PEMANFAATAN ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. DARI TANAH TERCEMAR SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI DALAM PRODUKSI BIODIESEL

(Skripsi)

Oleh

Grace Sondang Pretti

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
BANDAR LAMPUNG
2022

ABSTRACT

UTILIZATION OF LIPASE ENZYME PRODUCED BY *Pseudomonas* sp. FROM CONTAMINATED SOIL AS A CATALYST FOR TRANSESTERIFICATION REACTIONS IN BIODIESEL PRODUCTION

By

Grace Sondang Pretti

The rapidly increasing use of fuel causes dependence on fossil fuel to remain high and to reduce. This dependence, biofuel has become one of the priorities in the development of renewable energy. Biodiesel can be produced through a transesterification of vegetable oils or animal fats, throught wich the glycerides in the raw material are converted into methyl esters and glycerol as side product. In this study, transesterification of coconut oil was investigated using lipase enzyme produced from the bacterium *Pseudomonas* sp. isolated from the ground, as catalyst. The experimental results indicate that *Pseudomonas* sp. reach optimum growth at 18 hours and pH 7 with unit activity of 63.2 U/mL. The purified lipase enzyme has a specific activity of 43.161 U/mg with a purity of 7.5 times compared to that of the crude extract of the enzyme. Pure lipase enzyme has optimum activity at pH 7, temperature 40 °C, and incubation time of 120 minutes. The transesterification experiments were conducted with coconut oil to methanol a molar ratio of 1:4, 1:5, and 1:6, and the products were analyzed using GC-MS to confirm the formation methyl esters. Density and viscosity of the products were also measured.

Keywords: *Pseudomonas* sp., lipase enzyme, transesterification and biodiesel.

ABSTRAK

PEMANFAATAN ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. DARI TANAH TERCEMAR SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI DALAM PRODUKSI BIODIESEL

Oleh

Grace Sondang Pretti

Penggunaan BBM yang meningkat pesat menyebabkan ketergantungan BBM masih tinggi dan perlu dikurangi. Biofuel atau Bahan Bakar Nabati (BBN) telah menjadi salah satu prioritas dalam pengembangan energi terbarukan. Biodiesel dapat dihasilkan melalui proses transesterifikasi minyak nabati atau lemak hewani, yaitu dengan mengubah gliserida menjadi metil ester dan gliserol. Pada penelitian ini, transesterifikasi minyak kelapa menggunakan enzim lipase yang diproduksi dari bakteri *Pseudomonas* sp. yang diisolasi dari tanah, sebagai katalis. Bakteri *Pseudomonas* sp. tumbuh optimum pada jam ke-18 dan pH 7 dengan aktivitas unit sebesar 63,2 U/mL. Enzim lipase yang telah dimurnikan memiliki aktivitas spesifik sebesar 43,161 U/mg dengan kemurnian 7,5 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Enzim lipase murni mempunyai aktivitas optimum pada pH 7, suhu 40 °C, dan waktu inkubasi selama 120 menit. Proses transesterifikasi menggunakan minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan molar 1:4, 1:5, dan 1:6, dan produk dianalisis menggunakan GC-MS untuk mengkonfirmasi campuran metil ester sebagai produk utama reaksi transesterifikasi. Nilai densitas dan viskositas dari produk juga diukur.

Kata kunci: *Pseudomonas* sp., enzim lipase, transesterifikasi dan biodiesel.

PEMANFAATAN ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. DARI TANAH TERCEMAR SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI DALAM PRODUKSI BIODIESEL

Oleh

GRACE SONDANG PRETTI

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
BANDAR LAMPUNG
2022

Judul Penelitian : **PEMANFAATAN ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. DARI TANAH TERCEMAR SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI DALAM PRODUKSI BIODIESEL**

Nama : Grace Sondang Pretti

Nomor Pokok Mahasiswa : 1757011017

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Dr. Dian Herasari, M.Si
NIP. 197108062000032001

Donny Lesmana, M.Sc
NIP. 198410082008121003

2. Ketua Jurusan Kimia

Mulyono, Ph.D
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

Sekretaris : **Donny Lesmana, M.Sc.** .....

Penguji
Bukan Pembimbing : **Prof. Wasinton Simanjutak, Ph.D.** .....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **4 Maret 2022**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama	: Grace Sondang Pretti
NPM	: 1757011017
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **"Pemanfaatan Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. dari Tanah Tercemar sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi dalam Produksi Biodiesel"** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya, selain itu tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 30 Maret 2022

Penulis,

Grace Sondang Pretti
NPM. 1757011017

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Grace Sondang Pretti, lahir di Jakarta pada tanggal 14 Januari 2000. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara, pasangan Bapak Marahalim Gultom dan Ibu Rawati Sianturi.

Penulis mengawali pendidikan di Taman Kanak-Kanak (TK) Pelita, Jakarta pada tahun 2004-2005. Kemudian melanjutkan pendidikannya di SD Swasta Pelita, Jakarta pada tahun 2005-2011. Tahun 2011-2014 penulis melanjutkan pendidikannya pada jenjang pertama di SMP Santo Markus 1. Tahun 2014 penulis melanjutkan pendidikannya pada sekolah menengah atas di SMA Perguruan Advent Salemba dan tahun 2015-2017 di SMA Negeri 9 Jakarta. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Wilayah Barat Indonesia (SMM PTN-Barat) pada tahun 2017. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi. Organisasi yang diikuti penulis yaitu Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) sebagai anggota Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi pada tahun 2018-2019 dan 2019-2020. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia I dan Praktikum BIokimia II untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2021.

Penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2020 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase Ekstraseluler daari

Tanah Tercemar Limbah Minyak Rumah Tangga". Sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu kepada masyarakat, penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada bulan Juli-Agustus 2020 di Jaticempaka, Kecamatan Pondok Gede, Kota Bekasi. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pemanfaatan Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. dari Tanah Tercemar sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi dalam Produksi Biodiesel".

MOTTO

Serahkanlah kuatirmu kepada TUHAN, maka Ia akan memelihara engkau! Tidak untuk selama-lamanya dibiarkan-Nya orang benar itu goyah.
(Mazmur 55:23)

Segala perkara dapat kutanggung di dalam Dia yang memberi kekuatan kepadaku.
(Filipi 4:13)

Ia membuat segala sesuatu indah pada waktunya, bahkan Ia memberikan kekekalan dalam hati mereka. Tetapi manusia tidak dapat menyelami pekerjaan yang dilakukan Allah dari awal sampai akhir.
(Pengkhotbah 3:11)

Karena masa depan sungguh ada, dan harapanmu tidak akan hilang.
(Amsal 23:18)

Karena itu, saudara-saudaraku yang kekasih, berdirilah teguh, jangan goyah, dan giatlah selalu dalam pekerjaan Tuhan! Sebab kamu tahu, bahwa dalam persekutuan dengan Tuhan jerih payahmu tidak sia-sia.
(1 Korintus 15:58)

PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadirat Tuhan Yesus Kristus atas segala anugerah, kasih, dan kebaikan-Nya yang selalu melimpahkan berkat, hikmat berpikir, kesehatan, dan kekuatan dalam setiap proses perkuliahan yang telah dilalui. Tangan Tuhan selalu menopang dan menjawab setiap doa indah pada waktunya.

Keluarga tercinta:
Kepada Bapak dan Ibu yang telah bekerja keras memenuhi segala kebutuhan demi mendukung pendidikan. Memberikan dukungan berupa doa, semangat, dan materi untuk penulis sehingga dapat menyelesaikan tugas akhir dengan baik, serta adik penulis yang selalu memberikan semangat dan dukungan.

Rasa hormat saya kepada
Ibu Dian Herasari, M.Si., Bapak Donny Lesmana, M.Sc.,
dan Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, Ph.D.
Terima kasih telah membimbing penulis.

Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia
Atas dedikasi dan ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di kampus.

Sahabat-sahabat terbaik yang selalu hadir dan menemani penulis dalam suka maupun duka, mendengarkan segala keluh kesah penulis serta memberikan saran terbaik untuk penulis.

Kepada diri sendiri yang telah bekerja keras dan tidak pernah menyerah walau dalam keadaan yang sulit, tidak pernah berhenti belajar untuk selalu membenahi diri dan melakukan yang terbaik.

Serta,
Almamater tercinta, Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji dan syukur kehadirat Tuhan Yesus atas berkat dan kasihnya-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **"Pemanfaatan Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. dari Tanah Tercemar sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi dalam Produksi Biodiesel"** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, saran, dan kritik yang telah diberikan berbagai pihak. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat, Penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Marahalim Gultom dan Ibu Rawati Sianturi selaku orang tua Penulis yang selalu memberikan Penulis kasih sayang, nasihat, dukungan, dan doa. Semoga selalu diberikan kesehatan dan panjang umur oleh Tuhan Yesus.
2. Adik penulis Ingwer Ludwig Joshua yang selalu memberikan dukungan dan semangat bagi penulis. Semoga selalu diberkati, diberikan kesuksesan, dan umur yang panjang oleh Tuhan Yesus.
3. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku dosen Pembimbing I penulis, terima kasih atas segala motivasi, bimbingan, dan saran yang telah diberikan hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dan perkuliahan dengan baik. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kebaikan.
4. Bapak Donny Lesmana, M.Sc. selaku dosen Pembimbing II yang sudah banyak membantu penulis, senantiasa memotivasi, dan memberikan pengarahan dalam proses penelitian dan penyusunan skripsi. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kebaikan.

5. Bapak Prof. Wasinton Simanjutak, Ph.D. selaku dosen Pembahas yang telah memberikan motivasi, kritik, dan saran yang membangun kepada penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kebaikan.
6. Bapak Prof. Rudy T Mangapul, Ph.D. selaku pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu serta memberikan bimbingan, nasihat, dan saran kepada Penulis.
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Suripto Dwi Yuwono, M.T., sebagai Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membimbing dan memberikan banyak ilmu, pengalaman, dan motivasi kepada penulis selama perkuliahan. Semoga selalu diberi kesehatan dan kebaikan dalam hidup.
10. Seluruh karyawan Jurusan Kimia atas waktu serta pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
11. Partner penelitianku “BDL 17”, Arifa Rahmatika Salsabilla, Firyal Humaira Arif, dan Indah Parwatih. Terimakasih atas kerja sama, kesabaran, dorongan semangat, hiburan, kepedulian, kekompakkan, serta waktu yang diluangkan untuk mendengar keluh kesah Penulis. Semoga kita bisa sukses bersama dan bertemu kembali dikeadaan yang lebih baik dari saat ini.
12. Sahabat-sahabat penulis “Keluarga Jan Ethes Sanjarut”, Aiga Sheira Rait, Apri Dearni Sinaga, Nikita Damayanti, Novalisa Putri dan Olivia Margaretta Damai Sartika atas segala motivasi dan bantuannya sehingga penulis dapat melewati masa-masa yang berat dalam perkuliahan. Semoga persahabatan kita tetap terjaga dan kita selalu diberi jalan yang terbaik oleh Tuhan Yesus.
13. Sahabat-sahabat penulis “Arisan Bunda-Bunda Komplek”, Anastasia Pinkan Aulia Alvioleta, Gabriella Aurel Kathleen, Gita Adventi, Maria Editha Inggrid, Michele Septa Esther, dan Vera Agustina yang selalu menemani, memberikan dukungan, saran dan menghibur penulis dikala jenuh. Semoga

persahabatan kita tetap terjaga dan kita selalu diberi jalan yang terbaik oleh Tuhan Yesus.

14. Sahabat-sahabat terdekat penulis di kelas C Anisa Amelz Widyani, Iffah Nur Faidah, Innama Trina, Najma Firdausi, Nelda Rosa Oktarida, Nurmalia Salis, Putri Okta Nadia, dan Windi Agustina serta teman-teman "Yuk Menuju Lebih Baik - Kelas C" yang selalu memberikan dukungan, saran, dan hiburan selama menjalani proses perkuliahan dan penelitian yang berat. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kebaikan.
15. Sahabat-sahabat terdekat penulis "*Another People*", Kassandra Cahyani dan Shania Putri Salsabila yang selalu memberikan dukungan, saran, dan hiburan selama menjalani proses perkuliahan dan penelitian yang berat. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kebaikan.
16. Teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biokimia atas bantuan, ilmu, kerja sama, dorongan semangat, serta pengalaman yang kalian bagi dengan Penulis. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kelancaran dalam menjalani kehidupan.
17. Teman-teman "Kimia 2017" yang sudah menemani penulis sejak mahasiswa baru hingga penulis mampu menyelesaikan perkuliahan dengan baik. Semoga kita dapat dipertemukan kembali dan menjalani kehidupan yang baik.
18. POM-MIPA yang menjadi sarana penulis untuk bertumbuh dalam iman.
19. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu dan memberikan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini.

Demikian yang dapat penulis sampaikan, masih banyak kesalahan dan kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini dapat memberikan informasi, wawasan, dan ilmu yang bermanfaat . Semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu memberi kita berkat kesehatan dan kebaikan dalam menjalani hidup.

Bandar Lampung, 31 Maret 2022
Penulis,

Grace Sondang Pretti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI ..... **i**

DAFTAR TABEL ..... **iv**

DAFTAR GAMBAR ..... **vi**

I. PENDAHULUAN **1**

1.1. Latar Belakang 1
1.2. Tujuan Penelitian 4
1.3. Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA **5**

2.1. Tanah 5
2.2. Bakteri 6
2.2.1. Identifikasi Bakteri 6
2.2.2. Klasifikasi Bakteri 7
2.3. Bakteri *Pseudomonas* sp. 8
2.4. Enzim Lipase 9
2.4.1. Sumber Enzim Lipase 9
2.4.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim 11
2.4.3. Aktivitas Enzim 13
2.4.4. Uji Aktivitas Lipase Metode *Kwoon and Rhee* 14
2.4.5. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry 14
2.4.6. Pemanfaatan Enzim Lipase 15
2.5. Reaksi Transesterifikasi 16
2.5.1. Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Transesterifikasi 16

2.5.2. Minyak Kelapa 18
2.6. Biodiesel 19
2.7. Spektrofotometer UV-Vis 21
2.8. Kromatografi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*) 22

III. METODE PENELITIAN 23

3.1. Waktu dan Tempat 23
3.2. Alat dan Bahan 23
3.3. Prosedur Penelitian 24
3.3.1. Tahap Persiapan 24
3.3.2. Identifikasi Bakteri 25
3.3.3. Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri 25
3.3.4. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri 26
3.3.5. Produksi Enzim Lipase 26
3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase 26
3.3.7. Karakterisasi Enzim Lipase 28
3.3.8. Penentuan Aktivitas Enzim Lipase 28
3.3.9. Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase 30
3.3.10. Pembuatan Biodiesel 30
3.3.11. Karakterisasi Sampel Biodiesel 31

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 34

4.1. Identifikasi Bakteri 34
4.2. Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri 36
4.2.1. Waktu Optimum Pertumbuhan Bakteri 36
4.2.2. pH Optimum Pertumbuhan Bakteri 37
4.3. Produksi dan Isolasi Enzim Lipase 38
4.4. Pemurnian Enzim Lipase 39
4.4.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat [$(NH_4)_2SO_4$] 39
4.4.2. Dialisis 41
4.4.3. Kromatografi Filtrasi Gel 42
4.5. Karakterisasi Enzim Lipase 45
4.4.1. pH Optimum Enzim 45
4.4.2. Suhu Optimum Enzim 46
4.4.3. Waktu Inkubasi Optimum Enzim 48

4.5. Pembuatan Biodiesel 48
4.6. Uji Aktivitas Transesterifikasi 49
4.6.1. Densitas 50
4.6.2. Viskositas 51
4.6.3. Analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*) 52

V. KESIMPULAN DAN SARAN 60

5.1. Kesimpulan 60
5.2. Saran 60

DAFTAR PUSTAKA 61

LAMPIRAN 68

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Kondisi optimum beberapa jenis minyak nabati terhadap alkohol dalam pembuatan biodiesel 18

2. Komposisi asam lemak dalam minyak kelapa 19

3. Standar dan mutu (spesifikasi) bahan bakar nabati (biofuel) 20

4. Pemurnian enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. 44

5. Hasil uji kuantitatif karakterisasi biodiesel 52

6. Komposisi hasil percobaan dengan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:4 53

7. Komposisi hasil percobaan dengan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:5 55

8. Komposisi hasil percobaan dengan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:6 56

9. Hubungan nilai *optical density* (OD) dengan aktivitas enzim (U/mL) 69

10. Nilai aktivitas unit pada penentuan pH optimum produksi enzim 69

11. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat pada berbagai fraksi dengan aktivitas enzim lipase dari *Pseudomonas* sp. 70

12. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat fraksi 0-20% dan 20-90% dengan aktivitas enzim lipase dari *Pseudomonas* sp. 70

13. Nilai Absorbansi 280 nm enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel..... 71

14. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas enzim lipase hasil 72

15. Pengaruh pH pada aktivitas enzim lipase..... 73

16. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase..... 73

17. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase 73

18. Nilai densitas nisbah minyak kelapa terhadap metanol 74

19. Nilai viskositas nisbah minyak kelapa terhadap metanol 75

20. Nilai absorbansi dari kurva standar asam oleat..... 78

21. Nilai absorbansi dari kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin)..... 79

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Bakteri gram positif..... 8

2. Bakteri gram negatif..... 8

3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu..... 11

4. Hubungan laju reaksi dengan pH 12

5. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi..... 12

6. Reaksi transesterifikasi..... 16

7. Skema fraksinasi enzim..... 27

8. Diagram Alir Penelitian 33

9. Waktu pertumbuhan optimum bakteri berdasarkan nilai *optical density* dan aktivitas unitnya 36

10. pH optimum pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* sp. 38

11. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase dari *Pseudomonas* sp. 40

12. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase dari *Pseudomonas* sp. 41

13. Profil elusi pemurnian enzim lipase pada filtrasi gel dan hubungan absorbansi 280 nm dengan nilai aktivitas unit enzim (U/mL) 43

14. Pengaruh pH pada aktivitas enzim lipase 45

15. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase 47

16. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase 48

17. Nilai densitas nisbah minyak kelapa terhadap metanol 50

18. Nilai viskositas nisbah minyak kelapa terhadap metanol 51

19. Kromatogram hasil percobaan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:4 53

20. Kromatogram hasil percobaan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:5 54

21. Kromatogram hasil percobaan nisbah minyak kelapa terhadap metanol dengan perbandingan 1:6 56

22. Reaksi transesterifikasi lanjut 59

23. Spektroskopi massa asam laurat dari nisbah minyak kelapa terhadap metanol perbandingan 1:4 77

24. Spektroskopi massa metil laurat dari nisbah minyak kelapa terhadap metanol perbandingan 1:5 77

25. Spektroskopi massa metil laurat dari nisbah minyak kelapa terhadap metanol perbandingan 1:6 77

26. Kurva standar lipase 78

27. Kurva standar BSA 79

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Dewasa ini, kebutuhan akan energi utama bahan bakar minyak mengalami peningkatan seiring dengan kebutuhan masyarakat setiap harinya. Energi mempunyai peranan penting dalam pencapaian tujuan sosial, ekonomi, dan lingkungan untuk pembangunan berkelanjutan serta merupakan pendukung bagi kegiatan ekonomi nasional. Penggunaan energi di Indonesia meningkat pesat sejalan dengan pertumbuhan ekonomi dan pertambahan penduduk, sedangkan akses untuk mendapatkan energi yang andal dan terjangkau merupakan prasyarat utama untuk meningkatkan standar hidup masyarakat. Penggunaan BBM yang meningkat pesat, terutama dalam bidang transportasi sulit untuk digantikan oleh jenis energi lainnya. Ketergantungan kepada BBM masih tinggi, lebih dari 60% dari konsumsi energi final. Satu dekade terakhir, kapasitas produksi kilang BBM dalam negeri tidak bertambah, sedangkan permintaan BBM di dalam negeri meningkat dengan cepat (Alkusma, dkk., 2016).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Devita (2015), konsumsi BBM secara nasional terus meningkat dari tahun ke tahun. Setiap harinya konsumsi BBM tingkat nasional rata-rata mencapai 140.000-180.000 kiloliter. Meningkatnya kebutuhan akan energi ini menyebabkan eksploitasi dan konsumsi energi dari minyak bumi yang semakin tinggi serta cadangan minyak bumi juga semakin menipis. Selain semakin menipisnya jumlah cadangan bahan bakar fosil, penggunaan bahan bakar fosil akan menimbulkan masalah kerusakan lingkungan yang diakibatkan oleh penggerusan fosil, menurunnya kualitas udara akibat pembakaran bahan bakar fosil yang mengandung gas belerang, dan menyebabkan kenaikan suhu bumi (*global warming*). Salah satu cara untuk mengatasi masalah

kelangkaan energi adalah mengembangkan sumber energi alternatif. Oleh karena itu, diperlukan sumber energi lain sebagai energi alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah lingkungan.

Biofuel atau Bahan Bakar Nabati (BBN) telah menjadi salah satu prioritas dalam pengembangan energi terbarukan karena memiliki potensi sumber daya yang sangat besar di Indonesia (Murtiningrum dan Firdaus, 2015). Biodiesel yang secara umum didefinisikan sebagai ester monoalkil dari tanaman dan lemak hewan merupakan bahan bakar alternatif yang sangat potensial digunakan sebagai pengganti solar karena kemiripan karakteristiknya. Selain itu, biodiesel yang berasal dari minyak nabati merupakan bahan bakar yang dapat diperbaharui (*renewable*), mudah diproses, harganya relatif stabil, tidak menghasilan cemaran yang berbahaya bagi lingkungan (non toksik) serta mudah terurai secara alami (Wijaya, 2011).

Biodiesel dapat dihasilkan melalui proses transesterifikasi yaitu dengan mengubah trigliserida menjadi metil ester dan gliserol. Molekul trigliserida akan melepaskan tiga asam lemak menggantikan gugus alkohol dari ester dengan gugus alkohol lain. Pada umumnya reaksi transesterifikasi menggunakan bahan yang bersifat basa atau asam sebagai katalis. Hal ini bertujuan untuk menurunkan viskositas dan meningkatkan daya pembakaran minyak, sehingga dapat memenuhi syarat sebagai bahan bakar alternatif (Martoyo, 2006). Tetapi pada kenyataannya, pengunaan katalis basa atau asam memiliki beberapa kelemahan seperti pemulihan katalis dan gliserol yang sulit dan memerlukan banyak air pencuci. Penggunaan enzim sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi dapat mengatasi kelemahan tersebut. Proses enzimatis mampu bereaksi pada kondisi suhu moderat, rasio alkohol yang rendah terhadap minyak, pemulihan produk lebih mudah, dan konversi yang tinggi (Diego *et al.*, 2011). Pada proses penggunaan enzim cenderung memiliki kelebihan yang lain yaitu biaya pengolahan limbah yang lebih rendah dan dapat digunakan pada kadar FFA (*free fatty acid*) yang tinggi (Dean, 2012).

Satu dekade terakhir ini telah dikembangkan produksi biodiesel secara enzimatik menggunakan katalis enzim lipase. Enzim lipase sebagai biokatalis mampu

mengarahkan reaksi secara spesifik ke arah produk yang diinginkan tanpa terjadinya reaksi samping yang merugikan. Biokatalis ini merupakan katalis heterogen, sehingga pemisahannya dari produk setelah reaksi berakhir dapat dilakukan dengan mudah (Bajaj, *et al.*, 2010). Enzim lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis lemak dan minyak dengan cara memutuskan rantai panjang trigliserida pada lemak menjadi bentuk lipid polarnya (Yapasan, 2008). Enzim lipase dapat diperoleh dari bakteri yang memiliki sifat lipolitik, bakteri lipolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memecah atau menghidrolisis lemak, fosfolipid, dan turunannya (Winarno, 2008). Bakteri *Pseudomonas* sp. merupakan salah satu bakteri yang bersifat lipolitik dan banyak terdapat di tanah, air, tanaman, dan hewan. *Pseudomonas* sp. sering terdapat pada flora normal usus dan kulit manusia (Jawetz and Adelberg's, 2008).

Pembuatan biodiesel pada penelitian ini menggunakan minyak kelapa karena Indonesia memiliki lahan perkebunan kelapa terbesar di dunia dengan total produksi mencapai lebih dari 85% total dunia, sehingga dapat mendukung dalam mengembangkan produk biodiesel, selain itu minyak kelapa memiliki kandungan ester yang sangat tinggi dibanding minyak diesel itu sendiri, memiliki sifat pembakaran yang baik, dan ramah lingkungan (Wright, *et al*., 2014; Ma dan Hanna, 1999). Alkohol yang umum digunakan dalam proses transesterifikasi adalah metanol. Reaksi yang berlangsung dengan menggunakan metanol lebih cepat dibandingkan etanol. Metanol memiliki berat molekul paling ringan dibanding etanol sehingga jumlah yang diperlukan lebih sedikit yaitu sekitar 15-20% dari berat minyak sedangkan dengan etanol dibutuhkan 30% dari berat minyak. Metanol lebih sering digunakan dalam pembuatan biodiesel dibandingkan jenis alkohol lain karena harganya yang ekonomis (Susilo, 2006).

Sejalan dengan kemampuan enzim lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis lemak, maka perlu dilakukan identifikasi dan karakterisasi pada enzim lipase bakteri dari tanah yang tercemar oleh minyak, karakterisasi ini perlu dilakukan untuk mengetahui pH, suhu, waktu inkubasi optimum, dan aktivitas enzim yang tinggi dari enzim lipase. Setelah itu, enzim lipase hasil optimasi dapat digunakan sebagai katalis

pembuatan biodiesel pada campuran minyak kelapa dan metanol untuk menguji aktivitas transesterifikasinya sehingga diperoleh nilai aktivitas transesterifikasi yang tinggi dan enzim dapat digunakan secara luas dalam bidang industri, serta meningkatkan pengetahuan akan enzim lipase sebagai katalis dalam proses pembuatan biodiesel. Oleh karena itu, penelitian pemanfaatan enzim lipase yang dihasilkan oleh isolat bakteri *Pseudomonas* sp. dari tanah tercemar sebagai katalis reaksi transesterifikasi dalam produksi biodiesel perlu dilakukan.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun beberapa tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Menentukan kondisi optimum dari bakteri *Pseudomonas* sp. yang berasal dari sampel tanah tercemar.
2. Mengkarakterisasi enzim lipase yang diperoleh berdasarkan parameter kondisi optimum (suhu, pH, dan waktu inkubasi).
3. Memperoleh enzim lipase murni dan nilai aktivitas spesifik enzim.
4. Menguji aktivitas transesterifikasi biodiesel secara kualitatif dan kuantitatif dengan katalis enzim lipase.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang Biokimia, khususnya mengenai karakteristik enzim lipase yang diperoleh dari isolat bakteri *Pseudomonas* sp., kemampuan enzim lipase dalam mengkatalis reaksi transesterifikasi berdasarkan nilai kualitatif dan kuantitatif yang diperoleh serta dapat dimanfaatkan sebagai katalis dalam produksi biodiesel dan bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanah

Tanah merupakan bagian ekosistem yang sangat penting. Sumber daya tanah yang merupakan jantung ekosistem bumi mempunyai enam fungsi ekosistem (layanan ekosistem) yaitu sebagai medium untuk tumbuh-tumbuhan, pengendali pasokan air, habitat organismetanah, pendaur ulang alami, pengatur komposisi atmosfer, dan medium untuk keteknikan. Pencemaran tanah adalah keadaan di mana bahan kimia buatan manusia masuk dan merubah lingkungan tanah alami. Pencemaran ini biasanya terjadi karena: kebocoran limbah cair atau bahan kimia industri atau fasilitas komersial; penggunaan pestisida; masuknya air permukaan tanah tercemar ke dalam lapisan sub-permukaan, zat kimia, atau limbah; air limbah dari tempat penimbunan sampah serta limbah industri yang langsung dibuang ke tanah secara tidak memenuhi syarat (*illegal dumping*). Pencemaran yang masuk ke dalam tanah kemudian terendap sebagai zat kimia beracun di tanah. Zat beracun di tanah tersebut dapat berdampak langsung kepada manusia ketika bersentuhan atau dapat mencemari air tanah dan udara di atasnya (Muslimah, 2015).

Pencemaran organik yang banyak mencemari tanah adalah jenis pestisida yang banyak digunakan untuk pertanian, dimana penggunaan pestisida yang berlebihan akan berdampak buruk bagi tanah. Pencemaran anorganik yang paling toksik adalah dari logam berat seperti air raksa (hg), *cadmium* (Cd), *chromium* (Cr), dan timbal (Pb). Pencemaran logam berat menyebabkan tanah menjadi tercemar karena logam berat yang masuk ke dalam tanah akan bertahan lama di dalam tanah. Pencemaran mikrobiologis terjadi karena adanya mikroba patogen baik dari golongan bakteri, jamur maupun nematoda (Puspawati dan Haryono, 2018).

2.2. Bakteri

Bakteri berasal dari bahasa latin (*bacterium*; jamak: *bacteria*) yang merupakan kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik) (Radji, 2011). Bakteri sebagai makhluk hidup tentu memiliki informasi genetik berupa DNA. Bentuk DNA bakteri adalah sirkuler, panjang, dan biasa disebut nukleoi. Pada DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun atas akson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstrakromosomal yang tergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz and Adelberg's, 2008). Bakteri yang potensial dapat diperoleh dengan penapisan mikroorganisme dari lingkungan (Dwijoseputro dan Ratna, 1998). Umumnya isolat bakteri diperoleh sesuai dengan lingkungan tempat hidupnya. Hal ini dikarenakan kondisi lingkungan tersebutbiasanya digunakan bakteri sebagai substrat utamanya, misalnya bakteri amilolitik dapat diisolasi dari sampel yang berasal dari limbah pengolahan singkong, limbah sayur (Sen and Chakrabarty, 1986), rumen (Freer, 1993), serta hasil fermentasi ikan, dan bahan makanan dari beras (Olympia *et al.*, 1995).

2.2.1. Identifikasi Bakteri

Untuk menentukan jenis bakteri yang ditemukan maka perlum dilakukan identifikasi, berikut merupakan beberapa metode identifikasi:

a. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengamati pergerakan dan pembelahan secara biner, mengamati bentuk dan ukuran sel yang alami pada saat mengalami fiksasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan (Irianto, 2006).

b. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengidentifikasikan bakteri baik mengenai bentuknya maupun sifat-sifat morfologinya, dengan kata lain untuk

memperlihatkan bagian-bagian sel mikroba (Dwijoseputro dan Ratna, 1998). Zat warna dapat mengabsorbsi dan membiaskan cahaya, sehingga kontras sel bakteri dengan sekelilingnya ditingkatkan. Zat warna yang digunakan bersifat asam atau basa. Pada zat warna basa, bagian yang berperan memberikan warna disebut kromotor bermuatan positif, zat warna asam yang berperan memiliki muatan negatif. Zat warna basa lebih banyak digunakan karena memiliki muatan positif antara lain Eosin, *Congo Red*, dan lain-lain. Contoh warna asamyaitu *Crystal violet*, *Methylene Blue*, *Safranin*, *Base Fchsin*, *Malachite green*, dan lain-lain (Unsoed, 2008).

c. Media Selektif dan Diferensial

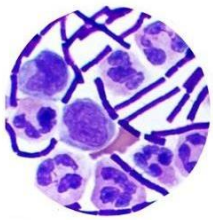
Media selektif digunakan untuk mengisolasi kelompok khusus bakteri. Media ini dilengkapi bahan kimia untuk menghambat pertumbuhan satu tipe bakteri dan menyebabkan pertumbuhan yang lainnya, sehingga memberi kemudahan untuk mengisolasi bakteri yang diinginkan media diferensial digunakan untuk membedakan kelompok mikroorganisme dari sifat morfologi dan biokimianya. Media ini dilengkapi campuran bahan kimia, setelah inokulasi dan inkubasi, menghasilkan perubahan karakteristik pada penampakan pertumbuhan bakteri, dan atau pada medium sekitar koloni, yang menyebabkan perbedaan. Beberapa contoh dari kedua media diatas di antaranya adalah agar garam mannitol, agar darah, agar McConkey, agar Eosin-*Methylene Blue* (EMB agar), agar darah telurit, agar tioglikolat/tarrozi (perbenihan anaerob), agar TCBS, agar monsur, agar coklat, atau Thayer-Martin, dan medium agar Lowenstein- Jensen (Kusnadi, 2003).

2.2.2. Klasifikasi Bakteri

Metode pengecatan bakteri dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang didasarkan dari reaksi atau sifat bakteri terhadap cat tersebut. Reaksi atau sifat bakteri tersebut ditentukan oleh komposisi dinding selnya sehingga pengecatan gram tidak bisa dilakukan pada mikroorganisme yang tidak mempunyai dinding sel seperti *Mycoplasma* sp. (Lay, 1994).

a. Bakteri Gram Positif

Bakteri gram positif adalah bakteri yang mampu mempertahankan zat warna kristal violet pada dinding selnya sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna ungu di bawah mikroskop seperti pada Gambar 1 (Jawetz and Adelberg, 2008).



Gambar 1. Bakteri gram positif

b. Bakteri Gram Negatif

Bakteri gram negatif adalah bakteri yang mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis yang terdapat dalam ruang periplasmik, yaitu antara membran luar dengan membran plasma. Bagian dinding sel bakteri ini dapat menyerap zat warna merah pada pewarnaan gram karena tidak mampu mempertahankan warna kristal violet seperti pada Gambar 2 (Radji, 2011).

Gambar 2. Bakteri gram negatif

2.3. Bakteri *Pseudomonas* sp.

Bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki karakteristik seperti gram negatif, berbentuk batang (*rods*) atau kokus (*coccus*), aerob obligat, dan motil mempunyai flagel polar. Bakteri ini bersifat oksidase positif, katalase positif, nonfermenter, dan tumbuh dengan baik pada suhu 4 °C atau dibawah 43 °C. Bakteri genus ini memproduksi beberapa enzim seperti protease, amilase, dan lipase. Selain itu

bakteri *Pseudomonas* sp. juga dapat menguraikan protein, karbohidrat dan senyawa organik lain menjadi CO_2, gas amonia, dan senyawa-senyawa lain yang lebih sederhana. Bakteri *Pseudomonas* sp. senang hidup di lingkungan yang bersuhu antara 15-30 °C (Suyono dan Salahudin, 2011).

Bakteri *Pseudomonas* sp. mempunyai batas-batas pH tertentu untuk pertumbuhannya. Bakteri *Pseudomonas* sp. pH 5,3-9,7 umumnya berkembang dengan baik pada pH antara 5,5-9,0 (Kordi, 2004). Beberapa spesies *Pseudomonas* seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri*, dan lain-lain. *Pseudomonas* sp. banyak terdapat di tanah, air, tanaman, dan hewan. *Pseudomonas* sp. sering terdapat pada flora normal usus dan kulit manusia (Jawetz and Adelberg's, 2008).

2.4. Enzim Lipase

Lipase (*triacylglycerol hydrolase*, EC 3.1.1.3) merupakan enzim kelas hidrolitik yang dapat mengkatalisis hidrolisis lemak (Gupta *et al.*, 2004). Enzim lipase yang diperoleh dari mikroorganisme seperti bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki berat molekul 49,92 kDa (Rashid, *et al.*, 2001). Enzim lipase memiliki aktivitas tertinggi pada pH 7 dan suhu 35-40°C (Nopiani dkk., 2016, Pratiwi dkk., 2013). Enzim lipase dapat larut dalam air dan dapat bekerja pada substrat lipid atau triasilgliserol (trigliserida) (Sharma *et al.*, 2001) yang memiliki peranan yang sangat penting dalam pencernaan suatu senyawa lemak. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis lemakdan minyak dengan cara memutuskan rantai panjang trigliserida pada lemak menjadi bentuk lipid polarnya (Yapasan, 2008).

2.4.1. Sumber Enzim Lipase

Enzim lipase dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Sharma *et al.*, 2001).

a. Lipase yang berasal dari mamalia dikelompokkan menjadi:
- Lipase pada sistem pencernaan, seperti lingual, lambung dan pankreas
- Lipase pada jaringan, seperti hati, paru-paru, jantung dan ginjal
- Lipase dalam air susu

b. Lipase yang bersumber dari tanaman dikelompokkan ke dalam tiga jenis, yaitu:
- Triasilgliserol lipase, terdapat pada tanaman jagung, minyak sawit, kacang, beras dan kentang
- Silhidrolase, dapat diperoleh dari tanaman kentang
- Phospolipase, terdapat pada tanaman seledri, kol dan kacang
- Liphospolipase, terdapat dalam tanaman gandum

c. Sedangkan lipase yang dihasilkan oleh mikroba dibedakan menjadi tiga jenis sumber, yaitu:
- Bakteri, seperti *Staphylococcus aureus*, *Bacillus, Pseudomonas* dan *Miraxella*
- Kapang, seperti *Penicillium camberti*, *Geotrichum candidum* dan *Mucormeihei*
- Khamir, seperti *Candida antartika*, *Candida rugosa* dan *Candidacylindraceae*

Di antara sumber lipase baik berasal dari tumbuhan, hewan dan mikroba, ternyata lipase dari mikroba yang paling banyak digunakan. Hal ini disebabkan karena mikroba dapat dengan mudah dibudidayakan. Selain itu, enzim lipase dari mikroba umumnya tahan terhadap panas meskipun jasad penghasilnya tidak tahan (Hidayat, 2006). Lipase mikrobial umumnya merupakan protein dengan bobot molekul antara 2.000 hingga 120.000 dengan aktifitas spesifik 500 - 1.000 unit per mg protein. Sebagian besar lipase yang dimurnikan merupakan glikoprotein yang mengandung 2-15% karbohidrat (August, 2000). Enzim yang diisolasi dari mikroba memiliki beberapa keuntungan, seperti produksi enzim dapat dilakukan pada skala besar, peralatan kultivasi dapat dimanfaatkan untuk keperluan produksi berbagai enzim dari mikroba tersebut, serta memiliki daya katalitik yang sangat spesifik sehinggga reaksi samping yang tidak diinginkan dapat dihindari (Sa'id, 1987).

Sumber mikroorganisme yang menghasilkan lipase umumnya banyak ditemukan di berbagai habitat seperti limbah industri minyak, pabrik pengolahan minyak sayur, pabrik susu, tanah yang terkontaminasi dengan minyak, dan lain-lain

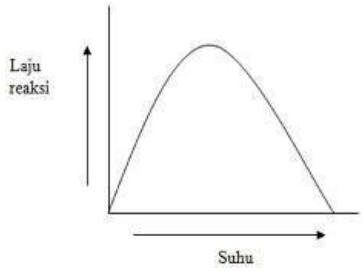
(Sztajer *et al*., 1988). Lingkungan yang berminyak seperti aliran minyak dari pabrik minyak bisa memberikan lingkungan yang baik untuk isolasi mikroorganisme penghasil lipase (Gupta *et al.*, 2004), untuk mendeteksi keberadaan mikroba penghasil lipase yang paling mudah menggunakan *Nutrient Agar* (Hidayat, 2006).

2.4.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Menurut Wolfe, (1993) terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut.

a. Suhu

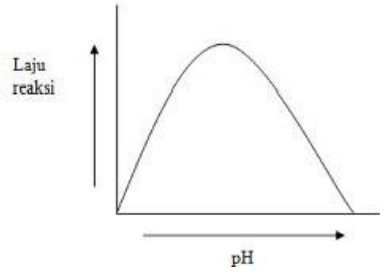
Suhu inkubasi sangat mempengaruhi kerja dari enzim, suhu inkubasi yang lebih tinggi dari suhu optimum kerja enzim dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi sisi aktif enzim yang disebabkan adanya denaturasi protein enzim. Sebagian besar enzim terdenaturasi pada suhu di atas 50 ºC. Dalam batas-batas suhu tertentu, kecepatan reaksiyang dikatalisis enzim akan naik bila suhunya naik. Reaksi yang paling cepat terjadi pada suhu optimum. Pada suhu 0 ℃ enzim menjadi tidak aktif dan dapat kembali aktif pada suhu normal. Menurut Aisjah (1993), pada suhu dibawah suhu optimum mengalami kenaikan nilai Aaktivitas karena ketika suhu mulai bertambah sampai suhu optimum, kecepatan reaksi enzim naik karena energi kinetik bertambah. Bertambahnya energi kinetik akan mempercepat gerak vibrasi, translasi, dan rotasi baik enzim maupun substrat. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu

b. pH (Derajat Keasaman)

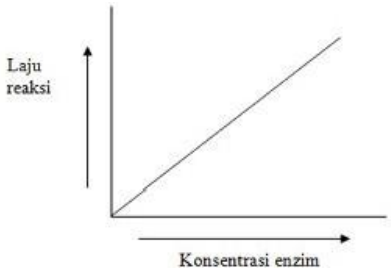
Enzim pada umumnya bersifat amfolitik, yang berarti enzim mempunyai konstanta disosiasi pada gugus asam maupun gugus basanya, terutama pada gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino. Perubahan kereaktifan enzim diperkirakan merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan. Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan laju reaksi dengan pH

c. Konsentrasi Substrat

Kecepatan reaksi enzimatis pada umumnya tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi akan meningkat apabila konsentrasi substrat meningkat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi yang dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hubungan laju reaksi dengan konsentrasi

2.4.3. Aktivitas Enzim

Aktivitas lipase memiliki satuan unit, satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai kemampuan enzim lipase untuk menghasilkan 1 μmol asam lemak bebas dari hidrolisis substrat oleh 1 mL enzim lipase tiap satuan menit (Adio *et al.*, 2015). Kurnia (2010), menyatakan bahwa untuk menentukan aktivitas optimum pada kondisi optimum maka perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzimatik pada variasi suhu dan pH, sehingga diketahui aktivitas lipase disetiap rentang suhu dan pH yang ditentukan. Uji aktivitas enzim lipase dapat dilakukan dengan metode potensiometri. Prinsip dari metode ini adalah pembuatan substrat dalam bentuk emulsi kemudian diberi enzim lipase yang belum diketahui keaktifannya, dan diinkubasi pada suhu dan pH optimum. Selama inkubasi, proses reaksi terjadi sehingga asam lemak dibebaskan. Asam lemak yang dibebaskan dihitung berdasarkan jumlah mol NaOH yang dibutuhkan saat titrasi. Aktivitas lipase dapat diukur dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Adio *et al.*, 2015):

$$Aktivitas\ unit\ (U/mL) = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 1.000}{V_e \times t} \quad \text{.....(1)}$$

Keterangan: V_1 = Volume NaOH sampel (mL)
V_2 = Volume NaOH blanko (mL)
V_e = Volume enzim (mL)
N = Normalitas NaOH (0,01-0,05 N)
1.000 = Konversi dari mmol ke μmol
t = Waktu inkubasi

Aktivitas optimum lipase tergantung dari senyawa pengemulsi yang digunakan karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air. Substrat perlu diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air. Substrat yang sering digunakan dalam penelitian adalah minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein (Kurnia, 2010). Aktivitas spesifik enzim memiliki satuan U/mg. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim tiap miligram protein. Aktivitas spesifik enzim dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$Aktivitas\ spesifik = \frac{Aktivitas\ enzim(U/mL)}{Kadar\ Protein\ (mg/mL)} \qquad \text{.....(2)}$$

2.4.4. Uji Aktivitas Lipase Metode *Kwoon and Rhee*

Metode kolorimetri yang sederhana dan cepat dikembangkan untuk menentukan aktivitas lipase untuk pemecahan lemak. Bebas asam lemak yang dihasilkan oleh lipase dari triasilgliserol ditentukan dengan mengamati warna yang terbentuk menggunakan kupri asetat-piridin sebagai pewarna berkembang reagen. Metode yang dimodifikasi ini hanya membutuhkan beberapa menit untuk menentukan asam lemak bebas, sedangkan membutuhkan waktu lebih dari 20 menit dengan metode konvensional yang memerlukan langkah-langkah penguapan pelarut dan sentrifugasi. Sensitivitas dan reproduktifitas metode ini baik untuk asam kaproat, kaprilat, kaprat, laurat, miristat, palmitat, stearat dan oleat (Kwoon and Rhee, 1986).

2.4.5. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Kandungan protein di dalam enzim sangat berpengaruh terhadap daya katalitik enzim tersebut. Pada umumnya dengan meningkatnya kadar protein dalam suatu enzim, maka daya katalitiknya akan meningkat. Salah satu metode yang digunakan untuk menentukan kadar protein adalah metode Lowry. Penentuan kadar protein bertujuan untuk mengetahui bahwa protein enzim masih terdapat pada setiap fraksi pemurnian (tidak hilang dalam proses pemurnian) dengan aktivitas yang baik. Metode ini bekerja pada kondisi alkali dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Ketika reagen *folin-ciocelteau* ditambahkan, maka reagen akan mengikat protein. Ikatan ini secara perlahan akan mereduksi reagen *folin-ciocelteau* menjadi heteromolibdenum dan mengubah warna kuning menjadi biru. Pada metode ini, pengujian kadar protein didasarkan pada pembentukan kompleks Cu^{2+} dengan ikatan peptida yang akan tereduksi menjadi Cu^{+} pada kondisi basa. Cu^{+} dan rantai samping tirosin, triptofan, dan sistein akan bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau*. Reagen ini bereaksi

menghasilkan produk tidak stabil yang tereduksi secara lambat menjadi molibdenum atau tungesteen blue. Protein akan menghasilkan intensitas warna yang berbeda tergantung pada kandungan triptofan dan tirosinnya. Maka dari itu, protein yang berbeda akan memberikan tingkat warna yang berbeda (Alexander and Griffith, 1993).

2.4.6. Pemanfaatan Enzim Lipase

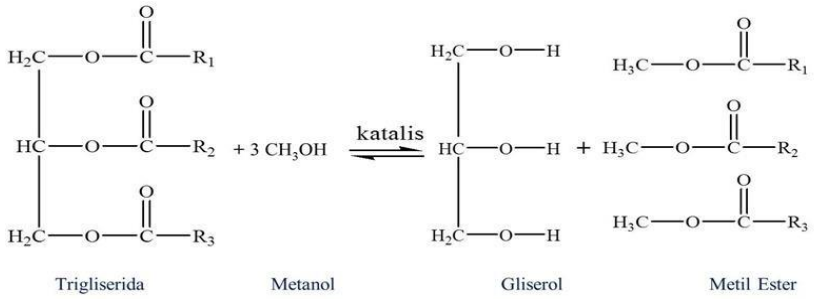
Dalam industri, lipase antara lain digunakan dalam industri farmasi untuk menghasilkan asam lemak dari minyak yang biasanya mengandung asam lemak tidak jenuh. Selain bidang farmasi, lipase juga digunakan dalam industri kosmetik, kulit, makanan, parfum, dan sintesis bahan organik lain.Lipase juga terkenal karena memiliki aktivitas yang tinggi dalam reaksi hidrolisis dan dalam kimia sintesis. Lipase dapat berperan sebagai biokatalis untuk reaksi-reaksi hidrolisis, esterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis (Gandhi, 1997). Hal lain yang menjadi keuntungan menggunakan lipase terdapat pada proses enzimatik yang toleran terhadap kadar air minyak dan meningkatkan rendemen produk bioteknologi yang dihasilkan dengan menghindari terjadinya penyabunan (Tan *et al*., 2010).

Enzim lipase juga digunakan sebagai biokatalis untuk sintesis biodiesel. Lipase sebagai biokatalis mampu mengarahkan reaksi secara spesifik kearah produk yang diinginkan tanpa terjadinya reaksi samping yang merugikan. Biokatalis ini merupakan katalis heterogen, sehingga pemisahannya dari produk setelah reaksi berakhir dapat dilakukan dengan mudah. Produksi produk bioteknologi menggunakan enzim lipase menjadi pilihan utama seiring dengan pesatnya kemajuan pembangunan. Hal ini disebabkan oleh proses menuju tren penerimaan secara ekologi atau ramah lingkungan. Penggunaan lipase sebagai biokatalis pada proses konversi (transesterifikasi minyak nabati) menghasilkan reaksi kondisi yang lebih aman dan memudahkan *recovery* katalis serta gliserol tanpa purifikasi atau produksi limbah kimia. Hal lain yang menjadi keuntungan menggunakan lipase terdapat pada proses enzimatik yang toleran terhadap kadar air minyak dan

meningkatkan rendemen produk bioteknologi yang dihasilkan dengan menghindari terjadinya penyabunan (Tan *et al*., 2010).

2.5. Reaksi Transesterifikasi

Transesterifikasi adalah suatu reaksi yang menghasilkan ester dimana salah satu pereaksinya juga merupakan senyawa ester. Sehingga terjadi pemecahan senyawa trigliserida dan migrasi gugus alkil antara senyawa ester. Ester yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi ini disebut biodiesel. R'adalah gugus alkil dan R1–R3 merupakan gugus asam lemak jenuh dan tak jenuh rantai panjang seperti pada Gambar 6 (Aziz *et al.*, 2011).



Gambar 6. Reaksi transesterifikasi

Reaksi transesterifikasi merupakan reaksi bolak-balik yang relatif lambat, untuk mempercepat jalannya reaksi dan meningkatkan hasil, proses dilakukan dengan pengadukan yang baik, penambahan katalis, dan pemberian reaktan berlebih agar reaksi bergeser ke kanan. Pemilihan katalis dilakukan berdasarkan kemudahan penanganan dan pemisahannya dari produk, untuk itu dapat digunakan katalis asam, basa, dan penukar ion (Aziz *et al*., 2011).

2.5.1. Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Transesterifikasi

Terdapat beberapa kondisi reaksi yang mempengaruhi konversi produk pada reaksi transesterifikasi adalah sebagai berikut.

1. Jenis dan Rasio Molar Pereaksi

Menurut Komintarachat dan Chuepeng (2010), stoikiometri reaksi dalam reaksi transesterifikasi diperlukan tiga mol alkohol per mol minyak untuk menghasilkan tiga mol biodiesel dan satu mol gliserin. Mengingat reaksi transesterifikasi merupakan reaksi bolak-balik maka diperlukan jumlah metanol yang berlebih untuk mendapatkan produk dengan jumlah yang maksimal. Jumlah metanol yang berlebih pada reaksi transesterifikasi dibutuhkan untuk menggeser kesetimbangan ke arah kanan sehingga rendemen biodiesel dan gliserol meningkat. Namun, diperlukan penggunaan jumlah metanol yang tepat untuk mendapatkan rendemen biodiesel yang maksimal. Hal ini disebabkan jumlah metanol yang berlebih juga dapat memberikan kerugian antara lain pemisahan ester dari lapisan gliserol menjadi lebih sulit dan kemungkinan katalis basa larut dalam alkohol yang berlebih.

Alkohol yang umum digunakan dalam proses transesterifikasi adalah metanol. Reaksi yang berlangsung dengan menggunakan metanol lebih cepat dibandingkan etanol. Metanol memiliki berat molekul paling ringan dibanding etanol sehingga jumlah yang diperlukan lebih sedikit yaitu sekitar 15-20% dari berat minyak sedangkan dengan etanol dibutuhkan 30% dari berat minyak. Metanol lebih sering digunakan dalam pembuatan biodiesel dibandingkan jenis alkohol lain karena harganya yang ekonomis (Susilo, 2006).

2. Suhu Reaksi

Reaksi transesterifikasi dapat dilakukan pada temperatur 30-65 °C (titik didih metanol sekitar 65 °C). Semakin tinggi temperatur, konversi yang diperoleh akan semakin tinggi untuk waktu yang lebih singkat. Temperatur yang rendah akan menghasilkan konversi yang lebih tinggi namun dengan waktu reaksi yang lebih lama (Destianna, 2007).

3. Waktu Reaksi

Lama waktu reaksi akan berbanding lurus dengan persen *yield* biodiesel yang diperoleh. Laju konversi meningkat seiring lamanya waktu reaksi. Semakin lama waktu reaksi, maka semakin banyak produk yang dihasilkan, karena akan memberikan kesempatan reaktan untuk bertumbukan satu sama lain (Destianna, 2007).

4. Jenis Katalis

Penggunaan jenis katalis dalam proses transesterifikasi akan memengaruhi produk yang dihasilkan. Penggunaan jenis katalis yang berbeda pun memengaruhi rasio molar metanol yang digunakan dalam transesterifikasi . Katalis yang umum digunakan pada proses transesterifikasi adalah katalis basa, asam, dan enzim. Pengolahan secara katalitik menggunakan NaOH atau KOH sebagai katalis basa, H_2SO_4 sebagai katalis asam, dan enzim lipase sebagai katalis yang berasal dari enzim (Marchetti *et al*., 2007).

Dalam penelitian ini, enzim lipase digunakan sebagai katalis dalam reaksi transesterifikasi untuk pembuatan bioiesel, beberapa literatur yang juga menggunakan enzim lipase sebagai katalis dari isolat bakteri *Pseudomonas* sp. yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kondisi optimum beberapa jenis minyak nabati terhadap alkohol dalam pembuatan biodiesel

Nisbah Minyak Nabati Terhadap Metanol (mol)		Kondisi Optimum	Yield (%)	Referensi
Minyak	Alkohol			
Minyak Kedelai (1)	Metanol (3)	40 °C, 72 jam	83,8	Yang *et al.*, 2009
Minyak Kedelai (1)	Etanol (3)	70 °C, 24 jam	71	Zhao *et al.*, 2007
Minyak Biji Bunga Matahari (1)	Metanol (4)	40 °C, 24 jam	95	Soumanou and Bornscheuer, 2007
Minyak Sayur (1)	Metanol (8)	40 °C, 70 jam	87	Salis *et al*., 2008

2.5.2. Minyak Kelapa

Kelapa (*Cocos nucifera*) adalah anggota tunggal dalam marga *Cocos* dari suku *Arenan* atau *Arecace*. Tanaman kelapa merupakan tanaman serbaguna karena seluruh bagian tanaman ini bermanfaat bagi kehidupan manusia. Tanaman kelapa juga memiliki nilai budaya dan ekonomi yang cukup tinggi dalam kehidupan masyarakat (Luntungan, 2008). Indonesia memiliki lahan perkebunan kelapa terbesar di dunia dengan total produksi mencapai lebih dari 85% total dunia,

sehingga dapat mendukung dalam mengembangkan produk biodiesel, selain itu minyak kelapa memiliki kandungan ester sangat tinggi dibanding minyak diesel itu sendiri, memiliki sifat pembakaran yang baik dan ramah lingkungan (Wright *et al*., 2014; Ma dan Hanna, 1999).

Tabel 2. Komposisi asam lemak dalam minyak kelapa

Asam Lemak	Kadar (%)
Asam Heksanoat	0,0067
Asam Stearat	0,637
Asam Linoleat	5,083
Asam Oktanoat	7,548
Asam Oleat	9,491
Asam Palmitat	13,6246
Asam Miristat	22,026
Asam Laurat	40,914

Pada Tabel 2 menunjukkan komposisi asam lemak dalam minyak kelapa berdasarkan analisa GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*) dapat diketahui bahwa komposisi asam lemak minyak kelapa merek Barco didominasi oleh asam laurat sebesar 40,91% dan asam miristat sebesar 22,02% (Hidayanti, dkk., 2015).

2.6. Biodiesel

Biodiesel yang secara umum didefinisikan sebagai ester monoalkil dari minyak nabati merupakan bahan bakar alternatif yang sangat potensial digunakan sebagai pengganti solar karena kemiripan karakteristiknya. Selain itu, biodiesel yang berasal dari minyak nabati merupakan bahan bakar yang dapat diperbaharui (*renewable*), mudah diproses, harganya relatif stabil, tidak menghasilan cemaran yang berbahaya bagi lingkungan (non toksik), serta mudah terurai secara alami (Wijaya, 2011). Biodiesel dapat dihasilkan melalui proses transesterifikasi yaitu dengan mengubah trigliserida menjadi metil ester dan gliserol. Molekul trigliserida akan melepaskan tiga asam lemak menggantikan gugus alkohol dari ester dengan gugus alkohol lain (Martoyo, 2006).

Menurut Kementrian Energi dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia (2019), untuk mendapatkan kepastian dari mutu bahan bakar nabati (biofuel) jenis biodiesel sebagai bahan bakar lain yang dapat dipasarkan di dalam negeri, maka harus sesuai dengan standar mutu yang telah ditentukan dan dapat dilihat dari Tabel 3.

Tabel 3. Standar dan mutu (spesifikasi) bahan bakar nabati (biofuel)

No.	Parameter Uji	Persyaratan	Satuan, Min/Maks
1.	Massa jenis pada 40 °C	850 - 890	kg/m^3
2.	Viskositas kinematik pada 40 °C	2,3 – 6,0	mm^2/s (cSt)
3.	Angka sentana	51	min
4.	Titik nyala (mangkok tertutup)	130	°C, min
5.	Korosi lempeng tembaga (3 jam pada 50 °C)	nomor 1	-
6.	Residu karbon dalam percontoh asli atau dalam 10% amplas distilasi	0,05; 0,3	% massa, maks
7.	Temperatur distilasi 90	360	°C, maks
8.	Abu tersulfatkan	0,02	% massa, maks
9.	Belerang	10	mg/kg, maks
10.	Fosfor	4	mg/kg, maks
11.	Angka asam	0,4	mg-KOH/g, maks
12.	Gliserol bebas	0,02	% massa, maks
13.	Gliserol total	0,24	% massa, maks
14.	Kadar ester metil	96,5	% massa, maks
15.	Angka iodium	115	% massa, ($g\text{-}I_2/100g$), maks
16.	Kestabilan oksidasi periode induksi metode rancimat	600	°C, maks
	Periode induksi metode petro oksi	45	% massa, maks
17.	Monogliserida	0,55	% massa, maks
18.	Warna	3	maks
19.	Kadar air	350	ppm, maks
20.	CFPP (*Cold Filter Plugging Point*)	15	°C, maks
21.	Logam I (Na + K)	5	mg/kg, maks
22.	Logam II (Ca + Mg)	5	mg/kg, maks
23.	Total kontaminan	20	mg/kg, maks

2.7. Spektrofotometer UV-Vis

Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Spektrofotometri digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorpsi atau diteruskan. Sinar radiasi monokromatik akan melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap sinar radiasi tersebut (Harmita, 2006). Spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif. Konsentrasi analit di dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007). Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam persamaan berikut:

$$A = a \times b \times c \quad \text{.....(3)}$$

Keterangan: A = Absorban
a = Absorptivitas molar
b = Tebal kuvet (cm)
c = Konsentrasi

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis yakni cahaya yang berasal dari lampu deuterium maupun wolfram diteruskan melalui lensa menuju ke monokromator pada spektrofotometer dan filter cahaya pada fotometer. Monokromator kemudian mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal). Bercak-bercak cahaya dengan panjang terntentu kemudian akan dilewatkan pada sampel yang mengandung suatu zat dalam konsentrasi tertentu. Oleh karena itu, terdapat cahaya yang diserap (diabsorbsi), ada pula yang dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan kemudian diterima oleh detektor. Detektor kemudian akan menghitung cahaya yang diterima kemudian diserap oleh sampel. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel sehingga akan diketahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif (Harmita, 2006).

2.8. Kromatografi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*)

Gas Chromatography-Mass Spectrometer merupakan gabungan metode analisis antara GC dan MS, dengan adanya gabungan kedua metode ini akan memberikan keuntungan yang lebih baik karena senyawa yang telah terpisahkan oleh GC dapat langsung dideteksi oleh MS kemudian GC-MS mampu memisahkan komponen-komponen dalam suatu analit sekaligus menentukan jenis komponen tersebut melalui spektrum massanya (Widelia, 2012).

Prinsip kerja GC-MS adalah sampel yang berupa cairan diinjeksikan ke dalam injektor kemudian diuapkan. Sampel yang berbentuk uap dibawa oleh gas pembawa menuju kolom untuk proses pemisahan. Setelah terpisah, masing-masing komponen akan melalui ruang pengion dan dibombardir oleh elektron sehingga terjadi ionisasi. Fragmen-fragmen ion yang dihasilkan akan ditangkap oleh detektor dan dihasilkan spektrum massa (Widelia, 2012).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Desember 2021 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Pengambilan sampel dilakukan di Jalan Bumi Manti 1 No 107 Kedaton, Bandar Lampung tepatnya di lingkungan tempat penjual nasi goreng. Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung. Analisis densistas dan viskositas sampel biodiesel dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Analisis uji transesterifikasi menggunakan kromatografi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*) dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA, Universitas Negeri Semarang.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi GC-MS (*Gas chromatography-Mass Spectrofotometry*) Shimadzu QP2010 SE, spektrofotometer UV-Vis Carry Win UV 32, *Laminar Air Flow* (LAF) CURMA model 9005-FL, kolom, *shaker*, *waterbath*, sentrifus, inkubator, oven, *autoclave*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, neraca analitik, pH meter, piknometer, viskometer *Ostwald*, termometer, jarum ose, spatula, pipet tetes, tabung sentrifugasi, mikropipet, bunsen, gunting, dan alat-alat gelas.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain isolat bakteri LPG-171, *Nutrient Agar* (NA), *sephadex* G-75, minyak zaitun, tween 80, garam fisiologi 0,9%, asam oleat, HCl, tembaga (II) asetat, BSA (*Bovine Serum Albumin*), ammonium sulfat, minyak kelapa, *buffer* fosfat, pereaksi *Lowry* A, pereaksi *Lowry* B, metanol, n-heksana, NaOH, akuades, kapas,tisu, kain kassa, *alumunium foil*, dan plastik *wrap*.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Peralatan gelas yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan. Sebelum disterilisasi bungkus alat menggunakan kertas. Sterilisasi alat yang sudah dibungkus kertas ke dalam *autoclave* bertekanan 1 atm dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian keringkan alat gelas yang telah disterilisasi kedalam oven selama ±2 jam.

b. Pembuatan Media Selektif

Media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung *nutrient* dengan komposisi pepton, NaCl dan *beef ekstract*. Timbang 2,8 g NA yang dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian tambahkan minyak zaitun sebanyak 1 mL. Panaskan media dengan *hot plate* dan disterilisasi media menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Tuang media pada cawan secara aseptis. Diamkan media hingga mengeras dan siap pakai.

c. Pembuatan Media Starter

Media terbatas yang mengandung tween 80, minyak zaitun dan *buffer* fosfat. Tween 80 sebanyak 2 tetes dan 2 mL minyak zaitun yang dilarutkan dalam 100 mL *buffer* fosfat. Sterilisasi media pada *autoclave* dengan tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit.

d. Pembuatan Media Produksi

Media yang mengandung tween 80, minyak zaitun dan *buffer* fosfat. Tween 80 sebanyak 10 tetes dan 20 mL minyak zaitun yang dilarutkan dalam dalam

1000 mL *buffer* fosfat. Sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit.

e. Inokulasi Bakteri

Tahap inokulasi bakteri menggunakan media agar selektif sebanyak 50 mL. Sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian tuang media pada tabung reaksi secara aseptis.Tutup mulut tabung menggunakan sumbat. Posisikan tabung dengan kemiringan 5° dan diamkan media dalam tabung selama 3 hari hingga siap dipakai. Isolat yang telah tumbuh pada cawan kultur dapat dipindahkan ke dalam media agar miring yang telah dibuat sebelumnya secara aseptis. Kemudian, inkubasi pada inkubator dengan suhu optimal selama kurang lebih 48 jam.

3.3.2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi isolat bakteri LP-G171 dari tanah tercemar untuk memproduksi enzim lipase dilakukan di Laboratorium Uji Bakteriologi Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung.

3.3.3. Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Kurva pertumbuhan bakteri diawali dengan pembuatan medium starter (media inokulum). Mikroba yang telah diinkubasi selama 72 jam dengan pH optimum dilakukan pengambilan setiap 6 jam sekali dan diukur OD (*Optical Density*) serapannya menggunakan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang 600 nm.

3.3.4. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri

a. Optimasi pH

Pengaruh pH terhadap bakteri diuji dengan *buffer* fosfat 0,05 M yang berbeda, yakni: pH 5, 6, dan 7, kemudian diuji aktivitas unitnya menggunakan metode *Kwon and Rhee*.

b. Optimasi Waktu Inkubasi

Pada optimasi waktu inkubasi bakteri diinkubasi selama 0 sampai 72 jam pada pH optimum dengan pengambilan sampel setiap 6 jam, kemudian diuji aktivitas unitnya menggunakan metode *Kwon and Rhee*.

3.3.5. Produksi Enzim Lipase

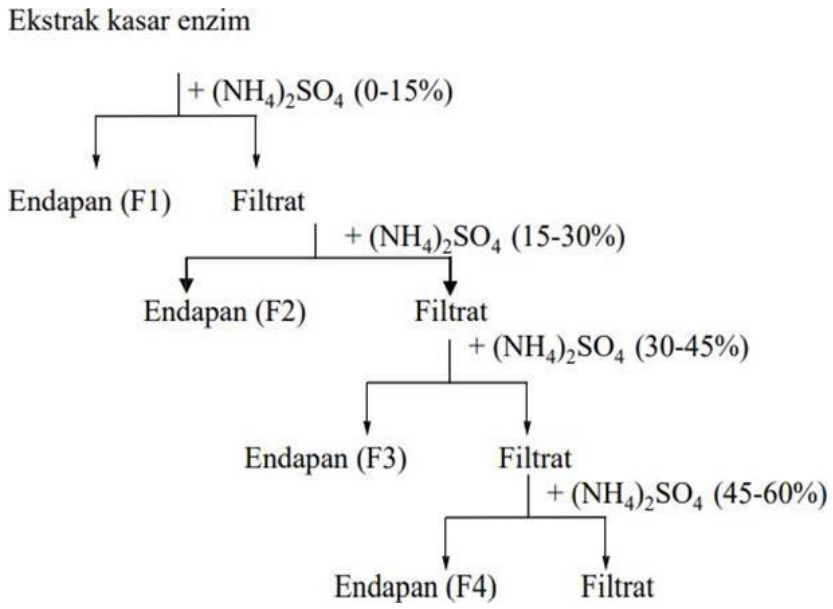
Produksi enzim lipase dilakukan setelah diketahui kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Mikroba terpilih yang disimpan di dalam medium agar miring diambil sebanyak dua ose dari medium tersebut dimasukkan dalam 20 mL starter kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 110 rpm selama 24jam. Sebanyak 2% *starter* dipindahkan ke medium kultur (media fermentasi) dan diinkubasi kembali sesuai dengan waktu pertumbuhan optimum bakteri. Media produksi disentrifugasi untuk memisahkan filtrat. Filtrat merupakan ekstrak kasarenzim, selanjutnya diuji aktivitas analisa protein dengan metode *Kwon and Rhee*.

3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase

a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Sejumlah ekstrak kasar enzim ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan *buffer* fosfat 0,01 M pH 7 dan diuji aktivitasnya dengan metode *Kwon and Rhee* serta diukur kadar proteinnya dengan

metode Lowry untuk mengetahui pada fraksi mana saja terdapat enzim lipase dengan aktivitas spesifik yang tinggi. Ekstrak kasar enzim yang diproleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20) %; (20-40) %; (40-60) %; (60-80) %; dan (80- 100) %. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi (0-20) % digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (20-40) %, dengan prosedur yang sama dilakukan hingga fraksi kejenuhan (80-100) %.



Gambar 7. Skema fraksinasi enzim

b. Dialisis

Endapan protein yang memiliki aktivitas tertinggi dari fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan *buffer* fosfat 0,05 M pH 7 selama ± 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis dilakukan pergantian larutan *buffer* setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan.

c. Kromatografi Filtrasi Gel

Persiapan kolom (*sephadex* G-75) dilakukan dengan mengkalibrasi menggunakan *buffer* fosfat pH 6,5 dengan eluen sejumlah dua kali volume tabung kolom. Pembuatan matriks *sephadex* G-75 dengan mengembangkan tepung

sephadex G-75 menggunakan *buffer* fosfat pH 6,5 dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam (Rahmi *et al*., 2020). Enzim hasil dialisis diambil sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks *sephadex* G-75 yang telah diaktivasi menggunakan *buffer* fosfat pH 6,5, kemudian dielusi dengan menggunakan *buffer* fosfat pH 6,5. Sampel ditampung sebanyak 5 mL pada setiap tabung dengan menentukan laju alir (menit/5 mL) pada masing-masing sampel. Masing-masing fraksi diuji aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm (Rusman, 2017).

3.3.7. Karakterisasi Enzim Lipase

a. Optimasi pH

Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim diuji dengan *buffer* fosfat 0,05 M dengan variasi, yaitu: pH 5, 6, 7, dan 8, kemudian diuji aktivitas unitnya menggunakan metode *Kwon and Rhee*.

b. Optimasi Suhu

Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim diuji pada pH optimum dengan variasi suhu, yaitu: 30, 35, 40, 45, 50, dan 55 °C, kemudian diuji aktivitas unitnya menggunakan metode *Kwon and Rhee*.

c. Optimasi Waktu Inkubasi

Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas enzim yang diinkubasi dengan variasi waktu, yaitu: 30, 60, 90, dan 120 menit pada suhu dan pH optimum, kemudian diuji aktivitas unitnya menggunakan metode *Kwon and Rhee*.

3.3.8. Penentuan Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode *Kwon and Rhee* (1986).

a. Penentuan Kurva Standar Asam Oleat

Larutan induk asam oleat diambil kemudian dibuatkan konsentrasi 200, 300, 400, 500, dan 600 ppm sedangkan pelarut n-heksana 3,75 mL digunakan sebagai blanko. Larutan standar dan blanko dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu

ditambahkan dengan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% pH 6 dan dikocok dengan vorteks selama 1 menit. Masing-masing larutan diambil kembali sebanyak 3,20 mL untuk dilakukan penentuan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 715 nm.

b. Uji Aktivitas Enzim Lipase

- Enzim sebanyak 0,70 mL ditambahkan 0,35 mL *buffer* fosfat pH 6,5 dan substrat minyak zaitun sebanyak 0,70 mL.
- Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 40 °C selama 15 menit.
- Setelah proses inkubasi, ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana, divorteks selama 1 menit dan didiamkan selama 15 menit.
- Setelah terbentuk dua fase, fase minyak diambil sebanyak 2,50 mL dan ditambahkan n-heksana sebanyak 1,25 mL.
- Sampel dan kontrol ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% pH 6 lalu divorteks.
- Fase minyak diambil sebanyak 3,20 mL kemudian dilakukan penentuan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 715 nm.

Pada uji aktivitas enzim, akuades digunakan sebagai kontrol sebagai pengganti enzim.

$$Aktivitas\ Unit\ (U/mL) = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times Fp \times \frac{1}{T} \quad \text{…...……(4)}$$

Keterangan: Asp = Nilai absorbansi larutan sampel
Ast = Nilai absorbansi larutan standar
Abl = Nilai absorbansi larutan blanko
Fp = Faktor Pengenceran
T = Waktu Inkubasi

Satu unit (U) aktivitas enzim setara dengan 1 µmol asam lemak bebas yang dihasilkan selama satu menit pada kondisi optimumnya.

3.3.9. Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase

Kadar protein dapat diukur berdasarkan metode *Lowry*, yaitu

a. 1 mL sampel enzim ditambahkan 3 mL pereaksi *Lowry* B lalu dikocok dan didiamkan selama 15 menit.
b. Tambahkan pereaksi *Lowry* A (*folin ciocalteu*) sebanyak 0,9 mL, lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit.
c. Lalu ditentukan absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm.

Pereaksi A : 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 M
Pereaksi B : 5 mL CuSO4.5H2O 1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan NaK-tartarat 1%
Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
Pereaksi D : Reagen *folin ciocelteau* diencerkan dengan akuades (1:1)
Larutan Standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*)

3.3.10. Pembuatan Biodiesel

a. Pembuatan Biodiesel dengan Katalis Enzim Lipase

Uji aktivitas transesterifikasi dilakukan menggunakan minyak kelapa merek Barco sebagai substrat dan metanol pro-analis sebagai reaktan. Proses transesterifikasi menggunakan tiga variasi perbandingan mol antara minyak kelapa dan metanol yaitu 1:4, 1:5 dan 1:6. Enzim lipase yang dihasilkan dari biakan mikroba *Pseudomonas* sp. yang digunakan sebagai katalis sebanyak 10% dari volume minyak kelapa yang dipakai, dengan proses sebagai berikut.

1. Minyak kelapa dan enzim lipase dimasukkan ke dalam labu tiga yang kemudian dipanaskan pada suhu 40 °C (keadaan stabil) selama satu jam dan diaduk menggunakan pengaduk magnetis.
2. Ditambahkan metanol secara perlahan dengan perbandingan molar 1:4, 1:5 dan 1:6.
3. Dilakukan proses transesterifikasi selama 24 jam, waktu dihitung dari penambahan metanol yang terakhir kalinya.
4. Produk hasil transesterifikasi kemudian pisah dan didiamkan selama 12 jam. Campuran akan membentuk 2 fasa, bagian bawah merupakan gliserol

sedangkan bagian atas merupakan metil ester.

5. Produk biodiesel hasil transesterifikasi kemudian dievaporasi untuk menghilangkan *impurities* yang masih tersisa dan jumlah *yield* produk biodiesel dapat diperoleh dengan membandingkan dari jumlah berat mula-mula dari minyak kelapa.

3.3.11. Karakterisasi Sampel Biodiesel

a. Analisis Densitas

Sampel biodiesel diukur densitasnya menggunakan alat piknometer yang berukuran 10 mL. Piknometer kosong dikeringkan di dalam oven kemudian ditimbang terlebih dahulu, lalu piknometer diisi dengan akuades dan ditimbang beratnya. Berat akuades diperoleh dari selisih berat piknometer berisi akuades dan berat piknometer kosong. Pada tahap selanjutnya sampel minyak dimasukkan ke dalam piknometer hingga meluap dan tidak terbentuk gelembung udara pada bagian atasnya serta bagian luar piknometer dikeringkan. Selanjutnya piknometer berisi sampel ditimbang dan berat sampel diperoleh dengan menghitung selisih berat piknometer berisi sampel dan berat piknometer kosong. Densitas dapat dihitung dengan persamaan berikut.

$$\rho\ sampel = \frac{W_1}{W_2} \times \rho\ air \quad \text{.....(5)}$$

b. Analisis Viskositas

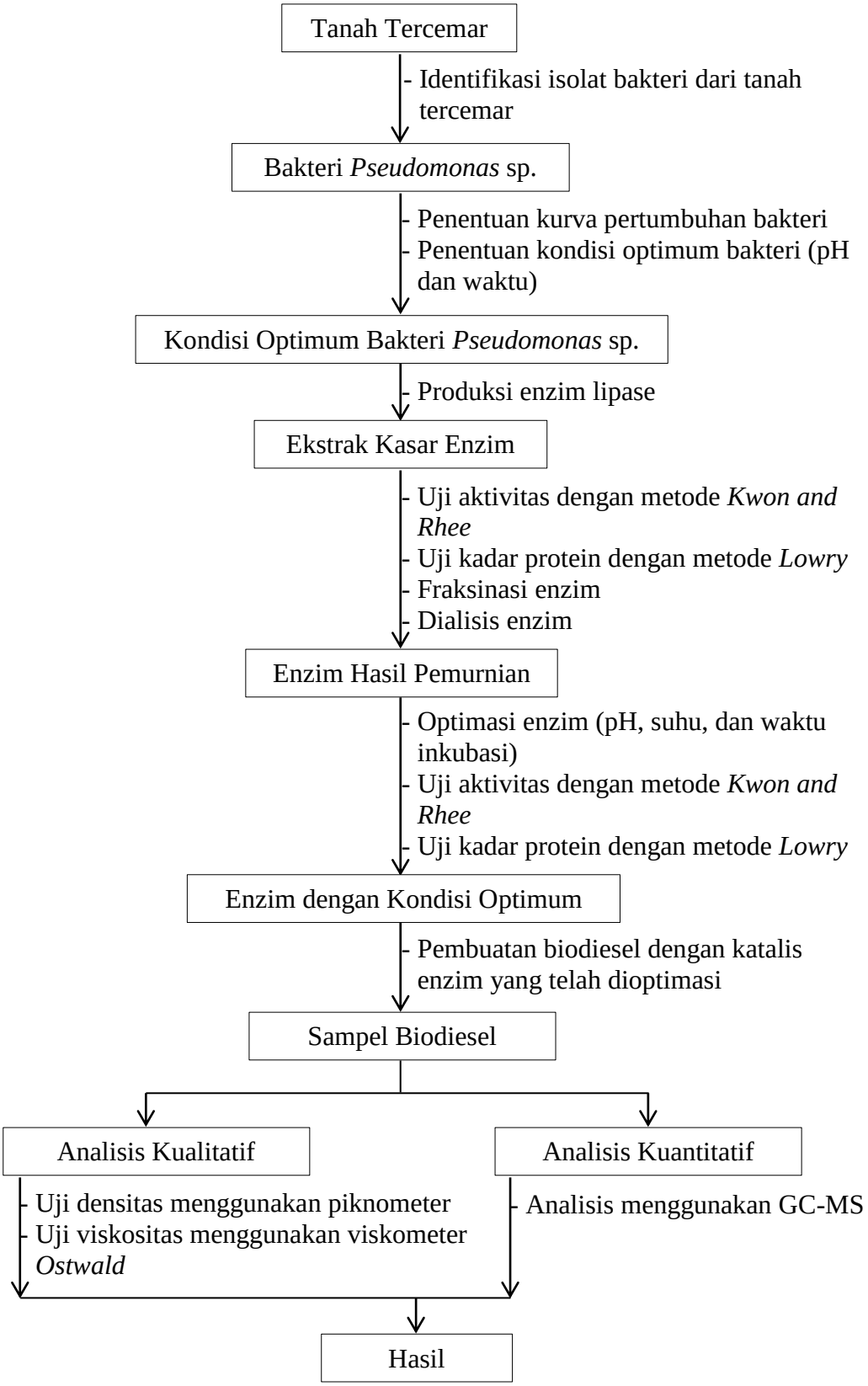
Sampel biodiesel diukur viskositasnya menggunakan metode *Ostwald* menggunakan alat viskometer *Ostwald* . Metode ini dilakukan dengan cara mengukur waktu yang dibutuhkan pada saat sampel mengalir dari batas atas sampai batas bawah dan membandingkan dengan waktu yang dibutuhkan oleh larutan pembanding. Setelah itu, waktu yang didapatkan dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan *Poisseulle* dan dihitung dengan persamaan berikut.

$$\mu = \mu_0 \frac{t \times \rho}{t_0 \times \rho_0} \quad \text{.....(6)}$$

$$v = \frac{\mu}{\rho} \quad \text{.....(7)}$$

c. Analisis Menggunakan Kromatografi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*).

Karakterisasi sampel biodiesel secara kuantitatif setelah transesterifikasi dengan katalis enzim lipase dilakukan dengan menggunakan dengan kromatografi GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry*).



Gambar 8. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan ini, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat bakteri LP-G171 dari tanah tercemar diidentifikasi sebagai Pseudomonas sp. memiliki kondisi pertumbuhan optimum pada pH 18 jam 7.
2. Enzim lipase memiliki aktivitas optimum pada pH 7, suhu 40 °C, dan waktu inkubasi 120 menit.
3. Enzim lipase yang telah dimurnikan memiliki kemurnian 7,5 kali lipat dari ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik 43.161 U/mg.
4. Hasil analisis nisbah minyak kelapa terhadap metanol (perbandingan 1:4, 1:5, dan 1:6) menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa asam lemak yang terkandung dalam biodiesel belum sepenuhnya terkonversi menjadi metil ester sehingga belum memenuhi standar SNI secara kuantitatif, sedangkan secara kualitatif (densitas dan viskositas) sampel 1:5 telah memenuhi standar SNI 7182:2015.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, terdapat beberapa saran yang dapat dilakukan dan berguna dalam perkembangan penelitian selanjutnya yaitu:

1. Identifikasi spesies dari bakteri *Pseudomonas* sp.
2. Produksi biodiesel yang dilakukan dengan variasi konsentrasi reaktan alkohol selain dari yang telah dilakukan, variasi waktu lamanya transesterifikasi, dan variasi konsentrasi katalis enzim lipase.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

Adio, O. Q., Kareem, S. O., Osho, M. B. and Omemu, A. M. 2015. Production of Lipases In Solid-State Fermentation by Aspergillus Niger F7-02 with Agricultural Residues. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *4*(06):509–512.

Ahmad, I., Ersan. dan Edison, R,. 2015. Pengaruh Dosis Enzim Papain Terhadap Rendemen dan Kualitas Virgin Coconut Oil (VCO). *Jurnal AIP*. Vol. 3 no. 2: 82-93. Bandar Lampung.

Aisjah, G. 1993. *Biokimia I*. PT Gramedia Pustaka. Jakarta.

Alexander, R. R. and Griffith, J. M. 1993. *Basic Biochemical Methods, 2nd*. Wiley-Liss, Inc. New York.

Alkusma, Y. M. Hermawan dan Hadiyanto. 2016. Pengembangan Potensi Energi Alternatif Baru Terbarukan Dengan Pemanfaatan Limbah Cair Kelapa Sawit Sebagai Sumber Energi Terbarukan Di Kabupaten Kotawaringin Timur. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 14(2):96-102.

Andayani, P. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Lipase Pseudomonas fluorencens yang Ditumbuhkan pada Media dengan Sumber Karbon Solar dan Minyak Sawit. Tesis. Universitas Brawijaya.

August, E. G. 2000. *Kajian Lipase Amobil Dari Aspergillus niger Pada Pembuatan MAG yang Bersifat Antibakteri Dari Minyak Kelapa*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Aziz, I., Nurbayti, S. dan Ulum, B. 2011. Esterifikasi Asam Lemak Bebas dari Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia VALENSI, 2*(2):384–388.

Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N. and Mehrotra, R. 2010. Biodiesel Production Through Lipase Catalyzed Transesterfication: An Overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 62(1):9-14.*

Dean, M. C. 2012. *A Histological Method That Can Be Used to Estimate the Time Taken to Form the Crown of A Permanent Tooth In Bell, L. S. (Ed*). ForensicMicroscopy For Skeletal Tissues Springer. New York.

Destianna, M.. 2007. *Intensifikasi Proses Produksi Biodiesel*. LKIM. Institut Teknologi Bandung.

Devita, L. 2015. Biodiesel Sebagai Bioenergi Alternatif Dan Prospeftif. *Jurnal Agrica Ektensia*, 9:23-26.

Diego, T. D. Manjon, A., Lozano, P. and Iborra, J. L. 2011. A Recyclable Enzymatic Biodiesel Production Process In Ionic Liquids. *Biosource Technology*, 102:6336-6339.

Dwijoseputro, D. dan Ratna S. 1998. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Freer, S. N. 1993. Purification And Characterization of The Extracellular A-Amylase From *Streptococcus Bovis* JB1. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(5):1398–1402.

Gandhi, N. N. 1997. Application of Lipase. *Jounal of the American Oil Chemists's Society*, 74(6):621-634.

Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. 2004. Bacterial Lipases: An Overview Of Production, Purification and Biochemical Properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *64*(6):763–781.

Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. UI Press.

Hidayanti, N., Arifah, N., Jazilah, R., Suryanto, A., dan Mahfud. 2015. Produksi Biodiesel dari Minyak Kelapa dengan Katalis Basa melalui Proses Transesterifikasi Menggunakan Gelombang Mikro (*Mirowave*). *Jurnal Teknik Kimia Vol. 10.*

Hidayat, N. 2006. *Mikrobiologi Industri (Edisi 1)*. Andi Offset. Yogyakarta.

Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi Jilid 2*. Yrama Widya. Bandung.

Jawetz, M. and Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.

Kementrian Energi dan Sumber Daya Mineral Republik Indonesia. 2019. *Keputusan Direktur Jenderal Energi Baru Terbarukan dan Konservasi Energi Nomor 189 K/ 10/ DJE/ 2019*. Jakarta.

Komintarachat, C. and Chuepeng, S. 2010. Methanol-Based Transesterification Optimization of Waste Used Cooking Oil over Potassium Hydroxide Catalyst. *American Journal of Applied Sciences, 7*(8), 1073-1078.

Kordi, M. G. H. K. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta. Jakarta.

Kumar, D. S. 2015. Fungal Lipase Production by Solid State Fermentation-An Overview. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 06(01):1–10.

Kurnia, D. R. D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol*. Universitas Diponegoro. Semarang.

Kusnadi. 2003. *Mikrobiologi (Common Teksbook)*. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.

Kwon, D. Y. and Rhee, J. S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *JAOCS*, Vol. 63 no.1. Seoul.

Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Lehninger, A. L. 1982. *Principles Of Biochemistry*. Worth Publisher, Inc. New York.

Luntungan, HT. 2008. Pelestarian Sumber Daya Genetik Kelapa Sebagai Komuditas Unggulan Dalam Pengembangan Lahan Rawa Pasang Surut dan Lebak. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 1(4), 234-258.

Ma, F. and Hanna, M.A., 1999. Biodiesel production: a review. Bioresour. Technol. 70, 1-15. Freedman, B., Butterfield, R.O., Pryde, E.H., 1986. Transesterification kinetics of soybeen oil. *JAOCS* 63, 1375-1380.

Marchetti JM, Miguel VU, Errazu AF. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renew Sustain Energy Rev.* 11:1300–1311

Martoyo, S. 2006. *Manajemen Sumber Daya Manusia, Edisi 5, Cetakan Pertama*. BPFE. Yogyakarta.

Murtiningrum dan Firdaus, A. 2015. Perkembangan Biodiesel Di Indonesia Tinjauan Atas Kondisi Saat Ini, Teknologi Produksi & Analisis Prospektif. *Jurnal PASTI (Penelitian dan Aplikasi Sistem dan Teknik Industri)*, 9:35-45.

Muslimah, S. Si, M. S. 2015. Dampak Pencemaran Tanah Dan Langkah Pencegahan. *Jurnal Penelitian Agrisamudra*, *2*(1):11–20.

Nopiani, AS, Yandri, Hadi, S. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 Dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Jurnal Analisis Kesehatan* (5).

Norjannah, B., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Cuan, J. C., dan Chong, W. T. 2016. Enzymatic Transesterification for Biodiesel Production a Comprehensive Review. *RSC Advances*. 65.

Olympia, M., Fukuda, H., Ono, H., Kaneko, Y. and Takano, M. 1995. Characterization of Starch-Hydrolyzing Lactic Acid Bacteria Isolated From A Fermented Fish And Rice Food, “Burong Isda” and Its Amylolytic Enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *80*(2):124–130.

Pratiwi, D., Sebayang, F. dan Jamilah, I. 2013. Produksi Dan Karakterisasi Enzim Lipase Dari Pseudomonas Aeruginosa Dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung Serta Kofaktor Na^{+} dan Co^{2+}. *Jurnal Saintia Kimia* (1):2.

Puspawati, C. and Haryono, P. 2018. *Bahan Ajar: Kesehatan Lingkungan, Penyehatan Tanah*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Kedokteran EGC. Jakarta.

Rahmi, H., Hariyanti, Rina, P. A. dan Wulandari, D. 2020. *Analisis Hasil Fraksinasi Protease dan Lipase yang Berasal dari Saluran Pencernaan Udang Vaname (Litopenaeus vannamei)*, 7:194–202.

Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., dan Imanaka, T. 2001. Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A. *Applied and Enviromental Microbiology*, 67(9):4064-4069.

Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar.

Rusman, H. J. 2017. *Potensi dan Imobilisasi Enzim Lipase dari Dedak Padi (Oryza sativa L.) Serta Aplikasinya dalam Mengkatalisis Reaksi Transesterifikasi dan Amidasi Menggunakan Substrat minyak Kelapa Murni*.Universitas Hasanuddin. Makassar.

Sa'id, E. G. 1987. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*. Mediatama Sarana Perkasa. Jakarta.

Salis, A,, Pinna, M., Monduzzi, M., and Solinas, V. 2008. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. *J. Mol. Catal. B. Enzym* 54:19–26.

Sen, S. and Chakrabarty, S. L. 1986. Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* D-39 Isolated From Vegetable Wastes: Purification and Characterization. *Journal of Applied Bacteriology*, 60(5):419–423.

Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. 2001. Production, Purification, Characterization and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662.

Soumanou, M. M. and Bornscheuer, U.T. 2003. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. *Enzyme Microb*

Technol.;33:97-103.

Susilo, B. 2006. Biodiesel; Pemanfaatan Biji Jarak Pagar Sebagai Alternatif Bahan Bakar. Trubus Agrisarana. Surabaya.

Suyono, Y. dan Salahudin, F. 2011. *Pseudomonas* Pada Tanah yang Terindikasi Kontaminasi Logam. *Jurnal Biopropal Industri*, 2(1):8–13.

Sztajer, H., Maliszewska, I. and Wieczorek, J. 1988. Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi and *Actinomycetes. Enzyme and Microbial Technology*, 10(8):492–497.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., and Wang, F. 2010. Biodiesel Production with Immobilized Lipase: A review. *Biotechnology Advances,* 28(5):628–634.

Unsoed. 2008. *Analisa Biologi Molokuler*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Wijaya, K. 2011. *Biodiesel Dari Minyak Goreng Bekas. Pusat Studi Energi*. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.

Winarno, F. G. 2008. *Enzim Pangan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

Wolfe, S. L. 1993. *Molecular and Cellular Biology*. Wadsworth Publishing Company. California.

Wright, R.T., Wiyono, I.E., Abdi, A., 2014. *Indonesia biofuels annual*. Global Agricultural Information Network (GAIN), ID1420.

Yang, J., Zhang, B., Yan, Y. 2009. Appl. Biochem. *Biotechnol*. 159:355–365.

Yapasan, E. (2008). *Partial Purification and Characterization of Lipase Enzyme from A Pseudomonas Strain. Tesis* (Issue December). İzmir Institute of Technology. İzmir.

Zhao, X., Zahab, B.E., Brosnahan, R., Perry, J., Wang, P. 2007. Appl. Biochem. *Biotechnol*. 143:236–243.