immobilized Marine *Bacillus cereus* HSS: Application in Wastewater Treatment. *Frontiers in Microbiology*, **9**:1–13.
- Henderson, L. W., Aydtlett, L. A., and Bailey, D. B. 1993. Evaluating Family Needs Surveys: Do Standard Measures of Reliability and Validity Tell Us What We Want To Know? *Journal of Psychoeducational Assessment*, **11**(3):208–219.
- Hiskia A, G., Zuhriana M., Tjahjono H., dan Denny S, S., 2017. Optimasi Sintesis Biosurfaktan Karbohidrat Ester dari Asam Palmitat dan Fruktosa Menggunakan Enzim Lipase Terimobilisasi. *Jurnal Teknik Kimia USU*, **6**(2):48–54.
- Jia, J., Yang, X., Wu, Z., Zhang, Q., Lin, Z., Guo, H., Lin, C. S. K., Wang, J., and Wang, Y. 2015. Optimization of Fermentation Medium for extracellular Lipase Production from *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. *BioMed Research International*, **2015**(1):1–8.
- Kanmani, P., Karthik, S., Aravind, J., and Kumaresan, K. 2013. The Use of Response Surface Methodology as a Statistical Tool for Media Optimization in Lipase Production from the Dairy Effluent Isolate *Fusarium Solani*. *ISRNBiotechnology*, **2013**(1):1–8.
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indarto, R., dan Dewi, D. L. 2014. Kajian Fitokimia Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Chimica et Natura Acta*, **2**(1):83–90.

- Kusumaningrum, A., Wayan Gunam, I. B., dan Mahaputra Wijaya, I. M. 2019. Optimasi Suhu Dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Endoglukanase Menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, **7**(2):243.
- Langkong, J., Mahendradatta, M., Tahir, M. M., Abdullah, N., dan Reski, M. 2019. Pemanfaatan Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Menjadi Produk Cookies Coklat. *Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary Journal*, **2**(1):44–50.
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., and Dias, D. A. 2021. Screening Natural Product Extracts for Potential Enzyme Inhibitors: Protocols, and the Standardisation of The Usage of Blanks in α -Amylase, α -Glucosidase and Lipase Assays. *Plant Methods*, **17**(1):1–19.
- Lestari, I., Pujiastuti, P., dan Wibowo, Y. M. 2023. Komparasi Metode Titrimetri Dengan Spektrofotometri UV-Vis pada Analisis *Chemical Oxygen Demand* (COD) Output IPAL Domestik Berdasarkan Linieritas, Akurasi dan Presisi. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*, **9**(4):592–602.
- Lo, C. F., Yu, C. Y., Kuan, I. C., and Lee, S. L. 2012. Optimization of Lipase Production by *Burkholderia* sp. Using Response Surface Methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**(11):14889–14897.
- Lordelo N, L., Pita, B. L. de M., Rodrigues, C. de A., dos Santos, P. N. A., Almeida, Y. A. de, Ferreira, L. da S., de Oliveira, M. L., de Almeida, L. S., Soares, C. M. F., de Souza Dias, F., and Fricks, A. T. 2025. From Waste to Biocatalyst: Cocoa Bean Shells as Immobilization Support and Substrate Source in Lipase-Catalyzed Hydrolysis. *Molecules*, **30**(15):3207.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**.
- Marliani, N., Astuti, W., dan Kartika, R. 2023. Kondisi Kerja Optimum Lipase Bakteri Endofit dari Daun *Macaranga hullettii* King ex Hook.f. *Bioprospek*, **15**(1):8–15.
- Maryati, Y., Susilowati, A., Mulyani, H., dan Budiari, S. 2022. Optimasi Penghambatan Lipase Pankreas pada Fermentasi Seduhan Daun Katuk Menggunakan RSM. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, **33**(1):29.
- Matatula, A. J., Mahulette, A. S., dan Tanasale, V. L. 2011. *Budidaya Tanaman Perkebunan Kakao*. Ambon.
- Mazhar, H., Afzal, A., Afzal, H., Noureen, A., Ahmad, M. M. I., Amaan, S., Abbas, N., Zhu, H., and Khawar, M. B. 2025. Extracellular Lipase Production from *Bacillus cereus* by Using Agro-Industrial Waste. *Biologia Futura*, **76**(1):42.
- Nadaf, R. D., Nadaf, P. D., Toragall, M. M., and Ct, S. 2024. Response Surface Methodology for Optimization of Media Components for Production of Lipase from *Bacillus subtilis* KUBT4. *Archives of Razi Institute*, **79**(3):659.

- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F. M., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L., and Toloh, B. H. 2019. *Bacillus sp.* As a Decomposition Agent in The Maintenance of *Brachionus rotundiformis* Which Uses Raw Fish As a Source of Nutrition. *Jurnal Ilmiah Platax*, **7**(1):158.
- Nooh, H. M., Masomian, M., Salleh, A. B., Mohamad, R., Ali, M. S. M., and Rahman, R. N. Z. R. A. 2018. Production of Thermostable T1 Lipase Using Agroindustrial Waste Medium Formulation. *Catalysts*, **8**(11):1.
- Onyeogaziri, F. C., and Papanephytous, C. 2019. A General Guide for the Optimization of Enzyme Assay Conditions Using the Design of Experiments Approach. *SLAS Discovery*, **24**(5):589.
- Palacios, D., Busto, M. D., and Ortega, N. 2014. Study of a New Spectrophotometric end-Point Assay for Lipase Activity Determination in Aqueous Media. *Lwt Food Science and Technology*, **55**(2):536.
- Pliego, J., Mateos, J. C., Rodriguez, J., Valero, F., Baeza, M., Femat, R., Camacho, R., Sandoval, G., and Herrera-López, E. J. 2015. Monitoring Lipase/Esterase Activity by Stopped Flow in a Sequential Injection Analysis System Using p-Nitrophenyl Butyrate. *Sensors (Switzerland)*, **15**(2):2798.
- Purwanti, A., Agustin, D. B., dan Nuri, N. 2023. Uji Potensi Antibakteri *Streptococcus mutans* Ekstrak Kulit Biji Kakao (*Theobroma cacao L*) dengan Metode Ekstraksi Sonikasi. *Jurnal Farmasi Higea*, **15**(1):69.
- Putra, W. A., Diharmi, A. R., dan Karnila, R. 2021. Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Kolagenase dari Organ Dalam Ikan Malong (*Congresox talabon*) pada pH Berbeda. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, **13**(1):27.
- Putri, D. M., Ristiani, L., dan Hasanah, Q. 2024. Peran Enzim dalam Proses Metabolisme Menurut Al-Quran dan Hadist. *ISTISYFA: Journal of Islamic Guidance and Counseling*, **2**(1):201.
- Putri, D. N., Khootama, A., Perdani, M. S., Utami, T. S., and Hermansyah, H. 2020. Optimization of *Aspergillus niger* Lipase Production by Solid State Fermentation of Agro-Industrial Waste. *Energy Reports*, **6**:331.
- Rachmawati, F. 2021. *Skrining Aktivitas Lipase dari Isolat bakteri-bakteri air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang Lampung*. Laporan Praktik Kerja Lapangan. Lampung.
- Sheira, R. A., dan Bahri, S. 2022. Pemurnian Parsial Enzim Lipase dari Bakteri Isolat Lokal LKMA3 dan Penentuan Aktivitasnya dengan Metode Spektrofotometri. *Prosiding*:1.
- Sholeha, R., dan Agustini, R. 2021. Lipase Biji-Bijian dan Karakteristiknya. *Unesa Journal of Chemistry*, **10**(2):175.
- Simamora, C. J. K., dan Sukmawati. 2020. Identifikasi dan Karakterisasi Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim. *Median*, **12**(1):31.

- Slepecky, R. A., and Hemphill, H. E. 2006. *The Genus Bacillus—Nonmedical*. Springer. United States.
- Soares, T. F., and Oliveira, M. B. P. P. 2022. Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. *Molecules*, **27**(5):1.
- Srinivasa C, P., and Prameela D, Y. 2020. Optimization of Lipase Production Using *Pseudomonas aeruginosa* by Response Surface Methodology. *Research Journal of Biotechnology*, **15**(12):163.
- Subroto, E., Lembong, E., Filianty, F., Indiarto, R., Primalia, G., Putri, M. S. K. Z., Theodora, H. C., and Junar, S. 2020. The Analysis Techniques of Amino Acid And Protein In Food And Agricultural”. International Journal of Scientific & Technology Research Products. *International Journal of Scientific and Technology Research Products*, **9**(11):32.
- Susanti, M., Khalimatusa’diah, S., dan Rasyid, A. 2022. Pemanfaatan Variasi Sumber Karbohidrat Dari Palawija Sebagai Alternatif Media Sintetik Untuk Pertumbuhan Bakteri. *The Journal of Science and Biology Education*, **7**(2):61.
- Suwariani, N, P., Hidayat, C., dan Cahyanto, M, N. 2016. Hidrolisis Bungkil Biji Jarak Pagar Menjadi Hidrolisat Cair dan Aplikasinya Sebagai Medium Produksi Lipase oleh *Aspergillus niger* 65I6 dengan Sistem Submerged Fermentation. *Jurnal Universitas Gajah Mada*, **1**(1):85.
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., and Frąc, M. 2021. Various Perspectives on Microbial Lipase Production Using Agri-Food Waste and Renewable Products. *Agriculture (Switzerland)*, **11**(6):3.
- Tompang, M. F., Gunny, A.A.N., and Zainuddin, N. I. 2012. BPE-P11 : An Optimization Study by Response Surface Methodology for Lipase Production from Oil Palm. *Malaysian International Conference on Trends in Bioprocess Engineering*, **1**(1):3.
- Utami, R. R., Supriyanto, S., Rahardjo, S., and Armunanto, R. 2017. Antioxidant Activity from Shell of Roasted Cocoa Bean with Low, Medium and High Roasting Degree. *Agritech*, **37**(1):88.
- Yumas, M. 2017. Pemanfaatan Limbah Kulit Ari Biji Kakao (*Theobroma cacao* L) Sebagai Sumber Antibakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, **12**(2):7.