

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM LIPASE DARI
Bacillus cereus ALP E1 SERTA UJI KATALISIS DALAM REAKSI
TRANSESTERIFIKASI**

(Tesis)

Oleh

**NINDY NOVITA SARI
NPM 2327011002**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

ABSTRACT

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE ENZYME FROM *Bacillus cereus* ALP E1 AND CATALYSIS TEST IN TRANSESTERIFICATION REACTIONS

By

NINDY NOVITA SARI

Lipase is a hydrolase enzyme capable of catalyzing reactions such as esterification, transesterification, hydrolysis, alcoholysis, acidolysis, aminolysis, and interesterification. Lipase has broad industrial applications but exploration of new lipases from *Bacillus cereus* is still limited. This study aims to obtain lipase enzymes from *B. cereus* ALP E1, purify, characterize enzymes, and determine catalytic ability of lipase in transesterification reactions.

Lipase enzyme production used the submerged fermentation method, then purification by ammonium sulfate fractionation and dialysis. Lipase enzyme activity was analyzed by UV-Vis spectrophotometry and protein content by the Lowry method. Characterization was carried out on several parameters, including pH, temperature, substrate variation, surfactants, metal ions, and organic solvents. After that, the catalytic ability of the lipase enzyme in the transesterification reaction was tested.

The results of lipase enzyme production from *B. cereus* ALP E1 using optimum conditions of pH 7, 8% Palm Oil Mill Effluent (POME) substrate, 155 rpm agitation, and 72 hours growth time obtained a specific activity of 2525.34 U/mg. Purification with 20-90% ammonium sulfate fraction and dialysis obtained specific activities of 12,520.22 U/mg and 31,083.14 U/mg. SDS-PAGE analysis showed a dominant protein band with a molecular weight of 55 kDa. The characteristics of the lipase enzyme showed optimum activity at pH 5, a temperature of 40°C, the optimum substrate *p*-Nitrophenyl palmitate. The addition of Tween 20 surfactant, Ba²⁺ ion, and organic solvent chloroform increased the relative activity of the lipase enzyme. Transesterification test using lipase catalyst produced oleate compounds and loss of trilaurin. Based on these results, it can be concluded that lipase from *B. cereus* ALP E1 has the potential to be used in industrial applications.

Keywords: *B. cereus* ALP E1, characterization, lipase, purification, transesterification.

ABSTRAK

PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP E1 SERTA UJI KATALISIS DALAM REAKSI TRANSESTERIFIKASI

Oleh

NINDY NOVITA SARI

Lipase adalah salah satu enzim hidrolase yang memiliki kemampuan mengkatalisis reaksi seperti, esterifikasi, transesterifikasi, hidrolisis, alkoholisis, asidolisis, aminolisis, dan interesterifikasi. Lipase memiliki aplikasi luas di bidang industri, namun eksplorasi lipase baru dari *Bacillus cereus* masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1, memurnikan dan mengkarakterisasi enzim, serta mengetahui kemampuan katalisis lipase dalam reaksi transesterifikasi.

Produksi enzim lipase menggunakan metode *submerged fermentation*, kemudian dimurnikan dengan metode fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Aktivitas enzim lipase dianalisis dengan metode spektrofotometri UV-Vis dan kadar protein dengan metode Lowry. Karakterisasi dilakukan pada beberapa parameter diantaranya: pH, suhu, variasi substrat, surfaktan, ion logam, dan pelarut organik. Setelah itu dilakukan uji kemampuan katalisis dari enzim lipase dalam reaksi transesterifikasi.

Hasil produksi enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1 menggunakan kondisi optimum pH 7, substrat *Palm Oil Mill Effluent* (POME) 8%, agitasi 155 rpm, dan waktu pertumbuhan 72 jam didapatkan aktivitas spesifik 2525,34 U/mg. Pada pemurnian dengan fraksi amonium sulfat 20-90% dan dialisis didapatkan aktivitas spesifik sebesar 12.520,22 U/mg dan 31.083,14 U/mg. Analisis SDS-PAGE memperlihatkan pita protein dominan dengan berat molekul 55 kDa. Karakteristik enzim lipase menunjukkan aktivitas optimum pada pH 5, suhu 40°C, substrat optimum *p*-Nitrofenil palmitat. Penambahan surfaktan Tween 20, ion Ba²⁺, dan pelarut organik kloroform meningkatkan aktivitas relatif enzim lipase. Uji transesterifikasi menggunakan katalis lipase menghasilkan senyawa oleat dan hilangnya trilaurin. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa lipase dari *B. cereus* ALP E1 berpotensi digunakan dalam aplikasi industri.

Keywords: *B. cereus* ALP E1, karakterisasi, lipase, pemurnian, transesterifikasi.

**PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM LIPASE DARI
Bacillus cereus ALP E1 SERTA UJI KATALISIS DALAM REAKSI
TRANSESTERIFIKASI**

Oleh

NINDY NOVITA SARI

Tesis

**Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
MAGISTER SAINS**

Pada

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



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

Judul Penelitian : **PRODUKSI DAN KARAKTERISTISASI
ENZIM LIPASE DARI *Bacillus cereus* ALP
E1 SERTA UJI KATALISIS DALAM
REAKSI TRANSESTERIFIKASI**

Nama Mahasiswa : **Nindy Novita Sari**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2327011002**

Program Studi : **Magister Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

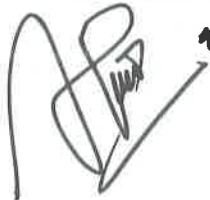


Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.
NIP. 19741211 199802 2 001



Dr. Titin Haryati, S.Si., M.Si.
NIP. 19811112 200901 2 006

**2. Ketua Program Studi Magister Kimia
FMIPA Universitas Lampung**



Prof. Dr. Ilim, M.S.
NIP. 19650525 199003 2 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

Sekretaris : **Dr. Titin Haryati, S.Si., M.Si.**

Anggota : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**

Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D.

Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

NIP. 196111001 200501 1 002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.

NIP. 19640326 198902 1 001

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **19 Januari 2026**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nindy Novita Sari
Nomor Pokok Mahasiswa : 2327011002
Program Studi : Magister Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa tesis saya yang berjudul **“Produksi Dan Karakterisasi Enzim Lipase Dari *Bacillus Cereus* ALP E1 Serta Uji Katalisis Dalam Reaksi Transesterifikasi”** adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan (*plagiarism*) atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai dengan tata etika ilmiah yang berlaku. Hak intelektual karya ilmiah ini saya serahkan kepada Universitas Lampung dan saya tidak keberatan jika data tesis ini di kemudian hari dipergunakan oleh pihak dosen atau prodi untuk kepentingan publikasi selama nama saya dicantumkan dalam publikasi tersebut sesuai kesepakatan bersama.

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

Bandar Lampung, 19 Januari 2026

uat Pernyataan,



Nindy Novita Sari
NPM. 2327011002

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kota Baru, Kalimantan Selatan pada tanggal 11 November 1999 sebagai anak pertama dari dua bersaudara dari pasangan Ayahanda Triyono dan Ibunda Murni Asih. Penulis menyelesaikan pendidikan formal di TK Harapan Bunda pada tahun 2004, kemudian melanjutkan di SD Negeri 01 Sidang Gunung Tiga yang diselesaikan pada tahun 2013, selanjutnya di SMP Negeri 1 Penawartama hingga tahun 2016, dan melanjutkan di SMA Negeri 1 Simpang Empat yang diselesaikan pada tahun 2018. Pada tahun 2018, penulis diterima di Jurusan Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Lambung Mangkurat, dengan program studi S-1 Pendidikan Kimia. Pada tahun 2023, penulis berkesempatan melanjutkan pendidikan Pascasarjana pada Universitas Lampung dengan Program Studi Magister Kimia.

Selama menjalani program Pascasarjana, penulis berkesempatan menjadi narasumber dalam kegiatan Program Jati Diri (Projadi) di STIT Darul Fattah Bandar Lampung pada tahun 2024. Dalam bidang publikasi ilmiah, penulis berkontribusi menjadi salah satu penulis karya ilmiah yang dipublikasikan dalam Jurnal Internasional bereputasi Scopus Q3 (*Protein Expression and Purification*) sebagai penulis pertama, yang berjudul “Partial purification and characterization acidophilic lipase from *Bacillus cereus* ALP E1”. Untuk kedepannya, penulis berharap dapat terus meng-*explore*, mengasah, dan mengembangkan *softskill* penulis dalam bidang-bidang lainnya dan dapat menghasilkan karya-karya lain yang bermanfaat.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya
Penulis mempersembahkan karya ini teruntuk:*

*Kedua orang tua
Yang telah membesarkan, mendidik, mendo'akan, memberikan kasih sayang dan
motivasi kepada penulis. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan yang
selalu diberikan kepada penulis*

*Adik penulis dan keluarga besar
Yang telah memberikan dukungan dan semangat*

*Dr. Nurhasanah, M.Si., dan Dr. Titin Haryati, M.Si.
Yang telah sabar membimbing, memberikan ilmu, serta saran dan masukannya
selama menempuh pendidikan dan penelitian di kampus*

*Sahabat-sahabatku tercinta
Yang selalu sabar menemani, memberikan keceriaan, motivasi, dan semangat*

Seseorang yang kelak menjadi pendamping hidup

*Almamater tercinta
Universitas Lampung*

MOTTO

“Dan janganlah kamu berputus asa dari rahmat Allah. Sesungguhnya tiada berputus dari rahmat Allah melainkan orang-orang yang kufur”

(Q.S. Yusuf : 87)

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(Q.S. Al-Baqarah : 286)

“Sesungguhnya kemenangan itu beriringan dengan kesabaran.

Jalan keluar beriringan dengan kesukaran.

Dan sesudah kesulitan pasti akan ada kemudahan”

(H.R. Tirmidzi)

“Keberanian sejati adalah menyelesaikan apa yang telah dimulai”

(Nindy Novita Sari)

SANWACANA

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT, atas rahmat, ridho, dan hidayah-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tesis yang berjudul **“Produksi Dan Karakterisasi Enzim Lipase Dari *Bacillus Cereus* ALP E1 Serta Uji Katalisis Dalam Reaksi Transesterifikasi”**. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian Tesis ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Teriring doa yang tulus, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Penyemangat terbesar dalam hidup, kedua orang tua, Ayahanda Triyono dan Ibunda Murni Asih, yang selalu mendoakan, memberikan kasih sayang, motivasi dan dukungannya kepada penulis dalam keadaan apapun.
2. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., dan Ibu Dr. Titin Haryati, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah membimbing penulis selama proses penelitian dan penulisan Tesis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan. Semoga Allah SWT membalas kebaikan Ibu dengan pahala dan keberkahan yang tiada terhingga.
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A.S. M.S., Bapak Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D., dan Ibu Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, M.Si. selaku Dosen Pembahas, yang telah memberikan banyak saran dan masukan positif kepada penulis.
4. Ibu Prof. Dr. Ilim, M.S., selaku Ketua Prodi Magister Kimia dan Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.

6. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana.
7. Bapak/Ibu Dosen dan Kepala Laboratorium Jurusan Kimia atas bantuan dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Universitas Lampung.
8. Para staf dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila, Pak Rudi, Mba Yuni, Mas Nomo, Mba Wit, dan Mba Della, atas segala bantuan yang diberikan kepada penulis.
9. Adik tersayang, Bunga Setya Putri, yang telah menemani dan mendukung penulis.
10. Rekan-rekan seperjuangan, Armidla, Rista, Laras, Kharisma, Kak Rusyda, dan Kak Syukri. Terimakasih atas kebersamaan dan dukungannya kepada penulis.
11. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Biokimia, Virginia, Talfah, Ulma', Harry, Anam, Dina, Retno, Desvica, Sayid, Alif, Titis, yang telah banyak membantu penulis. Terimakasih atas bantuan, ilmu, semangat, dan dukungannya kepada penulis.
12. Sahabat-sahabat penulis, Firdha Novria Hidayah, S.Pd., Gr., Halimatuzzahra, S.Pd., M.Pd., Armidla Nadya Kurniati, S.Si., M.Si., Rista Anggi Pramudia, S.Si., M.Si. Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si. dan Larasati G. Ermadi, S.Si., M.Si. atas dukungan dan motivasi yang telah kalian berikan.
13. Almamater tercinta Universitas Lampung.
14. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan Tesis ini.

Akhir kata, penulis memohon maaf kepada semua pihak apabila masih terdapat kesalahan dan kekeliruan dalam penulisan Tesis ini. Semoga Tesis ini dapat memberikan kebermanfaatan bagi kita semua.

Bandar Lampung, 19 Januari 2026

Nindy Novita Sari

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	iii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Enzim Lipase	5
2.2. Aplikasi Enzim Lipase di Industri	9
2.3. Produksi Enzim.....	12
2.3.1. <i>Submerged Fermentation</i>	12
2.3.2. <i>Solid-state Fermentation</i>	13
2.4. <i>Bacillus cereus</i>	13
2.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase	15
2.5.1. Uji Aktivitas Enzim	15
2.5.2. Uji Protein Enzim dengan Metode Lowry.....	16
2.6 Spektrofotometri UV-VIS	
2.7 <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)</i>	
III. METODE PENELITIAN.....	22
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22
3.2. Alat dan Bahan	22
3.3. Prosedur Penelitian	23
3.3.1. Tahap Persiapan.....	23
3.3.2. Produksi Enzim.....	24
3.3.3. Pengujian Aktivitas Enzim dan Kadar Protein	25
3.3.4. Pemurnian Enzim	26
3.3.5. Karakterisasi Enzim.....	27
3.3.6. Penentuan Bobot Molekul	30
3.3.7. Uji Transesterifikasi	30

3.4. Skema Penelitian	31
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.4.1. Ekstrak Kasar Enzim Lipase <i>B. cereus</i> ALP E1	32
4.4.2. Enzim Lipase Fraksi Hasil Pemurnian	34
4.4.3. Karakteristik Enzim Lipase	37
4.4.3.1. pH Optimum	38
4.4.3.2. Suhu Optimum.....	40
4.4.3.3. Variasi Substrat.....	41
4.4.3.4. Variasi Surfaktan	43
4.4.3.5. Variasi Pelarut Organik	45
4.4.3.6. Variasi Ion Logam	47
4.4.4. Penentuan Bobot Molekul	49
4.4.5. Uji Transesterifikasi	50
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1. Kesimpulan.....	54
5.2. Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN.....	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aplikasi enzim lipase di bidang industri.....	11
2. Analisis <i>Gas Chromatography Mass-Spectrometry</i> (GC-MS)	20
3. Rangkuman hasil pemurnian enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP	37
4. Hasil analisis GC-MS reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase ekstrak kasar dan dialisis	52
6. Hasil pengukuran absorbansi <i>p</i> -Nitrofenol pada pembuatan kurva standar.....	66
7. Hasil pengukuran absorbansi pada pembuatan kurva standar BSA.....	68
8. Data aktivitas enzim lipase	70
9. Data untuk menghitung kadar protein enzim ekstrak kasar	71
10. Hubungan antara persen kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP E1	72
11. Hubungan antara kejenuhan ammonium sulfat (0-20) % dan (20-90) % dengan aktivitas unit, kadar protein, dan aktivitas spesifik enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP E1	72
12. Data aktivitas enzim lipase secara dialisis	73
13. Data kadar protein enzim lipase secara dialisis.....	73
14. Data aktivitas enzim berdasarkan karakterisasi pH	73
15. Data aktivitas enzim berdasarkan karakterisasi suhu.....	73
16. Data aktivitas enzim berdasarkan karakterisasi substrat.....	73
17. Data aktivitas enzim berdasarkan karakterisasi surfaktan	74
18. Data aktivitas enzim karakterisasi berdasarkan pengaruh pelarut organik	74
19. Data aktivitas enzim karakterisasi berdasarkan pengaruh ion logam	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi enzim lipase.....	5
2. Mekanisme reaksi lipase.	8
3. Reaksi katalisis enzim lipase.....	9
4. Bakteri <i>B. cereus</i>	14
5. Reaksi hidrolisis <i>p</i> -NPP dengan lipase	16
6. Reaksi pada metode Lowry	17
7. Instrumentasi dasar spektrofotometer UV- <i>Vis</i>	18
8. Hasil kromatogram reaksi transesterifikasi oleh lipase	21
9. Diagram alir penelitian.....	31
10. Reaksi uji aktivitas dengan substrat <i>p</i> -NPP	33
11. Hubungan persentase kejenuhan amonium sulfat dengan aktivitas spesifik enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP E1.....	34
12. Hubungan persentase kejenuhan amonium sulfat (0-20) dan (20-90) % dengan aktivitas spesifik enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP E1.....	35
13. Variasi pH terhadap aktivitas enzim lipase	38
14. Variasi suhu terhadap aktivitas enzim.....	40
15. Variasi substrat terhadap aktivitas enzim.....	41
16. Pengaruh variasi surfaktan terhadap aktivitas enzim	43
17. Pengaruh variasi pelarut organik terhadap aktivitas enzim.....	45
18. Pengaruh variasi ion logam terhadap aktivitas enzim.....	47
19. Hasil analisis SDS-PAGE pada enzim lipase dari <i>B. cereus</i> ALP E1	49
20. Reaksi transesterifikasi	51
21. Kromatogram hasil analisis reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase ekstrak kasar (a) dan dialisis (b)	51

22. Kurva standar <i>p</i> -Nitrofenol	67
23. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	68
24. Uji aktivitas unit enzim lipase.....	69
25. Uji kadar protein Lowry	70
26. Kromatogram hasil analisis GC-MS reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase ekstrak kasar	75
27. Kromatogram hasil analisis GC-MS reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase hasil pemurnian dialisis	80

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan larutan buffer	65
2. Kurva standar <i>p</i> -Nitrofenol	66
3. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	68
4. Perhitungan aktivitas enzim	69
5. Perhitungan kadar protein enzim	70
6. Hasil pengukuran kadar protein	71
7. Data penentuan pola fraksinasi amonium sulfat	72
8. Data hasil dialisis	72
9. Data karakterisasi enzim lipase.....	73
10. Hasil analisis GC-MS reaksi transesterifikasi.....	75

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Lipase adalah salah satu enzim hidrolase yang paling banyak dibutuhkan pada bidang industri. Lipase memiliki kemampuan mengkatalisis pemecahan trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol, serta mengkatalisis reaksi lainnya seperti reaksi esterifikasi, transesterifikasi, hidrolisis, alkoholisis, asidolisis, aminolisis, dan interesterifikasi (Ali *et al.*, 2023; Jayaraman *et al.*, 2020; and Kim *et al.*, 2023). Karena kemudahannya digunakan dalam berbagai reaksi, maka enzim lipase banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri seperti industri deterjen, kertas, minyak dan lemak, kosmetik, farmasi, dan makanan. Aplikasi lipase lainnya yakni dalam biosensor, biodiesel, aplikasi biomedis, pestisida, dan bioremediasi (Ali *et al.*, 2023).

Enzim lipase dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Enzim dari mikroorganisme lebih banyak dipelajari karena sifatnya yang ramah lingkungan dan dapat diproduksi dengan metode fermentasi pada substrat yang ekonomis, kondisi pertumbuhan yang dapat dikendalikan, dan menghasilkan enzim dengan aktivitas yang tinggi (Chandra *et al.*, 2020).

Beberapa mikroorganisme penghasil lipase di antaranya bakteri, jamur, dan ragi. Enzim dari mikroorganisme seperti bakteri lebih menguntungkan karena memiliki sifat yang khas dan dapat diproduksi berkelanjutan yang tidak dipengaruhi oleh musim, aktivitas yang dihasilkan tinggi, dan stabilitas yang baik (Thabet *et al.*, 2023). Mikroorganisme penghasil lipase dengan aktivitas tinggi salah satunya yakni bakteri *Bacillus cereus* (Chandra *et al.*, 2020).

B. cereus merupakan bakteri gram positif yang dikenal mampu menghasilkan lipase dengan aktivitas tinggi, yang berperan penting dalam berbagai aplikasi industri, termasuk dalam produksi biodiesel. Beberapa penelitian enzim lipase dari *B. cereus* telah dilaporkan diantaranya, optimasi dan karakterisasi lipase alkalifilik dari strain *B. cereus* NC7401 yang baru diisolasi dari tanah tercemar bahan bakar diesel pada sumber karbon yang berbeda seperti pati, maltosa dan tripton didapatkan aktivitas lipase maksimum berturut-turut sebesar 30,6; 40; dan 38,6 U/mL. Enzim dari *B. cereus* NC7401 optimal pada suhu 55 °C dan pH 8,0 toleran terhadap metanol 1,5% (v/v) sebagai pelarut organik, Triton X-100 sebagai media aditif 1,5% (b/v) dan Ni^{2+} sebagai ion logam (Akhter *et al.*, 2022). Lipase yang dihasilkan dari *B. cereus* (PCSIR NL-37) didapatkan karakter enzim yang menunjukkan aktivitas tertinggi pada suhu 60 °C dan pH 7 berturut-turut sebesar 95,56 U/mL dan 124,50 U/mL. Aktivitas enzim sangat meningkat dengan adanya ion logam K^+ dan Zn^+ adanya SDS tidak mempengaruhi aktivitas lipase, sedangkan pada penambahan triton X-100 didapatkan aktivitas lipase maksimum sebesar 23,90 U/mL dan pada substrat minyak almond aktivitas lipase sebesar 120,00 U/mL (Mazhar *et al.*, 2023). Enzim lipase dari *B. pumilus* endofit WSS5 memiliki berat molekul sekitar 28 KDa berdasarkan hasil SDS-PAGE, dengan aktivitas optimal pada suhu 37 °C dan pH 8. Aktivitas lipase meningkat dengan adanya pelarut organik seperti etil asetat, metanol, 2-propanol, aseton, dan etanol (Khan *et al.*, 2023).

Aplikasi lipase lainnya yakni produksi biodiesel pada reaksi transesterifikasi. Penelitian yang dilakukan Bacha *et al.*, (2022) melaporkan bahwa pada reaksi transesterifikasi enzimatik yang dilakukan untuk produksi biodiesel dari minyak goreng bekas (WCO) dengan menggunakan enzim lipase *Bacillus stearothermophilus* dan *Staphylococcus aureus* yang diimobilisasi secara individual pada CaCO_3 untuk digunakan sebagai katalis didapatkan hasil biodiesel yang signifikan sebesar $97,66 \pm 0,57\%$. Stabilitas enzim dalam kehadiran ion logam, surfaktan, dan inhibitor, serta parameter kinetik menunjukkan potensi aplikasi enzim ini dalam industri kulit dan deterjen (Khan *et al.*, 2023).

Produksi enzim lipase pada skala industri umumnya dilakukan menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF) karena memiliki keunggulan seperti kontrol yang lebih baik terhadap parameter proses serta risiko kontaminasi yang relatif rendah jika dibandingkan dengan metode *Solid-State Fermentation* (SSF). Hal ini menjadikan SmF lebih cocok untuk produksi enzim dalam jumlah besar (Bussamara *et al.*, 2010; Szymczak *et al.*, 2021). Penelitian yang dilakukan oleh Ertuğrul *et al.*, (2007) mengeksplorasi produksi enzim lipase dari *Bacillus sp.* dengan menggunakan campuran limbah air dari penggilingan zaitun sebagai media fermentasi. Media tersebut terdiri dari 20% (v/v) *whey* yang ditambahkan dengan 1% (v/v) triolein, serta 20% (v/v) *whey* yang dicampur dengan 1% (v/v) limbah air pabrik zaitun, dengan tambahan 5,0 g/L pepton dan 3,0 g/L ekstrak ragi. Fermentasi dilakukan selama 64 jam pada suhu 30 °C dengan pH 6,0, dan hasilnya diperoleh aktivitas lipase ekstraseluler sebesar 15 U/mL dan aktivitas lipase intraseluler sebesar 168 U/mL. Selain penentuan kondisi optimum pada produksi enzim, karakterisasi enzim lipase juga perlu memperhatikan berbagai parameter, seperti pengaruh pH, suhu, senyawa organik, dan ion logam, guna mencapai aktivitas enzim yang optimal. Oleh karena itu, optimasi dan karakterisasi enzim lipase sangat penting untuk memperoleh aktivitas enzim yang maksimal (Haeruddin dkk., 2023).

Isolat bakteri *B. cereus* ALP E1 merupakan salah satu bakteri indigen yang telah berhasil diisolasi dari air laut pelabuhan panjang (Citra dan Nurhasanah, 2021). Bakteri ini sudah dilakukan uji aktivitas lipase pada kondisi optimum pH 7, konsentrasi substrat minyak zaitun 8% diperoleh aktivitas sebesar 0,16 U/mL (Rachmawati, 2021). Penambahan *Palm Oil Mill Effluent* (POME) sebagai substrat dalam pertumbuhan mikroba ini sudah diperoleh yaitu pada kondisi optimum substrat POME 8%, pH 7, konsentrasi inokulum 1%, kecepatan agitasi 155 rpm, dan waktu pertumbuhan 72 jam didapatkan aktivitas lipase tertinggi sebesar 55,8072 U/mL (Azizah *et al.*, 2024). Namun, aktivitas lipase tersebut relatif masih rendah dan karakteristik enzim lipase yang dihasilkan belum diketahui.

Berdasarkan uraian di atas, pada penelitian ini akan dilakukan produksi dan karakterisasi enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1. Produksi enzim lipase dilakukan dengan metode *submerged* fermentasi menggunakan kondisi optimum yang telah didapat oleh peneliti sebelumnya (Azizah *et al.*, 2024). Enzim lipase yang dihasilkan kemudian dimurnikan secara parsial dengan fraksinasi amonium sulfat dan dialisis, enzim lipase hasil pemurnian selanjutnya dikarakterisasi meliputi pH, suhu, variasi substrat, pengaruh pelarut organik, ion logam, dan surfaktan. Uji aktivitas enzim dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis, kadar protein dengan metode Lowry dan penentuan bobot molekul menggunakan SDS-PAGE. Enzim lipase hasil pemurnian juga dilakukan uji katalisis reaksi transesterifikasi, hasil reaksi transesterifikasi dianalisis menggunakan kromatografi gas (GC).

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1 dengan kemurnian yang relatif tinggi.
2. Mengetahui karakteristik enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1.
3. Mengetahui kemampuan enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1 dalam mengkatalisis reaksi transesterifikasi.

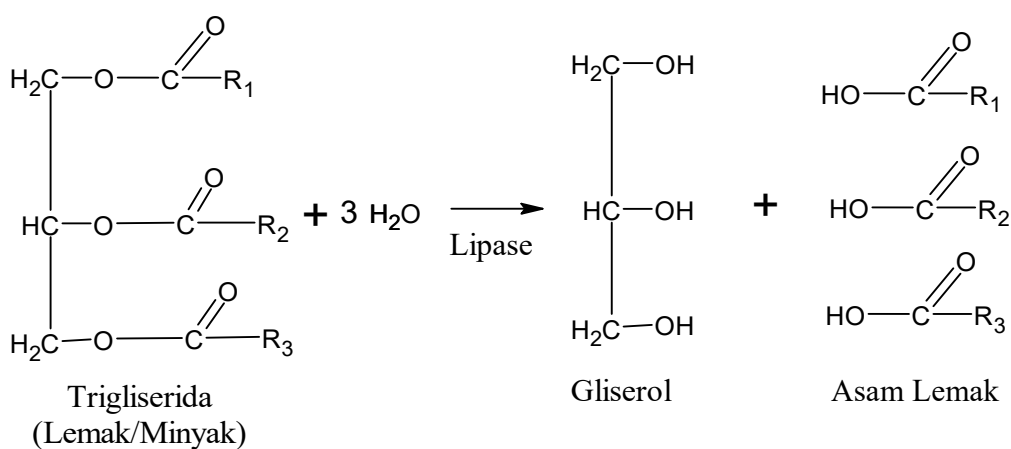
1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan baru dalam pengembangan mikroba indigenus lokal sebagai penghasil lipase. Enzim lipase yang berhasil dikarakterisasi dapat dipelajari lebih lanjut untuk diaplikasikan pada berbagai bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim Lipase

Triacylglycerol Lipase EC 3.1.1.3 atau yang lebih dikenal sebagai lipase, merupakan salah satu kelompok utama biokatalis yang memiliki beragam aplikasi dalam bioteknologi. Lipase umumnya larut dalam air dan berfungsi menghidrolisis triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan gliserol, yang kemudian diubah menjadi gula. Selain itu, lipase juga mampu mengkatalisis reaksi organik, baik dalam media berair maupun media tanpa air, melalui reaksi hidrolisis, gliserolisis, dan transesterifikasi (Fathi *et al.*, 2021). Oleh karena itu, selain menghasilkan asam lemak dan gliserol, lipase juga dapat menghasilkan berbagai ester, sebagian gliserida, serta lemak yang diesterifikasi dari substrat yang digunakan. Enzim ini memecah ikatan ester pada lemak dan gliserol karena sifat khususnya (Nugroho dkk., 2022). Reaksi katalis oleh enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi enzim lipase

Lipase dapat dibagi menjadi beberapa jenis berdasarkan fungsi khususnya, yang merupakan faktor kunci dalam penentuannya dalam aplikasi industri. Berdasarkan spesifisitasnya lipase dapat dikelompokkan menjadi empat tipe utama:

1. Regioselektif

Lipase regioselektif cenderung mengarahkan reaksi ke arah yang lebih menguntungkan dan menghindari reaksi sampingan lainnya. Sifat lipase ini sangat penting bagi industri kimia dan farmasi, terutama dalam produksi gliserida terstruktur seperti substitusi lemak kakao (*Cocoa-butter substitutes/CBS*) dan trigliserida rantai *medium long medium* (MLM). Lipase regioselektif dibagi lebih lanjut menjadi:

a. Lipase 1,3

Lipase ini mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol pada posisi C1 dan C3 pada tulang punggung gliserol dari trigliserida, menghasilkan asam lemak bebas, 2-monoasilgliserol, dan 1,2 atau 2,3-diasilgliserol.

b. Lipase 2

Lipase ini mengkatalisis penghilangan selektif asam lemak dari posisi kedua (karbon) pada tulang punggung gliserol dari molekul *triacylglycerol*, sehingga menghasilkan 1,3-diasilgliserol secara spesifik. Spesifisitas sn-2 ini sangat langka dan telah dikaitkan dengan lipase dari *Geotrichum candidum*, yang memiliki kemampuan untuk menghidrolisis asam oleat dan linoleat dari posisi sn-2 pada trigliserida (Verma *et al.*, 2021).

2. Lipase spesifik substrat

Lipase spesifik substrat dapat digunakan secara efektif dalam reaksi di mana mereka secara selektif bekerja pada substrat tertentu dalam campuran bahan yang berbeda, sehingga memfasilitasi sintesis produk yang diinginkan. Secara umum, substrat yang dapat dihidrolisis oleh lipase spesifik substrat meliputi asam lemak dan alkohol. Lipase-lipase ini memiliki spesifisitas terhadap gugus asam lemak atau alkohol dari substrat lipase. Mereka dapat diklasifikasikan secara luas menjadi kategori berikut:

a. Lipase spesifik lemak adalah lipase ini spesifik untuk asam lemak berdasarkan panjang rantainya. Beberapa lipase lebih suka bekerja pada asam lemak rantai pendek, beberapa pada rantai sedang, sementara yang lain pada rantai panjang.

Lipase dari *B. cereus* menunjukkan spesifisitas untuk asam lemak rantai pendek (C4:0) hingga rantai sedang (C12:0). Lipase dari *Pseudomonas* sp. menunjukkan spesifisitas untuk asam lemak terkait posisi ikatan rangkap dan urutan preferensinya adalah sebagai berikut:

asam α -linoleat > asam stearat > asam oleat > asam β -linoleat > asam linoleat terkonjugasi.

- b. Lipase spesifik alkohol adalah bentuk spesifisitas substrat lain dari lipase. Gugus alkohol pada suatu substrat merupakan faktor penting dalam menentukan afinitas lipase terhadap substrat tersebut. Lipase mikroba memiliki spesifisitas substrat yang luas yang memungkinkan mereka mengkatalisis sintesis ester dari alkohol primer, sekunder, dan tersier dengan senyawa aromatik, alifatik, dan alilik. Ester dari alkohol primer dan sekunder telah berhasil disintesis menggunakan lipase, sedangkan biotransformasi alkohol tersier masih menantang karena hambatan sterik dari struktur tersier (Verma *et al.*, 2021).

3. Lipase Non-Spesifik

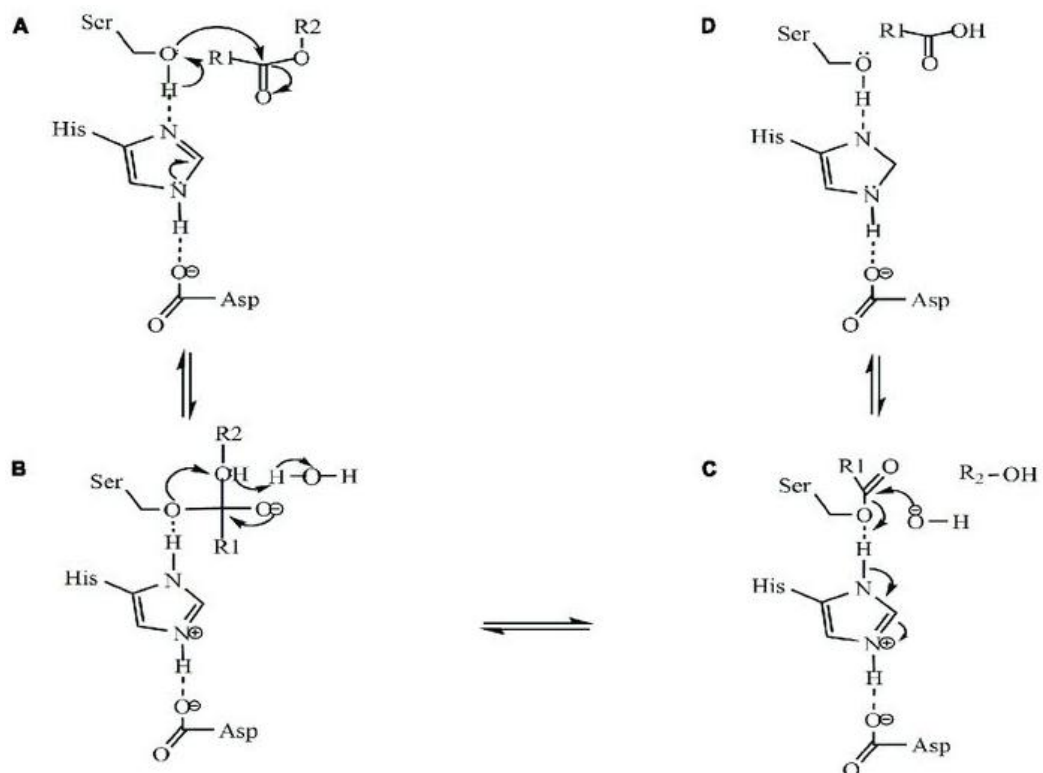
Lipase ini sangat kuat dan mampu bekerja pada berbagai substrat, seperti yang ditunjukkan oleh lipase *Mucor miehei* yang dapat digunakan dalam berbagai aplikasi mulai dari industri kosmetik hingga produksi biodiesel. Lipase ini umumnya mengkatalisis hidrolisis *triacylglycerol* menjadi asam lemak bebas dan gliserol dengan mono- dan diacylglycerol sebagai intermedietnya, juga mampu membalik reaksi di bawah kondisi mikrokuatik yang menghasilkan gliserida dari gliserol dan asam lemak (Verma *et al.*, 2021).

4. Enantioselektif

Lipase enantioselektif ini secara khusus menghidrolisis salah satu isomer dari suatu rasemat. Lipase ini mampu membedakan enantiomer dalam campuran rasemik. Beberapa proses yang dikatalisis oleh lipase enantiospesifik mencakup transesterifikasi alkohol sekunder menjadi produk farmasi, hidrolisis mentol benzoat untuk produk kosmetik/makanan, dan hidrolisis metil ester asam glisidat untuk produk medis/kesehatan. Contoh penerapan lipase semacam ini meliputi

sintesis senyawa isomerik yang hanya berfungsi optimal dalam konfigurasi tertentu (Verma *et al.*, 2021).

Sisi aktif lipase terdiri dari triad katalitik Ser-His-Asp / Glu, triad katalitik serupa dengan yang diamati pada serin protease, oleh karena itu katalis lipase diperkirakan akan berlangsung melalui jalur yang sama seperti protease serin. Mekanisme reaksi lipase berlangsung seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 2.



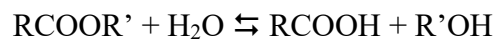
Gambar 2. Mekanisme reaksi lipase (Jaeger *et al.*, 1999).

Berdasarkan mekanisme reaksi pada Gambar 2, tahapan reaksi yang terjadi yaitu, tahap 1 terdapat ikatan lipid, terjadi aktivasi nukleofilik residu serin oleh histidin tetangga dan serangan nukleofilik atom karbon ke karbonil substrat oleh gugus dari Ser O⁻. Kemudian terjadi tahap 2 yaitu transisi intermediet tetrahedral, dengan O⁻ yang distabilkan oleh interaksi dua kelompok NH peptida. Histidin menyumbangkan proton untuk menghilangkan komponen alkohol sebagai gugus dari substrat. Tahap 3 disebut sebagai intermedia kovalen (asil enzim), yaitu komponen asam dari substrat diesterifikasi ke residu serin enzim. Molekul air yang masuk diaktifkan oleh residu histidin tetangga, dan menghasilkan ion

hidroksil yang melakukan serangan nukleofilik pada kovalen intermediet atom karbon karbonil. Selanjutnya pada tahap 4 residu histidin menyumbangkan proton ke atom oksigen dari residu serin aktif, ikatan ester antara komponen serin dan asil terputus, kemudian produk asil dilepaskan (Jaeger *et al.*, 1999).

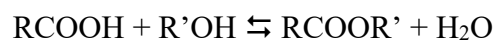
Reaksi katalitik lipase diklasifikasikan kedalam dua kategori utama, yaitu hidrolisis dan sintesis. Reaksi yang masuk dalam kategori sintesis terdiri atas reaksi esterifikasi, interesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis, dan reaksi transesterifikasi (Sholeha dan Agustini, 2021). Reaksi katalitik lipase dapat dilihat pada Gambar 3.

(i) *Hydrolysis*



(ii) *Synthesis*

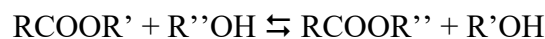
(a) *Esterification*



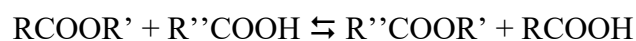
(b) *Interesterification*



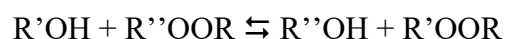
(c) *Alcoholysis*



(d) *Acidolysis*



(e) *Transesterification*



Gambar 3. Reaksi katalisis enzim lipase.

2.2. Aplikasi Enzim Lipase di Industri

Enzim lipase banyak dikembangkan sebagai biokatalis untuk aplikasi industri karena lebih ramah lingkungan, efisien, dan tidak menghasilkan produk samping berbahaya. Pada bidang industri, enzim perlu memenuhi berbagai syarat tertentu agar reaksi dapat berjalan, seperti kemampuan untuk berfungsi pada kondisi yang ekstrim, termasuk suhu dan pH yang sangat rendah atau tinggi, kekuatan ionik,

serta adanya pelarut organik dan surfaktan. Sebagian besar enzim industri berasal dari mikroorganisme, terutama dari organisme mesofilik yang tumbuh pada suhu sedang (Vivek *et al.*, 2022).

Lipase digunakan dalam berbagai industri seperti industri susu, minyak dan lemak, deterjen, kosmetik, dan farmasi. Lipase dalam industri minyak dan lemak biasanya digunakan dalam sintesis ester melalui esterifikasi dan transesterifikasi dalam makanan. Selain itu lipase dapat diaplikasikan pada industri deterjen untuk menghidrolisis noda berminyak serta bioremediasi dengan hidrolisis lipid. Pada industri farmasi, lipase berperan dalam produksi obat-obatan seperti Diltiazem hidroklorida sebagai zat anti hipertensi dan *Epothilone A* untuk anti kanker. Industri lain yang menggunakan lipase sebagai katalis industri kertas dan tekstil dan pada industri susu, lipase menghidrolisis lemak susu dan memodifikasi panjang rantai asam lemak untuk meningkatkan rasa keju, mempercepat pematangan keju, lipolisis lemak, mentega dan krim. Reaksi lipase pada lemak susu, berbagai produk terutama keju lunak dengan karakteristik rasa tertentu dihasilkan dengan asam lemak bebas (Chandra *et al.*, 2020). Selain itu, lipase dapat diaplikasikan pada produksi biodiesel sebagai biokatalis, dimana lipase mampu mengkatalisis reaksi transesterifikasi trigliserida dan hidrolisis sehingga cocok untuk produksi biodiesel (Yusuf *et al.*, 2024). Aplikasi enzim lipase dalam berbagai bidang industri beserta aksi enzim lipase dan produk dari aplikasinya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Aplikasi enzim lipase di bidang industri (Susanti dan Febriana, 2017).

Industri Enzim Lipase	Aksi Enzim Lipase	Produk Aplikasi	Sumber Penghasil Lipase
Deterjen	Hidrolisis Lemak	Penghapusan noda minyak dari kain	<i>Pseudomonas Protegens</i> (LipA), <i>P. aeruginosa</i> ECS3, <i>Bacillus</i> sp.
Produk susu	Hidrolisis lemak susu, pematangan susu	Pengembangan agen penyedap dalam susu, keju, dan mentega	<i>Lactobacillus</i> spp
Makanan Bakery	Modifikasi lemak mentega	Rak-hidup perpanjangan	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas</i>
Minuman	Peningkatan rasa	Minuman beralkohol	<i>Lactobacillus</i> spp
Dressing makanan	Peningkatan aroma	Mayones dan saus	<i>Bacillus</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp
Daging dan ikan	Transesterifikasi	Produk daging dan ikan; penghilangan lemak	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Pseudomonas</i> sp
Lemak dan Minyak	Pengembangan rasa	Cocoa butter, margarin, asam lemak	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> (GTL2), <i>Bacillus</i> sp
Bahan kimia	Transesterifikasi, hidrolisis	Gliserol, mono dan digliserida	<i>Bacillus</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp
Farmasi	Enantioselectivity, sintesis	Blok bangunan kiral, Lipid khusus, obat untuk membantu pencernaan	<i>Bacillus</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp
Kosmetik	Transesterifikasi, hidrolisis	Pengemulsi, pelembab kulit dan krim matahari, cokelat, minyak mandi, dll	<i>Bacillus</i> sp, <i>thermostable streptomyces</i> sp
Kertas	Hidrolisis	Kertas dengan peningkatan kualitas	<i>Bacillus</i> sp
Agro-kimia	Hidrolisis dan transesterifikasi minyak dan lemak	Herbisida seperti phenoxypropionate	<i>Bacillus cereus</i> BC-003
Surfaktan		Poligliserol dan asam lemak karbohidrat ester digunakan sebagai deterjen industri dan emulsifier dalam formulasi makanan seperti saus dan es krim	<i>Geobacillus</i> sp, <i>Bacillus</i> sp
Industri Bahan Bakar	Esterifikasi	Produksi Biodiesel	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i> GTL2, <i>Bacillus subtilis</i> KUBT4

2.3. Produksi Enzim

Produksi enzim lipase biasanya dilakukan dengan metode fermentasi, meliputi metode fermentasi terendam (*submerged fermentation*) dan fermentasi padat (*solid-state fermentation*). Penggunaan metode fermentasi dilakukan berdasarkan jenis mikroorganisme tertentu (Szymczak *et al.*, 2021).

2.3.1. *Submerged Fermentation*

Submerged fermentation adalah proses fermentasi yang dilakukan dalam kondisi dengan kelebihan air, memungkinkan budidaya mikroorganisme seperti bakteri, ragi, atau jamur filamen dalam wadah tertutup yang berisi media nutrisi cair. Produksi enzim menggunakan metode fermentasi terendam menggunakan substrat dengan cukup cepat, sehingga perlu terus diganti atau ditambah nutrisi untuk pertumbuhan mikroorganisme. Mikroorganisme ini memanfaatkan nutrisi dalam media, tumbuh, dan melepaskan enzim ke dalam cairan tersebut. Teknik fermentasi ini paling cocok untuk mikroorganisme seperti bakteri yang membutuhkan kadar air tinggi (Szymczak *et al.*, 2021).

Fermentasi terendam memiliki keuntungan meliputi, pemurnian produk lebih mudah, sistem fermentasi lebih mudah untuk direkayasa oleh para peneliti karena kemudahan kontrol proses dan sterilisasi. Selain itu, produksi enzim dapat bersifat konstitutif atau diinduksi dan menunjukkan pola produksi yang berbeda, tergantung pada strain dan kondisi kultur (Mukti *et al.*, 2020). Pada produksi skala industri, fermentasi terendam biasanya dilakukan menggunakan peralatan modern yang memungkinkan pengendalian berbagai parameter seperti suhu, pH, kecepatan pengadukan, suplai gas, serta pemantauan densitas optik, kadar oksigen, dan karbon dioksida dalam gas hasil keluaran.

Produksi lipase melalui metode *submerged fermentation* telah banyak dilaporkan, antara lain oleh *B. cereus* NC7401 yang menghasilkan lipase dengan aktivitas lipolitik tertinggi (Akhter *et al.*, 2022), serta *B. methylotrophicus* PS3 yang berhasil memproduksi lipase dengan aktivitas maksimum mencapai 127,31 U/mL

(Sharma *et al.*, 2017). Temuan tersebut menunjukkan bahwa metode *submerged fermentation* efektif digunakan untuk menghasilkan enzim lipase dengan aktivitas yang optimal.

2.3.2. Solid-state Fermentation

Solid-state fermentation adalah proses fermentasi yang berlangsung dengan sedikit atau tanpa air, fermentasi keadaan padat menggunakan substrat padat seperti dedak, ampas tebu, dan pulp kertas. Proses ini memungkinkan mikroorganisme seperti bakteri, ragi, atau jamur filamen untuk tumbuh pada media padat yang lembab. Pada skala laboratorium, fermentasi ini memiliki beberapa keunggulan yakni penggunaan bahan-bahan limbah kaya nutrisi dapat dengan mudah didaur ulang sebagai substrat. Pada metode fermentasi ini, substrat digunakan sangat lambat dan stabil, sehingga substrat yang sama dapat digunakan untuk periode fermentasi yang lama. Oleh karena itu, teknik ini mendukung pelepasan nutrisi yang terkontrol. SSF paling cocok untuk teknik fermentasi yang melibatkan jamur dan mikroorganisme yang membutuhkan kadar air lebih sedikit. Namun, tidak bisa digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme yang membutuhkan air (aktivitas air), seperti bakteri (Maftukhah, 2020).

2.4. *Bacillus cereus*

B. cereus termasuk dalam genus *Bacillus* yang merupakan bakteri gram positif anaerobik fakultatif yang berbentuk batang dengan ukuran lebar 1-1,2 μ m. Suhu pertumbuhan optimum biasanya berkisar antara 37-48 °C dengan minimum 5-20 °C serta pH berkisar 5,5-8,5 (Jawetz, 2014). Bakteri ini biasanya ditemukan dalam tanah dan berbagai makanan. *B. 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 *B. cereus* ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Bakteri *B. cereus* (Haque, 2021)

Berikut ini adalah klasifikasi dari bakteri *B. cereus*

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

B. cereus dapat menyebabkan penyakit seperti muntah dan diare. Selain itu, bakteri ini menyebabkan berbagai infeksi sistemik dan lokal pada individu dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Pada suhu tinggi yakni diatas 105 °C dan suhu rendah 4 °C mampu menghambat pertumbuhan *B. cereus*. Namun, dengan tekanan berbeda menyebabkan peningkatan toleransi suhu karena kemampuannya dalam beradaptasi (Gharib *et al.*, 2020).

Bakteri *B. cereus* ALP E1 merupakan bakteri yang berhasil diisolasi dari air laut yang tercemar minyak di Pelabuhan Panjang, Lampung (Citra dan Nurhasanah., 2021). Berdasarkan karakterisasi morfologi dan biokimia, bakteri ini tergolong gram positif berbentuk basil dan mampu membentuk endospora, menunjukkan kemampuan bertahan hidup pada kondisi ekstrem. Selain itu, *B. cereus* ALP E1 memiliki potensi untuk menghasilkan biosurfaktan, yang dapat menurunkan tegangan permukaan dan mengemulsikan minyak, serta enzim lipase, yang

berperan penting dalam reaksi biokatalitik seperti hidrolisis dan transesterifikasi lemak. Kombinasi sifat ini menjadikan isolat ALP E1 berpotensi diaplikasikan dalam remediasi lingkungan, bioteknologi industri, pengolahan limbah, dan produksi energi terbarukan. Bakteri ini secara genetik juga dapat menghasilkan enzim lipase yang berfungsi untuk memecah trigliserida (lemak dan minyak) menjadi sumber energi yang lebih ramah lingkungan. *B. cereus* ALP E1 menghasilkan lipase ekstraseluler yang dapat diproduksi dalam jumlah besar (Rachmawati, 2021).

2.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase

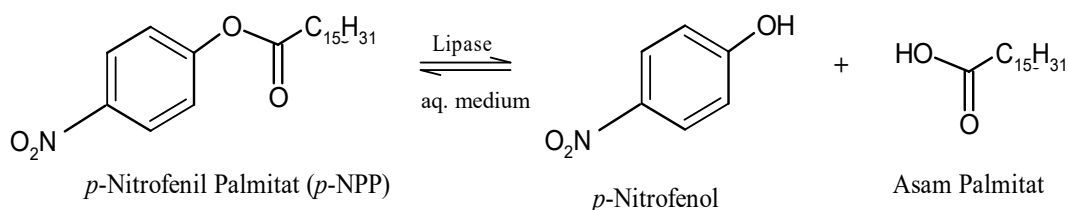
2.5.1. Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas lipase dinyatakan dalam satuan unit (U), satu unit aktivitas lipase setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh lipase per menit. Aktivitas optimum enzim lipase dapat ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada variasi suhu dan pH tertentu. Beberapa metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas lipase secara kuantitatif meliputi titrimetri, dan spektrofotometri UV-Vis (Vera *et al.*, 2023).

Metode titrimetri cukup akurat tetapi memiliki kekurangan, yaitu harus terdapat indikator dan reaksi harus berlangsung secara stoikiometri sedangkan pada metode spektrofotometri memiliki keunggulan dibandingkan metode titrimetri yakni 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).

Spektrofotometri digunakan dalam pengujian aktivitas lipase dengan substrat *p*-Nitrofenil palmitat (*p*-NPP). Aktivitas lipase diukur dari perubahan absorbansi pada λ_{maks} 410 nm, yang menunjukkan pelepasan senyawa *p*-Nitrofenol (*p*-NP) dari substrat, sehingga larutan berubah menjadi kuning. Semakin kuning larutan, semakin tinggi aktivitas lipase. Aktivitas lipase dinyatakan dalam satuan unit/mg, yang diartikan sebagai jumlah μmol produk (*p*-Nitrofenol) yang dihasilkan per

menit per mg enzim (Septiani, 2019). Reaksi hidrolisis yang terjadi dapat dituliskan pada Gambar 5.

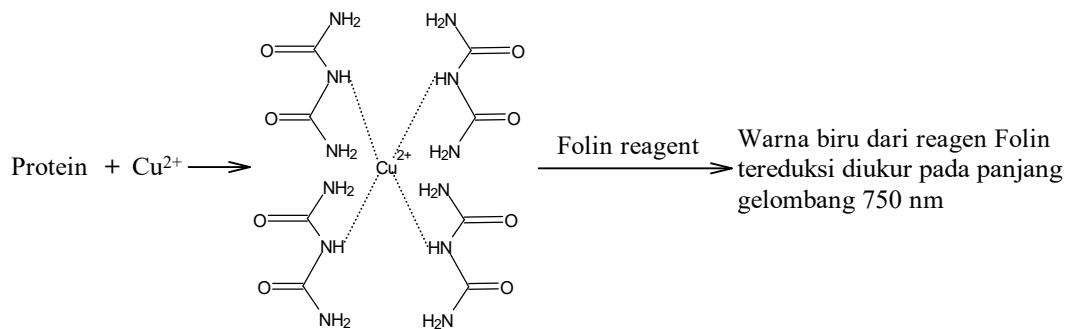


Gambar 5. Reaksi hidrolisis *p*-NPP dengan lipase

Metode spektrofotometri UV-*Vis* memiliki beberapa faktor yang perlu untuk diperhatikan seperti warna sampel, autofluoresensi, dan kekeruhan akibat kelarutan yang buruk. Kekeruhan dapat mengganggu pengukuran dengan meningkatkan serapan cahaya dan menyebabkan absorbansi yang terlalu tinggi. Untuk mengurangi gangguan ini, diperlukan penggunaan blanko dan reagen yang sesuai (Lankatillake *et al.*, 2021).

2.5.2. Uji Protein Enzim dengan Metode Lowry

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 dalam jumlah yang kecil (Subroto *et al.*, 2020). Metode Lowry didasarkan pada 2 reaksi yaitu, reaksi kompleks Cu(II) protein dalam suasana alkalis akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen *Folin-Ciocalteu* dengan kompleks fosfomolibdat fosfotungstat (*fosfomolibdotungstat*), menghasilkan *heteropoly molybdenum blue* akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang kemudian memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kalorimetri pada $A_{\text{maks}} 750 \text{ nm}$ (Lowry *et al.*, 1951 dan Subroto *et al.*, 2020). Reaksi Reduksi Reagen *Folin-Ciocalteu* oleh Kompleks Cu-Protein pada Metode Lowry dituliskan pada Gambar 6.

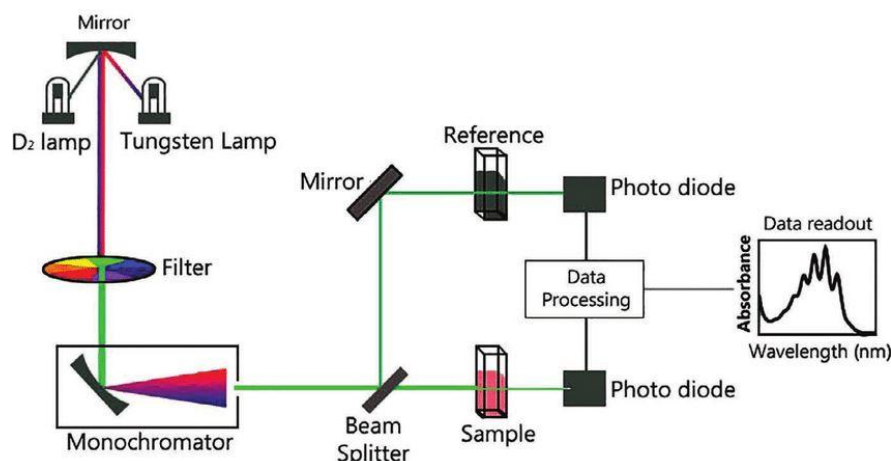


Gambar 6. Reaksi pada metode Lowry

Warna biru yang dihasilkan tergantung pada konsentrasi protein yang terkandung di dalamnya. Semakin pekat warnanya maka konsentrasi protein yang terdapat pada enzim semakin tinggi. Penentuan 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 dan Subroto *et al.*, 2020).

2.6 Spektrofotometri UV-VIS

Spektrofotometri ultraviolet-visible (UV-Vis) adalah 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 (Wahyuni *et al.*, 2022). Spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu metode analisis yang banyak digunakan dalam penelitian kimia khususnya analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa organik dan anorganik. Metode ini diterapkan secara luas digunakan untuk penentuan senyawa dalam jumlah yang sangat kecil (Pratiwi and Nandiyanto, 2022). Instrumentasi dasar spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Instrumentasi dasar spektrofotometer UV-*Vis* (Arora *et al.*, 2021)

Prinsip kerja spektrofotometri UV-*Vis* didasarkan pada interaksi antara atom atau molekul dengan cahaya, sesuai dengan hukum Lambert-Beer. Menurut hukum ini, ketika sinar monokromatik melewati suatu senyawa, cahaya akan diserap, dipantulkan, atau dipancarkan karena material tersebut menerima energi yang tinggi. Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa ada hubungan linear antara absorbansi cahaya dan konsentrasi senyawa (Gao *et al.*, 2023). Konsentrasi dalam larutan ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu menggunakan persamaan Lambert-Beer yang ditunjukkan pada Persamaan 1 sebagai berikut.

$$A = a \cdot b \cdot c \quad \dots\dots\dots (1)$$

A adalah nilai absorbansi, *a* adalah absorptivitas spesifik analit yang bergantung pada panjang gelombang dan pelarut yang digunakan, *b* adalah ketebalan kuvet, dan *c* menyatakan konsentrasi analit. Nilai absorbansi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya jenis pelarut, suhu, pH, konsentrasi larutan elektrolit yang tinggi, dan adanya zat pengganggu (Nurani *et al.*, 2023).

2.7 Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Kromatografi gas secara umum digunakan untuk memisahkan campuran kimia berdasarkan pendistribusian sampel diantara fase diam dan fase gerak. Fase gerak dalam kromatografi gas berupa gas dan fase diamnya berupa padatan atau cairan.

Fase gerak akan membawa campuran untuk dipisahkan masing-masing komponennya. Pemisahan komponen akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di dalam fase diam (Indriani *et al.*, 2023). Prinsip kerja dari GC-MS, yaitu molekul-molekul gas bermuatan akan diseleksi berdasarkan massa dan beratnya, spektrum yang didapat dari pengubahan sampel menjadi ion-ion yang bergerak, kemudian dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (m/e). Ionisasi menghasilkan fragmen-fragmen yang akan menghasilkan spektrum. Spektrum massa merupakan gambar antara kelimpahan relatif dengan perbandingan massa per muatan (m/e) (McLafferty, 1987).

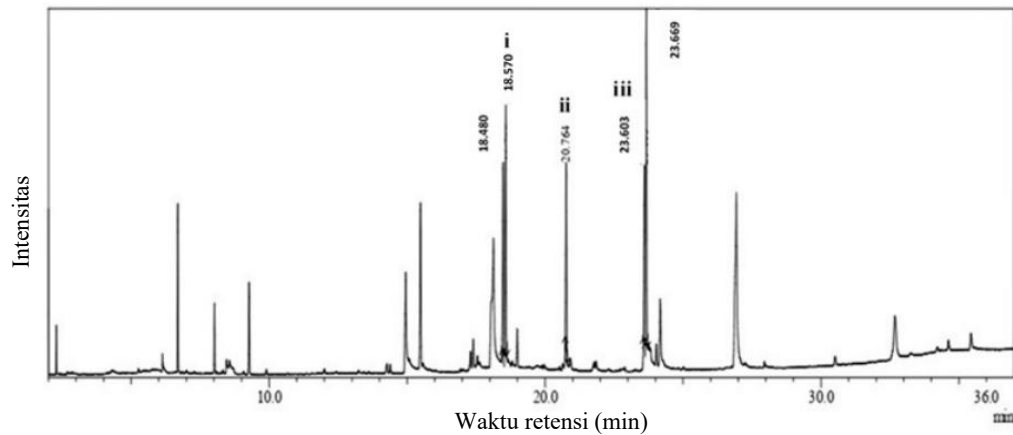
Analisis kromatografi gas (GC-MS) terhadap biodiesel yang diproduksi menunjukkan bahwa proses transesterifikasi minyak goreng bekas (WCO) menghasilkan komposisi asam lemak metil ester (FAME) yang sesuai dengan standar internasional EN 14214. Biodiesel yang dihasilkan memiliki kandungan ester sebesar $97,7 \pm 0,21\%$ dan nilai iodin $65,3 \pm 1,15$ g iodine/100 g, memenuhi spesifikasi bahan bakar biodiesel. Komposisi asam lemak mencakup senyawa seperti kaprilat (C8), kaprat (C10), palmitat (C16), dan linolenat (C18:3), dengan kandungan linolenat sebesar $0,55 \pm 0,02\%$ yang juga sesuai dengan standar. Biodiesel menunjukkan efisiensi konversi asam lemak rantai panjang menjadi ester metil yang lebih tinggi dibandingkan dengan WCO, serta mengidentifikasi senyawa baru seperti asam oktadekanoat 9.10 epoksi dan 15.16 epoksi dalam WCO yang merupakan hasil degradasi selama proses penggorengan. Hasil ini menegaskan efektivitas lipase imobilisasi dalam menghasilkan biodiesel berkualitas tinggi dari limbah minyak goreng (Bacha *et al.*, 2022). Kemampuan biokatalis untuk mengubah asam lemak minyak menjadi metil ester ditunjukkan pada Tabel 2 hasil perbandingan antara analisis GC-MS dari biodiesel, WCO, dan *olive oil*.

Tabel 2. Analisis *Gas Chromatography Mass-Spectrometry* (GC-MS) (Bacha *et al.*, 2022).

<i>Fatty Acid</i>	<i>Common Name</i>	<i>Olive Oil</i>	WCO	Biodiesel
C8	<i>Caprylic</i>	-	0.27±0.02	0.38±0.01
C10	<i>Capric</i>	-	0.05±0.01	0.06±0.01
C12	<i>Lauric</i>	-	0.03±0.01	0.02±0.01
C14	<i>Myristic</i>	0.01±0.02	0.01±0.01	0.01±0.02
C15	<i>Pentadecylic</i>	0.01±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01
C16	<i>Palmitic</i>	17.00±0.41	20.30±0.56	25.6±0.23
C17	<i>Margaric</i>	0.15±0.01	0.08±0.01	0.11±0.02
C18	<i>Stearic</i>	2.34±0.11	2.04±0.020	1.48±0.21
C20	<i>Arachidic</i>	0.38±0.05	0.26±0.04	0.08±0.04
C22	<i>Behenic</i>	0.12±0.04	0.25±0.07	-
C24	<i>Lignoceric</i>	0.05±0.02	0.02±0.01	-
C16:1ω7	<i>Palmitoleic</i>	2.15±0.11	1.32±0.02	1.77±0.03
C17:1ω7	-	0.08±0.02	0.03±0.02	0.6±0.02
C18:1ω9	<i>Oleic</i>	56.66±1.36	55.12±0.25	57.2±0.25
C18:1ω7	<i>Cis-vaccenic</i>	2.95±0.08	2.77±0.05	2.90±0.10
C20:1ω9	<i>Condoic</i>	0.21±0.06	0.3±0.07	-
C22:1ω9	<i>Erucic</i>	-	-	-
C18:2ω6	<i>Linoleic</i>	17.17±0.47	14.06±0.88	6.5±0.86
C10:3ω3	<i>Linolenic</i>	0,69 ± 0,05	0.39±0.04	0.19±0.05
	<i>Octadenoic Acid 9.10</i>	-	0.47±0.01	0.75±0.04
	<i>Epoxy</i>			
	<i>Stearic Acid Allyl</i>	-	0.52±0.03	0.72±0.03
	<i>14-Methylhexadecanoic</i>	-	0.55±0.02	0.71±0.01
	<i>Octadenoic Acid 15.16</i>	-	0.68±0.01	0.81±0.02
	<i>Epoxy</i>			

Analisis GC-MS terhadap biodiesel yang dihasilkan melalui reaksi transesterifikasi minyak goreng bekas menggunakan lipase *B. subtilis* yang diimobilisasi pada CaCO₃ mengidentifikasi komponen utama biodiesel berupa ester-ester etil asam lemak (FAEEs). Berdasarkan kromatogram, puncak utama terlihat pada waktu retensi 18,57, 20,764, dan 23,669 menit yang masing-masing merepresentasikan ester asam oleat, ester asam linoleat, dan ester asam arakidat. Puncak-puncak ini menunjukkan bahwa produk transesterifikasi mengandung ester-ester lemak yang dominan, sesuai dengan karakteristik biodiesel. Hasil ini mendukung keberhasilan katalisis lipase dalam mengubah trigliserida minyak bekas menjadi biodiesel dengan efisiensi tinggi, menghasilkan *yield* hingga 71%. Analisis GC-MS memberikan validasi komposisi kimia biodiesel yang sesuai

untuk penggunaan energi terbarukan (Alshehri *et al.*, 2024). Hasil kromatogram reaksi transesterifikasi minyak goreng bekas menggunakan lipase *B. subtilis* yang diimobilisasi pada CaCO_3 mengidentifikasi komponen utama biodiesel dapat dilihat pada Gambar 8 sebagai berikut.



Gambar 8. Hasil kromatogram reaksi transesterifikasi oleh lipase (Alshehri *et al.*, 2024).

Pada GC-MS, setelah masing-masing komponen dalam campuran telah terpisah dalam kolom GC semua komponen akan memasuki detektor ionisasi elektron. Bobot metil ester yang terbentuk dapat dihitung menggunakan Persamaan 2 sebagai berikut (Elma dkk., 2018).

$$\text{Biodiesel (w/w)} = \frac{\text{Berat biodiesel yang dihasilkan}}{\text{Berat minyak yang digunakan}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari - Juli 2025 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Analisis spektrofotometri UV-Vis di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Analisis penentuan bobot molekul protein di Laboratorium Sentral, Universitas Padjadjaran, serta analisis Kromatografi Gas (GCMS) di Badan Reserse Kriminal Polri Pusat Laboratorium Forensik, Bogor.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain: spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1780), kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) Agilent 7890B, neraca analitik (Optica Analytical Balance 220), inkubator (Presistern P'selecta), *autoclave* (Gea LS-35L EDAM 63), *centrifuge* (Hermle Z207A dan Refrigerated Centrifuge Z327K), tabung sentrifugasi (15 dan 50 mL), mikropipet 50 – 1.000 μ L (Eppendorf) dan tip mikropipet, *Laminar Air Flow/LAF* (Airtech HVS-1300), *water bath* (Memmert W 350), *shaker incubator* (Labtech LSI EDAM 97), pengaduk magnetik pelat panas (CB162 Stuart) dan *stir bar*, oven (ARGO LAB TCN 115), pH meter (Basic Benchtop XS), jarum ose, pembakar spiritus, *freezer* (Labfreez Ultraflow), botol semprot, spatula dan sendok *stainless steel*, kaca arloji, termometer, batang pengaduk, pipet tetes, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, dan alat-alat gelas kimia.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri *B.cereus* ALP E1 yang merupakan *collection culture* di Laboratorium Biokimia yang telah diisolasi dari air laut di Pelabuhan Panjang, Lampung (Citra dan Nurhasanah, 2021), limbah cair kelapa sawit (POME) dari PT. Sumber Indah Perkasa, *Nutrient Agar* (NA) Merck, *Nutrient Broth* (NB) Merck, kapas, kasa, kertas saring, akuades, Na_2CO_3 , NaOH , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Na/K-tartrat , reagen *Folin-Ciocalteu*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *p*-Nitrofenol, *p*-Nitrofenil palmitat, *p*-Nitrofenil Dekanoat, *p*-Nitrofenil Butirat, *p*-Nitrofenil Oktanoat, Gom Arab, Triton-x 100, buffer Tris HCl pH 8, buffer asetat pH 4, buffer fosfat pH 7, aseton, etanol, tween 80, tween 20, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), kloroform, metanol, etil asetat, dan isopropanol.

3.3. Prosedur Penelitian

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 menimbang 1 gram NA dan dilarutkan ke dalam 50 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 15-20 menit. Setelah selesai, tabung reaksi didiamkan dalam posisi miring dengan kemiringan 5°. Kegiatan tersebut dilakukan pada LAF untuk menghindari kontaminasi (Sangkoy *et al.*, 2023).

3.3.1.2. Pembuatan Media Cair

Media cair yang digunakan adalah medium NB yang digunakan untuk media pertumbuhan bakteri. Media cair dibuat dengan menimbang 0,8 gram NB dan ditambahkan 100 mL akuades di dalam Erlenmeyer dan dipanaskan hingga NB

larut. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 1 atm selama 15-20 menit (Octaviani dkk., 2022).

3.3.1.3. Peremajaan Isolat

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

3.3.1.4. Pembuatan Inokulum

Bakteri *B. cereus* ALP E1 yang telah diremajakan dalam media agar miring, kemudian diambil sebanyak 2 ose dan diinokulasikan ke dalam 20 mL NB dan diinkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam (Rait dkk., 2022).

3.3.2. Produksi Enzim

Produksi enzim lipase dilakukan menggunakan metode *submerged* fermentasi pada kondisi optimum seperti waktu pertumbuhan 72 jam, pH 7, konsentrasi inokulum 1% dan konsentrasi substrat POME 8%, kecepatan agitasi 155 rpm dalam volume 1000 mL (Azizah *et al.*, 2024). Pembuatan media produksi menggunakan NB yang dilarutkan dengan akuades serta ditambahkan substrat POME 8%, dan dipanaskan hingga larut. Kemudian media disterilisasi pada autoklaf selama 15-20 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm, media yang telah steril ditambahkan sebanyak 1% konsentrasi inokulum yang berisi bakteri *B. cereus* ALP E1 yang diinokulasikan ke dalam media produksi serta diinkubasi pada *shaker* selama 72 jam dengan kecepatan 155 rpm pada suhu ruang (Azizah *et al.*, 2024). Selanjutnya, media produksi disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15-20 menit sehingga didapatkan ekstrak kasar enzim. Ekstrak kasar enzim ditentukan aktivitas dan kadar proteinnya (Ertugrul *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 1951).

3.3.3. Pengujian Aktivitas Enzim dan Kadar Protein

3.3.3.1 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, membuat deret standar dengan konsentrasi 0, 5, 25, 50, 75, dan 100, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm.

Uji aktivitas lipase dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan Ertuğrul *et al.*, (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 yang 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 dibuat dengan menambahkan 0,2 mL aseton:etanol (1:1) dan 0,2 mL enzim untuk menginaktivasi enzim sebelum diinkubasi. Selanjutnya, aktivitas enzim diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} 410 nm. Aktivitas enzim kemudian dihitung dengan menggunakan Persamaan 3 sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas Enzim (U/mL)} = \frac{[\text{pNP}] (\mu\text{M}) \times \text{Volume total}}{\text{Waktu inkubasi (menit)} \times \text{Volume enzim}} \dots\dots\dots(3)$$

3.3.3.2. Uji Protein Enzim

Uji kadar protein enzim lipase dilakukan menggunakan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951 dalam Subroto *et al.*, 2020). Untuk menentukan kadar protein digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) yang dibuat deret standar 0, 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 menggunakan pereaksi sebagai berikut:

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

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

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

Pereaksi D: reagen *Folin-Ciocalteu* diencerkan dengan aquades 1:1

Enzim lipase sebanyak 0,1 mL ditambahkan 0,9 mL 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. Larutan kontrol 0,1 mL enzim digantikan dengan 0,1 mL *aquades* dan dibuat perlakuan yang sama dengan sampel. Aktivitas spesifik dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan 4 sebagai berikut.

$$\text{Aktivitas Spesifik (U/mg)} = \frac{\text{Aktivitas unit (U/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}} \dots\dots\dots(4)$$

3.3.4. Pemurnian Enzim

Pemurnian enzim dilakukan bertujuan untuk memurnikan enzim dari zat pengotor lainnya. Pemurnian enzim dalam penelitian ini dilakukan dengan 2 cara, yaitu fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis.

3.3.4.1. Fraksinasi Amonium Sulfat

Fraksinasi dengan amonium sulfat dilakukan terhadap ekstrak kasar enzim lipase dengan cara ditambahkan amonium sulfat sesuai fraksi kejenuhan 0-20, 20-40, 40-60, 60-80, dan 80-100% sedikit demi sedikit ke dalam larutan ekstrak kasar enzim dalam Erlenmeyer sambil diaduk dengan pengaduk magnet. Pengadukan diusahakan sedemikian rupa sehingga tidak menimbulkan busa selama kurang

lebih 20 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit sehingga terpisah antara filtrat dan endapan. Setiap endapan protein enzim yang didapat lalu dilarutkan dalam larutan buffer fosfat pH 7 dengan konsentrasi 0,05 M dan ditentukan aktivitas enzimnya menggunakan metode Ertuğrul *et al.*, (2007) serta kadar proteinnya menggunakan metode Lowry *et al.*, (1951), sedangkan filtrat yang diperoleh digunakan pada fraksi kejenuhan tahap selanjutnya (Hapsari dkk., 2021).

3.3.4.2. Dialisis

Proses dialisis bertujuan untuk membersihkan enzim dari sisa garam dan ion-ion selama fraksinasi dengan garam amonium sulfat sehingga diperoleh enzim dengan tingkat kemurnian dan aktivitas yang lebih tinggi. Enzim yang telah dimurnikan dengan fraksi amonium sulfat yang memberikan aktivitas tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan, lalu kantong selofan tersebut dimasukkan dalam wadah yang berisi buffer fosfat 0,01 M. Selama dialisis, dilakukan pergantian buffer setiap 4 jam agar konsentrasi ion-ion dalam kantong dialisis dapat berkurang. Proses ini dilakukan secara berulang terus sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada ion garam di luar kantong, diuji dengan menambah larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat di luar kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 (Hapsari dkk., 2021). Enzim hasil dialisis ditentukan aktivitas dan kadar protein, serta digunakan dalam tahap karakterisasi enzim.

3.3.5. Karakterisasi Enzim

Pada penelitian ini, karakterisasi enzim lipase dilakukan untuk melihat pengaruh variasi pH, suhu, substrat, surfaktan, ion logam, dan pengaruh pelarut organik terhadap aktivitas enzim lipase. Tahapan yang dilakukan dalam karakterisasi adalah sebagai berikut.

3.3.5.1. Penentuan pH optimum enzim

Tahap ini bertujuan untuk mendapatkan pH optimum dari enzim lipase. Enzim yang sudah dimurnikan selanjutnya ditentukan karakterisasi pH. Rentang pH yang digunakan yaitu pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Enzim hasil pemurnian direaksikan dengan buffer pada masing-masing pH, untuk pH 4 digunakan buffer asetat 0,05 M, pH 5,6, dan 7 digunakan buffer fosfat 0,05 M sedangkan untuk pH 8 digunakan buffer Tris-HCl 0,05 M (Indriyani dkk., 2021). Selanjutnya diinkubasi selama 15 menit pada suhu 35 °C dan ditambah substrat, lalu ditentukan aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometri UV-Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007)

3.3.5.2. Penentuan suhu optimum enzim

Tahap ini bertujuan untuk memperoleh suhu optimum. Setelah karakter pH didapatkan, selanjutnya dilakukan karakterisasi enzim berdasarkan variasi suhu reaksi. Rentang suhu yang digunakan yaitu suhu 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C dan 50 °C. Enzim ditambahkan substrat dengan pH optimum yang telah diperoleh, lalu diinkubasi pada rentang suhu 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C dan 50 °C selama 15 menit (Indriyani dkk., 2021) yang selanjutnya ditentukan aktivitas enzim menggunakan spektrofotometri UV-Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007).

3.3.5.3. Pengaruh variasi substrat

Tahap ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui substrat yang paling optimal untuk enzim lipase. Pada tahap ini substrat yang digunakan yaitu *p*-Nitrofenil butirat, *p*-Nitrofenil oktanoat, *p*-Nitrofenil dodekanoat, dan *p*-Nitrofenil palmitat. Selanjutnya 0,2 mL enzim direaksikan dengan 1,8 mL masing-masing variasi substrat pada pH optimum dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu optimum (Kaur *et al.*, 2023). Kemudian aktivitas enzim ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007).

3.3.5.4. Pengaruh variasi surfaktan

Tahap ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzim lipase terhadap penambahan variasi surfaktan. Surfaktan yang digunakan pada tahap ini yaitu, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB), Tween 20, Tween 80, dan Triton X-100. Selanjutnya masing-masing surfaktan sebanyak 0,2 mL direaksikan dengan 0,2 mL enzim, campuran tersebut diletakkan pada *shaker* inkubator selama 30 menit dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian 1,8 mL substrat ditambahkan dan diinkubasi pada suhu optimum selama 15 menit (Saraswat *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). Aktivitas enzim ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007).

3.3.5.5. Pengaruh variasi ion logam

Pada tahap ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzim lipase dengan penambahan ion logam. Ion logam yang digunakan yaitu ion K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} dan Al^{3+} , selanjutnya 0,2 mL enzim ditambahkan masing-masing ion logam dengan konsentrasi 1 mM. Kemudian campuran diletakkan pada *shaker* inkubator selama 30 menit dengan kecepatan 150 rpm, selanjutnya ditambahkan 1,8 mL substrat pada pH optimum kemudian diinkubasi dengan suhu optimum selama 15 menit (Fetyan *et al.*, 2023). Penentuan aktivitas enzim terhadap variasi ion logam ditentukan dengan spektrofotometri UV-Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007)

3.3.5.6. Pengaruh pelarut organik

Pada tahap ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan enzim lipase dengan penambahan pelarut organik. Pelarut organik yang digunakan yaitu kloroform, aseton, etanol, metanol, etil asetat, dan 2-propanol pada konsentrasi 5%. Tahap ini mereaksikan sebanyak 0,2 mL enzim yang ditambahkan masing-masing 0,2 mL pelarut organik, kemudian diletakkan pada *shaker* inkubator selama 30 menit dengan kecepatan 150 rpm (Khan *et al.*, 2023). Selanjutnya tambahkan substrat

sebanyak 1,8 mL dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu optimum, aktivitas enzim dapat ditentukan dengan spektrofotometri UV- Vis λ_{maks} 410 nm (Ertuğrul *et al.*, 2007). Pada kontrol dengan prosedur yang sama, tanpa ditambahkan pelarut organik (Akhter *et al.*, 2022).

3.3.6 Penentuan Bobot Molekul

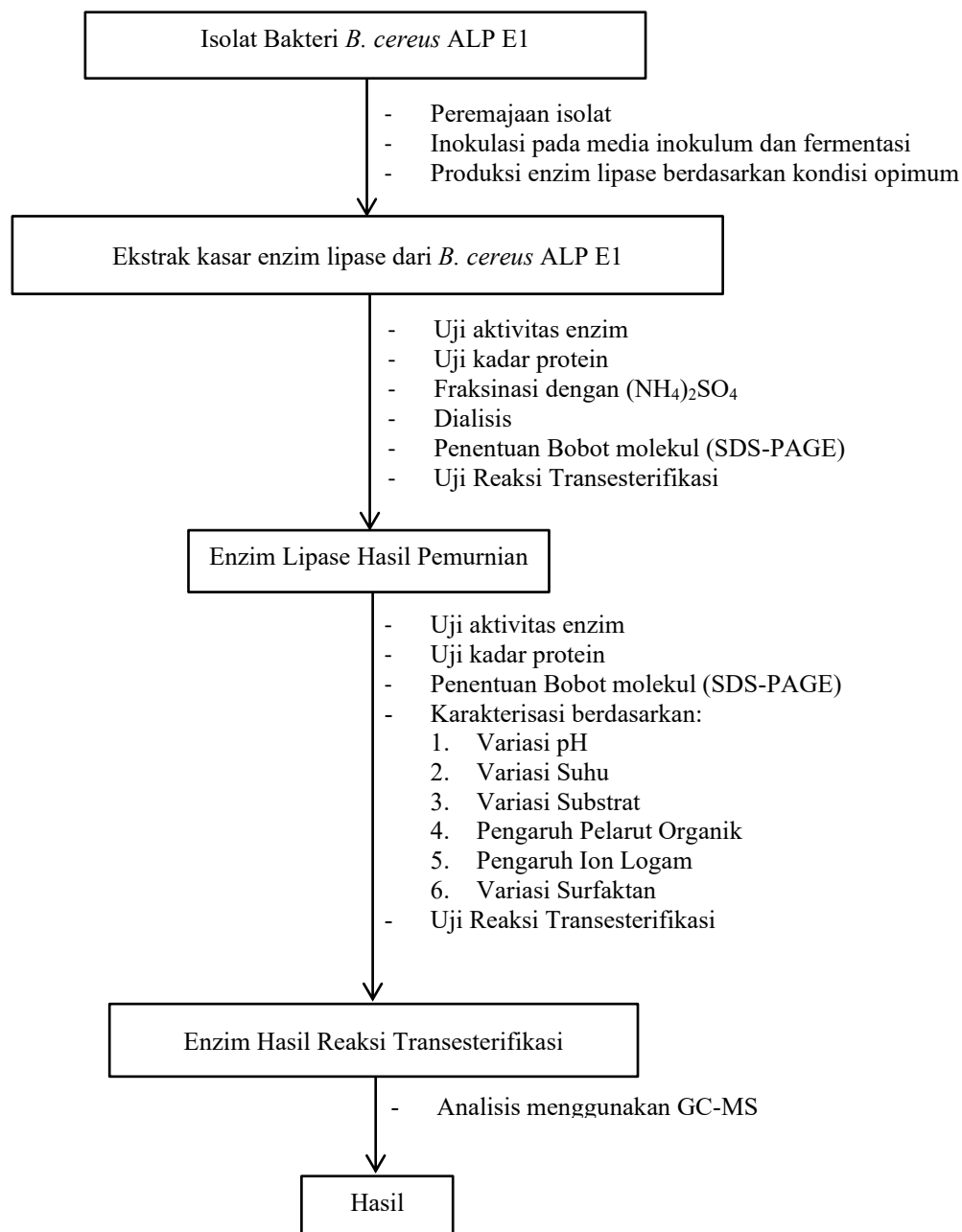
Penentuan bobot molekul enzim lipase dilakukan analisis menggunakan *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide* Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). SDS-PAGE dilaksanakan pada 110V dengan gel 12% dan buffer SDS, di mana pita protein divisualisasikan menggunakan 0,1% *Coomassie Brilliant Blue* untuk mewarnai gel. Massa dari molekul enzim yang dimurnikan dihitung menggunakan Protein Marker III (pra-pewarnaan), *peqGOLD Protein Ladder* (Haryati *et al.*, 2022).

3.3.7. Uji Transesterifikasi

Uji reaksi transesterifikasi pada produksi biodiesel dilakukan dengan menggunakan katalis lipase dari *B. cereus* hasil karakterisasi, kemudian direaksikan dengan cara sebagai berikut, 2 mL minyak kelapa sawit dicampurkan dengan 0,1 mL lipase dalam labu leher dua, lalu ditambahkan 500 μ L t-butanol sebagai kosolven dan 500 μ L metanol sebagai pelarut. Campuran tersebut didiamkan selama 3 jam, kemudian disentrifugasi pada 1000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan enzim dan gliserol dari biodiesel. Hasil sentrifugasi membentuk dua lapisan yakni asam lemak metil ester (*Fatty Acid Methyl Ester* atau FAME) dan produk sampingan berupa gliserol. Lapisan atas atau supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi kemudian dianalisis menggunakan GC-MS untuk menentukan kandungan FAME (Nor *et al.*, 2024; Purkan dkk., 2020).

3.4. Skema Penelitian

Keseluruhan aktivitas yang dilakukan dalam metode penelitian ini dirangkum dalam Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir penelitian

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1 pada tahap ekstrak kasar lipase menunjukkan aktivitas sebesar 133,37 U/mL dengan aktivitas spesifik 2525,34 U/mg. Setelah dilakukan pemurnian tahap fraksinasi amonium sulfat 20–90%, aktivitas enzim meningkat menjadi 568,73 U/mL dengan aktivitas spesifik 12.520,22 U/mg, dengan tingkat kemurnian 4,96 kali lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar. Sementara itu, dari hasil dialisis memberikan aktivitas sebesar 366,00 U/mL dan aktivitas spesifik mencapai 31.083,14 U/mg, dengan peningkatan kemurnian hingga 12,31 kali dibandingkan enzim ekstrak kasar.
2. Enzim lipase yang dihasilkan oleh *B. cereus* ALP E1 memiliki karakter pH 5, suhu optimum 40 °C, memiliki aktivitas tertinggi terhadap substrat rantai panjang, yaitu *p*-nitrofenil palmitat (C16). Pada penambahan surfaktan menunjukkan persen relatif paling baik pada surfaktan Tween 20. Sementara itu, pada pelarut organik, menunjukkan persen relatif paling baik pada pelarut organik kloroform dan ion logam Ba²⁺ juga memberikan efek positif dengan persen relatif paling baik, yang menunjukkan peran penting kofaktor tertentu dalam menjaga stabilitas enzim.
3. Penelitian ini berhasil mengetahui kemampuan enzim lipase dari *B. cereus* ALP E1 dalam mengkatalisis reaksi transesterifikasi. Hasil uji transesterifikasi mampu memodifikasi profil komponen kimia minyak kelapa sawit

menggunakan katalis enzim lipase. Berdasarkan analisis GC-MS menggunakan katalis enzim lipase ekstrak kasar didominasi oleh senyawa *Dodecanoic acid*, *1,2,3-propanetriyl ester* (Trilaurin) (32,13%), sehingga menunjukkan konversi yang belum maksimal. Sebaliknya, hasil reaksi transesterifikasi menggunakan katalis enzim lipase hasil dialisis menunjukkan hilangnya trilaurin dan munculnya senyawa 9-Octadecenoic acid dengan luas area sebesar 3,01%, yang mengindikasikan terjadinya pembentukan produk hasil reaksi transesterifikasi.

5.2. Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk melanjutkan pemurnian lipase *B. cereus* ALP E1 menggunakan teknik kromatografi agar diperoleh rendemen yang lebih tinggi dengan aktivitas spesifik tetap terjaga. Selain itu, perlu dilakukan kajian lebih mendalam terkait stabilitas dan kinetika enzim terhadap variasi pH, suhu, surfaktan, ion logam, serta pelarut organik guna memperkuat data karakterisasi. Kondisi reaksi transesterifikasi juga perlu dioptimalkan melalui pengaturan rasio metanol terhadap minyak, enzim, suhu, dan waktu reaksi, serta penerapan teknik immobilisasi enzim sehingga konversi FAME dapat meningkat dan aplikasi lipase sebagai biokatalis biodiesel menjadi lebih potensial.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelaziz, A. A., Abo-Kamar, A. M., Elkotb, E. S., and Al-Madboly, L. A. (2025). Microbial lipases: advances in production, purification, biochemical characterization, and multifaceted applications in industry and medicine. *Microb Cell Fact*, **24**(1).
- Abdulla, R., Derman, E., K.Mathialagan, T., Yaser, A. Z., Abu Samah, M. A., Gansau, J. A., and Najmuddin, S. U. F. S. (2022). Biodiesel production from waste palm cooking oil using immobilized candida rugosa lipase. *Sustainability*, **14**(20).
- Adina, S. R., Suwanto, A., Meryandini, A., and Puspitasari, E. (2021). Expression of novel acidic lipase from micrococcus luteus in pichia pastoris and its application in transesterification. *J. Genet. Eng. Biotechnol*, **19**(1), 55.
- Akhter, K., Karim, I., Aziz, B., Bibi, A., Khan, J., and Akhtar, T. (2022). Optimization and characterization of alkaliphilic lipase from a novel *bacillus cereus* NC7401 strain isolated from diesel fuel polluted soil. *Plos One*, **17**(8), E0273368.
- Albayati, S. H., Masomian, M., Ishak, S. N. H., Ali, M. S. B. M., Thean, A. L., Shariff, F. B. M., Noor, N. D. B. M., and Rahman, R. N. Z. R. A. (2020). Main structural targets for engineering lipase substrate specificity. *Catalysts*, **10**(7), 747.
- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., and Lee, I. J. (2023). The recent advances in the utility of microbial lipases: a review. *Microorganisms*, **11**(2), 510.
- Almansoori, A. K. K., Reddy, N. S., Abdulfattah, M., Ismail, S. S., and Abdul Rahim, R. (2024). Characterization of a novel subfamily 1.4 lipase from *bacillus licheniformis* IBRL-CHS2: cloning and expression optimization. In *Plos One*, **19**(12).
- Alshehri, W. A., Alghamdi, N. H., Khalel, A. F., Almalki, M. H., Hadrich, B., and Sayari, A. (2024). Thermostable caco3-immobilized bacillus subtilis lipase for sustainable biodiesel production from waste cooking oil. *Catalysts*, **14**(4), 253.

- Anidiobu, V. O., Oladeji, B. S., and Anidiobu, C. O. (2025). Rheological , physicochemical , and GC-MS of fatty acid composition of palm oil from cross river state , Nigeria. *Turk. J. Agric. Food Sci. Technol*, **13**(10), 2906–2915.
- Arora, S. R., Rana, R. S., and Godara, S. S. (2021). Characterization tools and techniques for nanomaterials and nanocomposites. *Nanomater. Nanocompos*, 61–83.
- Azizah, A. N., Nurhasanah, Laila, A., and Pandiangan, K. D. (2024). Optimization of lipase production from indigenous bacteria in seawater Panjang Port , Lampung using response surface methodology (RSM) Approach. *Basistora*, 8072.
- Bacha, A. B., Alonazi, M., Alharbi, M. G., Horchani, H., and Ben Abdelmalek, I. (2022). Biodiesel production by single and mixed immobilized lipases using waste cooking oil. *Molecules*, **27**(24), 8736.
- Bala, J. D., Lalung, J., Al-Gheethi, A. A. S., Hossain, K., and Ismail, N. (2018). Microbiota of palm oil mill wastewater in Malaysia. *Trop. Life Sci. Res.*, **29**(2), 131.
- Bussamara, R., Fuentesfria, A. M., Oliveira, E. S. De, Broetto, L., Simcikova, M., Valente, P., Schrank, A., and Vainstein, M. H. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresour. Technol.*, **101**(1), 268–275.
- Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb. Cell Factories*, **19**(1), 1–42.
- Citra, S., dan Nurhasanah. (2021). Skrining bakteri penghasil biosurfaktan dari air laut tercemar minyak di pelabuhan panjang lampung. *Rafflesia J. Nat. Appl. Sci*, **1**(1), 50–58.
- 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. *Turk. J. Biol.*, **45**(3), 287–300.
- Den, G. (2024). The effect of temperature on enzyme activity: mechanisms and practical implications. *Biochem. Mol. Biol. J.*, **10**(2), 24–24.
- Elma, M., Suhendra, S. A., dan Wahyuddin, W. (2018). Proses pembuatan biodiesel dari campuran minyak kelapa dan minyak jelantah. *Konversi*, **5**(1), 8.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G., and Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard. Mater.*, **149**(3), 720–724.

- Fathi, F., Kasra-Kermanshahi, R., Moosavi-Nejad, Z., and Qamsari, E. M. (2021). Partial purification, characterization and immobilization of a novel lipase from a native isolate of *lactobacillus fermentum*. *Iran. J. Microbiol.*, **13**(6), 871.
- Fetyan, N. A. H., Ismail, I. M., Salem, R., and Afifi, M. M. (2023). Isolation, purification and production of lipase from bacillus subtilis isolated from food processing wastes and its application in biodiesel production. *Egypt. J. Chem*, **66**(12), 173–187.
- Gao, J., Zhu, R., Li, L., Gao, Q., Wu, X., Zhang, Y., and Zhang, Y. (2023). An adaptive absorption spectroscopy with adjustable moving window width for suppressing nonlinear effects in absorbance measurements. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **294**, 122550.
- 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. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, **8**(1), 34–40.
- Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., Mitchell, D. A., De Souza, E. M., Pedrosa, F. O., and Krieger, N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microb. Cell Factories*, **10**(1), 1–15.
- Gupta, R., Gupta, N., and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **64**(6), 763–781.
- Haeruddin, H., Astuti, W., dan Pratiwi, D. R. (2023). Pengaruh ion logam terhadap aktivitas lipase dari bakteri air bekas galian tambang Di Samarinda. *Pros. Sem. Nas. Kim*, **2**(1), 67–70.
- Hapsari, M. W., Anggraeni, N., Rohana, L., Lanywati, E., dan Kusumaningtias, N., Dan W. (2021). Isolasi, purifikasi parsial dan karakterisasi enzim L-asparaginase dari bawang putih (*Allium Sativum*). *Unkartur Semarang*, **1**(1), 71–79.
- Haque, M. A. (2021). Pathogenicity of feed-borne *bacillus cereus* and its implication on food safety. *Agrobiol Rec*, **3**, 1–16.
- Haryati, T., Widhiastuty, M. P., Warganegara, F. M., and Akhmaloka, A. (2022). Molecular characterization of transesterification activity of novel lipase family I.1. *Biosci. Rep.*, **42**(10).
- Hassan, S., Beltagy, E., Abd, H., and Latif, E. (2022). Purification , characterization and application of a cold active lipase from marine *Bacillus cereus* HSS. *Microbiol. Biotechnol. Lett*, **50**(1), 1–10.

- He, B., Li, N., Qin, Y., Xian, L., Zhou, J., Liu, S., Zhang, J., Wu, J., Wang, Q., and Liang, X. (2025). Gene cloning, purification, and characterization of a cold-active alkaline lipase from *Bacillus cereus* U2. *Fermentation*, **11**(7), 365.
- Holtheuer, J., Tavernini, L., Bernal, C., Romero, O., Ottone, C., and Wilson, L. (2023). Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in a rotating bed reactor. *Molecules*, **28**(2), 644.
- Indriani, S., Isdaryanti, M. A., Poleuleng, A. B., Syahra, N. J., and Prastiyo, Y. B. (2023). Analisis GC-MS (*gas chromatography-mass spectrometry*) terhadap batang kelapa sawit (*elaeis guineensis* jaq.). *J. Agropiantae*, **12**(2), 147–155.
- Indriyani, D. M., Nurhasanah, and Herasari, D. (2021). Optimization of lipase production from local bacteria isolate with palm oil inducer. *J. Kim. Sains Apl*, **24**(2), 58–61.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., and Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol*, **53**, 315–351.
- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., Afzal, M., Kouser, A., and Nadeem, H. (2018). Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog. Biophys. Mol. Biol*, **132**, 23–34.
- Jawetz, M. D. (2014). *Mikrobiologi Kedokteran*. Buku Kedokteran Egc.
- Jayaraman, J., Alagu, K., Appavu, P., Joy, N., Jayaram, P., and Mariadoss, A. (2020). Enzymatic production of biodiesel using lipase catalyst and testing of an unmodified compression ignition engine using its blends with diesel. *Renew. Energ.*, **145**, 399–407.
- Kaur, M., Kumar, R., Katoch, P., and Gupta, R. (2023). Purification and characterization of extracellular lipase from a thermotolerant strain: *bacillus subtilis* Ttp-06. *3 Biotech*, **13**(10), 1–13.
- Khan, S. S., Verma, V., and Rasool, S. (2023). Purification and characterization of lipase enzyme from endophytic *bacillus pumilus* WSS5 for application in detergent industry. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **50**, 102681.
- Kim, B. H., Hwang, J., and Akoh, C. C. (2023). Liquid microbial lipase recent applications and expanded use through immobilization. *Curr. Opin. Food Sci.*, **50**, 100987.
- Kumar, S., Saha, D., Ray, D., and Aswal, V. K. (2025). Surfactant-driven modifications in protein structure. *Soft Matter*, **21**(25), 4979–4998.
- Lankatillake, C., Luo, S., Flavel, M., Lenon, G. B., Gill, H., Huynh, T., and Dias, D. A. (2021). Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in α -amylase, α -glucosidase and lipase assays. *Plant Methods*, **17**(1), 1–19.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **3**(12), 1–19.
- Maftukhah, S. (2020). Aplikasi *bacillus* sp pada produksi enzim menggunakan metode fermentasi padat - review. *Unistek*, **7**(1), 6–9.
- Manning, G. S., and Kay, A. R. (2023). The physical basis of osmosis. *J. Gen. Physiol.*, **155**(10), E202313332.
- Mazhar, H., Afzal, A., Afzal, H., Noureen, A., Ahmad, M. M. I., Amaan, S., Abbas, N., Zhu, H., and Khawar, M. B. (2025). Extracellular lipase production from *bacillus cereus* by using agro-industrial waste. *Biologia Futura*, **76**(1), 41–48.
- Mazhar, H., Afzal, A., Aman, S., Khawar, M. B., Hamid, S. E., Ishaq, S., Ali, S. S., Zhu, H., and Hussain, Z. (2023). Purification and characterization of lipase produced from *bacillus cereus* (PCSIR NL-37). *Bionatura*, **8**(1).
- McLafferty, F. W. (1987). *Interpretasi spektra massa*. Gadjah Mada University Press.
- Monteiro, R. R. C., Berenguer-Murcia, Á., Rocha-Martin, J., Vieira, R. S., and Fernandez-Lafuente, R. (2023). Biocatalytic production of biolubricants: strategies, problems and future trends. *Biotechnol. Adv.*, **68**, 108215.
- Moschona, A., Spanou, A., Pavlidis, I. V., Karabelas, A. J., and Patsios, S. I. (2024). Optimization of enzymatic transesterification of acid oil for biodiesel production using a low-cost lipase: the effect of transesterification conditions and the synergy of lipases with different regioselectivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **196**(11), 8168–8189.
- Mukti, P. R., Feliatra, F., and Effendi, I. (2020). Growth of bacteria *bacillus cereus* in liquid media with different protein sources. *Jocos*, **1**(1), 35–40.
- Nadaf, P., Ghagane, S., Nadaf, R. D., and Timmappa, S. C. (2025). Purification and characterization of lipase from *bacillus subtilis* Kubt4 for biodiesel production. *Discover Appl. Sci.*, **7**(2).
- Nguyen, A. T., and Tallent, S. M. (2019). Screening food for *bacillus cereus* toxins using whole genome sequencing. *Food Microbiol.*, **78**, 164–170.
- Nor, N. F. S. M., Veny, H., Hamzah, F., Rodhi, M. N. M., Kusumaningtyas, R. D., Prasetyawan, H., Hartanto, D., Sulaiman, S., and Sazali, R. A. (2024). Enzymatic transesterification using different immobilized lipases and its biodiesel effect on gas emission. *Bull. Chem. React. Eng. Catal.*, **19**(2), 265–274.
- Nugroho, S. A., Wardana, R., Fatimah, T., Mastuti, L., and Lia Novenda, I. (2022). Hidrolisis lemak oleh enzim lipase pada tanaman jarak pagar (*Jatropha Curcas*). *Bioma*, **7**(1), 81–89.

- Nurani, L. H., Edityaningrum, C. A., Irnawati, I., Putri, A. R., Windarsih, A., Guntarti, A., and Rohman, A. (2023). Chemometrics-assisted uv-vis spectrophotometry for quality control of pharmaceuticals: a review. *Indones. J. Chem.*, **23**(2), 542–567.
- Octaviani, I., Ahsanal, K., and Mally, G. S. (2022). Cemaran bakteri *staphylococcus aureus* dan *pseudomonas aeruginosa* pada masker organik. *J. Tunas-Tunas Ris. Kesehat*, **12**(3).
- Peter, R. (2025). Comparative study of submerged and solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Ferment. Technol*, **14**(1), 1–2.
- Pratiwi, R. A., and Nandiyanto, A. B. D. (2022). How to read and interpret UV-Vis spectrophotometric results in determining the structure of chemical compounds. *Ijert*, **2**(1), 1–20.
- Purba, K. S., Khalimi, K., dan Suniti, N. I. W. (2021). Uji aktivitas antijamur *bacillus cereus* terhadap colletotrichum fructicola krer penyebab penyakit antraknosa pada buah cabai rawit (*Capsicum Frutescens* L.). *J. Agroekoteknol. Trop*, **10**(1), 50–58.
- Purkan, P., Lestari, I. T., Arissirajudin, R., Ningsih, R. R. P., Apriyani, W., Nurlaila, H., Sumarsih, S., Hadi, S., Retnowati, W., and Kim, S. W. (2020). Isolation of lipolytic bacteria from domestic waste compost and its application to biodiesel production. *Rasayan J. Chem*, **13**(4), 2074–2084.
- Rachmawati, F. (2021). *Skrining Aktivitas Lipase Dari Isolat Bakteri-Bakteri Air Laut Tercemar Minyak Di Pelabuhan Panjang Lampung*.
- Rait, A., Nurhasanah, dan Bahri, S. (2022). Pemurnian parsial enzim lipase dari bakteri isolat lokal lkma3 dan penentuan aktivitasnya dengan metode spektrofotometri. *Pros. Semin. Nas. Sains*, **6**, 1–5.
- Romo-Silva, M., Flores-Camargo, E. O., Chávez-Camarillo, G. M., and Cristian-Urbina, E. (2024). Production, purification, and characterization of extracellular lipases from *hyphopichia wangnamkhiaoensis* and *yarrowia deformans*. *Fermentation*, **10**(12), 1–21.
- Sahoo, R. K., Das, A., Gaur, M., Sahu, A., Sahoo, S., Dey, S., Rahman, P. K. S. M., and Subudhi, E. (2020). Parameter optimization for thermostable lipase production and performance evaluation as prospective detergent additive. *Prep. Biochem. Biotechnol*, **50**(6), 578–584.
- Sangkoy, W. J., Simbala, H., and Rumondor, E. (2023). Antibacterial activity of ethanol extract of areca vestiaria leaves (*areca vestiaria*) against *staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, and *pseudomonas aeruginosa* bacteria. *Pharmacon*, **12**(1), 133–139.
- Saraswat, R., Verma, V., Sistla, S., and Bhushan, I. (2017). Evaluation of alkali and thermotolerant lipase from an indigenous isolated *bacillus* strain for detergent formulation. *Electron. J. Biotechnol.*, **30**, 33–38.

- Sengpracha, W., Agustin, M., and Phutdhawong, W. (2012). A survey on the fatty acid composition of commercial palm oil in Thailand. *Chem Sci Trans*, **1**(3), 612–617.
- Septiani, S. (2019). Karakterisasi lipase termostabil (isolat A196) berdasarkan parameter temperatur dan pH pada industri makanan. *Lantanida J*, **7**(1), 49–57.
- Sharma, P., Sharma, N., Pathania, S., and Handa, S. (2017). Purification and characterization of lipase by *bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry. *J Genet Eng Biotechnol*, **15**(2), 369–377.
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Gupta, L. K., and Gupta, J. K. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *bacillus* sp. Rsj-1. *Process Biochem*, **37**(10), 1075–1084.
- Sholeha, R., dan Agustini, R. (2021). Lipase biji-bijian dan karakteristiknya: seed lipases and its characterization. *Unesa J. Chem.*, **10**(2), 168–183.
- Subroto, E., Lembong, E., Filianty, F., Indiarto, R., Primalia, G., Salza Kirana, M., Putri, Z., Theodora, H. C., and Junar, S. (2020). The analysis techniques of amino acid and protein in food and agricultural products. *Int. J. Sci. Technol. Res.*, **9**(10).
- Sundaramahalingam, M. A., Amrutha, C., Sivashanmugam, P., and Rajeshbanu, J. (2021). An encapsulated report on enzyme-assisted transesterification with an allusion to lipase. *3 Biotech*, **11**(11), 481.
- Szymczak, T., Cybulska, J., Podleśny, M., and Frąc, M. (2021). Various perspectives on microbial lipase production using agri-food waste and renewable products. *Agriculture*, **11**(6), 540.
- Thabet, H. S., Seddik, I., Mohamed, W. A., Sayed, A. M., and Yusuf, S. (2023). Isolation, screening, and molecular identification of lipase-producing bacteria from different bacterial sources. *Assiut Vet. Med. J.*, **69**(178), 134–144.
- Vera, H. M., Astuti, W., and Pratiwi, D. R. (2023). Screening of lipase from water bacteria in Benanga Lempake Dam, North Samarinda and its potential as a detergent additive. *J. Atomik*, **8**(2), 50–53.
- Verma, S., Meghwanshi, G. K., and Kumar, R. (2021). Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics. *Biochimie*, **182**, 23–36.
- Vivek, K., Sandhia, G. S., and Subramaniyan, S. (2022). Extremophilic lipases for industrial applications: a general review. *Biotechnol. Adv.*, **60**, 108002.

- Wahyuni, A. M., Afthoni, M. H., dan Rollando, R. (2022). Pengembangan dan validasi metode analisis spektrofotometri uv vis derivatif untuk deteksi kombinasi hidrokortison asetat dan nipagin pada sediaan krim. *Sainsbertek J. Ilm. Sains Teknol*, **3**(1), 239–247.
- Wang, C., Liu, C., Zhu, X., Peng, Q., and Ma, Q. (2023). Catalytic site flexibility facilitates the substrate and catalytic promiscuity of vibrio dual lipase/transferase. *Nat. Commun*, **14**(1), 4795.
- Wang, S., Meng, X., Zhou, H., Liu, Y., Secundo, F., and Liu, Y. (2016). Enzyme stability and activity in non-aqueous reaction systems: a mini review. *Catalysts*, **6**(2), 32.
- Yahya, S. (2013). *Spektrofotometri UV-Vis*. Erlangga.
- Yusuf, B. O., Oladepo, S. A., and Ganiyu, S. A. (2024). Efficient and sustainable biodiesel production via transesterification: catalysts and operating conditions. *Catalysts* 2, **14**(9), 581.