

**STUDI KESTABILAN LIPASE DARI BAKTERI *Lysinibacillus  
boronitolerans* LKM G1 TERHADAP VARIASI pH, SUHU, DAN  
PELARUT ORGANIK**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**VERINDA INDAH SARI**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRACT

### STUDY OF LIPASE STABILITY FROM THE BACTERIA *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 AGAINST VARIATIONS IN pH, TEMPERATURE, AND ORGANIC SOLVENTS

By

VERINDA INDAH SARI

Lipase is an enzyme that functions to hydrolyze ester bonds in triglycerides to produce diglycerides, monoglycerides, glycerol, and fatty acids. Lipase has the ability to be in the interface area, which causes the biocatalyst to become more active in the presence of a substrate that is partially soluble in an aqueous environment and can catalyze in a media environment containing organic solvents. The aim of this research is to study the stability of the lipase enzyme from the bacterium *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 against variations in pH, temperature, and organic solvents. The stages carried out include bacterial rejuvenation, production and purification, pH and temperature characterization and testing enzyme stability in variations in pH, temperature, and organic solvents. The results show that the production of the lipase enzyme from the bacteria *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 at pH 6, temperature 30 °C, and 4% palm oil inducer can produce a crude extract of the lipase enzyme with a specific activity value of 1082,45 U/mg. The purification stage using ammonium sulfate and dialysis obtained 4 times purity compared to the crude extract. The results of testing the lipase enzyme from the bacterium *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 show that the enzyme has an optimum pH of pH 6 and an optimum temperature of 40 °C and is relatively more stable at pH 6, a temperature of 40 °C, and in the solvent hexane. Lipase from this bacteria can be used to catalyze organic synthesis reactions such as esterification, transesterification and alcoholysis.

**Keywords:** lipase, various organic solvents, *Lysinibacillus boronitolerans*, stability, hexane.

## ABSTRAK

### STUDI KESTABILAN LIPASE DARI BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 TERHADAP VARIASI pH, SUHU, DAN PELARUT ORGANIK

Oleh

VERINDA INDAH SARI

Lipase merupakan enzim yang berfungsi menghidrolisis ikatan ester dalam trigliserida menghasilkan digliserida, monogliserida, gliserol, dan asam lemak. Lipase memiliki kemampuan untuk berada pada daerah antarmuka, yang menyebabkan biokatalis tersebut menjadi lebih aktif dengan adanya substrat yang sebagian larut dalam lingkungan berair serta dapat mengkatalis dalam lingkungan media mengandung pelarut organik. Tujuan dari penelitian ini adalah mempelajari kestabilan enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 terhadap variasi pH, suhu, dan pelarut organik. Tahapan yang dilakukan meliputi peremajaan bakteri, produksi dan pemurnian, karakterisasi pH dan suhu serta menguji kestabilan enzim dalam variasi pH, suhu, dan pelarut organik. Hasil menunjukkan bahwa produksi enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 pada kondisi pH 6, suhu 30 °C, dan induser minyak kelapa sawit 4% dapat menghasilkan ekstrak kasar enzim lipase dengan nilai aktivitas spesifik 1082,45 U/mg. Tahap pemurnian menggunakan ammonium sulfat dan dialisis diperoleh kemurnian 4 kali dibandingkan dengan ekstrak kasarnya. Hasil pengujian enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 menunjukkan bahwa enzim tersebut memiliki pH optimum pH 6 dan suhu optimum 40 °C serta relative lebih stabil pada pH 6, suhu 40 °C, dan pada pelarut heksana. Lipase dari bakteri ini dapat dimanfaatkan untuk mengkatalis reaksi sintesis organik seperti esterifikasi, transesterifikasi, dan alkoholisis.

**Kata Kunci:** lipase, variasi pelarut organik, *Lysinibacillus boronitolerans*, kestabilan, heksana.

**STUDI KESTABILAN LIPASE DARI BAKTERI *Lysinibacillus  
boronitolerans* LKM G1 TERHADAP VARIASI pH, SUHU DAN  
PELARUT ORGANIK**

Oleh

**VERINDA INDAH SARI**

**Skripsi**

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2023**

Judul Penelitian : **STUDI KESTABILAN LIPASE DARI  
BAKTERI *Lysinibacillus boronitolerans*  
LKM G1 TERHADAP VARIASI pH,  
SUHU, DAN PELARUT ORGANIK**

Nama Mahasiswa : **Verinda Indah Sari**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1957011010**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

**1. Komisi Pembimbing**

  
**Dra. Aspita Laila, M.S.**  
NIP. 196009091988112001

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

**2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila**

  
**Mulyono, Ph.D.**  
NIP. 197406112000031002

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dra. Aspita Laila, M.S.**



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



**Anggota : Prof. Andi Setiawan, Ph.D.**



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
**NIP. 197110012005011002**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 06 November 2023**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Verinda Indah Sari  
NPM : 1957011010  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul: **Studi Kestabilan Lipase dari Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 Terhadap Variasi pH, Suhu, dan Pelarut Organik** merupakan benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain kecuali disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan.

Kemudian, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 23 November 2023

Yang menyatakan,



Verinda Indah Sari  
NPM. 1957011010

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Verinda Indah Sari  
NPM : 1957011010  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul: **Studi Kestabilan Lipase dari Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 Terhadap Variasi pH, Suhu, dan Pelarut Organik** merupakan benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain kecuali disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan.

Kemudian, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung,  
Yang menyatakan,

Verinda Indah Sari  
NPM. 1957011010



## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis bernama lengkap Verinda Indah Sari lahir di Rajabasa Lama pada tanggal 15 Februari 2001. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara, putri dari Bapak Edi Jumangin dan Ibu Suginem. Penulis pertama kali menempuh pendidikan di Taman Kanak-kanak Pertiwi 2 Rajabasa Lama yang diselesaikan pada tahun 2006. Kemudian dilanjutkan ke Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Rajabasa Lama yang ditamatkan pada tahun 2013. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Labuhan Ratu yang ditamatkan pada tahun 2016. Lalu penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Way Jepara pada tahun 2016-2019.

Pada tahun 2019, penulis diterima di Jurusan S1 Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri-Barat (SMMPTN-Barat). Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke 30 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2019. Penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Universitas Lampung sebagai anggota Dinas Pergerakan dan Pemberdayaan Wanita (PPW) periode 2020, dan Anggota Dinas Sains dan Pengabdian Masyarakat (SPM) periode 2022.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Wonosari, Kecamatan Pekalongan, selama 40 hari. Setelah melaksanakan kewajiban KKN, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dari bulan Juli tahun 2022 hingga bulan September tahun 2022 dengan judul “Uji Efektivitas Dekomposer M-21 Terhadap Penurunan Kadar

*Biological Oxygen Demand (BOD) Pada Limbah Cair Industri Tahu*” Selama menjalani perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Analisis untuk mahasiswa jurusan Biologi Terapan pada semester satu pada tahun 2022 dan menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa jurusan Biologi semester dua dan mahasiswa Biologi Terapan semester dua pada tahun 2023.

## **MOTTO**

Selesaikan apa yang sudah kamu mulai. Tidak masalah seberapa lambat dan seberapa lama kamu dalam menyelesaikannya. Semua hanya tentang waktu, maka bersabarlah. Karena semua orang punya waktunya masing-masing.

(Penulis)

Kamu harus berproses, berjuang, dan terus berusaha. Ketika jalan yang kamu lalui terasa susah, kamu tidak boleh menyerah. Hidup hanya sekali dan tantangan akan selalu menghampiri. Ubah setiap kesulitan menjadi peluang dan pantaskan dirimu untuk menjadi seorang pemenang.

(Merry Riana)

Tidak ada ujian yang tidak bisa diselesaikan. Tidak ada ujian yang melebihi batas kesanggupan. Karena Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kadar kesanggupannya.

(QS. Al-Baqarah: 286)

## PERSEMBAHAN

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.



Karya sederhana ini dipersembahkan kepada:

**Kedua orang tua tercinta**

**Bapak Edi Jumangin dan Ibu Suginem.**

Yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, doa, serta dukungan secara moril dan finansial kepada penulis selama ini.

Rasa hormat saya kepada:

**Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., | Ibu Dr. Nurhasanah, M.Si. |**

**Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D.**

**Serta seluruh dosen Jurusan Kimia**

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama penulis menempuh pendidikan di kampus hingga mendapat gelar sarjana. Semoga

Allah SWT membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, *Aamiin*.

Serta

**Keluarga besar dan sahabat-sahabat seperjuangan**

dan

**Almamater tercinta, Universitas Lampung**

## SAN WACANA

*Assalammu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuuh.*

*Alhamdulillah* *rabbil'alaamiin*. Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahuwata'aalaa, serta tak lupa pula salam cinta kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, karena berkat Rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “**Studi Kestabilan Lipase dari Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 Terhadap Variasi pH, Suhu, dan Pelarut Organik**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selain bersyukur kepada dzat pencipta bumi dan kekasih-Nya, penulis juga ingin berterima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Adapun pihak-pihak tersebut, antara lain:

1. Kedua orang tuaku; Bapak Edi Jumangin dan Ibu Suginem untuk segala doa, nasihat, *support*, pengorbanan, perjuangan, kesabaran, dan kasih sayangnya. Terima kasih karena selalu mendukung pilihan penulis, terima kasih atas cinta dan kasih sayang yang selalu diberikan di setiap jalan penulis menempuh pendidikan, terima kasih atas doa yang selalu dipanjatkan kepada Allah SWT sehingga penulis selalu diberikan dan diberkahi kelancaran dalam setiap urusan dalam menyelesaikan pendidikan.
2. Kakak ku dan kakak iparku; Ade Tyas Mayasari dan Bangun Dwi Terima kasih sudah mendengarkan keluh kesah yang hampir setiap hari dan tiada hentinya menyemangati penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S., sebagai pembimbing I penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, dukungan, dan ilmu pengetahuan yang telah diberikan

kepada penulis mulai dari saat penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan hingga melaksanakan penelitian untuk menuntaskan skripsi ini.

4. Ibu Dr. Nurhasanah S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing II atas segala saran, bimbingan, ilmu, semangat, kesabaran, dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., selaku dosen pembahas terima kasih karena telah memberikan masukan-masukan yang membangun untuk kemudian dijadikan sebuah pembelajaran oleh penulis.
6. Bapak Prof. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., selaku dosen pembimbing akademik, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas bimbingan, nasihat, motivasi, dan kesabaran dalam membimbing penulis selama masa perkuliahan.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu baik dalam bidang akademik maupun non akademik.
10. Laboran laboratorium Biokimia, staff administrasi, satuan pengaman, dan seluruh pegawai di lingkungan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
11. *Nurhasanah's Research Group* 2019: Astin Vidyasani, Cindi Pebrianti, Putpita Sari dan Yori Pratiwi, terima kasih atas bahu, telinga, pengorbanan waktu istirahat, keringat, dan air mata yang telah dikorbankan selama menjalankan penelitian bersama penulis di laboratorium.
12. Kakak-kakak *Nurhasanah's Research*: Kak Aulia, kak nurmay, kak salsa, kak nisa dan kak qonita Terima kasih telah membantu, serta memberikan dukungan kepada penulis. Semoga sukses selalu kakak- kakak.
13. Teman-teman serta adik-adik Lab Biokimia terima kasih telah memberikan semangat, dan dukungannya sehingga penulis mampu menyelesaikan penelitian dengan baik.

14. Sahabat kontrakan : Hilda, Anjel, Partini, Zahra, Sinta, dan Chinta terima kasih atas segala dukungan, bantuan, dan semangat selama masa perkuliahan.
15. Sahabat masa kecil ku: Alif Asniati, Novia, Ristania, Yuli Nurul, yang selalu memberi motivasi, semangat, kepercayaan dan ruang hiburan bagi penulis. Sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah memperlancar kita dalam menjalani kehidupan baik dunia maupun akhirat.
16. Teman-Teman Kimia 2019 terutama Kelas C atas segala kenangan selama kuliah.
17. Seluruh pihak yang telah membantu dan mendukung penulis yang tidak dapat dituliskan satu per satu.
18. Kepada diri saya sendiri Verinda Indah Sari, terima kasih karena telah berjuang dan bertahan hingga selesai.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, tetapi penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung,  
Penulis

**Verinda Indah Sari**

## DAFTAR ISI

Halaman

<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iv</b>
<b>I.PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	4
1.3. Manfaat Penelitian .....	4
<b>II.TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1. Enzim .....	5
2.2.1.Sifat-sifat Enzim .....	6
2.2.2.Penggolongan Enzim .....	7
2.1.3.Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	8
2.1.4. Isolasi dan Pemurnian Enzim.....	9
2.2. Enzim Lipase .....	10
2.2.1.Aplikasi Enzim Lipase .....	11
2.2.2.Uji Aktivitas Lipase .....	13
2.2.3.Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.....	13
2.2.4.Kestabilan Enzim .....	14
2.3. Spektrofotometri UV-Vis.....	15
<b>III.METODE PENELITIAN</b> .....	<b>17</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
3.2. Alat dan Bahan.....	17
3.3. Prosedur Penelitian .....	18



3.3.1. Tahap Persiapan .....	18
3.3.2. Pembuatan Media.....	18
3.3.3. Peremajaan Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1 ...	19
3.3.4. Produksi Enzim.....	19
3.3.5. Pemurnian Enzim.....	20
3.3.6. Karakterisasi Enzim .....	21
3.3.7. Stabilitas Enzim .....	21
3.3.8. Uji Aktivitas Enzim Lipase.....	23
3.4. Skema Penelitian.....	25
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
4.1. Bakteri Isolat Lokal LKM G1 .....	26
4.2. Enzim Lipase dari Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1 .....	27
4.3. Pemurnian Enzim Lipase .....	29
4.3.1. Fraksinasi dengan Pengendapan Garam Ammonium Sulfat ....	29
4.3.2. Dialisis .....	32
4.4. Karakterisasi Enzim Hasil Pemurnian .....	35
4.4.1. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Lipase .....	35
4.4.2. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Lipase.....	37
4.5. Kestabilan Enzim Lipase dari Isolat Lokal Bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1.....	38
4.5.1. Kestabilan Terhadap Variasi pH.....	39
4.5.2. Kestabilan Terhadap Variasi Suhu.....	41
4.5.3. Kestabilan Enzim Lipase dalam Pelarut Organik .....	42
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>46</b>
5.1. Simpulan .....	46
5.2. Saran .....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>55</b>

## DAFTAR TABEL

### Tabel

1. Klasifikasi Enzim Berdasarkan Tipe Reaksi (Risnoyatningsih, 2008). ....	7
2. Klasifikasi Subkelas Enzim.....	7
3. Aplikasi enzim lipase dalam dunia industri (Susanti & Fibriana, 2017). 12	
4. Nilai log P beberapa pelarut organik (Masomian et al., 2018). ....	15
5. Pola fraksinasi bertingkat enzim lipase dari bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> isolat LKM G1 .....	30
6. Fraksinasi dengan tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-20%) dan .....	31
7. Pemurnian enzim lipase dari isolat lokal <i>bakteri Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1. ....	33
8. Hasil Pengukuran Absorbansi p-Nitrofenol pada Pembuatan Kurva Standar.....	59
9. Hasil Pengukuran Absorbansi BSA pada Pembuatan Kurva Standar.....	60
10. Data Aktivitas Unit Karakterisasi pH Enzim Lipase .....	62

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	
1. Skema Alur Prosedur Penelitian .....	25
2. Isolat LKM G1 yang telah diremajakan.....	27
3. Hubungan tingkat kejenuhan garam ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim lipase.....	30
4. Hubungan antara kejenuhan fraksi (0-20%) dan (20-90%) dengan aktivitas spesifik enzim lipase dari isolat lokal bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> .....	31
5. Perbandingan aktivitas spesifik enzim lipase pada berbagai perbandingan .....	34
6. Pengaruh pH terhadap aktivitas lipase .....	35
7. Pengaruh suhu inkubasi terhadap aktivitas lipase.....	37
8. Aktivitas sisa enzim lipase dari bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1 terhadap variasi pH.....	39
9. Aktivitas sisa enzim lipase dari isolat lokal bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> LKM G1 terhadap variasi suhu .....	41
10. Aktivitas sisa enzim lipase dari isolat lokal bakteri <i>Lysinibacillus boronitolerans</i> dalam berbagai pelarut organik .....	43
11. Kurva standar p-Nitrophenol.....	59
12. Kurva Standar Bovine Serum Albumine (BSA) .....	60

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Lipase pada umumnya dikenal sebagai triasil gliserol asil hidrolase (EC 3.1.1.3) yang katalik alaminya berfungsi untuk menghidrolisis ikatan ester dalam trigleserida menghasilkan digliserida, monogliserida, gliserol, dan asam lemak (Chavan *et al.*, 2014). Salah satu sifat unik lipase yaitu memiliki kemampuan katalisis antarmuka, di mana biokatalis tersebut menjadi lebih aktif dengan adanya substrat yang sebagian larut dalam lingkungan berair dan mampu mengkatalisis sintesis transesterifikasi ester dalam media organik yang mengandung konsentrasi air (Sholeha & Agustini, 2021). Lipase telah terbukti efisien digunakan sebagai biokatalis yang selektif dalam banyak aplikasi industri, seperti biosensor, bahan kimia, farmasi, pestisida, makanan, kulit, kosmetik hingga detergen (Wahyuningsih *et al.*, 2015).

Saat ini banyak industri di Indonesia yang bergantung pada hasil produksi enzim lipase impor, padahal ketersediaan dan harga lipase impor cenderung mahal karena sedikitnya produsen yang mampu memproduksi enzim lipase (Telussa, 2013). Hal tersebut sejalan dengan informasi pasar global mengenai peningkatan penjualan lipase, pada tahun 2018 penjualan lipase diperkirakan mencapai USD 425,0 juta dan mengalami peningkatan mencapai USD 590,2 juta pada tahun 2023, yang menandakan kebutuhan lipase pada industri juga akan terus mengalami peningkatan (Chandra *et al.*, 2020). Mahalnya harga enzim lipase sering menjadi masalah dalam industri, sehingga hal tersebut mendorong untuk dikembangkannya suatu teknologi yang dapat menjadikan enzim menjadi lebih

stabil serta awet, sehingga penanganan dan penggunaan enzim sebagai biokatalis dapat lebih mudah dan ekonomis (Panji *et al.*, 2014).

Saat ini bidang industri membutuhkan enzim lipase yang memiliki kestabilan yang baik untuk memperkecil biaya produksi, sedangkan kestabilan lipase sendiri dipengaruhi oleh suhu, pH, lama penyimpanan, dan adanya pelarut organik (Lotti *et al.*, 2015). Proses-proses di industri membutuhkan kondisi enzim lipase yang ekstrem seperti rentang pH yang luas, suhu tinggi, dan penggunaan pelarut organik (Wahyudi, 2014). Kestabilan enzim lipase dalam pelarut organik sangat penting karena pada sebagian industri digunakan senyawa-senyawa non polar, senyawa non polar yang akan digunakan adalah senyawa non polar yang mudah larut dalam pelarut organik (Kumar *et al.*, 2016). Sebagai contohnya yaitu pada pembuatan biodiesel yang proses pembentukan melalui reaksi transesterifikasi rantai panjang asam-asam lemak dan alkohol dengan bantuan katalis, sehingga membentuk alkil ester atau biodiesel (Nenobahan *et al.*, 2020).

Pengaruh pH dan suhu terhadap kestabilan enzim juga tidak kalah penting karena bentuk struktur aktif enzim perlu dijaga agar tidak berubah sehingga tetap memenuhi konsep *Lock and Key* dimana enzim dengan substratnya mampu mempertahankan aktivitasnya pada kondisi tertentu (Hans, 2010). Enzim bakteri cenderung memiliki pH optimum pada pH netral atau basa dan sering kali lebih termostabil dibandingkan dengan ragi dan jamur (Bakir & Metin, 2016).

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh perubahan kondisi sekitarnya terutama suhu dan pH. Hal ini dikarenakan enzim dibangun dari residu asam amino yang memiliki gugus basa, netral atau asam (Gusniah *et al.*, 2020). Untuk memperoleh bakteri-bakteri yang menghasilkan lipase dengan kestabilan pH, suhu dan pelarut organik yang baik, banyak sumber yang dapat dieksplorasi baik dari lingkungan alam yang ekstrem hingga sumber lingkungan buatan.

Beberapa penelitian terkait kestabilan lipase telah dilaporkan diantaranya lipase termostabil yang diproduksi oleh bakteri *Aeromonas sp.*, diisolasi dari lumpur laut di Angsila, Thailand menghasilkan lipase termostabil yang stabil pada pH optimum >8.0 dan stabil pada dalam kondisi asam lemah serta stabil pada suhu

sedang sekitar  $<40^{\circ}\text{C}$  (Charoenpanich *et al.*, 2011). Liu *et al* (2009) melaporkan bakteri yang diisolasi dari air laut dengan menggunakan bakteri gram positif seperti *Bacillus sp* memiliki tingkat stabilitas yang baik dalam pelarut benzene, butanol, heksanol, dan toluena. Selain itu, lipase yang di uji menggunakan bakteri isolasi dari tanah terkontaminasi minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali menghasilkan lipase alkali yang stabil dalam etanol dan n-propanol (Parwata, I dan Martiningsih, 2014). Lipase dari bakteri yang diisolasi dari lumpur kawah Bleduk Kuwu, Jawa Tengah juga dilaporkan stabil pada metanol dan etanol (Parwata *et al.*, 2014).

Isolat lokal bakteri *Lysinibacillus borontolerans* LKM G1 merupakan bakteri yang diperoleh dari fase mesofilik proses pengomposan limbah domestik dengan suhu pengomposan  $37^{\circ}\text{C}$ . Studi pendahuluan telah dilakukan terhadap isolat-isolat bakteri yang diisolasi dari limbah domestik dan ketahanannya terhadap pelarut organik, yaitu metanol, benzena, dan *n*-heksana. Hasil dari pengujian tersebut menunjukkan bahwa isolat tersebut relatif tahan terhadap pelarut organik *n*-heksana (Husna, 2022). Namun untuk kestabilan dalam berbagai pH, suhu, dan pelarut organik lain belum di pelajari lebih lanjut. Berdasarkan uraian diatas, maka pada penelitian ini dilakukan studi kestabilan enzim lipase dari bakteri isolat lokal *Lysinibacillus boronitrolerans* LKM G1 dalam berbagai variasi pH, suhu, dan pelarut organik polar ( etanol dan butanol), semi polar (etil asetat dan kloroform) serta pelarut non polar (heksana dan benzena).

## 1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui aktivitas lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1
2. Mempelajari kestabilan lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dalam berbagai pH, suhu dan pelarut organik seperti etanol, butanol, etil asetat, kloroform, heksana, dan benzena.
3. Mengetahui variasi pH, suhu dan jenis pelarut organik yang dapat menstabilkan enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1.

## 1.3. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai variasi pH, suhu dan jenis pelarut organik yang mampu menstabilkan enzim lipase bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 serta pada tahap lanjut dapat dipelajari sintesis reaksi-reaksi organik.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Enzim

Enzim merupakan sekelompok protein yang bertanggung jawab mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi (Supriyatna *et al.*, 2015). Enzim memiliki sifat yang sangat spesifik terhadap substrat tertentu pada konfirmasi tiga dimensi dari protein-protein penyusunnya (Hasna, 2012). Pada umumnya enzim menghasilkan kecepatan, spesifikasi dan kendali pengaturan terhadap reaksi dalam tubuh. Enzim juga bertindak sebagai katalis yaitu senyawa yang dapat meningkatkan laju reaksi kimia seperti katalis, di sisi lain enzim juga mereduksi atau mengurangi energi aktivasi reaksi kimia (Supriyatna & Ukit, 2016). Enzim sangat penting dalam proses biokimia karena enzim dapat mengkatalis ratusan reaksi bertahap yang dapat menghasilkan makromolekul dari prekursor-prekursor sederhana (Lehninger, 2005).

Enzim dikenal sebagai suatu biokatalis yang diproduksi oleh semua organisme hidup dan dapat diekstraksi dari sel yang kemudian dapat digunakan sebagai katalis secara komersial. Enzim disebut biokatalis karena enzim memiliki kemampuan untuk mengkatalis suatu reaksi (Robinson, 2015). Enzim sendiri tersusun dari polimer asam amino yang membentuk rantai panjang linier dan dihubungkan dengan peptida menjadi suatu protein dan memiliki fungsi katalik yang khusus. Sebagai katalis, enzim memiliki beberapa kelebihan diantaranya memiliki aktivitas tinggi meskipun pada konsentrasi rendah (Christy & Kavitha, 2014). Berdasarkan tempat bekerjanya enzim dapat dibedakan dalam 2 golongan, yaitu *endoenzim* dan *eksoenzim*. Endoenzim (enzim intraseluler) adalah enzim yang dihasilkan di dalam sel yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan



metabolisme di dalam sel. Sedangkan eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya (Kasipah *et al.*, 2013). Dalam melakukan aktivitasnya enzim dipengaruhi oleh lingkungan. Pengaruh lingkungan tersebut dapat mengganggu kestabilan enzim sehingga dapat menjadi masalah yang sering terjadi dalam industri. Kestabilan enzim dapat didefinisikan sebagai kemampuan enzim untuk mempertahankan aktivitasnya selama penyimpanan dan penggunaan, serta ketahanannya yang dapat merusak dalam pelarut tertentu (seperti asam-basa) dan pengaruh dari suhu dan pH yang ekstrem (Nawani *et al.*, 2006).

### **2.2.1. Sifat-sifat Enzim**

Enzim sebagai suatu senyawa yang memiliki struktur sama dengan protein baik murni maupun protein yang terikat pada gugus non protein, yang memiliki sifat yang sama dengan protein lain yaitu:

- a. Dapat didenaturasikan oleh panas,
- b. Terpresipitaskan atau terendapkan oleh senyawa-senyawa organik cair seperti etanol dan aseton juga oleh garam-garam organik berkonsentrasi tinggi seperti ammonium sulfat,
- c. Memiliki bobot molekul yang relatif besar sehingga tidak dapat melewati membran semi permeabel atau tidak dapat terdialisis .

sebagai katalis enzim memiliki ciri khas khusus yaitu:

- a. Enzim bersifat tidak diubah oleh reaksi yang dikatalisnya,
- b. Enzim merupakan biokatalisator yang dalam konsentrasi kecil dapat memacu laju reaksi, enzim sangat peka terhadap faktor-faktor yang menyebabkan denaturasi, seperti suhu dan pH (Susanti & Fibriana, 2017).

### 2.2.2. Penggolongan Enzim

Enzim digolongkan ke dalam kelas utama berdasarkan tipe reaksi yang dikatalis dan beberapa sub kelas seperti yang tercantum dalam Tabel 1 dan 2 dibawah ini

**Tabel 1.** Klasifikasi Enzim Berdasarkan Tipe Reaksi (Risnoyatiningasih, 2008).

Kelas	Kelas Enzim	Tipe Reaksi
1	Oksidoreduktase	Reaksi reduksi oksidasi (transfer elektron dari satu substrat ke substrat lainnya)
2	Transferase	Transfer atom atau gugus dari satu substrat ke substrat lain
3	Hidrolase	Reaksi hidrolisis (pemecahan ikatan karena adanya air)
4	Liase	Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap(adisi) atau pemutusan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi
5	Isomerase	Reaksi isomerisasi (penyusunan ulang atom-atom substrat)
6	Ligase	Pembentukan ikatan C-C, C-S, C-O, dan C-N diikuti dengan pemutusan isofosfat ATP

**Tabel 2. Klasifikasi Subkelas Enzim.**

Kelas	Subkelas	Tipe Reaksi yang dikatalis
Oksidoreduktase	Oksidase Reduktase Dehidrogenase	Oksidasi substrat Reduksi substrat Pelepasan atom hydrogen( $H_2$ ) Sehinggaterbentuknya ikatan rangkap
Transferase	Transaminase Kinase	Transfer gugus amino antara substrat Transfer gugus fosfat antara substrat
Hidrolase	Lipase Protonase Nuklenase	Hidrolisis gugus ester dalam lipid Hidrolisis gugus amida dalam protein Hidrolisis gugus fosfat dalam lasam nukleat
Liase	Dehidrase Dekarboksilase	Kehilangan air Kehilangan karbondioksida
Isomerase	Epimerase	Isomerisasi pada pusat kiral substra
Ligase	Sintetase Karboksilase	Pembentukan ikatan baru dengan melibatkan ATP Pembentukan ikatan baru antara substrat dan $CO_2$ dengan melibatkan ATP

### 2.1.3. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Dalam menjalankan perannya sebagai katalis, kerja enzim dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu:

a. Suhu

Suhu sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim, pada suhu yang rendah reaksi enzimatik berlangsung lambat, sedangkan kenaikan suhu akan mempercepat reaksi hingga suhu optimum tercapai dan reaksi enzimatik maksimum. Tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi hingga melebihi optimumnya akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim (kerusakan struktur enzim).

b. pH

Setiap enzim memiliki pH optimum yang khas, yaitu pH yang menyebabkan aktivitas maksimal. pH optimum enzim tidak perlu sama dengan pH lingkungan normalnya, dengan pH yang mungkin sedikit diatas atau dibawah pH optimum.

c. Konsentrasi Enzim dan Substrat

Kecepatan suatu reaksi yang menggunakan enzim bergantung pada konsentrasi enzim tersebut. Pada konsentrasi substrat tertentu kecepatan reaksi bertambah seiring dengan bertambahnya konsentrasi enzim (Wuryanti, 2004).

d. Aktivator dan Inhibitor

Aktivator merupakan molekul yang mempermudah ikatan antara enzim dengan substratnya, misalnya ion klorida yang bekerja pada enzim amilase. Sedangkan inhibitor merupakan suatu molekul yang menghambat kerja enzim yang dapat menghasilkan produk bersama substrat melalui molekul yang dapat berikatan dengan enzim (Wuryanti, 2004).

e. Induser dan Repressor

Induser merupakan suatu zat yang dapat meningkatkan kerja mikroorganisme dalam memproduksi enzim tertentu. Misalnya pada produksi enzim lipase, biasanya induser yang digunakan berupa minyak, lemak atau asam lemak seperti minyak kelapa sawit. Repressor pada produksi enzim lipase ada berupa

sumber karbon yang sederhana seperti monosakarida dan disakarida (Murni *et al.*, 2011).

#### **2.1.4. Isolasi dan Pemurnian Enzim**

Isolasi dan pemurnian enzim terdiri dari beberapa metode yaitu diantaranya:

a. Ekstraksi

Ekstraksi enzim dilakukan pada suhu yang rendah dan pH yang sesuai dengan jenis enzim yang akan diisolasi yang bertujuan untuk mempertahankan struktur dan fungsi biologinya. Hal tersebut disebabkan karena enzim merupakan kelompok biomakromolekul yang tidak stabil jika di luar sel (Satwika, 2010).

b. Sentrifugasi

Sentrifugasi adalah sebuah proses pemisahan partikel padat dari cairan sesuai dengan prinsip gravitasi dan sentrifugal di mana kerapatan partikel padat harus lebih besar dari kepadatan cairan, sehingga partikel padat dipisahkan dari partikel cair. Pada pemisahan padat – cair, partikel padat akan terpisah pada bagian terluar sentrifuge, cairan dengan densitas lebih tinggi juga akan terpisah di luar sentrifuge, hal ini disebabkan oleh gravitasi. Semakin besar kepadatannya, semakin banyak besarnya gaya gravitasi yang diberikan (Manurung & Saptini, 2020)

c. Fraksinasi Ammonium Sulfat

Fraksinasi ammonium sulfat merupakan salah satu dari teknik pemurnian enzim yang banyak digunakan. Fraksinasi didasarkan oleh pengendapan protein karena interaksi antara gugus polar dengan molekul air, molekul protein dengan garam dan gaya tolak-menolak antar protein yang muatan sama. Pada tahap *salting in* yaitu peningkatan kelarutan protein dan *salting out* yaitu penurunan kelarutan protein yang diakibatkan oleh penambahan garam dengan konsentrasi tertentu (Arafah, 2016).

#### d. Dialisis

Dialisis adalah metode dapat digunakan untuk meningkatkan kemurnian suatu enzim setelah dilakukanya proses fraksinasi garam. Dalam proses dialisis, membran semi permeable digunakan untuk memisahkan molekul besar dan molekul kecil. Peningkatan kemurnian enzim setelah proses dialisis dengan pengendapan garam ammonium sulfat pada saturasi 70% memiliki tingkat kemurnian 4,70 kali dibandingkan dengan supernatan selulase, kemudian dilakukan dialisis untuk kemurnian meningkat menjadi 21,25 kali dibandingkan dengan supernatan (Ratnayani *et al.*, 2021).

## 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 (Sholeha & Agustini, 2021). Lipase ditemukan sebagai enzim ekstraseluler yang dihasilkan dari berbagai mikroorganisme, mulai dari tanaman, hewan serta mikroba seperti bakteri, actinomycetes, yeast, dan kapang (Falony *et al.*, 2006). Mikroorganisme dapat digolongkan menjadi 3 berdasarkan suhu optimumnya yaitu psikrofilik (14°C-20°C), mesofilik (30°C-40°C), dan termofilik (42°C-100°C). Pada mikroba mesofilik dapat bertahan hidup pada pH berkisar antara 5,5 hingga 8, spesies bakteri mesofilik diantaranya *Bacillus*, *Clostridium*, *Pasteurianum*, *Staphylococcus aureus* (Aslim *et al.*, 2002).

Enzim lipase dapat berkembang pesat dalam bidang bioteknologi, sehingga lipase banyak digunakan sebagai biokatalisator didalam modifikasi minyak dan lemak . Enzim lipase dapat diisolasi dari mikroba, tumbuhan, dan hewan (Firdaus *et al.*, 2017). Namun hanya lipase dari mikroba yang banyak digunakan di dalam industri karena sifat-sifat enzim dan spesifik substratnya (Ramakrishnan *et al.*, 2013). Lipase yang berasal dari hewan dapat diperoleh pada pankreas sapi, domba dan babi. Lipase yang berasal dari hewan sangat rentan terhadap residu pembawa yang berupa hormon dan virus yang berasal dari hewan asalnya (Vakhlu & Kour,

2006). Sedangkan lipase dari tumbuhan jarang dimanfaatkan karena prosesnya yang rumit dan hasilnya sangat sedikit (Souissi *et al.*, 2009).

Lipase sangat lambat bekerja pada larutan lemak dalam air, tetapi dalam keadaan emulsi, hidrolisis lipase sangat cepat. Lipase yang mempunyai sifat spesifik bergantung pada substrat asalnya, pH dan substrat lipase sangat bergantung pada keaktifan optimum lipase. Lipase dari bakteri aktif pada umumnya memiliki pH basa, sehingga perlu terus dipelajari tentang faktor-faktor penting seperti kondisi pertumbuhan, cara isolasi, serta cara pemurniannya yang dilakukan sehingga dapat memperoleh lipase dengan kemurnian tingkat tinggi (Vieille & Zeikus, 2001). Lipase dikenal sebagai katalis yang dapat digunakan pada reaksi chemo-, region-, dan enantio-selektif. Lipase sangat dikenal karena kemudahan penanganannya, substrat yang toleransinya luas dan stabilitasnya yang tinggi terhadap suhu tinggi dan kehadiran pelarut organik (Kumar *et al.*, 2016).

### **2.2.1. Aplikasi Enzim Lipase**

Potensi aplikasi lipase yang tak terbatas terlihat dalam produksi biofuel, senyawa sintesis organik, deterjen, parfum, kosmetik, kulit, obat-obatan enantiopure, diagnostik medis, makanan, dan pakan. Pemilihan lipase untuk masing-masing aplikasi ini didasarkan pada spesifisitas dan stabilitasnya dalam sistem pelarut yang berbeda (Salihu & Alam, 2015). Lipase juga dieksploitasi sebagai katalis yang harganya relative murah dan diaplikasikan dalam industri yang lebih modern, seperti kue, deterjen, dan bahkan sebagai biokatalis dalam proses pembuatan energi alternatif untuk mengubah minyak nabati menjadi bahan bakar. Penggunaan enzim lipase dalam pengolahan biodiesel menggantikan katalis kimia memiliki keunggulan yaitu lebih ramah lingkungan dan aman. Aplikasi industri lipase membutuhkan proses intensifikasi untuk pengolahan terus menerus menggunakan alat-alat seperti microreactors aliran kontinu pada skala kecil. Aplikasi lipase dalam dunia industri dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Aplikasi enzim lipase dalam dunia industri (Susanti & Fibriana, 2017).

Industri Aksi enzim lipase	Aksi enzim lipase	Produk/ Aplikasi
Deterjen	Hidrolisis lemak	Penghapusan noda minyak dari kain
Produk susu	Hidrolisis lemak susu, pematangan keju	Pengembangan agen penyedap dalam susu, keju, dan mentega
Makanan Bakery	Modifikasi lemak mentega	Rak-hidup perpanjangan
Minuman	Peningkatan rasa	Minuman beralkohol
Dressing makanan	Peningkatan aroma	Mayones dan saus
Daging dan ikan	Transesterifikasi	Produk daging dan ikan; penghilangan lemak
Lemak dan minyak	Pengembangan rasa	Cocoa butter, margarin, asam lemak
Bahan kimia	Transesterifikasi; hidrolisis	Gliserol, mono dan digliserida
Farmasi	Enantioselectivity, sintesis	Blok bangunan kiral, Lipid khusus, obat untuk membantu pencernaan
Kosmetik	Transesterifikasi, hidrolisis	Pengemulsi, pelembab kulit dan krim matahari, cokelat, minyak mandi, dll
Kulit	Perpaduan	Produk kerajinan kulit
Kertas	Hidrolisis	Kertas dengan peningkatan kualitas
Pembersihan dan pengendalian polusi	Hidrolisis	Penghapusan lemak, untuk menghapus noda dan menghidrolisis minyak dan lemak
Agro-kimia	Hidrolisis dan transesterifikasi minyak dan lemak	Herbisida seperti phenoxypropionate
Surfaktan		Poligliserol dan asam lemak karbohidrat ester digunakan sebagai deterjen industri dan emulsifier dalam formulasi makanan seperti saus dan es

		krim
Industri bahan bakar	Esterifikasi	Produksi biodiesel

### 2.2.2. Uji Aktivitas Lipase

Aktivitas enzim adalah besarnya kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dengan unit/mL menit. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan 1  $\mu\text{mol}$  karbon diubah menjadi 1  $\mu\text{mol}$  produk per menit pada kondisi tertentu sehingga pengertian aktivitas enzim lipase adalah jumlah yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1  $\mu\text{mol}$  ikatan per menit pada kondisi pengujian. Ada beberapa cara untuk menentukan aktivitas enzim, yang paling umum digunakan yaitu metode titrimetri dan metode spektrofotometri (Sholeha & Agustini, 2021).

Metode titrimetri cukup akurat tetapi juga mempunyai kekurangan, kekurangannya yaitu harus terdapat indikator dan reaksi harus berlangsung secara stokiometri, sedangkan pada metode spektrofotometri memiliki keunggulan lebih akurat karena angkanya terbaca langsung dan di catat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk digital (Yahya, 2013). Aktivitas lipase yang diukur berdasarkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang 410 nm dengan menunjukkan pelepasan senyawa *p*-nitrofenol (*p*-NP) dari substrat *p*-NPP. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversi menjadi kadar *p*-NP ( $\mu\text{mol}$ ) dengan cara interpolasi ke kurva standar. Sebagai standar digunakan senyawa *p*-nitrofenol dengan seri konsentrasi 2-12  $\mu\text{g/mL}$  yang diukur pada panjang gelombang 410 nm (Septiani, 2019).

### 2.2.3. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Metode lowry merupakan metode pengembangan dari metode biuret. Reaksi yang terlibat adalah reaksi kompleks Cu(II) protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) menjadi Cu(I). Ion  $\text{Cu}^+$  kemudian akan mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks phosphomolybdat-phosphotungstat



(phosphomolybdate), menghasilkan *hetero-polymolybdenum* blue yang diakibatkan oleh reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu yang akan memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara Kalorimeter (Purwanto, 2014).

#### **2.2.4. Kestabilan Enzim**

Stabilitas enzim merupakan sifat penting yang harus dimiliki oleh enzim, sebagai biokatalisator sehingga stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai aktivitas enzim selama penggunaan serta penyimpanan enzim tersebut, serta kestabilannya terhadap senyawa yang bersifat merusak seperti pelarut (asam, basa) dan oleh pengaruh suhu dan pH (Kurnia, 2010). Stabilitas enzim terhadap pH tergantung oleh beberapa faktor antara lain, suhu, kekuatan ion, dan komposisi kimia *buffer* yang digunakan. Terdapat dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang mempunyai stabilitas tinggi, yaitu menggunakan enzim yang memiliki stabilitas ekstrem alami dan mengusahakan peningkatan stabilitas enzim yang secara alami kurang atau tidak stabil (Kurnia, 2010). Adanya perubahan konsentrasi substrat atau pH lingkungan akan mengakibatkan aktivitas enzim ikut mengalami perubahan, karena itu setiap enzim yang mempunyai pH dan temperatur tertentu yang menyebabkan aktivitasnya mencapai keadaan optimum. Kondisi pH dan temperatur yang optimum akan mendukung enzim dalam melakukan katalisa suatu reaksi dengan baik sedangkan temperatur dan pH yang kurang sesuai akan mengakibatkan kerusakan atau tidak aktifnya protein dalam suatu enzim.

Ketahanan terhadap asam dihasilkan oleh adaptasi bakteri mikroorganisme lipase dengan meningkatkan permeabilitas selektif membran terhadap proton dan penyesuaian membran (Salihu & Alam, 2015). Lipase yang memiliki toleransi terhadap basa dapat digunakan dalam formulasi detergen karena sifatnya yang dapat memecah lemak (Romdhane, 2010). Sifat toleransi terhadap pelarut organik yang dipengaruhi oleh efek kumulatif dari konstanta dielektrik, momen dipol, pengikatan hidrogen, poliarisasi dan nilai log P, perlakuan lipase dalam pelarut organik terkait dengan kapasitas dalam reaksi sintesis dan hidrolisis. Telah di

ketahui bahwa *Bacillus sp* sangat stabil dalam pelarut organik hidrofobik dan aktivitasnya sedikit meningkat dengan adanya 10-50% ( $v/v$ ) dari alkane rantai pendek seperti benzen dan toluena (Kumar *et al*, 2016b). Pelarut organik dengan nilai log P>4 memiliki aktivitas katalis yang tinggi, sedangkan pada pelarut dengan nilai log P antara 2 sampai 4 memiliki aktivitas yang rendah terlebih pelarut organik yang memiliki nilai P<2, pelarut dengan nilai P<2 cenderung kurang menstimulasi pembukaan *lid* pada enzim lipase sehingga aktivitas katalis menjadi rendah (Rahman *et al.*, 2006). Nilai Log P pelarut organik dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Nilai log P beberapa pelarut organik (Masomian *et al.*, 2018).

Pelarut	Log P
Control	-
Glycerol	-3.0
DMSO	-1.3
Methanol	-0.76
Ethanol	-0.18
1-Propanol	0.28
Pyridine	0.77
1-Butanol	0.84
Propyl acetate	1.2
Isoamyl alcohol	1.36
Benzene	2.0
Toluene	2.5
Xylene	3.15
Hexane	3.9
Isooctane	4.7
Octane	5.2
Decane	5.8
n-Tridecane	7.33
n-Tetradecane	7.6
n-Hexadecane	8.86

### 2.3. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri merupakan salah satu metode instrumen yang paling sering diterapkan dalam analisis kimia untuk mendeteksi senyawa (padat/cair) berdasarkan absorban foton. Sampel biasanya harus diperlakukan atau derivatasi

pada panjang gelombang foton 200 nm-700 nm agar sampel dapat menyerap foton, misalnya pada sampel penambahan reagen dalam pembentukan garam kompleks dan lain sebagainya (Irawan, 2019). Instrument Spektrofotometer UV-Vis atau spektrofotometer ultraviolet-sinar tampak memanfaatkan sinar dengan panjang gelombang 180-380 nm untuk daerah UV dan 380-780 nm untuk daerah visible atau sinar tampak. Spektrofotometer ini jenisnya terdiri berkas tunggal (single beam) dan berkas rangkap (double beam). Perbedaan pada keduanya adalah pada spektrofotometer double beam pengukuran dapat dilakukan secara bersamaan antara kuvet yang berisi larutan contoh atau standar dan kuvet yang berisi blanko dalam satu ruang sehingga pembacaan serapan zat tidak dipengaruhi oleh perubahan tegangan listrik karena blanko dan zat diukur pada saat yang bersamaan (Warono & Syamsudin, 2013).

Konsentrasi didalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorben pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007). Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$A = a \times b \times c$$

Keterangan :

A=absorban

a=absorptivitas molar

b=tebal kuvet (cm)

c=konsentrasi

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis yakni cahaya yang berasal dari lampu deuterium maupun wolfram diteruskan melalui lensa menuju ke manokromator pada spektrofotometer dan fotometer.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2022-Juni 2023 dilaboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas (kaca arloji, gelas kimia 1000 mL, gelas ukur 1000 mL, labu ukur 10 mL, erlenmayer 250 mL, erlenmayer 500 mL, corong gelas, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri), *hot plate*, neraca analitik, bunsen, termometer 100 °C, jarum ose, pH meter, *ice box*, baskom plastik, *waterbath incubator*, oven, *shaker*, *micropipette*, tip, *magnetic stirrer*, *autoclave* model S-90N, sentrifuga, tabung sentrifuga, *laminar air flow* (LAF) CRUMA model 9005-FL, dan spektrofotometer UV-Visible Agilent Cary 100.

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini, meliputi bakteri mesofilik isolat lokal LKM G1 dari pengomposan limbah domestik (Fransiska, 2019). *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), minyak zaitun bertolli, minyak kelapa sawit, tween 80, *p*-nitrofenol (*p*-NP), *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP), gum arab, isopropanol, *tris* HCl, NaOH, HCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>, triton –X 100, CuSO<sub>4</sub>, Na-K tartrat, reagen folin –Ciocelteau, akuades, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, metanol, butanol, etil asetat, kloroform, benzena, heksana, kapas, kertas saring, *aluminium foil*, kasa, plastik *wrap*, dan spirtus.

### 3.3. Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini diantaranya persiapan, pembuatan media, peremajaan bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 penghasil lipase, produksi lipase, pemurnian lipase, karakterisasi enzim lipase pH dan suhu optimum serta uji kestabilan enzim lipase dalam berbagai variasi pH, suhu, dan pelarut organik.

#### 3.3.1. Tahap Persiapan

##### a. Persiapan Alat

Peralatan gelas yang akan digunakan dicuci bersih, dikeringkan, dan disterilisasi agar alat-alat terhindar dari kontaminasi mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Seluruh kegiatan secara aseptik dilakukan didalam *Laminar Air Flow* (LAF).

#### 3.3.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media padat/agar miring, pembuatan media cair, dan pembuatan media kultur. Pembuatan media dapat dilakukan dengan cara berikut:

##### a. Pembuatan Media Padat/ Media Agar Miring

Media padat yang digunakan adalah medium *Nutrient Agar* (NA) untuk media pertumbuhan bakteri. Media padat dibuat dengan cara menimbang 2,8 gram NA, lalu ditambahkan kedalam akuades 100 mL dan dipanaskan hingga larut. Setelah itu media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

##### b. Pembuatan Media Cair

Media cair yang digunakan yaitu medium *Nutrient Broth* (NB) untuk media pertumbuhan bakteri. Media cair yang dibuat dengan cara menimbang 1,3 gram NB, lalu ditambahkan ke dalam 100 mL akuades dan dipanaskan hingga larut. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

c. Pembuatan Media Kultur

Media kultur yang akan digunakan sebagai starter dan kultur disiapkan dengan cara ditimbang sebanyak 1,3 gram *Nutrient Broth* (NB) kemudian dilarutkan dalam 100 mL *buffer* fosfat pH 6. Lalu ditambah 2 tetes tween 80 dan 2 mL minyak zaitun. Media disterilisasi di *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

### 3.3.3. Peremajaan Bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1

Isolat LKM G1 diambil 1 ose dimasukkan ke dalam media NB, kemudian dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 120, lalu dituang ke dalam media NA pada cawan dan dibiakan diinkubasi selama 24 jam kemudian digores ke media NA miring dalam tabung secara aseptik, lalu dibiakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dan disimpan sebagai isolat stok.

### 3.3.4. Produksi Enzim

Isolat LKM G1 dalam media agar miring diambil sebanyak 2 ose dimasukkan dalam 20 mL starter kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Sebanyak 2 % starter dipindahkan ke media kultur (medium fermentasi) dan diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 120 rpm selama 60 jam pada pH 6 dan penambahan induser minyak kelapa 4% (Husna, 2022). Setelah proses inkubasi selesai, media kultur yang berisi bakteri di sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Filtrate

hasil sentrifugasi disebut ekstrak kasar enzim, kemudian ditentukan aktivitas lipasanya menggunakan metode spektrofotometri dengan substrat *p*-NPP dan kadar protein enzim menggunakan metode Lowry (Rait, 2022).

### 3.3.5. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim lipase hasil produksi dilakukan dengan 2 tahapan sebagai berikut:

a. Fraksinasi Ammonium Sulfat

Proses pemurnian sampel ekstrak kasar enzim lipase diawali dengan fraksinasi bertingkat menggunakan garam ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan (0-20)%, (20-40)%, (40-60)%, (60-80)%, dan (80-100)%. Fraksinasi dengan ammonium sulfat dilakukan dengan cara menambahkan ammonium sulfat perlahan-lahan kedalam larutan ekstrak kasar enzim dalam gelas beaker sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Pengadukan diusahakan sedemikian rupa sehingga tidak menimbulkan busa selama pengadukan kurang lebih 20 menit. Setiap endapan protein enzim yang didapat lalu dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit kemudian dilarutkan ke dalam larutan *buffer* fosfat pH 6 dengan konsentrasi 0,25 M. Setiap fraksi diuji aktivitas lipasanya menggunakan metode spektrofotometri dengan substrat *p*-NPP dan kadar protein dengan metode Lowry.

b. Dialisis

Dialisis dilakukan pada suhu dingin menggunakan pengaduk magnet. Enzim yang telah dimurnikan dengan fraksinasi ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan, lalu kantong selofan tersebut dimasukkan kedalam wadah yang berisi *buffer* fosfat pH 6 0,1 M dan diletakkan diatas pengaduk magnet. Pada saat dialisis dilakukan pergantian *buffer* setiap 4 jam agar konsentrasi ion-ion dalam kantong dialisis dapat berkurang. Proses ini dilakukan secara berulang terus sampai ion-ion dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada ion garam dalam

kantong, diuji dengan menambah larutan  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  atau  $\text{BaCl}_2$ . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih  $\text{BaSO}_4$ .

### 3.3.6. Karakterisasi Enzim

#### a. Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Enzim

Enzim yang telah dimurnikan selanjutnya dikarakterisasi pH optimumnya, yaitu pada rentang pH 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Lalu enzim hasil pemurnian parsial direaksikan dengan substrat masing-masing pH kemudian diinkubasi selama 15 menit, setelah itu ditentukan aktivitas lipasenya menggunakan metode spektrofotometri menggunakan substrat *p*-NPP.

#### b. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim

Enzim yang telah dimurnikan selanjutnya dikarakterisasi suhu optimumnya yaitu pada rentang suhu 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 °C. enzim hasil pemurnian ditambahkan substrat *p*-NPP lalu diinkubasi dengan masing-masing suhu pada pH optimumnya dan ditentukan aktivitas nya dengan metode spektrofotometri menggunakan substrat *p*-NPP (May & Herasari, 2021).

### 3.3.7. Stabilitas Enzim

#### a. Variasi pH

Efek pH pada stabilitas lipase ditentukan dengan menginkubasi enzim lipase hasil pemurnian kedalam larutan *buffer* 50 mM dengan rentang pH 5,0-10,0 kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit, ditentukan aktivitasnya menggunakan metode spektrofotometri dengan substrat paranitofenil palmitat (*p*-NPP) pada pH optimum, sebagai kontrol digunakan akuades sebagai pengganti *buffer* (Charoenpanich *et al*, 2011).



b. Variasi Suhu

Efek suhu pada stabilitas lipase ditentukan dengan mereaksikan enzim lipase hasil pemurnian dengan substrat *p*-nitrofenil palmitat pada pH optimum dalam berbagai suhu, rentang suhu yang digunakan adalah 25-50 °C. selanjutnya campuran reaksi di inkubasi pada suhu tertentu dalam *water bath* dan di uji aktivitas lipase dengan metode spektrofotometri menggunakan substrat paranitofenil palmitat (*p*-NPP). Stabilitas terhadap suhu ditentukan dengan mengukur aktivitas lipase setelah perinkubasian enzim dalam 50 Mm *buffer* pH 6 pada berbagai suhu (25-50 °C) selama 15 menit, 30 menit, 45 menit dan 60 menit. Aktivitas lipase tanpa proses inkubasi digunakan sebagai kontrol yang dimana stabilitas lipase di nyatakan dalam bentuk aktivitas relatif terhadap kontrol (Parwata, 2012).

c. Pelarut Organik

Pelarut organik yang digunakan adalah metanol, butanol, etil asetat, kloroform, benzena, dan heksana. Stabilitas lipase terhadap pelarut organik di tentukan dengan menginkubasi enzim dalam pelarut organik dengan perbandingan pelarut organik terhadap larutan enzim sebesar 1:1 (1 mL enzim dan 1 mL pelarut organik). Lalu diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37°C. Selama 30 menit (Abd Rahman *et al.*, 2010). Selanjutnya campuran larutan di tambahkan substrat *p*-NPP sebanyak 1 mL dan di shaker kembali selama 15 menit, 30 menit, 45 menit, dan 60 menit dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian campuran larutan ditentukan aktivitas enzimnya. Sebagai larutan kontrol digunakan akuades untuk menggantikan pelarut organik, stabilitas lipase terhadap pelarut organik dinyatakan dalam bentuk aktivitas relatif terhadap kontrol

Kestabilan enzim ditentukan dengan cara menghitung persen aktivitas sisa yaitu aktivitas enzim setelah perlakuan inkubasi dibagi dengan aktivitas sebelum enzim diinkubasi . enzim dapat dikatakan stabil apabila aktivitas enzim sisanya lebih dari 50% (Sukmana *et al.*, 2014).

### 3.3.8. Uji Aktivitas Enzim Lipase

#### a. Kurva Standar *p*-nitrofenol (*p*-NP)

kurva *p*-nitrofenol(*p*-NP) dibuat dengan cara : larutan *p*-NP 0,01 M dibuat dengan melarutkan 14 mg serbuk *p*-NP dengan akuades sebanyak 10 mL. larutan *p*-NP merupakan larutan stok untuk pembuatan larutan dengan konsentrasi lebih kecil . deret konsentrasi standar yang digunakan dalam penelitian ini adalah  $300\mu\text{M}$ ,  $500\mu\text{M}$ ,  $700\mu\text{M}$ ,  $900\mu\text{M}$ ,  $1100\mu\text{M}$ ,  $1300\mu\text{M}$  (Umar, 2016).

#### b. Uji Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase diukur dengan menggunakan substrat *p-nitrophenyl palmitat* dengan cara berikut:

Larutan A (15 mg *p-nitrophenyl palmitat* dilarutkan dalam 5 mL isopropanol) di campurkan kedalam larutan B (0,05 gram *Gum Arabic* dan 0,2 mL triton X-100 lalu dilarutkan dalam 50 Mm *buffer* Tris-HCL pH 8), kemudian dihomogenkan seluruh bahan hingga volume akhir 50 mL. Aktivitas lipase diukur dengan mencampur 1,8 mL larutan subtrat dengan 0,2 mL larutan enzim dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit. Lalu larutan kontrol disiapkan sebanyak 0,2 mL larutan enzim lalu ditambahkan aseton:etanol (1:1) untuk menginaktivasi enzim dan dilakukan perlakuan yang sama seperti sampel. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 410 nm (Vitisant, T *et al.*, 2013)

#### c. Uji Kadar Protein

Kadar protein enzim di tentukan dengan menggunakan metode lowry (Lowry *et al*, 1951). Adapun pereaksi yang digunakan dalam pengujian kadar protein antara lain:

Pereaksi A : 2 gram  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N

Pereaksi B : 5 mL larutan  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% ditambahkan 5 mL larutan Na(K)-tartat 1%.

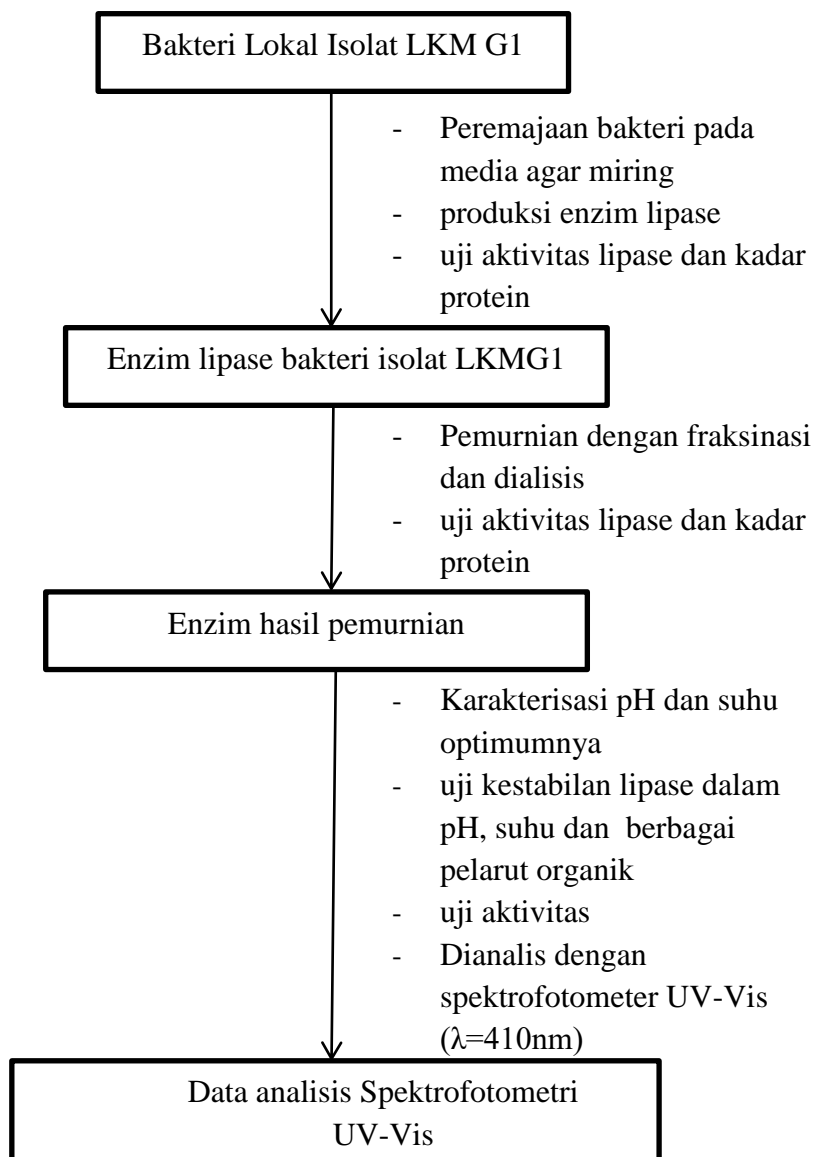
Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A

Pereaksi D: reagen *Folin-ciocalteu* diencerkan dengan akuades 1:1.

Sebanyak 0,1 mL enzim lipase ditambahkan 0,9 mL akuades lalu ditambahkan 5 mL pereaksi C kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar, lalu ditambahkan dengan cepat 0,5 mL pereaksi D kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit, setelah itu diukur pada panjang gelombang 750 nm. Sebagai larutan kontrol 0,1 mL enzim diganti dengan 0,1 mL akuades dengan perlakuan yang sama seperti sampel, untuk menentukan konsentrasi protein enzim digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

### 3.4. Skema Penelitian

Tahap-tahap penelitian yang akan dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Skema Alur Prosedur Penelitian

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan :

1. Ekstrak kasar enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 memiliki aktivitas spesifik sebesar 1082,45 U/mg, mengalami peningkatan 4 kali pada tahap pemurnian dialisis yang memiliki aktivitas spesifik 4340,30 U/mg. Enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 memiliki pH optimum pada pH 6, dan memiliki suhu optimum pada suhu 40 °C.
2. Enzim lipase dari bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 stabil pada pH 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 pada waktu inkubasi 15-30 menit. Sedangkan pada variasi suhu 25, 30, 35, 40, 45, dan 50 °C stabil pada waktu inkubasi 15-45 menit, dan pada variasi pelarut organik metanol, butanol, etil asetat, klorform, heksana, dan benzena stabil pada waktu inkubasi 15-30 menit.
3. pH 6, suhu 40 °C dan pelarut heksana relatif menstabilkan enzim lipase dari isolat lokal bakteri *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 dibandingkan dengan pH, suhu dan pelarut lainnya.

### 5.2. Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan pemurnian enzim menggunakan metode kromatografi kolom agar mendapatkan enzim lipase dengan tingkat kemurnian lebih baik dan penentuan berat molekul dari enzim serta disarankan mempelajari metode lain untuk meningkatkan kestabilan lipase dari

bakteri isolat lokal *Lysinibacillus boronitolerans* LKM G1 sehingga dapat digunakan dalam berbagai bidang industri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abd Rahman, R. N. Z. R., Ahmad Kamarudin, N. H., Yunus, J., Salleh, A. B., & Basri, M. 2010. Expression of an organic solvent stable lipase from *Staphylococcus epidermidis* AT2. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(9), 3195–3208.
- Aderiye, B., & Sulaimon, A. 2017. Optimization and Lipase Production of *Lysinibacillus sphaericus* in Domestic Oil Rich Waste Water. *Biotechnology Journal International*, 19(4), 1–12.
- Aslim, B., Yüksekdağ, Z. N., & Beyatli, Y. 2002. Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus species* isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 24–30.
- Arafah, R. A. 2016. Isolasi, Pemurnian, dan Karakterisasi Enzim A-Amilase dari Bakteri Termofil Sumber Air Panas Lejja Sulawesi Selatan dan Aplikasi dalam Hidrolisis Pati Sagu Menjadi Maltodekstrin. *Desertsi*. Universitas Hasanudin, Makasar.
- Bakir, Z. B., & Metin, K. 2016. Purification and characterization of an alkali-thermostable lipase from thermophilic *anoxybacillus flavithermus* HBB 134. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 1087–1097.
- Bharati S. Meti, S. K. J. 2021. Immobilization Optimization and Characterization of Immobilized Lipase from *Lysinibacillus macroides* FS1 for Biodiesel Production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(4), 234–245.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., & Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 19, Issue 1).
- Charoenpanich, J., Suktanarag, S., & Toobbucha, N. 2011. Production of a thermostable lipase by *Aeromonas sp.* EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *ScienceAsia*, 37(2), 105–114.

- Chavan, A., Chougale, D., & Lakshmikantha, R. Y. 2014. Mutational Study Of *Bacillus* Species For Production , Purification And Characterisation Of Lipase. *International Journal Of Pharmaceutical, Chemical And Biological Sciences*. IJPCBS 2012, 2(4), 545-551.
- Christy, M. P. B., & Kavitha, S. 2014. Role of Enzymes. *International Journal of Recent Scientific Research*, 5(6), 1181–1183.
- Falony, G., Armas, J., Mendoza, J. and Hernandez, J. 2006. Production of Extracellular Lipase From *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Biotech*, 44, 235–240.
- Firdaus, F., Dali, S., & Rusman, H. J. 2017. Imobilisasi Enzim Lipase Dedak Padi (*Oryza Sativa L.*) Pada Karbon Aktif: Karakterisasi, dan Uji Stabilitas Kerja Enzim Imobil. *Indo. J. Chem. Res.*, 5(1), 32–36.
- Gusniah, A., Veny, H., & Hamzah, F. 2020. Activity and stability of immobilized lipase for utilization in transesterification of waste cooking oil. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 15(1), 242–252.
- Hans Perdana Utomo. 2010. *Pengaruh Temperatur dan pH Terhadap Kestabilan Enzim Xilanase Termofilik Bacillus sp Hasil Fraksinasi Dengan Ammonium Sulfat*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Haniya, M., Naaz, A., Sakhawat, A., Amir, S., Zahid, H., & Syed, S. A. 2017. Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*, 16(19), 1106–1115.
- Hasna. 2012. Studi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase Candadida Ruhosa EC 3.1.1.3 Terimobilisasi Pada Matriks Ca-Alginat. *Skripsi*. Universitas Indonesia. Depok.
- Husna, Q.N. 2022. Produksi, Pemurnian, dan Karakterisasi Enzim Lipase Dari Bakteri Lokal LKM GI Toleran Pelarut Organik Asal Pengomposan Limbah Domestik. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Info, A., Jelantah, M., Lipase, E. K., & Kesambi, B. 2020. *Pembuatan Biodiesel Minyak Jelantah Menggunakan Biokatalis Ekstrak Kasar Lipase dari Biji Kesambi ( Schleicheraoleosa l )*. (Vol. 3, Issue 2622).
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(2), 1.



- Jithendar, T., Sairam, K. V. S. S., & Verma, V. 2015. Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences purification, characterization, thermostability and shelf life studies of glucose oxidase from *Aspergillus niger* PIL7. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(3), 1666–1678.
- Kasipah, C., Rismayani, S., & Nurachman, Z. 2013. Isolation and Characterization of Bacteriaproducer Extracellular Lipase Enzyme From an Activated Sludge. *Jurnal Ilmiah Arena Tekstil*, 28(1), 1–7.
- Kumar, A., Dhar, K., Kanwar, S. S., & Arora, P. K. 2016a. Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. *Biological Procedures Online*, 18(1).
- Kurnia, D. 2010. Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Apergillus niger* sebagai Biokatalis Pada Proses Gliserolisis untuk menghasilkan Monoasilgliserol. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Lehninger, A. L. 2005. Dasar-Dasar Biokimia. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Liu, S., Fang, Y., Xu, W. Lu, M., Wang, S., and Chen, L. 2009. Screening and Identification of a Novel Organic Solven-Stable Lipase Producer. *Annual Microbiology*. 59: 539
- Lotti, Y., and Chen, J. Y. 2015. Enzyme Immobilization on Cellulose Matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. 31(6): 553-567.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Manurung, H. E. F., & Saptini, Y. 2020. Pada Proses Sentrifugasi Pengujian Kadar Gel Berdasarkan Sni 8385 : 2017. *Prosiding PPIS, 2017*, 141–146.
- Masomian, M., Rahman, R. N. Z. R. A., & Salleh, A. B. 2018. A novel method of affinity tag cleavage in the purification of a recombinant thermostable lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. *Catalysts*, 8(10), 1–23.
- May, D., & Herasari, D. 2021. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi Optimization of Lipase Production from Local Bacteria Isolate with H* ). 24(2), 58–61.
- Murni, S. W., Kholisoh, S. D., L., T. D., & M., P. E. 2011. Lipase Production, Characterization, and Isolation from *Aspergillus niger*. *Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, 1–7.

- Nawani, N., Singh, R., & Kaur, J. 2006. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus sp*: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5), 559–565.
- Nenobahan, M. A., Ledo, M. E. S., & Nitsae, M. 2020. Pembuatan Biodiesel Minyak Jelantah Menggunakan Biokatalis Ekstrak Kasar Lipase Dari Biji Kesambi (*Schleichera oleosa L.*). *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 3(1), 20–25
- Nopiani, N., As, Y., & Hadi, S. 2017. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Jurnal Analis Kesehatan*, 5(1), 504–510.
- Parwata, I dan Martiningsih, N. 2014. Lipase Alkali dan Stabil Alkohol dari Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali. *Seminar Nasional Riset Inovatif II*, 900–906.
- Parwata, I. P. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Lipase Stabil Pelarut Organik dari *Pseudomonas stutzeri* Isolat Kawah Lumpur Bledug Kuwu Purwodadi Jawa Tengah. Disertasi. Intitut Teknologi Bandung. Bandung.
- Parwata, I. P., Asyari, M., & Hertadi, R. 2014. Organic solvent-stable lipase from moderate halophilic bacteria *Pseudomonas stutzeri* isolated from the mud crater of Bleduk Kuwu, Central Java, Indonesia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(1), 31–40.
- Pham, V. H. T., Kim, J., Chang, S., & Chung, W. 2021. Investigation of lipolytic-secreting bacteria from an artificially polluted soil using a modified culture method and optimization of their lipase production. *Microorganisms*, 9(12).
- Purwanto, M. G. M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. In *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi* (Vol. 7, Issue 2, pp. 64–71).
- Raharja, S., Suparno, O., Mangunwidjaja, D., Herdiyani, A., Oktavia, T., & Najah, Z. 2012. Penambahan pelarut organik pada media untuk hidrolisis enzimatik minyak ikan menggunakan lipase dari *Aspergillus niger*. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 22(3), 140–150.
- Rahman, R. N. Z. R. A., Baharum, S. N., Salleh, A. B., & Basri, M. 2006. S5 lipase: An organic solvent tolerant enzyme. *Journal of Microbiology*, 44(6), 583–590.

- Ramakrishnan, V., Goveas, L. C., Narayan, B., & Halami, P. M. 2013. Comparison of Lipase Production by *Enterococcus faecium* MTCC 5695 and *Pediococcus acidilactici* MTCC 11361 Using Fish Waste as Substrate: Optimization of Culture Conditions by Response Surface Methodology. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–9.
- Ratnayani, O., Elvira, P. Y., & Wirajana, I. N. 2021. Fraksinasi selulase mikroba selulolitik dengan amonium sulfat dan amobilisasi pada agar-agar komersial. *Journal of Applied Chemistry*, 9(1), 1–9.
- Risnoyatiningsih, S. 2008. Yellow sweet potato starch hydrolysis into glucose enzymatically. *J Teknik Kimia*, 3(1), 215–223.
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41.
- Rohman, A. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Kurnia, D. 2010. Studi Aktivitas Enzim Lipase dari *Apergillus niger* sebagai Biokatalis Pada Proses Gliserolisis untuk menghasilkan Monoasilgliserol. Tesis. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Salihu, A., & Alam, M. Z. 2015. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry*, 50(1), 86–96.
- Satwika, R. 2010. Kombinasi Metode Sonikasi, Pemanasan dan Fraksinasi Amonium Sulfat untuk Ekstraksi Enzim Posfolipase A2 dari *Acanthaster planci*. Fakultas Teknik UI. Depok.
- Sedijani, P., Rasmi, D. A. C., Kusmiyati, K., Eniarti, M., & Rohimah, S. 2022. Isolation and Activity Test of Lipolytic Bacteria on Different pH and Temperature. *Jurnal Biologi Tropis*, 22(3), 1084–1091.
- Sahoo, D., Rajesh, D., Aradhana, S., Kalpana, S., Anshuman, S., and Enketeswara. 2020. Characterization of Novel Metagenomic-Derived Lipase from Indian Hot Spring. *International Microbiology*. 23
- Selvia, R. I., Wuryanti, W., & Sriatun, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase dari Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik berasal dari Kupu-kupu (*Lepidoptera*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 16(3), 97–101.
- Septiani, S. 2019. Karakterisasi Lipase Termotabil (Isolat A196) Berdasarkan Parameter Temperatur Dan Ph Pada Industri Makanan. *Lantanida Journal*, 7(1), 49.
- Sharma, S., & Kanwar, S. S. 2014. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 2014.

- Sheira Rait, A., Nurhasanah, & Bahri, S. 2022. Pemurnian Parsial Enzim Lipase dari Bakteri Isolat Lokal LKMA3 dan Penentuan Aktivasnya dengan Metode Spektrofotometri. *Seminar Nasional FMipa, SN-SMIAP-VI. 1-5*.
- Sholeha, R., & Agustini, R. 2021. Lipase biji-bijian dan karakteristiknya. *Journal of Chemistry, 10(2)*, 168–183.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-ellouz, Y., & Nasri, M. 2009. Production of lipase and biomass by *Staphylococcus simulans* grown on sardinella (*Sardinella aurita*) hydrolysates and peptone. *African Journal of Biotechnology, 8(3)*, 451–457.
- Su'i, M and sSuprihana. 2013. Lipase Frctionation of Coconut Endosprn by Salyin Out Method. *Agritech, 33(4)*, 477-383
- Sukmana, M. E., Sutrisno, & Roosdiana, A. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama Penyimpanan terhadap Kestabilan Aktivitas Xilanase dari *Trichoderma viride*. *Kimia Student Journal, 2(1)*, 386–392.
- Sukmawati, & Simamora. 2020. Median Volume 12 Nomor 1 Bulan Februari 2020 Identifikasi dan Karakterisasi Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Median Volume 12 Nomor 1 Bulan Februari 2020. *Median, 12(1)*, 28–37.
- Supriyatna A, Amalia D, Jauhari AA, Holydaziah D. 2015. Aktivitas enzim amilase, lipase, dan protease dari larva. *J Istek 9*: 18-32.
- Supriyatna, A., & Ukit, U. 2016. Screening and Isolation of Cellulolytic Bacteria from Gut of Black Soldier Flays Larvae (*Hermetia illucens*) Feeding with Rice Straw. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education, 8(3)*, 314.
- Susanti, R., & Fibriana, F. 2017. Teknologi enzim. *Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang*, 210.
- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Subtitute dan Karakterisasi Lipasnya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura 2013*, 134–143.
- Tri Panji., C. Palilingan, S., & Artika, I. M. 2014. Optimasi Produksi Enzimatis Diasilgliserol Melalui Gliserolisis Kontinu. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan, 25(1)*, 16–22.
- Umar, R. L. A. 2016. *Optimasi Kondisi Lingkungan Media Kawasan Mangrove Wonorejo Surabaya W 3 . 8 Dari Kawasan Mangrove Wonorejo Tugas Akhir*. Institut Sepuluh November. Surabaya.

- Vakhlu, J., & Kour, A. 2006. Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(1), 69–85.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. 2001. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43.
- Vitisant, T., Leelaruji, W., Chulalaksananukul, S., Wattayakorn, G and Chulalaksananukul, W. 2013. A High-activity Lipolytic Yeast Isolated From Sichang Island, Thailand. *Maejo Int. J. Sci. Technol*, 7, 96–105.
- Wahyudi, S.T. 2014. Studi Stabilitas dan Aktivitas Lipase Papandayan Pada Berbagai Suhu, Pelarut Organik dan Keadaan Teramobil. Disertasi. Intitut Teknologi Bandung. Bandung.
- Wahyuningsih, Supriyo, E., & Broto, R. T. W. 2015. Biokatalis Lipase Rhizopus Oryzae Pada Reaksi Transesterifikasi Lipid Terstruktur Kaya Asam Lemak. *Metana*, 11(02), 7–12.
- Warono, D., & Syamsudin. 2013. Analisis Kimia Kuantitatif. Ed ke-5. *Konversi*, 2(2), 57–65.
- Wuryanti, W. 2004. Isolasi dan Penentuan Aktivitas Spesifik Enzim Bromelin dari Buah Nanas (*Ananas comosus L.*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 7(3), 78–82.
- Yahya, S. 2013. Spektrofotometri UV-Vis. Erlangga. Jakarta.