

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP E1
DENGAN SUBSTRAT *PALM OIL MILL EFFLUENT* (POME)
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)**

(Skripsi)

Oleh

**ANGGUN NADHIFAHMIA AZIZAH
NPM 2017011006**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP E1 DENGAN SUBSTRAT *PALM OIL MILL EFFLUENT* (POME) MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)

Oleh

ANGGUN NADHIFAHMIA AZIZAH

Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim hidrolase yang mampu mengkatalisis hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Lipase bakteri digunakan secara luas di bidang industri. Dalam memproduksi enzim lipase, diperlukan adanya kondisi optimum seperti waktu pertumbuhan, konsentrasi substrat, pH, konsentrasi inokulum, dan kecepatan agitasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum enzim lipase dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dengan pemanfaatan substrat POME.

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi peremajaan bakteri, penentuan kondisi optimum yang dilakukan melalui dua pendekatan yaitu secara konvensional untuk menentukan waktu pertumbuhan dan konsentrasi substrat POME dan secara statistik menggunakan RSM 3 level faktorial, yaitu pH, konsentrasi inokulum, dan kecepatan agitasi, serta produksi enzim lipase dengan menggunakan kondisi optimum yang telah didapatkan.

Hasil penelitian diperoleh kondisi optimum produksi enzim lipase dengan pendekatan konvensional yaitu pada waktu pertumbuhan 72 jam dan konsentrasi POME 8%, sedangkan secara statistik dengan RSM diperoleh kondisi optimum pada pH 7, konsentrasi inokulum 1%, dan kecepatan agitasi 155 rpm dengan model polinomial $\hat{y} = 38,44 + 4,33A - 0,6910B - 0,5900C - 5,49AB + 2,67AC - 2,51BC - 24,12A^2 + 13,04B^2 - 11,26C^2$. Hasil produksi ekstrak kasar enzim lipase pada waktu pertumbuhan 72 jam, konsentrasi POME 8%, pH 7, konsentrasi inokulum 1%, dan kecepatan agitasi 155 rpm didapatkan aktivitas unit enzim lipase sebesar 55,8072 U/mL, kadar protein sebesar 1,0829 U/mg, dan aktivitas spesifik enzim lipase sebesar 51,5356 U/mg.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, enzim industri, lipase, POME, RSM

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF LIPASE ENZYME PRODUCTION FROM *Bacillus cereus* ALP E1 WITH PALM OIL MILL EFFLUENT (POME) SUBSTRATE USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)

By

ANGGUN NADHIFAHMIA AZIZAH

Lipase (EC 3.1.1.3) is a hydrolase enzyme that can catalyze the hydrolysis of triglycerides into glycerol and free fatty acids. Bacterial lipase is widely used in industry. In producing the lipase enzyme, optimum conditions are required such as growth time, substrate concentration, pH, inoculum concentration, and agitation rate. This research aims to obtain optimal conditions for the lipase enzyme from the *Bacillus cereus* ALP E1 bacteria by utilizing the POME substrate.

The procedures in this research carried out in this research include rejuvenating the bacteria, determining optimum conditions which are carried out using two conventional approaches, conventionally to determine growth time and POME substrate concentration and statistically using RSM 3 factorial levels, namely pH, inoculum concentration, and agitation rate, as well as lipase enzyme production using the optimal conditions that have been obtained.

The research results obtained optimum conditions for lipase enzyme production using the conventional approach at growth time of 72 hours and POME substrate concentration of 8%, while statistically with RSM the optimum conditions were obtained at pH 7, inoculum concentration 1%, and agitation rate 155 rpm with polynomial model $\hat{y} = 38,44 + 4,33A - 0,6910B - 0,5900C - 5,49AB + 2,67AC - 2,51BC - 24,12A^2 + 13,04B^2 - 11,26C^2$. The results of the production of the crude extract of lipase enzyme in growth time of 72 hours, POME substrate concentration of 8%, pH 7, inoculum concentration 1%, and agitation rate 155 rpm showed that the lipase enzyme unit activity of 55.8072 U/mL, protein content of 1,0829 mg/mL and the specific activity of the lipase enzyme of 51.5356 U/mg.

Keywords: *Bacillus cereus*, industrial enzymes, lipase, POME, RSM

**OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP E1
DENGAN SUBSTRAT *PALM OIL MILL EFFLUENT* (POME)
MENGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)**

Oleh

ANGGUN NADHIFAHMIA AZIZAH

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
2024**

Judul : **OPTIMASI PRODUKSI ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP E1 DENGAN SUBSTRAT *PALM OIL MILL EFFLUENT* (POME) MENGGUNAKAN *RESPONSE SURFACE METHODOLOGY* (RSM)**

Nama Mahasiswa : **Anggun Nadhifahmia Azizah**

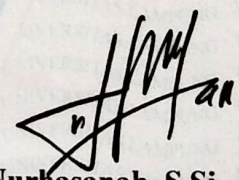
NPM : 2017011006

Program Studi : Kimia

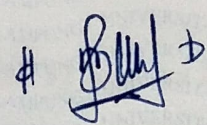
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




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


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

**2. Ketua Jurusan Kimia
FMIPA Universitas Lampung**

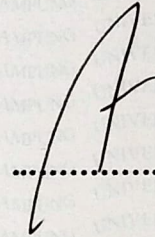


Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

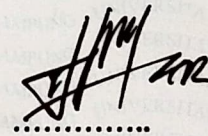
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

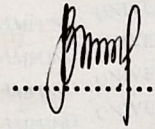
Ketua : **Dra. Aspita Laila, M.S.**



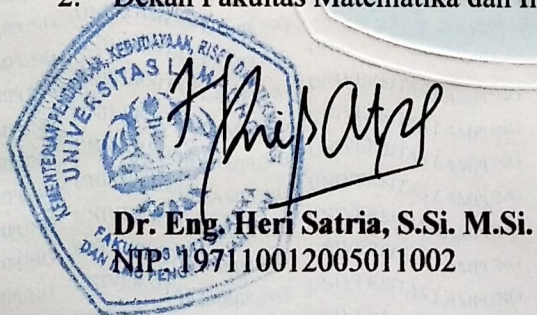
Sekretaris : **Dr. Nurhasanah, S.Si. M.Si.**



Anggota : **Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 12 Agustus 2024

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Anggun Nadhifahmia Azizah
Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011006
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 *Bacillus cereus* ALP E1 dengan Substrat Palm Oil Mill Effluent (POME) menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM)”** adalah benar karya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Kemudian, saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024
Menyatakan,



Anggun Nadhifahmia Azizah
NPM. 2017011006

RIWAYAT HIDUP



Penulis memiliki nama lengkap Anggun Nadhifahmia Azizah yang dilahirkan di Padang Cermin pada tanggal 24 Desember 2002. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara, putri dari pasangan Bapak Muji Wahana dan Ibu Sariyati. Penulis mengawali jenjang pendidikan di Taman Kanak-Kanak Hang Tuah yang diselesaikan pada tahun 2008. Kemudian melanjutkan pendidikan sekolah dasar di SDN 9 Padang Cermin hingga tahun 2014. Selanjutnya, penulis menempuh pendidikan menengah pertama di SMPN 4 Pesawaran. Pada tahun 2017, penulis menempuh pendidikan menengah atas di SMAN 10 Bandar Lampung. Setelah lulus pada tahun 2020, penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur SNMPTN.

Selama menempuh pendidikan sebagai mahasiswa Jurusan Kimia di Universitas Lampung, penulis telah mengikuti kegiatan organisasi Kader Muda Himaki (KAMI) FMIPA Unila tahun 2020–2021. Selanjutnya, penulis aktif menjadi anggota Biro Penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia FMIPA Unila selama dua periode kepengurusan, 2021–2023. Penulis juga aktif berorganisasi sebagai Koordinator Bidang Desain dan Publikasi *Chemistry English Club* (CEC) pada tahun 2023. Pada tahun 2022, penulis pernah mengikuti kegiatan Pertukaran Pelajar Kampus Merdeka di Universitas Gadjah Mada selama satu semester. Selanjutnya, pada tahun 2023, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Kota Besi, Kecamatan Batu Brak, Kabupaten Lampung Barat, Lampung

dan di tahun yang sama, penulis juga melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Mikrobiologi, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong dengan riset penelitian berjudul “Skrining Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Sedimen Mangrove di Wilayah Segara Anakan, Cilacap.”

Pada periode perkuliahan akhir, penulis berkesempatan untuk menjadi Asisten Praktikum Biokimia untuk Jurusan Kimia angkatan 2021 dan Jurusan Biologi angkatan 2023 pada tahun 2023–2024. Penulis telah menyelesaikan riset penelitian dengan judul “Optimasi Produksi Enzim Lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 dengan Substrat *Palm Oil Mill Effluent* (POME) menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM)” pada tahun 2024 di laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Universitas Lampung.

MOTTO

حَسْبُنَا اللَّهُ وَنِعْمَ الْوَكِيلُ

"Cukuplah Allah menjadi Penolong kami dan Allah adalah sebaik-baiknya Pelindung."

(Q.S. Al-Imran: 173)

لَا يُكَلِّفُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا

"Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya."

(Q.S. Al-Baqarah: 286)

وَعَسَى أَنْ تَكْرَهُوا شَيْئًا وَهُوَ خَيْرٌ لَكُمْ وَعَسَى أَنْ تُحِبُّوا شَيْئًا وَهُوَ شَرٌّ لَكُمْ وَاللَّهُ يَعْلَمُ وَأَنْتُمْ لَا تَعْلَمُونَ

"Boleh jadi kamu membenci sesuatu padahal ia amat baik bagimu, dan boleh jadi pula kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk bagimu, Allah mengetahui sedang kamu tidak mengetahui."

(Q.S. Al-Baqarah: 216)

"Jadilah seperti pohon yang tumbuh dan berbuah lebat, dilempari dengan batu tetapi membalasnya dengan buah."

(Abu Bakar Ash-Shiddiq)

"Let's walk slowly, enjoying every steps of the journey at our own pace, following our own rhythms."

(Mark Lee)

"Don't follow other people's standards, just be the best version of yourself. Do everything with love and appreciate every little thing you've done."

(Penulis)

PERSEMBAHAN



Dengan mengucap Alhamdulillahirabbil'alamin, puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya serta salawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW.

Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti dan tanggung jawabku kepada:

*Diriku sendiri yang telah melewati suka duka penelitian hingga sampai di titik ini,
"I'm proud of you, let's getting better every day."*

Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Muji Wahana dan Ibu Sariyati yang senantiasa mendoakan, mendidik, dan memberikan kasih sayang serta dukungan kepada penulis di segala kondisi. Adikku tersayang, Tegar Zaki Athoya yang senantiasa memberikan doa dan dukungan kepada penulis.

Rasa hormat saya kepada:

Dra Aspita Laila, M.S., Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., dan Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandingan, S.Si. M.Si. serta seluruh Dosen Kimia FMIPA Unila yang telah mendidik, membimbing, dan memberikan motivasi kepada penulis selama menempuh pendidikan di kampus. Semoga Allah membalas kebaikan bapak dan ibu sekalian, Aamiin.

Keluarga besar dan sahabat-sahabat yang senantiasa memberikan doa, motivasi, dan dukungan kepada penulis.

Almamater yang kubanggakan, Universitas Lampung.

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Optimasi Produksi Enzim Lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 dengan Substrat *Palm Oil Mill Effluent* (POME) menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM).” Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Pada penulisan skripsi ini, penulis tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan, tetapi berkat rahmat dan ridha Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak semua itu dapat terlalui. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat dan karunianya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini
2. Kedua orang tua, bapak dan ibu yang tiada hentinya memberikan doa dan dukungan secara moril dan finansial. Terima kasih untuk segala pengorbanan, kesabaran, ilmu, dan kasih sayang yang kalian berikan selama ini. Semoga Allah SWT selalu memberikan perlindungan, kesehatan, kebahagiaan dunia dan akhirat, rezeki yang cukup, keberkahan, dan umur yang panjang sehingga dapat membersamai penulis dalam suka maupun duka di masa mendatang.
3. Adikku, Tegar Zaki Athoya yang selalu mendoakan, mendukung, menghibur, dan menyemangati penulis di berbagai kondisi. Semoga selalu berbakti kepada orang tua dan Allah SWT memberikan jalan terbaik-Nya untukmu.

4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S selaku dosen pembimbing I atas segala kebaikan, ilmu, arahan, saran, dan motivasinya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan baik. Terima kasih atas dukungan yang ibu berikan selama ini. Semoga Allah memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua kebaikan ibu.
5. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing II atas segala kebaikan, ilmu, bimbingan, kesabaran, dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Terima kasih atas waktu dan dukungan Ibu di segala kondisi sehingga penulis sampai di titik ini. Semoga Allah memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua kebaikan Ibu.
6. Ibu Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandiangan, S.Si., M.Si. selaku dosen pembahas yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, saran, masukan, dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Semoga Allah memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua kebaikan Ibu.
7. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik atas segala bantuan dan bimbingannya kepada penulis selama menjalani perkuliahan. Semoga Allah memberikan perlindungan dan keberkahan atas semua kebaikan Bapak.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan pengalaman yang berharga bagi penulis selama perkuliahan.
10. Segenap Staf dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, terkhusus Mba Della atas kebaikan dan bantuannya kepada penulis saat di perkuliahan hingga melakukan penelitian di Laboratorium Biokimia.
11. Bapak Dr. Eng Heri Satria, M.Si. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
12. Keluarga besar yang senantiasa memberikan doa dan dukungan kepada penulis.

13. Teman baik penulis, Amira Rahmawati yang selalu menyempatkan waktunya untuk mendengarkan keluh kesah penulis dan memberikan saran dan motivasinya sejak SMP. Terima kasih pula kepada Aura Latifuzzahra yang telah menyempatkan waktunya untuk mendengarkan kesulitan penulis dan mengajak penulis untuk *refreshing*. Terakhir, terima kasih kepada Fina Novika Putri yang telah menemani penulis sejak SMA. Penulis sangat berterima kasih kepada kalian semua yang selalu senantiasa mendoakan dan mendukung penulis hingga saat ini. Semoga kalian selalu dilancarkan dan diberi perlindungan oleh Allah SWT.
14. Teman yang kebersamai penulis, Mutiara Septia Nurokhim mulai dari mengikuti kelas, pertukaran pelajar, dan *peer group* penelitian yang sama. Terima kasih telah membantu dan kebersamai penulis serta canda tawa yang diberikan selama di dunia perkuliahan ini. Semoga pertemanan ini tetap terjalin tanpa adanya rasa canggung untuk waktu yang lama.
15. Teman-teman *Unila Foodvloger*, Mutiara Septia Nurokhim, Najla Shauma Zahra, Rusmauli Defana Panjaitan, Bunga Mega Nurlinda, Maria Agustina Sidabutar, Ratih Nurhidayati, Erlisa Aulia, Geo Alfriza Gaghana, Ribka Angelina Gultom, Stephani Marisca Febrianti, Avi Eriyani, dan Rahmadtullah, atas semua doa, dukungan, bantuan, dan waktu dalam suka maupun duka. Terima kasih telah hadir dan memberikan warna baru di dunia perkuliahan penulis. Semoga pertemanan ini tetap terjalin untuk waktu yang lama, walaupun dengan keterbatasan jarak dan komunikasi.
16. Teman-teman PP UGM, Mutiara Septia Nurokhim, Tasyadinia, Elsa Fitrianiingsih, Mitha Nurmaya Angely, Yasmin Fahira, Ade Sarah Oktavianty, Siti Salwa Khotijah, dan Geo Alfriza Gaghana, atas doa, bantuan, dan motivasinya selama ini. Terima kasih atas suka dukanya saat menjalani perkuliahan di kampus *orang lain* walaupun baru saja menjalani perkuliahan secara luring. Semoga pertemanan ini tetap terjalin untuk waktu yang lama, walaupun dengan keterbatasan jarak dan komunikasi.
17. Sobat Biokimia, Nadia Anindita, Nurdiana, Carlos Daniel, dan teman-teman lainnya atas canda tawa dan kebersamaan yang telah dilewati. Semoga pertemanan ini tetap terjalin untuk waktu yang lama.

18. *Nurhasanah's Research Group* 2020, Najla Shauma Zahra, Umi Latifah, Agil Sriwahyuni, Anisa, dan Leoni Wulandari, atas segala dukungan, doa, kerja sama, dan waktunya untuk berjuang bersama dalam menyelesaikan penelitian. Semoga selalu dilancarkan segala urusannya oleh Allah SWT.
19. Rekan penelitian Bu Aspita Laila, Fathia Sa'adah dan Jordy Setiawan, atas dukungan dan kerja samanya untuk berjuang menyelesaikan penelitian ini dengan baik.
20. Kakak-kakak *Nurhasanah's Research Group*, Kak Verin, Kak Astin, Kak Cindi, Kak Puspita, Kak Yori, Kak Adel, dan Kak Nisa yang senantiasa memberikan bimbingan dan bantuan kepada penulis.
21. Adik-adik *Biochemistry's Research Group* atas dukungan dan doa yang diberikan. Semoga penelitian kalian dimudahkan dan dilancarkan.
22. Rekan-rekan Laboratorium *Biochemistry'20* sekaligus para Asisten Praktikum Biokimia yang telah membersamai penulis untuk berjuang melewati suka maupun duka penelitian selama satu tahun ini. Segala bantuan dan kebahagiaan yang kalian berikan membuat penulis bersyukur ada di *peergroup* biokimia ini. Semoga kalian semua dilancarkan dan dapat mencapai kesuksesan masing-masing.
23. Teman-teman *Chemistry'20*, terutama kelas B atas segala kebersamaan, keceriaan, semangat, dan kenangannya selama menjalani perkuliahan. Semoga kalian semua dilancarkan dan dapat mencapai kesuksesan masing-masing.
24. Rekan-rekan Himaki 2021 dan 2022 atas segala ilmu dan pengalaman bermanfaat yang telah diberikan, semoga sukses selalu dan dilancarkan urusannya.
25. Rekan-rekan *Chemistry English Club* 2023 atas segala ilmu, motivasi, dan pengalaman berharga yang telah diberikan, semoga sukses selalu dan dilancarkan urusannya.
26. Almamater tercinta Universitas Lampung.
27. Diriku sendiri, Anggun Nadhifahmia Azizah, atas perjuangan dan semangatnya untuk tidak pernah menyerah. Terima kasih karena telah memberikan yang terbaik untuk meraih mimpimu. Aku ingin meminta maaf

karena sering memaksa dirimu untuk terus berjalan meski tertatih. Semoga ini menjadi awal yang baik untuk perjalanan panjangmu di kemudian hari, walaupun nantinya kamu menghadapi banyak rintangan, aku harap kamu tidak menyerah sebelum berhasil. Namun, jika di masa mendatang tidak sesuai dengan harapanmu, jangan terlalu menyalahkan dirimu. Aku ingin kamu hidup tanpa penyesalan apapun, jadi jalani hidupmu dengan benar. Semoga Allah SWT menunjukkan jalan terbaik untukmu.

Terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Allah SWT membalas segala amal dan kebaikan kalian. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan informasi, wawasan, dan ilmu yang bermanfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, 19 Agustus 2024
Penulis

Anggun Nadhifahmia Azizah

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	xvii
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan.....	4
1.3. Manfaat.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. <i>Green Chemistry</i>	6
2.2. <i>Bacillus cereus</i>	6
2.3. Enzim.....	8
2.3.1. Klasifikasi Enzim	9
2.3.2. Mekanisme Kerja Enzim.....	10
2.3.2.1. Model Gembok dan Kunci (<i>Lock and Key</i>)	10
2.3.2.2. Model <i>Induced-Fit</i>	11
2.3.3. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	12
2.3.3.1. Suhu	12
2.3.3.2. pH atau Derajat Keasaman.....	12
2.3.3.3. Konsentrasi Substrat dan Enzim	13
2.3.3.4. Kecepatan Agitasi	14
2.3.3.5. Konsentrasi Inokulum	15
2.3.3.6. Zat-zat Penguat (Aktivator)	15
2.3.3.7. Zat-zat Penghambat (Inhibitor).....	15
2.4. Enzim Lipase	16
2.4.1. Aplikasi Enzim Lipase di Industri	17
2.4.2. Uji Aktivitas Enzim	18
2.4.3. Uji Protein Enzim	19
2.5. Limbah Cair Kelapa Sawit	19
2.6. Spektrofotometri UV-Vis	20
2.7. <i>Response Surface Methodology</i> (RSM)	22
2.8. <i>Analysis of Variance</i> (ANOVA).....	24

III. METODE PENELITIAN	26
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	26
3.2. Alat dan Bahan	26
3.3. Prosedur	27
3.3.1. Tahap Persiapan	27
3.3.1.1. Pembuatan Media Padat	27
3.3.1.2. Pembuatan Media Cair	27
3.3.1.3. Peremajaan Isolat	28
3.3.1.4. Pembuatan <i>Starter</i>	28
3.3.2. Kondisi Optimum Produksi Enzim Lipase.....	28
3.3.2.1. Kondisi Optimum Produksi Lipase dengan Metode Konvensional	28
3.3.2.2. Kondisi Optimum Produksi Lipase dengan Metode <i>Response Surface Methodology (RSM)</i>	29
3.3.3. Produksi Enzim	30
3.3.4. Pengujian Enzim Lipase.....	31
3.3.4.1. Uji Aktivitas Enzim Lipase	31
3.3.4.2. Uji Kadar Protein Enzim Lipase	32
3.4. Skema Penelitian	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Isolat Bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1	34
4.2. Kondisi Optimum Enzim Lipase	35
4.2.1. Kondisi Optimum Lipase dengan Metode Konvensional	36
4.2.2. Kondisi Optimum Lipase dengan Metode <i>Response Surface</i> <i>Methodology (RSM)</i>	37
4.2.2.1. Analisis Statistik	39
4.2.2.2. Interaksi Kondisi Optimasi dengan Hasil Aktivitas Enzim	43
4.2.2.3. Penentuan Kondisi Optimum dan Verifikasi Model	47
4.3. Produksi Enzim Lipase	48
V. KESIMPULAN DAN SARAN	49
5.1. Kesimpulan.....	49
5.2. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN.....	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rentang dan tingkatan parameter optimasi enzim lipase dari bakteri.....	29
2. <i>Design of Experiment</i> (DOE)	30
3. Hasil uji aktivitas enzim lipase	38
4. Hasil analisis varians	40
5. Kriteria optimasi produksi enzim lipase	47
6. Verifikasi model.....	47
7. Hasil pengukuran absorbansi p-nitrofenol pada pembuatan kurva standar	61
8. Hasil pengukuran absorbansi pada pembuatan kurva standar BSA.....	63
9. Hasil pengukuran aktivitas unit tanpa adanya substrat POME	66
10. Hasil pengukuran aktivitas unit enzim dengan konsentrasi POME 2%	66
11. Hasil pengukuran aktivitas enzim lipase dengan konsentrasi POME 4%	67
12. Hasil pengukuran aktivitas enzim lipase dengan konsentrasi POME 6%	67
13. Hasil pengukuran aktivitas enzim lipase dengan konsentrasi POME 8%	67
14. Hasil pengukuran aktivitas enzim lipase dengan konsentrasi POME 10%	68
15. Hasil pengukuran aktivitas enzim lipase dengan konsentrasi POME 12%	68
16. Hasil pengukuran kadar protein tanpa substrat POME	70
17. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 2%	70
18. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 4%	70
19. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 6%	71
20. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 8%	71
21. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 10%	71
22. Hasil pengukuran kadar protein dengan konsentrasi POME 12%	72

23. Hasil pengukuran aktivitas spesifik enzim lipase	73
24. Hasil uji aktivitas unit enzim lipase dengan RSM	74
25. Hasil produksi enzim.....	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bacillus cereus</i>	7
2. Model <i>lock and key</i>	11
3. Model <i>induced fit</i>	11
4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim	12
5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim	13
6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim	13
7. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi	14
8. Reaksi enzim lipase	16
9. Instrumentasi dasar spektrofotometer UV-Vis	21
10. Tiga model RSM (a) FFD, (b) BBD, (c) CCD	23
11. Skema penelitian	33
12. Isolat bakteri <i>Bacillus cereus</i> ALP E1 yang telah diremajakan	35
13. <i>Starter</i> bakteri	35
14. Aktivitas spesifik enzim lipase pada variasi waktu pertumbuhan dan konsentrasi POME	36
15. Plot distribusi normal residu	41
16. Plot perbandingan antara hasil percobaan dan prediksi	42
17. Residu vs percobaan	42
18. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi pH dan konsentrasi inokulum	44
19. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi pH dan kecepatan agitasi	45
20. Plot (a) kontur (b) 3D pengaruh interaksi konsentrasi inokulum dan kecepatan agitasi	46
21. Kurva standar p-nitrofenol	61
22. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	63

23. Uji aktivitas unit enzim lipase.....	65
24. Uji kadar protein (Lowry)	69

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sejak tahun 1940-an, permasalahan lingkungan hidup mulai muncul seiring dengan pertumbuhan jumlah penduduk yang pesat setiap tahunnya mengakibatkan adanya industrialisasi yang berlebihan sehingga meningkatkan limbah, polutan, dan adanya penurunan sumber daya alam. Oleh karena itu, pada tahun 1990, tercetuslah istilah “*Green Chemistry*” atau kimia hijau yang mengusulkan gerakan ramah lingkungan mulai dari perencanaan produk hingga sintesis, pemrosesan, dan analisis dengan tujuan untuk meminimalkan bahaya lingkungan di bidang industri, salah satunya dengan menggunakan katalis enzim (Marco *et al.*, 2019). Katalis enzim akan meningkatkan laju reaksi yang lebih tinggi, bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu, dan biaya yang lebih rendah dibandingkan dengan katalis biasa (Mohammeda *et al.*, 2020).

Enzim berperan sebagai biokatalis yang berfungsi untuk mempercepat reaksi-reaksi kimia. Enzim dapat dihasilkan dari spesies tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Namun, enzim yang berasal dari mikroorganisme seperti bakteri lebih menguntungkan karena sifatnya yang khas, seperti produksi berkelanjutan yang tidak dipengaruhi oleh musim, aktivitas dan hasilnya yang tinggi, serta stabilitas yang baik (Thabet *et al.*, 2023). Bahkan, hampir 90% enzim industri berasal dari mikroorganisme (Phukon *et al.*, 2020). Namun, 99% kebutuhan enzim di Indonesia masih diimpor dari negara lain seperti Jepang, India, Cina, dan sebagian negara di Eropa. Pada tahun 2017, kebutuhan enzim industri di Indonesia mencapai 2.500 ton, dengan nilai impor sekitar 200 miliar

rupiah dan laju pertumbuhan tahunan rata-rata 5–7% (Astriany dkk., 2022). Lipase termasuk salah satu enzim yang paling banyak dibutuhkan untuk industri. Pada tahun 2018, pasar lipase global menduduki peringkat ketiga dengan nilai \$336,09 juta atau sebesar 11,6% dari pasar enzim global yang diperkirakan mencapai \$29,07 miliar. Pasar lipase global diperkirakan akan tumbuh menjadi \$466,29 juta pada tahun 2024 dengan pertumbuhan sebesar 7,6% yang menandakan bahwa kebutuhan enzim lipase untuk industri akan mengalami peningkatan setiap tahunnya (Kim *et al.*, 2023). Enzim lipase dikenal juga sebagai triasilgliserol asil hidrolase (EC 3..1.1.3) yang bekerja untuk menghidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Selain itu, lipase mampu mengkatalisis reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi dalam lingkungan *non-air* (Budžaki *et al.*, 2022). Saat ini, lipase bakteri banyak diminati karena potensinya dalam berbagai aplikasi industri seperti pada industri makanan, minuman, deterjen, tekstil, kosmetik, dan farmasi (Sukmawati dan Simamora, 2020). Selain itu, enzim ini dapat digunakan di bidang agrokimia, biosensor, biopolimer, pengelolaan lingkungan, bioremediasi, biodegradasi, produksi biodiesel, dan sebagainya (Raveendran *et al.*, 2018).

Untuk memproduksi enzim skala industri, diperlukan adanya kondisi optimum seperti pH, suhu, waktu pertumbuhan, dan konsentrasi substrat, dan kecepatan agitasi untuk memperoleh aktivitas enzim tertingginya (Seftiono, 2017). Salah satu metode populer untuk studi optimasi adalah *Response Surface Methodology* (RSM). RSM dapat menentukan kondisi tertentu agar diperoleh respon yang optimal secara statistik dengan menemukan respon rata-rata yang akan menjadi permukaan respon ketika diplot. Dalam dekade terakhir, RSM telah banyak digunakan untuk mempelajari optimasi, salah satunya optimalisasi hidrolisis produksi enzimatik. Metode ini mampu menentukan interaksi antar variabel dan meningkatkan produksi enzim tanpa peningkatan biaya dalam waktu yang lebih singkat (Mishra *and* Varjani, 2019).

Metode ini dinilai lebih mudah karena mempersingkat waktu pengerjaan (Patel *et al.*, 2021). Pada penelitian lainnya melaporkan bahwa *Candida cylindracea* penghasil enzim lipase yang ditumbuhkan pada media produksi yang dibuat menggunakan POME 1% (v/v) secara statistik dioptimalkan dengan menggunakan RSM sehingga didapatkan kondisi optimalnya pada penambahan pepton 0,45% (b/v), Tween-80 0,65% (v/v), dan inokulum 2,2% (v/v) aktivitas lipolitik sebesar 20,26 U/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya optimasi menghasilkan peningkatan sebesar 5,19 kali lipat produksi secara keseluruhan. Pada penelitian tersebut, limbah POME digunakan sebagai substrat pertumbuhan yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim (Salihu *et al.*, 2011).

Palm Oil Mill Effluent (POME) termasuk salah satu limbah agroindustri yang dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam produksi enzim lipase. POME berupa produk samping dari proses pengolahan *Crude Palm Oil* (CPO). Limbah lipid dengan biomolekul yang melimpah dapat berfungsi sebagai media yang kaya dengan nutrisi-nutrisi yang dapat digunakan sel mikroba untuk tumbuh dan memproduksi lipase (Fibriana *et al.*, 2021). Selain itu, penggunaan POME sebagai substrat dapat menjadi solusi dari tingginya biaya produksi enzim dalam skala besar dan pemanfaatannya di sektor industri (Jana *et al.*, 2013). Penggunaan substrat yang berasal dari bahan organik dalam produksi enzim menjadi penelitian yang menarik, salah satunya menggunakan limbah agroindustri khususnya POME sebagai bahan baku karena tersedia secara luas dan tentunya murah. Selain itu, dapat juga digunakan sebagai alternatif untuk pengolahan limbah (Girelli *et al.*, 2020).

Studi pendahuluan terhadap bakteri yang diisolasi dari air laut Pelabuhan Panjang, Lampung yang tercemar minyak telah dilakukan. Menurut Rachmawati (2021), dari 12 isolat bakteri *Bacillus cereus* yang ditemukan, bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 memiliki diameter zona bening sekitar 25,0 mm dengan aktivitas lipase tertinggi dengan pada pH 7 sebesar 0,3 U/mL dengan konsentrasi substrat berupa minyak zaitun 8% sebesar 0,16 U/mL. Namun, aktivitas lipase tersebut belum terlalu tinggi jika dibandingkan dengan isolat lokal lainnya, seperti bakteri

Lysinibacillus boronitolerans LKM G1 yang pada kondisi optimumnya memiliki aktivitas lipase sebesar 6592,58 U/mL (Husna, 2022). Oleh karena itu, dilakukan optimasi dengan menggunakan limbah POME sebagai substrat pertumbuhan yang diharapkan dapat meningkatkan aktivitas lipolitik dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1. Pada penelitian sebelumnya, optimasi dilakukan secara eksperimen di laboratorium tanpa bantuan perangkat lunak dan metode statistik dengan bantuan perangkat lunak, seperti RSM belum dilakukan. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini dilakukan untuk melihat peran metode RSM dalam proses optimasi produksi enzim lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 sehingga dapat meningkatkan aktivitas enzim lipase menggunakan limbah agroindustri yaitu POME sebagai substrat pertumbuhan dan diharapkan dapat digunakan untuk aplikasi industri.

1.2. Tujuan

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan waktu pertumbuhan dan konsentrasi optimum POME untuk produksi enzim lipase dari *Bacillus cereus* ALP E1 secara konvensional.
2. Mendapatkan kondisi optimum produksi enzim lipase dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dan menentukan interaksi antar variabel secara independen dengan RSM.
3. Menentukan aktivitas ekstrak kasar enzim lipase dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1.

1.3. Manfaat

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian adalah sebagai berikut:

1. Substrat POME dapat menjadi solusi dari tingginya biaya produksi enzim dalam skala besar dan alternatif untuk pengolahan limbah.
2. Penggunaan RSM sebagai metode untuk menentukan kondisi optimum dapat mempersingkat waktu dan mengurangi biaya penelitian.
3. Ekstrak kasar enzim dari bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dapat dikembangkan lebih lanjut untuk aplikasi industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

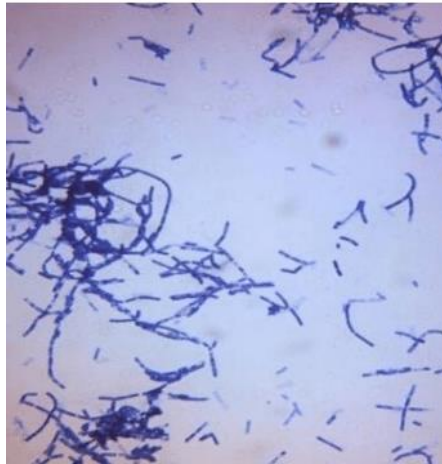
2.1. *Green Chemistry*

Green Chemistry atau kimia hijau adalah cabang ilmu kimia yang berfokus pada perancangan, proses pembuatan, dan pemanfaatan produk dengan meminimalkan atau menghilangkan penggunaan dan pembentukan zat berbahaya. Penerapan konsep ini memberikan solusi terhadap tantangan global seperti perubahan iklim, pencemaran lingkungan, dan penipisan sumber daya alam (Asokan *et al.*, 2019). Terdapat 12 prinsip kimia hijau yang diperkenalkan oleh Anastas dan Warner (1998), di antaranya: pencegahan: mencegah adanya limbah lebih baik daripada mengolah dan membersihkan limbah yang ada, ekonomi atom: metode sintesis harus mengoptimalkan pemanfaatan semua bahan yang digunakan untuk menghasilkan produk akhir, sintesis bahan kimia yang tidak terlalu berbahaya, perancangan bahan kimia yang lebih aman sesuai fungsi yang diinginkan, penggunaan pelarut dan zat pendamping yang lebih aman, perancangan sistem untuk mendapatkan efisiensi energi pada suhu dan tekanan yang rendah, penggunaan bahan baku terbarukan, pengurangan pemanfaatan zat derivatif, perancangan agar zat kimia yang dihasilkan mudah terurai, analisis *real-time* untuk pencegahan polusi, dan penggunaan bahan kimia yang aman.

2.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus termasuk genus *Bacillus* yang merupakan bakteri Gram positif anaerobik fakultatif yang berbentuk basil (batang) dengan panjang 3–5 μm dan lebar 1–1,2 μm . Suhu pertumbuhan optimumnya biasanya berkisar antara

37–48 °C dan minimum 5–20 °C serta pH berkisar 5,5–8,5 (Jawetz *et al.*, 2014). Bakteri ini biasanya ditemukan dalam tanah dan berbagai makanan. *Bacillus cereus* memiliki kemampuan untuk membentuk spora yang dapat bertahan lama pada kondisi yang ekstrim karena dapat beradaptasi dengan adanya perubahan lingkungan (Nguyen *and* Tallent, 2019). Bakteri *Bacillus cereus* ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. *Bacillus cereus* (Haque, 2021).

Berikut ini adalah klasifikasi bakteri *Bacillus cereus* (Toldra *and* Leo, 2017).

Kingdom : Bacteria
Filum : Firmicutes
Kelas : Bacilli
Ordo : Bacillales
Famili : Bacillaceae
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus cereus*

Bacillus cereus termasuk bakteri patogen yang dapat menyebabkan keracunan seperti muntah dan diare serta beberapa infeksi sistemik dan lokal. Pertumbuhan *Bacillus cereus* dapat dihambat dengan suhu tinggi yaitu di atas 105 °C maupun suhu rendah di bawah 4 °C. Namun, terkadang pada tekanan yang berbeda menyebabkan peningkatan toleransi terhadap suhu karena kemampuan adaptasinya (Gharib *et al.*, 2020). Walaupun demikian, bakteri ini dapat

memproduksi enzim yang dapat digunakan di bidang industri seperti enzim amilase, protease, dan lipase (Demirkan *et al.*, 2021).

2.3. Enzim

Istilah “enzim” berasal dari bahasa Yunani “ $\epsilon\zeta\upsilon\mu\omicron$ ” yang berarti ragi. Konsep enzim diperkenalkan pertama kali oleh Wilhelm Friedrich Kuhne pada tahun 1877 meskipun istilah enzim dan penggunaannya telah digunakan secara luas sejak zaman kuno (Gurung *et al.*, 2013). Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi biokimia, yang mampu mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis. Oleh karena itu, reaksi yang memerlukan waktu bertahun-tahun tanpa katalis dapat terjadi hanya sepersekian detik jika dikatalisis dengan enzim yang sesuai (Borgaonkar *and* Patil, 2020). Enzim termasuk protein yang memiliki bentuk globular atau bulat dan terdiri dari satu atau lebih rantai polipeptida. Keunggulan enzim sebagai biokatalisator yaitu dapat mempercepat reaksi tanpa membentuk produk samping, produktivitas tinggi, spesifikasi tinggi, dan dapat menghasilkan produk akhir yang tidak terkontaminasi sehingga akan mengurangi biaya purifikasi dan efek kerusakan lingkungan (Rahmi dkk., 2020).

Enzim memiliki kemampuan untuk mengubah laju reaksi artinya enzim hanya meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah produk akhir yang terbentuk atau mempengaruhi kesetimbangan reaksi. Selain itu, enzim bekerja secara spesifik pada substrat tertentu saja dan hanya diperlukan dalam jumlah kecil karena sesuai dengan perannya sebagai katalisator. Enzim bekerja secara bolak balik, maksudnya enzim tidak menentukan arah reaksi, melainkan hanya mempercepat laju reaksi sehingga tercapai keseimbangan. Enzim dapat menguraikan suatu senyawa menjadi senyawa lain dan membentuk senyawa baru. Aktivitas enzim dapat menurun atau bahkan hilang karena pH terlalu asam atau basa maupun adanya pelarut organik sehingga enzim akan bekerja dengan baik pada kondisi optimumnya (Putri dkk., 2023).

Mikroorganisme merupakan sumber enzim yang paling sering dimanfaatkan daripada tumbuhan dan hewan karena lebih menguntungkan. Hal ini karena enzim yang berasal dari isolat mikroorganisme memiliki termostabilitas yang lebih tinggi, pH cenderung netral atau basa optimal, dan lebih stabil.

Mikroorganisme termofilik seperti bakteri, jamur, dan archaea mampu bertahan suhu tinggi karena peningkatan interaksi disulfida, elektrostatik, dan hidrofobik dalam proteinnya sehingga membantu dalam beradaptasi pada kondisi lingkungan yang ekstrim. Enzim dengan stabilitas termostabilitas dan stabilitas pH dapat mempertahankan aktivitas katalitiknya, spesifisitasnya dalam reaksi kimia, dan memiliki aplikasi bioteknologi yang baik (Thapa *et al.*, 2019).

2.3.1. Klasifikasi Enzim

Enzim diklasifikasikan menjadi 6 golongan yaitu oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase, dan ligase.

- a. Enzim oksidoreduktase akan mengkatalisis reaksi oksidasi dan reduksi dengan bantuan koenzim seperti NAD, NADP, dan FAD. Contoh enzim oksidoreduktase adalah enzim dehidrogenase, oksigenase, peroksidase, oksidase, reduktase, dan hidrosilase (Susanti dan Fidia, 2017).
- b. Enzim transferase akan mengkatalisis pemindahan gugus-gugus tertentu seperti gugus metil, asil, glikosil, fosfat ataupun sulfur. Contoh enzim transferase adalah enzim asil transferase, transkarboksilase, transaldolase, aminotransferase, transketolase, glukokinase dan piruvat kinase (Susanti dan Fidia, 2017).
- c. Enzim hidrolase akan mengkatalisis pemecahan ikatan antara atom karbon dan atom yang lain dengan adanya penambahan molekul air. Contoh kelompok enzim hidrolase adalah enzim lipase, esterase, peptidase, amilase, dan glikosidase (Susanti dan Fidia, 2017).
- d. Enzim liase akan mengkatalisis pemecahan ikatan antara atom karbon dan oksigen (C-O) dan atom-atom karbon (C-C) tanpa menggunakan molekul air. Contoh kelompok enzim liase adalah piruvat dekarboksilase (Sumbono, 2021).

- e. Enzim isomerase akan mengkatalisis reaksi perubahan konfigurasi molekul sehingga menghasilkan molekul baru dengan cara mengatur kembali atom dan substrat. Contohnya enzim isomerase adalah enzim mutase (Sumbono, 2021).
- f. Enzim ligase adalah enzim yang mengkatalis pembentukan ikatan seperti ikatan C-C, C-O, dan C-N. Contoh enzim jenis ini adalah enzim sintetase (Sumbono, 2021).

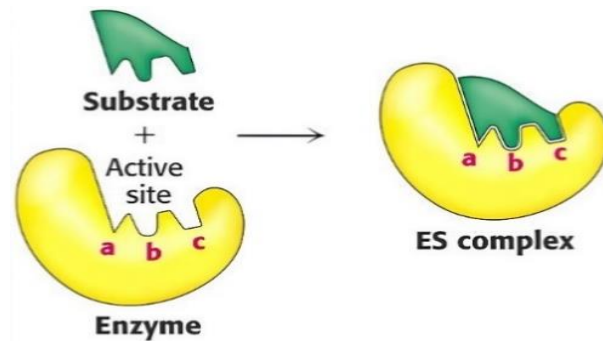
2.3.2. Mekanisme Kerja Enzim

Mekanisme kerja enzim melibatkan reaksi kimia yang terjadi ketika enzim berikatan dengan substrat sehingga membentuk kompleks enzim-substrat. Proses ini berlangsung di bagian enzim yang berfungsi sebagai katalis yang disebut situs aktif enzim. Situs aktif ini terbentuk dari beberapa asam amino yang terletak berjauhan satu sama lain dalam rantai peptida. Asam amino ini disatukan melalui pelipatan yang dihasilkan dari struktur enzim sekunder dan tersier. Rantai samping residu asam amino pada situs aktif menyediakan gugus untuk berikatan dengan gugus substrat tertentu. Pengikatan menginduksi reaksi konformasi di situs aktif sehingga enzim membentuk kompleks keadaan transisi. Ketika produk reaksi terdisosiasi, enzim kembali ke keadaan semula. Mekanisme kerja enzim terdiri dari dua model yang berbeda (Bhatia, 2018).

2.3.2.1. Model Gembok dan Kunci (*Lock and Key*)

Model gembok dan kunci diperkenalkan pertama kali oleh Emil Fischer pada tahun 1894. Suatu enzim berikatan dengan substrat dalam bentuk yang spesifik pada sisi aktif enzim sehingga saling melengkapi. Suatu enzim digambarkan sebagai kunci yang dapat membuka dan substrat digambarkan sebagai gembok. Substrat harus berikatan tepat dengan enzim agar reaksi dapat berlangsung. Namun, model ini memiliki kelemahan yaitu tidak dapat menjelaskan kestabilan

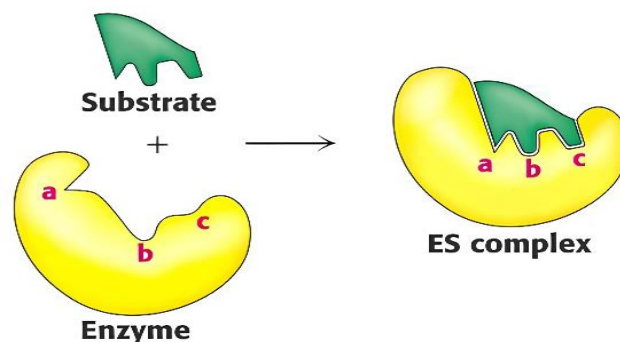
enzim ketika berpindah ke tempat reaksi enzim (Tripathi *and* Bankaitis, 2018). Model *lock and key* ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Model *lock and key* (Stryer *et al.*, 2002).

2.3.2.2. Model *Induced-Fit*

Model *induced-fit* diusulkan pertama kali oleh Daniel Koshland pada tahun 1958 sebagai modifikasi model gembok dan kunci karena enzim menunjukkan fleksibilitas konformasinya. Koshland mengungkapkan bahwa situs aktif enzim dibentuk kembali selama interaksi dengan substrat sehingga enzim melakukan penyesuaian dengan substrat hingga mencapai konfigurasi yang sesuai (Tripathi *and* Bankaitis, 2018). Model *induced fit* ditunjukkan pada Gambar 3.



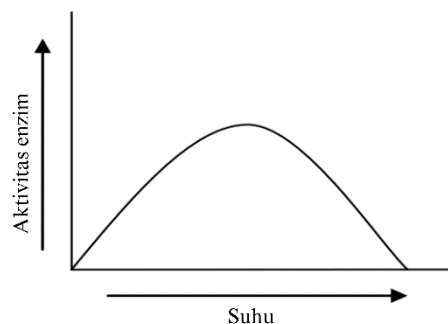
Gambar 3. Model *induced fit* (Stryer *et al.*, 2002).

2.3.3. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Dalam menjalankan fungsinya, aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya sebagai berikut:

2.3.3.1. Suhu

Suhu memiliki pengaruh terhadap aktivitas dan stabilitas enzim. Aktivitas enzim akan meningkat seiring bertambahnya suhu hingga batas optimum kemudian mengalami penurunan aktivitas enzim. Suhu maksimum menyebabkan struktur protein dan gugus non polar dalam molekul terbuka yang mengakibatkan kelarutan protein di dalam air menjadi turun sehingga aktivitas enzim juga akan menurun. Enzim menjadi kurang efektif ketika melebihi batas tertentu (Putri dkk., 2023). Grafik hubungan antara peningkatan suhu dengan kecepatan laju reaksi dapat dilihat pada Gambar 4.

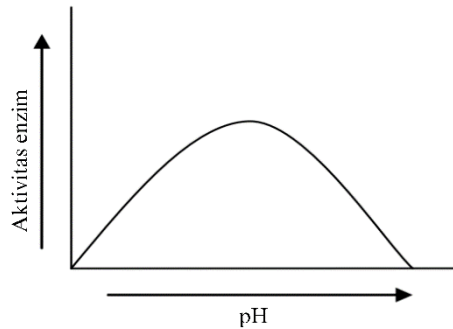


Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

2.3.3.2. pH atau Derajat Keasaman

Enzim memiliki pH optimum yang khas dengan sifat asam maupun basa. Aktivitas enzim akan maksimum jika enzim bekerja pada pH optimumnya. Perubahan pH akan menyebabkan protein penyusun enzim terdenaturasi karena

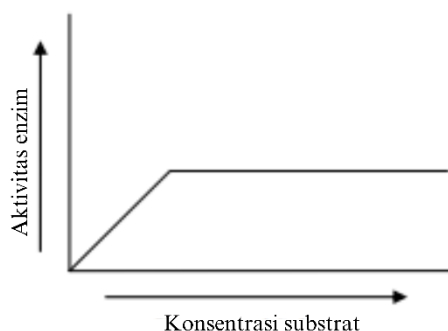
adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur tiga dimensi enzim. Grafik hubungan antara peningkatan pH dengan kecepatan laju reaksi ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

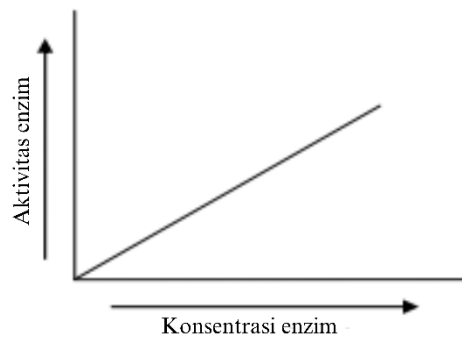
2.3.3.3. Konsentrasi Substrat dan Enzim

Konsentrasi enzim dan substrat berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi substrat karena substrat akan terikat dengan enzim. Namun, penambahan konsentrasi substrat tidak dapat lagi meningkatkan aktivitas enzim saat mencapai titik batas yaitu enzim jenuh dengan substrat yang sesuai dengan hukum Michaelis-Menten (Sholeha dan Agustini, 2021). Grafik hubungan antara penambahan konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

Penambahan konsentrasi enzim akan meningkatkan aktivitas enzim karena semakin banyak sisi aktif enzim yang mengikat substrat sehingga terbentuk produk. Penambahan konsentrasi enzim tersebut menyebabkan produk lebih cepat terbentuk (Sholeha dan Agustini, 2021). Grafik hubungan antara penambahan konsentrasi enzim terhadap laju reaksi ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh konsentrasi enzim terhadap laju reaksi (Sholeha dan Agustini, 2021).

2.3.3.4. Kecepatan Agitasi

Kecepatan agitasi mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan. Kecepatan agitasi akan memberikan pencampuran dan perpindahan panas yang memadai, meningkatkan oksigen terlarut, dan mempengaruhi ketersediaan unsur hara dalam media kultur. Pada kecepatan agitasi yang lebih rendah akan terjadi kekurangan oksigen dalam media kultur dan mempengaruhi pertumbuhan mikroba, tetapi jika kecepatan agitasi yang sangat tinggi juga terkadang akan menurunkan produksi enzim. Hal ini karena adanya gaya geser di antara sel-sel mikroba yang tersuspensi dalam media kultur dan produksi menurun karena kerusakan sel akibat tumbukan sel (Ibrahim *et al.*, 2015).

2.3.3.5. Konsentrasi Inokulum

Konsentrasi inokulum mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan. Konsentrasi inokulum berhubungan dengan pertumbuhan mikroorganisme yang menghasilkan enzim. Pada konsentrasi inokulum yang cukup, nutrisi akan tersedia sehingga mampu memperpanjang waktu yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh dan menggunakan substrat. Peningkatan mikroorganisme karena tingginya inokulum dapat menyebabkan kekurangan nutrisi dalam media. Akibatnya adanya persaingan untuk mendapatkan nutrisi sehingga terdapat penurunan aktivitas enzim (Cakmak *and* Halide, 2021).

2.3.3.6. Zat-zat Pengeriat (Aktivator)

Aktivator adalah senyawa yang dapat meningkatkan aktivitas enzim. Aktivator dapat terikat pada molekul enzim (gugus prostetik) yang selanjutnya berikatan dengan koenzim (Vitolo, 2020). Contoh aktivator seperti garam dan logam alkali dengan konsentrasi 2 hingga 5% sehingga dapat merangsang aktivitas enzim (Putri dkk., 2023).

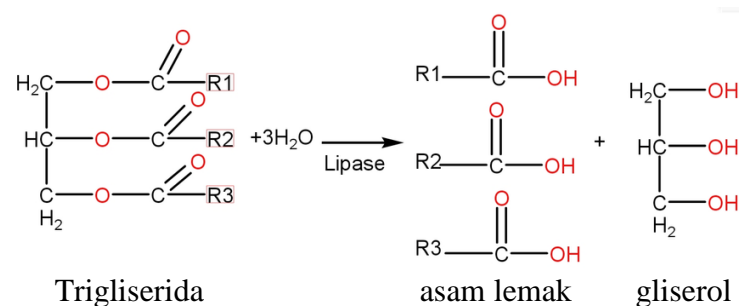
2.3.3.7. Zat-zat Penghambat (Inhibitor)

Inhibitor adalah zat yang menurunkan aktivitas enzim melalui pengikatan spesifik ke beberapa domain molekul enzim. Biasanya, inhibitor bekerja pada situs aktif dan tidak merusak struktur tersier dan kuartener protein. Inhibitor enzim sering kali tidak diinginkan keberadaan terutama dalam industri. Penghambatan enzim secara diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu inhibitor ireversibel dan reversibel. Inhibitor ireversibel menyebabkan kerusakan atau modifikasi satu atau lebih gugus fungsi enzim dan bersifat permanen. Pada inhibitor reversibel, inhibitor yang terikat oleh enzim dapat dilepaskan dengan adanya jumlah substrat yang sesuai. Inhibitor reversibel dapat dibagi menjadi tiga jenis utama:

- Inhibitor kompetitif: molekul substrat dan inhibitor bersaing untuk mendapatkan situs aktif enzim.
- Inhibitor non kompetitif: substrat dan molekul inhibitor tidak bersaing untuk domain yang sama dari molekul enzim.
- Inhibitor tidak kompetitif: inhibitor terikat pada enzim hanya setelah substrat dimasukkan ke dalam situs aktif, maksudnya inhibitor berikatan langsung dengan kompleks enzim-substrat (Vitolo, 2020).

2.4. Enzim Lipase

Triacylglycerol Lipases, EC 3.1.1.3, atau yang biasa disebut lipase merupakan kelompok utama biokatalis yang memiliki aplikasi bioteknologi yang luas. Lipase biasanya larut dalam air dan memiliki kemampuan untuk menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan gliserol yang dikonversi menjadi gula. Selain itu, lipase memiliki kemampuan untuk mengkatalisis reaksi organik baik dalam media berair maupun dalam media tanpa air dengan melalui reaksi hidrolisis, gliserolisis, dan transesterifikasi (Budžaki *et al.*, 2022). Oleh karena itu, selain menghasilkan asam lemak dan gliserol, lipase dapat menghasilkan berbagai ester, sebagian gliserida, dan lemak yang diesterifikasi dari substrat yang digunakan. Enzim ini akan memecahkan ikatan ester pada lemak dan gliserol dengan sifat khususnya (Nugroho dkk., 2022). Gambar reaksi enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi enzim lipase (Sholeha dan Agustini, 2021).

Bakteri lipolitik merupakan jenis mikroorganisme yang menghasilkan enzim lipase dengan kemampuan untuk mendegradasi lemak dengan memecah ikatan ester dan triasilgliserol menjadi asam lemak dan gliserol yang larut dalam air, sehingga enzim lipase pada bakteri lipolitik dapat membantu sebagai pengurai bahan organik berupa minyak. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan enzim lipase berkaitan dengan aktivitas bakteri lipolitik dalam mendegradasi lemak (Khairani dan Kartika, 2023). Bakteri lipolitik merupakan bakteri yang membutuhkan konsentrasi lemak minimal tertentu untuk pertumbuhannya. Banyak bakteri yang bersifat aerobik dan proteolitik aktif juga bersifat lipolitik. Jenis yang mempunyai spesies bersifat lipolitik misalnya *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Serratia* dan *Micrococcus*. Salah satu contoh yang bersifat lipolitik kuat misalnya *P. Fluorescens* (Chairunnisa *et al.*, 2019).

2.4.1. Aplikasi Enzim Lipase di Industri

Enzim lipase sebagai biokatalis banyak dikembangkan untuk aplikasi industri karena lebih ramah lingkungan dengan produksi yang lebih efisien dan tanpa adanya produk sampingan yang berbahaya. Untuk aplikasi industri, enzim harus memenuhi persyaratan spesifik agar suatu reaksi dapat berlangsung yaitu enzim mampu bekerja di lingkungan reaksi ekstrim seperti suhu dan pH rendah atau tinggi, kekuatan ionik, adanya pelarut organik dan surfaktan. Sumber utama enzim industri adalah mikroorganisme dan sebagian besar enzim ini diperoleh dari organisme mesofilik yang tumbuh pada suhu sedang (Vivek *et al.*, 2022).

Lipase dalam aplikasi industri biasanya digunakan dalam sintesis ester melalui esterifikasi dan transesterifikasi dalam makanan, kosmetik, wewangian, obat-obatan, dan produksi biodiesel. Selain itu lipase dapat diaplikasikan untuk bioremediasi dengan hidrolisis lipid, dalam formulasi deterjen untuk menghidrolisis noda berminyak. Dalam industri farmasi, lipase berperan dalam produksi obat-obatan penting seperti Diltiazem hidroklorida sebagai zat anti hipertensi dan Epothilone A untuk anti kanker. Industri lain yang menggunakan lipase sebagai katalis industri kertas dan tekstil (Chandra *et al.*, 2020).

2.4.2. Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas lipase mempunyai satuan unit (U). Satu unit aktivitas lipase setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh lipase tiap satuan menit. Penentuan aktivitas optimum enzim lipase dapat diketahui dengan pengukuran aktivitas enzimatis pada variasi temperatur dan pH tertentu. Metode yang digunakan untuk memperkirakan aktivitas lipase secara kuantitatif ialah titrimetri, spektrofotometri, kromatografi dan konduktometri (Pliego *et al.*, 2015). Metode titrimetri cukup akurat tetapi memiliki kekurangan, yakni harus terdapat indikator dan reaksi harus berlangsung secara stoikiometri sedangkan pada metode spektrofotometri memiliki keunggulan lebih akurat karena angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital. Metode spektrofotometri lebih selektif dan dapat digunakan untuk menentukan kuantitas zat yang sangat kecil (Yahya, 2013). Metode spektrofotometri digunakan untuk pengujian aktivitas lipase dengan menggunakan substrat p-nitrofenil palmitat. Aktivitas lipase diukur berdasarkan perubahan absorbansi pada λ_{maks} 410 nm yang menunjukkan pelepasan senyawa p-nitrofenol dari substrat p-nitrofenil palmitat sehingga larutan menjadi warna kuning. Semakin kuning larutan menunjukkan semakin tinggi aktivitas lipasenyanya. Aktivitas lipase dinyatakan dalam satuan unit/mg yang didefinisikan sebagai μmol produk (p-nitrofenol) yang dihasilkan oleh lipase per menit per mg enzim (Septiani, 2019).

Ketika ingin melakukan pengujian menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis, terutama untuk pengujian berbasis enzim, maka harus dipertimbangkan warna sampel, autofluoresensi, kekeruhan yang timbul akibat kelarutan yang buruk. Kekeruhan akan mengganggu pengukuran karena meningkatkan serapan dan menghasilkan absorbansi yang terlalu tinggi. Oleh karena itu, untuk meminimalkan dampak gangguan tersebut, perlu adanya penggunaan blanko dan reagen yang sesuai (Lankatillake *et al.*, 2021).

2.4.3. Uji Protein Enzim

Protein merupakan salah satu komponen makromolekul utama yang tersusun dari asam amino melalui ikatan peptida pada urutan dan jenis tertentu. Metode Lowry termasuk salah satu metode yang digunakan untuk menguji kadar protein enzim. Metode ini adalah metode pengembangan dari metode biuret sehingga lebih sensitif dan dapat menentukan kadar protein larut dalam jumlah yang kecil. Prinsip metode Lowry adalah kompleks Cu (II) dalam suasana alkalis akan tereduksi menjadi Cu (I). ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu*, kompleks *phosphomolybdat-phosphotungstat* (*phosphomolybdotungstate*), 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 kolorimetri pada $\lambda_{\text{maks}} 750 \text{ nm}$. Warna biru yang dihasilkan tergantung pada konsentrasi protein yang terkandung di dalamnya. Semakin pekat warnanya maka konsentrasi protein yang terdapat pada enzim semakin tinggi. Dalam menentukan kadar protein dengan metode Lowry perlu menggunakan kurva standar seperti *Bovine Serum Albumin* (BSA) untuk menggambarkan hubungan antara konsentrasi protein dengan absorbansinya (Lowry *et al.*, 1951; Subroto *et al.*, 2020).

2.5. Limbah Cair Kelapa Sawit

Limbah Cair Pabrik Kelapa Sawit (LCPKS) atau yang lebih dikenal dengan istilah *Palm Oil Mill Effluent* (POME) dihasilkan dari pabrik kelapa sawit yang terdiri dari 95% air dan 5% padatan. POME mengandung BOD, COD, dan tingkat keasaman yang tinggi (Sarwani *et al.*, 2019). Selain itu, gas metana merupakan penyumbang terbesar gas rumah kaca karena air limbah terdiri dari nutrisi yang kaya akan senyawa organik dan karbon, sehingga dekomposisi dari senyawa-senyawa organik oleh 6 bakteri anaerob dapat menghasilkan biogas. Limbah yang langsung dibuang langsung ke lingkungan tanpa adanya pengolahan, sebagian

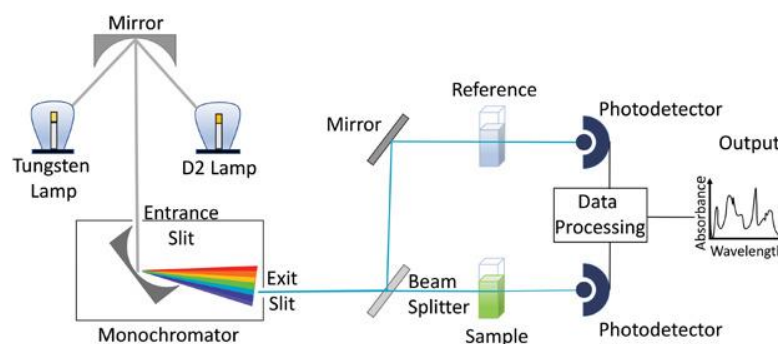
akan mengendap, terurai secara perlahan, menimbulkan kekeruhan, mengeluarkan bau yang tajam, mengonsumsi oksigen terlarut dalam air, dan merusak ekosistem. POME memiliki konsentrasi yang tinggi dan berwarna coklat pekat serta menimbulkan polusi. Saat ini, industri kelapa sawit di Indonesia dapat memproduksi limbah cair kelapa sawit sekitar 455.000 ton per harinya. Oleh karena itu, pemerintah memperkirakan bahwa pada tahun 2030, limbah POME yang membahayakan lingkungan dan makhluk hidup akan mencapai 130 juta ton. Pencemaran limbah cair kelapa sawit akan menyebabkan turunnya kualitas lingkungan di mana secara tidak langsung akan berbahaya bagi kesehatan manusia (Shintawati dkk., 2017).

Air limbah industri kelapa sawit terdiri dari air *hydroclone*, *sludge*, air cucian pabrik, air kondensat, dan sebagainya yang berasal dari sterilisasi dan klarifikasi yang dialirkan ke *sludge recovery tank* untuk pengutipan minyak POME memiliki karakteristik yaitu mengandung bahan organik yang sangat tinggi seperti kadar BOD mencapai 20.000–30.000 mg/L, COD mencapai 40.000–60.000 mg/L, padatan tersuspensi mencapai 15.000 – 40.000 mg/L (ppm), padatan total mencapai 30.000–70.000 mg/L (ppm), minyak dan lemak berkisar 5.000–7.000 mg/L (ppm), N-NH₃ berkisar antara 30–40 mg/L (ppm), memiliki Ph 4–9, dan suhu 90–140 °C. Semakin tinggi bahan organik, maka kadar bahan pencemaran juga semakin tinggi. Oleh karena itu diperlukan pengolahan limbah atau degradasi limbah untuk menurunkan kandungan kadar bahan pencemaran sebelum dibuang ke sungai atau laut (Pandia dkk., 2020).

2.6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri *ultraviolet-visible* (UV-Vis) adalah sebuah metode yang digunakan untuk mengukur panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diserap oleh sampel. Spektrofotometri menggunakan sumber radiasi elektromagnetik berupa ultraviolet dekat dengan panjang gelombang 190–380 nm dan sinar tampak dengan panjang gelombang 380–780 nm (Miarti dan Legasari, 2022). Spektrofotometri UV-Vis termasuk salah satu

metode analisis yang banyak digunakan dalam penelitian kimia untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa organik dan anorganik. Metode ini diterapkan secara luas dan umumnya digunakan untuk penentuan senyawa dalam jumlah yang sangat kecil (Pratiwi dan Nandiyanto, 2022). Instrumentasi dasar spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 9. Instrumentasi dasar spektrofotometer UV-Vis (Rocha *et al.*, 2018).

Prinsip kerja dari spektrofotometri UV-Vis yaitu adanya interaksi atom atau molekul dengan cahaya yang berdasar pada hukum Lambert-Beer. Pada hukum Lambert-Beer, jika sinar monokromatik melewati suatu senyawa, maka cahaya akan diserap, dipantulkan, ataupun dipancarkan karena material tersebut mendapatkan energi yang tinggi. Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan antara serapan dengan konsentrasi bersifat linear (Gao *et al.*, 2023). Konsentrasi di dalam larutan ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu menggunakan persamaan Lambert-Beer yang ditunjukkan pada Persamaan 1.

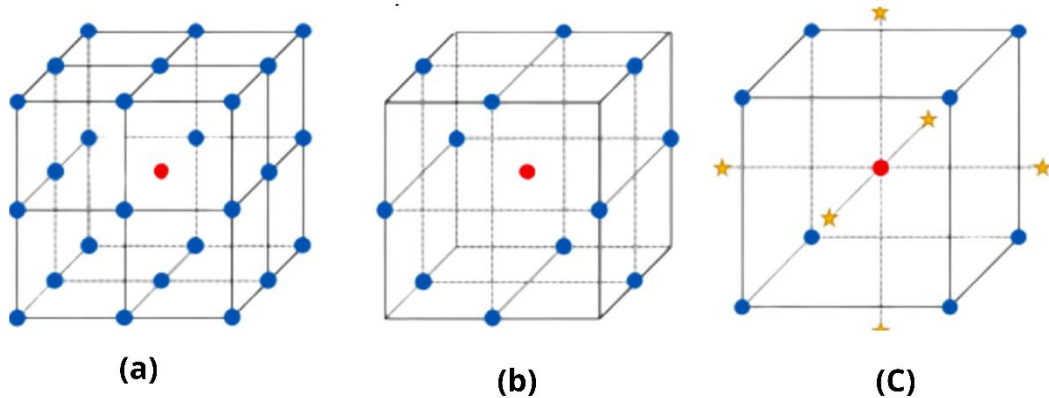
$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

A menunjukkan absorbansi, ϵ menunjukkan absorptivitas molar, b tebal kuvet (cm), dan c menunjukkan konsentrasi. Nilai absorbansi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya jenis pelarut, suhu, pH, konsentrasi larutan elektrolit yang tinggi, dan adanya zat pengganggu (Wardaniati dan Taibah, 2019).

2.7. *Response Surface Methodology (RSM)*

RSM diperkenalkan pada tahun 1950 an oleh George E.P. Box dan K.B. Wilson. Metodologi ini menggunakan serangkaian uji coba eksperimental untuk memperoleh respon optimal yang dipengaruhi oleh variabel yang berbeda. RSM adalah alat optimasi matematis dan statistik yang mengevaluasi hubungan antara faktor dan respons (Chen *et al.*, 2022). RSM memberikan hasil yang dapat diandalkan dengan keuntungan karena tidak memerlukan banyak eksperimen atau uji coba karena permukaan respons dapat dikembangkan dengan menyesuaikan hasil uji coba pada sejumlah titik sampel yang terbatas. RSM dimulai dengan menentukan respon atau hasil dari pengaturan eksperimental dan parameternya perlu ditentukan. Respon rata-rata adalah fungsi yang tidak diketahui yang bergantung pada parameter yang dipertimbangkan untuk eksperimen (Koocheki *et al.*, 2020).

Tujuan RSM adalah untuk menemukan respon rata-rata yang akan menjadi permukaan respon ketika diplot. RSM memperkenalkan desain eksperimen berbeda yang dapat dirujuk menjadi *Design of Experiment (DOE)* untuk mengetahui respon dari data masukan. Perbedaan DOE ini bergantung pada pilihan titik dimana respon harus dipelajari (Yolmeh *and* Jafari, 2017). Tiga desain eksperimen yaitu *Full Factorial Design (FFD)*, *Box-Behnken Design (BBD)*, dan *Central Composite Design (CCD)* ditunjukkan pada Gambar 9 sebagai berikut.



Gambar 10. Tiga model RSM (a) FFD, (b) BBD, (c) CCD (Chen *et al.*, 2022).

FFD berguna untuk memperoleh banyak informasi tentang efek utama dalam jumlah percobaan yang relatif lebih sedikit. Namun FFD tidak cocok untuk memberikan wawasan tentang interaksi antar faktor. Desain ini memerlukan jumlah percobaan yang paling banyak dari pada desain lainnya. BBD sesuai untuk mengevaluasi interaksi antar faktor. Namun, BBD tidak cocok untuk mempelajari faktor-faktor yang memiliki lebih dari tiga level. Oleh karena itu, BBD cukup memadai ketika mengevaluasi proses tanpa titik ekstrim sehingga memerlukan jumlah percobaan yang paling sedikit. CCD dapat digunakan untuk membangun model orde kedua secara efisien dan cocok untuk mempelajari faktor-faktor dengan tiga hingga lima level (Chen *et al.*, 2022).

Untuk menemukan respons rata-rata, serangkaian eksperimen akan dilakukan. Eksperimen ini akan ditentukan berdasarkan model yang dipilih untuk eksperimen. Model paling sederhana dalam RSM didasarkan pada fungsi linier, seperti yang disajikan pada Persamaan 2.

$$y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (2)$$

y mewakili prediksi respon, β_0 mewakili intersep model, β_i mewakili koefisien linier, dan x_i mewakili level variabel independen. Respons yang didapatkan pada fungsi linier tidak menunjukkan adanya kelengkungan apapun sehingga dapat digunakan model orde kedua untuk mengevaluasi kelengkungan. Persamaan polinomial orde kedua digunakan untuk mengevaluasi respon dan regresi

berganda diterapkan untuk penyesuaian data. Pengaruh variabel independen termasuk interaksi linier, kuadrat, dan timbal balik terhadap variabel dependen ditentukan. Persamaan polinomial kuadrat yang memberikan hubungan matematis antara variabel terikat (respon) terhadap variabel bebas seperti yang disajikan pada Persamaan 3.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

y mewakili prediksi respon, β_0 mewakili suku konstan, β_i mewakili koefisien regresi linier, β_{ii} mewakili koefisien regresi kuadrat, dan x_i mewakili level variabel independen, β_{ij} mewakili koefisien regresi interaktif (Satti *et al.*, 2019).

2.8. Analysis of Variance (ANOVA)

ANOVA merupakan sebuah metode statistik untuk memeriksa hubungan antara dua atau lebih data dengan melakukan analisis varian yang dilakukan oleh perangkat lunak *Design-Expert* (Behera *et al.*, 2019). Uji ANOVA digunakan sebagai metode analisis untuk menguji hipotesis penelitian. Hipotesis yaitu jawaban sementara terhadap rumusan masalah penelitian. Suatu hipotesis yang akan diuji dinamakan hipotesis nol (H_0). Hipotesis yang berbeda dengan hipotesis nol dinamakan hipotesis alternatif (H_a) (Machali, 2021).

Analisis ANOVA dilakukan setelah didapatkan hasil eksperimen, untuk menentukan kecocokan model yang digunakan dengan Uji-F dan R^2 . Uji-F mengukur signifikansi model, semakin tinggi nilai F untuk semua syarat menunjukkan bahwa persamaan model mampu menjelaskan variasi respon. Validitas nilai F selanjutnya dikonfirmasi dengan mengevaluasi nilai p yang sesuai untuk mengidentifikasi signifikansi statistik model dan parameter. Model matematis yang diberikan dianggap signifikan secara statistik dengan *F-value* pada tingkat kepercayaan >95% dan *p-value* <0,05. Koefisien determinasi (R^2) digunakan untuk mengukur kesesuaian model regresi. Nilai R^2 selalu terletak di

antara 0 dan 1, semakin dekat nilai R^2 dengan 1 maka semakin baik respon prediksinya. Selain itu, selisih *adjusted* R^2 dan *predicted* R^2 tidak lebih dari 0,2, dan *adequate precision* atau parameter yang mengukur rasio sinyal terhadap kesalahan harus lebih besar dari 4. Kondisi ini baik karena menandakan model cocok untuk data eksperimen (Behera *et al.*, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2023–Juli 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, spatula, rak tabung reaksi, neraca analitik DJ-V220A Lucky, inkubator Precistern P' Selecta, *Laminar Air Flow* (LAF) 9005-FL Crumair, oven T60 Heraeus, *hot plate*, *magnetic stirrer*, jarum ose, bunsen, autoklaf model CV-EL, *waterbath* Mamert W260, pH meter Metrohm, mikropipet Dragon lab, mikrotip, sentrifugasi 17250-10-Centrifuge Cole-Parmer, tabung sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis Cary-100, dan perangkat lunak *Design-Expert*.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 yang berasal dari air laut di Pelabuhan Panjang, Lampung (Citra dan Nurhasanah, 2021), limbah cair kelapa sawit (POME) dari PT. Indo Energy Solutions, *Nutrient Agar* (NA) Merck, *Nutrient Broth* (NB) Merck, kapas, kassa, kertas saring, akuades, Na₂CO₃, NaOH, CuSO₄.5H₂O, 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 6,5 dan 7, buffer borat pH 9, aseton, etanol, dan isopropanol.

3.3. Prosedur

3.3.1. Tahap Persiapan

3.3.1.1 Pembuatan Media Padat

Media padat yang digunakan adalah medium NA untuk meremajakan isolat bakteri dengan teknik agar miring. Medium NA dibuat dengan cara 2 gram NA ditimbang dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades dalam Erlenmeyer 250 mL lalu dipanaskan hingga larut. NA dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dan ditutup dengan kapas penutup. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah selesai, tabung reaksi dibiarkan dalam posisi miring dengan kemiringan 5°. Kegiatan tersebut dilakukan di LAF untuk menghindari kontaminasi (Purwaningrum dkk., 2021).

3.3.1.2 Pembuatan Media Cair

Media cair yang digunakan adalah medium NB yang digunakan untuk media pertumbuhan bakteri. Media cair dibuat dengan cara 0,8 gram NB ditimbang dan ditambahkan 100 mL akuades di dalam Erlenmeyer dan dipanaskan hingga larut. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Mirnawati dkk., 2021).

3.3.1.3 Peremajaan Isolat

Isolat *Bacillus cereus* ALP E1 diambil sebanyak 1 ose menggunakan jarum ose dan digoreskan zig-zag ke media NA secara aseptis, lalu diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C (Mirnawati dkk., 2021).

3.3.1.4 Pembuatan Starter

Bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 yang telah diremajakan dalam media NA diambil sebanyak 2 ose dan diinokulasi ke dalam 20 mL NB, lalu diinkubasi dalam *shaker* dan kecepatan 110 rpm selama 24 jam (Rait dkk., 2021).

3.3.2. Kondisi Optimum Produksi Enzim Lipase

3.3.2.1 Kondisi Optimum Produksi Lipase dengan Metode Konvensional

Kondisi optimum produksi dilakukan dengan variabel waktu pertumbuhan (jam) dan konsentrasi POME (%). Optimasi dilakukan dengan cara ditambahkan POME pada variasi konsentrasi 0, 2, 4, 6, 8, 10 dan 12% (v/v) ke dalam 100 mL media NB dan disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Pratiwi, 2013). Setelah itu, dimasukkan 2% (v/v) *starter* dan diinkubasi selama 24 jam, 48 jam, 96 jam, 120 jam, 144 jam, dan 168 jam dalam *shaker*. Selanjutnya, media tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15–20 menit sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim kemudian ditentukan aktivitas lipasenya dengan mengukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} 410 nm dan kadar protein pada λ_{maks} 750 nm (Rait dkk., 2021).

3.3.2.2 Kondisi Optimum Produksi Lipase dengan Metode *Response Surface Methodology* (RSM)

Pada penelitian ini, parameter produksi seperti pH, suhu, dan konsentrasi substrat POME dilakukan menggunakan rancangan desain RSM-CCD dalam perangkat lunak *Design Expert* 13.0, sebagaimana dapat dilihat pada Tabel 1. Hal ini bertujuan untuk meminimalisir munculnya multivariat pada rancangan desain. Selain itu, optimasi pada waktu pertumbuhan dilakukan terlebih dulu menggunakan POME dengan variasi konsentrasi dan tanpa POME sebagai kontrol. Kondisi optimum pada variabel waktu pertumbuhan dan konsentrasi POME dibuat tetap pada optimasi dengan RSM ini.

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	6,5	9
Konsentrasi inokulum (%)	1	4,5	8
Kecepatan agitasi (rpm)	100	150	200

(Dutta *et al.*, 2010; Mazhar *et al.*, 2017).

Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan menggunakan kondisi produksi mengikuti *Design of Experiment* (DOE) dari perangkat lunak yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. *Design of Experiment (DOE)*

Percobaan	A : pH	B: Konsentrasi inokulum (%)	C: Kecepatan agitasi (rpm)
1	6,5	4,5	150
2	9	1	100
3	6,5	4,5	150
4	9	4,5	150
5	6,5	4,5	150
6	4	4,5	150
7	6,5	4,5	100
8	4	8	100
9	4	1	200
10	4	1	100
11	6,5	4,5	150
12	6,5	4,5	200
13	6,5	4,5	150
14	6,5	8	150
15	6,5	1	150
16	4	8	200
17	9	8	200
18	9	8	100
19	6,5	4,5	150
20	9	1	200

Hasil dari DOE dianalisis menggunakan ANOVA dengan uji hipotesis. Penelitian ini menggunakan hipotesis model prasyarat diterima H_0 jika *p-value* <0,05 dan ditolak H_a jika *p-value* >0,05, serta *Lack of Fit* prasyarat diterima H_0 jika *p-value* >0,05 dan ditolak H_a jika *p-value* <0,05 (Behera *et al.*, 2019).

3.3.3. Produksi Enzim

Produksi enzim lipase dilakukan setelah kondisi optimum seperti waktu pertumbuhan, pH, suhu, konsentrasi inokulum dan konsentrasi substrat diketahui. Isolat *Bacillus cereus* ALP E1 pada media agar miring diambil sebanyak 2 ose dan dimasukkan ke dalam 20 mL *starter* dan kemudian diinkubasi pada *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 110 rpm. Sebanyak konsentrasi inokulum optimum % (v/v) diinokulasikan ke dalam media kultur dan diinkubasi pada

kondisi optimumnya. Selanjutnya, media produksi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15-20 menit sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim ditentukan aktivitas enzim dan kadar proteinnya (Rait dkk., 2021).

3.3.4. Pengujian Enzim Lipase

3.3.4.1. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Uji aktivitas enzim lipase dilakukan menggunakan substrat p-nitrofenil palmitat. Untuk menguji aktivitas lipase dibuat kurva standar dengan menggunakan 14 mg p-nitrofenol yang dilarutkan dalam 10 mL buffer Tris-HCl pH 8. Kemudian, dibuat deret standar dengan konsentrasi yang berbeda lalu diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm.

Uji aktivitas lipase dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan Ertugal (2007), pengujian 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 dilarutkan dalam 50 Mm buffer Tris-HCl). Aktivitas lipase diukur dengan mencampurkan 1,8 mL substrat dengan 0,2 mL larutan enzim yang diinkubasi pada suhu optimum menggunakan *waterbath* selama 15 menit. Setelah itu, larutan ditambahkan 0,2 mL aseton:etanol (1:1) untuk menginaktivasi enzim. Larutan kontrol substrat dibuat dengan menambahkan 0,2 mL aseton:etanol (1:1) ke dalam 0,2 mL enzim untuk mengaktifasi enzim sebelum diinkubasi. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm. Aktivitas enzim kemudian dihitung dengan menggunakan Persamaan 4.

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{[\text{pNP}] (\mu\text{M}) \times \text{volume total}}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{volume enzim}} \quad (4)$$

3.3.4.2. Uji Kadar Protein Enzim Lipase

Uji kadar protein enzim lipase dilakukan menggunakan metode Lowry (Lowry dalam Subroto *et al.*, 2020). Untuk menentukan kadar protein digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang dibuat deret standar 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Larutan tersebut masing-masing ditambahkan pereaksi Lowry dan dilakukan perlakuan seperti uji Lowry. Selanjutnya, diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 750 nm.

Kadar protein enzim ditentukan oleh metode Lowry dengan menggunakan pereaksi sebagai berikut:

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%

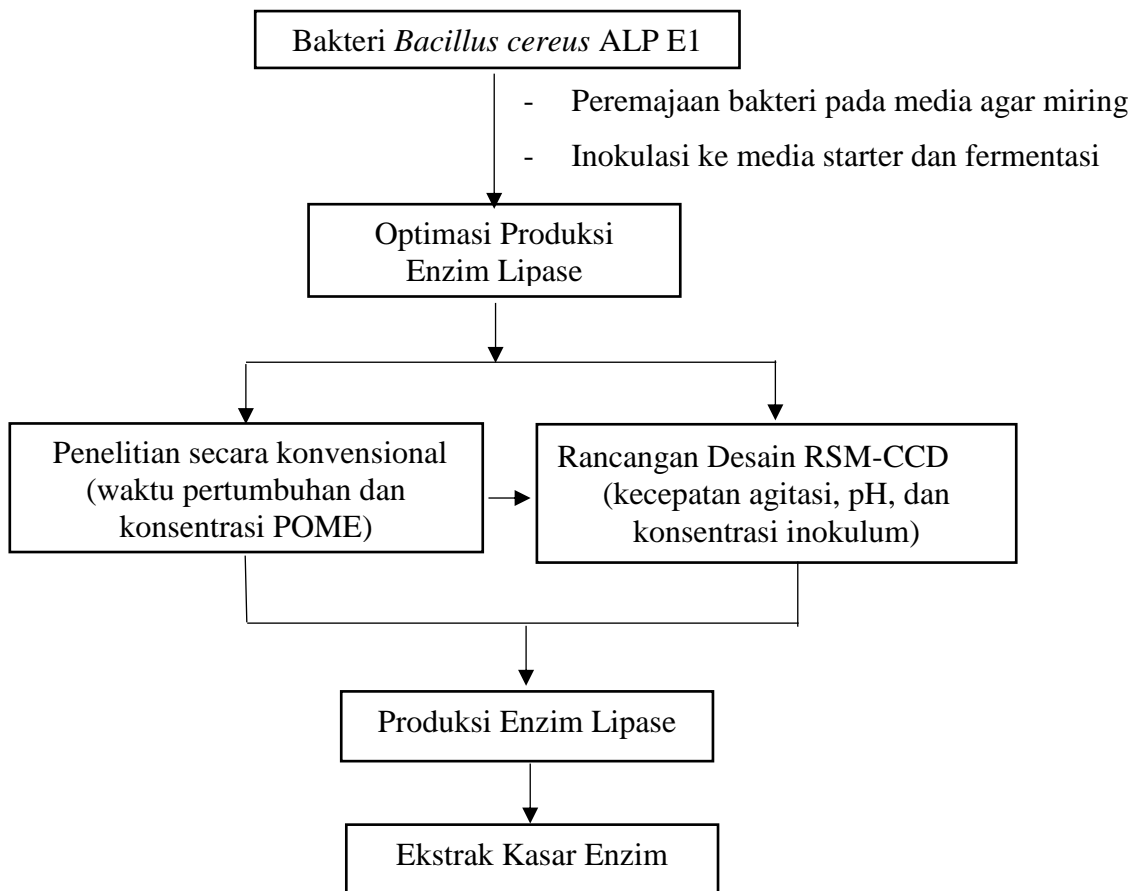
Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A

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

Enzim lipase sebanyak 0,1 mL ditambahkan 0,9 mL akuades dan 5 mL pereaksi C dan dihomogenkan. Larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, setelah itu ditambahkan 0,5 mL pereaksi D. Larutan dihomogenkan selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 750 nm. Untuk larutan kontrol, 0,1 mL enzim digantikan dengan 0,1 mL akuades dan dibuat perlakuan yang sama dengan sampel. Aktivitas spesifik dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan 5.

$$\text{Aktivitas spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas unit } \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}}\right)}{\text{Kadar Protein } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \quad (5)$$

3.4. Skema Penelitian



Gambar 11. Skema penelitian.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 untuk memproduksi lipase pada media dengan waktu pertumbuhan 72 jam pada konsentrasi POME 8%.
2. Kondisi optimum pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 dengan menggunakan RSM untuk memproduksi lipase pada media dengan pH 7, konsentrasi inokulum 1%, dan kecepatan agitasi 155 rpm. Hasil plot 3D dan analisis varians, interaksi konsentrasi inokulum dan kecepatan agitasi tidak signifikan dalam mempengaruhi aktivitas enzim lipase.
3. Aktivitas spesifik ekstrak kasar enzim lipase bakteri *Bacillus cereus* ALP E1 hasil produksi pada kondisi optimum yang didapatkan sebesar 51,5356 U/mg.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pada penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan optimasi lanjutan dengan menggunakan parameter lain seperti sumber nitrogen dan substrat selain POME untuk meningkatkan aktivitas enzim dan menentukan pengaruh antar variabelnya. Selain itu, perlu dilakukan pemurnian dan karakterisasi enzim untuk meningkatkan aktivitas enzim lipasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anastas, P. T. and Warner, J.C. 1998. *Green chemistry: Theory and practice*. Oxford University Press. Oxford.
- Asokan, A., Abdulla, M., Milan, B., Albin, F., and Abdul, M. 2019. A review on green chemistry and green engineering on environmental sustainability. *Asian Journal of Applied Science and Technology*. **3**(3): 194–201.
- Astriany, D., Hamdani, S., dan Wilianto, H. 2022. Produksi enzim protease *Bacillus altitudinis* dan *Pseudomonas citronellolis* hasil isolasi dari lumpur kubangan babi dengan variasi substrat putih telur. *Prosiding Seminar Nasional dan Diseminasi Penelitian Dosen*. **2**: 338–343.
- Baharuddin, M., Abdul, R. P., Ahyar, A., dan Nursiah, L. 2014. Pengaruh suhu dan pH terhadap hidrolisis CMC oleh enzim selulase dari isolat bakteri larva kupu-kupu *Cossus cossus*. *Jurnal Teknosains*. **8**(3): 343–354.
- Behera, A. R., Veluppil, A., and Dutta, K. 2019. Optimization of physical parameters for enhanced production of lipase from *Staphylococcus hominis* using response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*. **26**(33): 34277–34284.
- Bhatia, S. 2018. *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology*. IOP Publishing. Bristol.
- Borgaonkar, K. and Patil, R. 2020. RNA as enzymes and comparison of its properties with proteins as enzymes. *MedPulse International Journal of Biochemistry*. **13**(1): 12–19.
- Budžaki, S., Velić, N., Ostojčić, M., Stjepanović, M., Rajs, B. B., Šereš, Z., Maravić, N., Stanojev, J., Hessel, V., and Strelec, I. 2022. Waste management in the agri-food industry: the conversion of eggshells, spent coffee grounds, and brown onion skins into carriers for lipase immobilization. *Foods*. **11**(3): 1–9.

- Cakmak, M. and Halide, A. 2021. Screening of microfungi for lipolytic activity and optimization of process parameters in lipase production by solid substrate fermentation using selected microfungi (*Penicillium aurantiogriseum*). *Kuwait Journal of Science*. **48**(1): 98–105.
- Chairunnisa, C., Riyanto, R., dan Karim, A. 2019. Isolasi dan uji bakteri lipolitik dalam mendegradasi minyak pada limbah cair kelapa sawit di Kebun Marihat, Pematang Siantar. *Jurnal Ilmiah Biologi UMA*. **1**(2): 44–52.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P. K. 2020. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*. **19**(169): 1–42.
- Chen, W. H., Carrera Uribe, M., Kwon, E. E., Lin, K. Y. A., Park, Y. K., Ding, L., and Saw, L. H. 2022. A comprehensive review of thermoelectric generation optimization by statistical approach: Taguchi method, Analysis of Variance (ANOVA), and Response Surface Methodology (RSM). *Renewable and Sustainable Energy*. **169**: 1–17.
- Citra, S. dan Nurhasanah. 2021. Skrining bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang Lampung. *Rafflesia Journal of Natural and Applied Science*. **1**(1): 50–58.
- Dutta, S., Nripes, K. M., and Lalitagauri, R. 2010. Statistical optimisation of fermentation process parameters for the production of an alkaline, thermostable lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Indian Chemical Engineer*. **52**(2): 106 –115.
- Ebrahimpour, A., Raja , N. Z., Nor, H. A., Mahiran, B., and Abu, B. S. 2011. Lipase production and growth modeling of a novel thermophilic bacterium: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain AFNA. *Electronic Journal of Biotechnology*. **14**(4):1–16.
- Ertugal, S., Donmez, G., and Takac, 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
- 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.
- Fadhilah, W. K., Saputra, H. A., and Baby, N. 2022. Mung beans (*Phaseolus radiates* L.): Utilization as components of the growth medium *Bacillus subtilis*. *Asian Journal of Health and Applied Sciences*. **1**(2): 24–31.

- Fibriana, F., Upaichit, A., and Cheirsilp, B. 2021. Turning waste into valuable products: Utilization of agroindustrial oily wastes as the low-cost media for microbial lipase production. *Journal of Physics: Conference Series*. **1918**(5): 1–12.
- Gao, J., Zhu, R., Li, L., Gao, G., Wu, X., Zhang, Y., and Zhang, Y. 2023. An adaptive absorption spectroscopy with adjustable moving window width for suppressing nonlinear effects in absorbance measurements. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **294**: 1–10.
- Gharib, A. A., El-Hamid, M. I. A., El-Aziz, N. K. A., Yonan, E. Y., and Allam, M. O. 2020. *Bacillus cereus*: Pathogenicity, viability and adaptation. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. **8**(1): 34–40.
- Girelli A., Astolfi M, and Scuto F. 2020. Agroindustrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*. **244**: 2–11.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., and Rai, V. 2013. A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*. **3**: 1–18.
- Haque, M. A. 2021. Pathogenicity of feed-borne *Bacillus cereus* and its implication on food safety. *Agrobiological Records*. **3**: 1–16.
- Husna, N. Q. 2021. Produksi, pemurnian, dan karakterisasi enzim lipase dari bakteri lokal LKM G1 toleran pelarut organik asal pengomposan limbah domestik. *Skripsi*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Ibrahim, D., Haritharan, W., and Sheh, L. 2015. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*. **6**(3): 265–271.
- Izebe, K. S., Onaolapo, J. A., Ibrahim, K., Ibrahim, Y. K. E., Oladosu, P., Ya'aba, Y., Mohammed, S. B., Adigwe, P. O., and Olurinola, P. F. 2020. Formulated sorghum media as alternative to nutrient broth in cultivation of *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571) and *Bacillus subtilis* (NCTC 8241). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **9**(10): 1845–1851.
- Jana A., Maity C., Halder S., Das A., Pati B., Mondal K., and Mohapatra P. 2013. Structural characterization of thermostable, solvent tolerant, cytosafe tannase from *Bacillus subtilis* PAB2. *Biochemical Engineering Journal*. **77**: 161–170.
- Jawetz, Melnick, and Aldeberg. 2014. Mikrobiologi Kedokteran. *Mikrobiologi Kedokteran*. **27**(1). 251–257.

- Khairani dan Kartika. 2023. Isolasi dan identifikasi bakteri lipolitik dari limbah cair kelapa sawit (*Elaeis quineensis jacq.*). *Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*. **6**(1): 1–13.
- Kim, B. H., Hwang, J., and Akoh, C. C. 2023. Liquid microbial lipase—recent applications and expanded use through immobilization. *Current Opinion in Food Science*. **50**(1): 1–9.
- Koocheki, Khajeh, and Hosseini. 2020. *Saffron*. Woodhead Publishing. New Delhi.
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G., Gill, H., Huynh, T., and Dia, D. 2021. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardization of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*. **17**(3): 1–19.
- Lowry, O., Rosebrough, and Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **3**(12): 193–265.
- Machali. 2021. *Metode penelitian kuantitatif*. Suka Press. Yogyakarta.
- Marco, B., Barbara, S. R., Eliane, G. T., Ana, C. K., and Herida, R. 2019. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **27**: 1–8.
- Mazhar, H, Naaz, A., Sakhawat, A., Amir, S., Zahid, H., and Syed, S. 2017. Optimized production of lipase from *Bacillus subtilis* PCSIRNL-39. *African Journal of Biotechnology*. **16**(19): 1106–1115.
- Miarti, A. dan Legasari, L. 2022. Ketidakpastian pengukuran kadar biuret, kadar nitrogen, dan kadar air pada pupuk urea di laboratorium kontrol produksi PT Pupuk Sriwidjaja Palembang. *Jurnal Cakrawala Ilmiah*. **3**(2): 681–674.
- Mirawati, Nur, M., dan Ummi, Z. 2021. Uji antiseptik ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. *Journal of Chemistry*. **9**(2): 135–540.
- Mishra, B. and Varjani, S. 2019. Evaluation of pullulan production by a newly isolated *Micrococcus luteus*. *Indian Journal Biology*. **57**(11): 813–820.
- Mohammed, W., Amma, Q. A., and Asma, O. E. 2020. Green chemistry: Principles, applications, and disadvantages. *Chemical Methodologies*. **4**: 408–423.
- Muloiwa, M., Stephen N., and Megersa, D. 2020. Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. *South African Journal of Chemical Engineering*. **33**: 141–150.

- Nguyen, A. T., and Tallent, S. M. 2019. Screening food for *Bacillus cereus* toxins using whole genome sequencing. *Food Microbiology*. **78**(3): 164–170.
- Nugroho, S. A., Wardana, R., Fatimah, T., Mastuti, L., dan Novenda, I. L. 2022. hidrolisis lemak oleh enzim lipase pada tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*). *Jurnal Biologi Dan Pembelajaran Biologi*. **7**(1): 81–89.
- Pandia, Hernawati, Jari, dan Kahar. 2020. Pengaruh laju alir terhadap COD, BOD, dan VFA pada pengolahan Limbah Cair Kelapa sawit (LCPKS) dalam bioreaktor anaerobik. *Jurnal Chemurgy*. **4**(2): 30–37.
- Patel, G., Shah, K., Shindhal, T., Rakholiya, P., and Sunita. 2021. Process parameter studies by central composite design of response surface methodology for lipase activity of newly obtained *Actinomyce*. *Environmental Technology and Innovation*. **23**: 1–14.
- Phukon, L.C., Chourasia, R., Kumari, M., Godan, T., Sahoo, D., Parameswaran, B. and Rai, A. 2020. Production and characterisation of lipase for application in detergent industry from a novel *Pseudomonas helmanticensis* HS6. *Bioresource Technology*. **309**: 1–8.
- 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*. **15**(2): 2798–2811.
- Pratiwi, D. 2013. Produksi dan karakterisasi enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan induser minyak jagung serta kofaktor Na⁺ dan Co²⁺. *Saintia Kimia*. **1**(2): 1–5.
- Pratiwi, R. and Nandiyanto, A. 2022. How to read and interpret UV-Vis spectrophotometric results in determining the structure of chemical compounds. *Indonesian Journal of Educational Research and Technology*. **2**(1): 120.
- Purwaningrum, N., Lusiana, M., dan Diah, P. 2002. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi n-heksan, etil asetat dan air dari sabut kelapa muda (*Cocos nucifera linn*) terhadap *Escherichia coli* ESBL (extended spectrum beta lactamase). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. **7**(1): 29–37.
- Putri, D. M., Ristiani, L., dan Hasanah, Q. 2023. Peran enzim dalam proses metabolisme menurut Al-Quran dan hadist. *Journal of Islamic Guidance and Counselling*. **2**(1): 194–206.
- Rachmawati, F. 2021. Skrining aktivitas lipase dari isolat bakteri–bakteri air laut tercemar minyak di Pelabuhan Panjang Lampung. *Laporan Praktik Kerja Lapangan*. Universitas Lampung. Lampung.

- Rahmi, H., Hariyanti, Rina, P., dan Devi, M. 2020. Analisis hasil fraksinasi protease dan lipase yang berasal dari saluran pencernaan udang vaname (*Litopenaeus vannamei*). *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. **7**(2): 194–202.
- Rait, A., Nurhasanah, dan Syaiful, B. 2021. Pemurnian parsial enzim lipase dari bakteri isolat lokal LKMA1 dan penentuan aktivitasnya dengan metode spektrofotometri. *Prosiding Seminar Nasional Sains*. **6**: 1–5.
- Raveendran, S., Kuruvilla, A., and Rebello, S. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*. **56**(1): 9–17.
- Rocha, F. S., Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Kaliaguine, S., and Patience, G. S. 2018. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy UV-Vis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. **96**(12): 2512–2517.
- Salihu, A., Alam, M. Z., Abdulkarim, M. I., and Salleh, H. M. 2011. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **69**(2): 66–73.
- Sarwani, M., Fawzi, M., Osman, S., and Nasrin, A. 2019. Bio-methane from *Palm il Mill Effluent* (POME): transportation fuel potential in Malaysia. *Journal of Advanced Research in Fluid Mechanics and Thermal Sciences*. **63**(1): 1–11.
- Satti, S. M., Abbasi, A. M., Salahuddin, Rana, Q. A., Marsh, T. L., Auras, R., Hasan, F., Badshah, M., Farman, M., and Shah, A. A. 2019. Statistical optimization of lipase production from *Sphingobacterium sp.* strain S2 and evaluation of enzymatic depolymerization of Poly (lactic acid) at mesophilic temperature. *Polymer Degradation and Stability*. **160**: 1–13.
- Seftiono, H. 2017. Mikroorganisme di Indonesia dan peranannya dalam bidang pangan: kajian pustaka. *Jurnal Argointek*. **11**(1): 14–20.
- Septiani, S. 2019. Karakterisasi lipase termostabil (isolat A196) berdasarkan parameter temperatur dan pH pada industri makanan. *Lantanida Journal*. **7**(1): 49–57.
- Shahedi, M., Zohreh, H., Maryam, Y., Jasper, B. and Mehdi, M. 2021. Improvement of biodiesel production from palm oil by co-immobilization of *Thermomyces lanuginosa* lipase and *Candida antarctica* lipase B: Optimization using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*. **170**: 490–502.

- Shintawati, Udin, H., dan Agus, H. 2017. Karakteristik pengolahan limbah cair pabrik minyak kelapa sawit dalam bioreaktor cigar semi kontinu. *Jurnal Teknik Pertanian Lampung*. **6**(2):81–88.
- Sholeha, R. dan Agustini, R. 2021. Lipase biji-bijian dan karakteristiknya. *UNESA Journal of Chemistry*. **10**(2): 168–186.
- Spriggs, K. A., Martin, B., and Anne, E.W. 2010. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular Cell*. **40**: 228–237.
- Stryer, L., Tymoczko, J. and Berg, J. 2002. *Biochemistry*. W.H Freeman. New York.
- Sukmawati dan Simamora. 2020. Identifikasi dan karakterisasi aktivitas ekstrak kasar enzim. *Jurnal Median*. **12**(1): 28–37.
- Subroto, E., Elazmanawati, L., Fitry, F., Rossi, I., Gissela, P., Miswa, S., Hanna, C., and Salsabila, J. 2020. The analysis techniques of amino acid and protein in food and agricultural products. *International Journal of Scientific and Technology Research*. **9**(10): 29–36.
- Sumbono, A. 2021. *Enzim Seri Biokimia Pangan Dasar*. Penerbit Deepublish. Sleman.
- Susanti, R. dan Fidia, F. 2017. *Teknologi Enzim*. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Thabet, H., Seddik, I., Mohamed. W., Sayed, A., and Yusuf, S. 2023. Isolation, screening, and molecular identification of lipase-producing bacteria from different bacterial sources. *Assiut Veterinary Medical Journal*. **69**(179): 134–144.
- Thapa, S., Li, H., Ohair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. Al, Johnson, T., and Zhou, S. 2019. Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*. **61**(8): 579–601.
- Toldra, F. and Leo, M. . N. 2017. *Advances in Food Diagnostics*. John Wiley and Sons. New York.
- Tripathi, A. and Bankaitis, V. A. 2018. Molecular docking: From lock and key to combination lock. *Molecular Medicine and Clinical Applications*. **2**(1): 1–19.
- Verschuuren, G. 2014. *Excel 2013 for Scientists*. Holu Marco Books. Chicago.
- Vitolo, M. 2020. Brief review on enzyme activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*. **9**(2): 60–76.

- Vivek, K., Sandhia, G. S., and Subramaniyan, S. 2022. Extremophilic lipases for industrial applications: A general review. *Biotechnology Advances*. **60**(2): 1–22.
- Wardaniati, I. dan Taibah. 2019. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol bee pollen lebah trigona (*Trigona itama*). *Journal of Pharmacy and Science*. **3**(1): 21–28.
- Yahya, S. 2013. *Spektrofotometri UV-Vis*. Erlangga. Jakarta.
- Yolmeh M. and Jafari S. 2016. Applications of Response Surface Methodology in the food industry processes. *Food and Bioprocess Technology*. **10**: 413–433.