

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL LIPASE
TOLERAN ALKOHOL DARI LINGKUNGAN TANAH BERMINYAK
SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI UNTUK
PEMBUATAN BIODIESEL**

(Skripsi)

Oleh

**SRI ASTUTI
1617011024**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL LIPASE TOLERAN ALKOHOL DARI LINGKUNGAN TANAH BERMINYAK SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI UNTUK PEMBUATAN BIODIESEL

Oleh

SRI ASTUTI

Produksi biodiesel melalui reaksi transesterifikasi secara enzimatik telah banyak dikembangkan. Oleh karena itu, enzim yang digunakan sebagai katalis harus memiliki stabilitas yang baik dalam alkohol. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri penghasil lipase toleran alkohol dari sampel tanah di lingkungan penjual nasi goreng. Isolat bakteri yang diperoleh diidentifikasi dan diuji aktivitas lipolitiknya dalam pelarut alkohol (metanol dan etanol) menggunakan metode plate assay. Produksi enzim juga dilakukan untuk memperoleh enzim lipase yang selanjutnya digunakan sebagai katalis reaksi transesterifikasi antara minyak kelapa dan metanol dengan perbandingan 1:6 sebanyak 10% dari volume minyak. Identifikasi isolat bakteri menunjukkan uji positif bakteri *Pseudomonas* sp.. *Pseudomonas* sp. lebih stabil dalam metanol dibandingkan dengan etanol dengan kondisi optimum pertumbuhan pada media pH 7 dan waktu inkubasi ke-36 jam dengan nilai aktivitas unit sebesar 23,06 U/mL. Enzim lipase yang telah dimurnikan mempunyai nilai aktivitas spesifik sebesar 22,48 U/mg dan mempunyai aktivitas optimum pada suhu 35°C, pH 6, dan konsentrasi metanol 75% dengan aktivitas spesifik sebesar 22,76 U/mg. Hasil analisis produk reaksi transesterifikasi menggunakan GC-MS menunjukkan adanya senyawa metil ester yang terbentuk yaitu metil laurat 4,6%; metil miristat 1,53%; dan metil palmitat 1,11%. Jumlah metil ester yang dihasilkan menunjukkan bahwa reaksi transesterifikasi belum berjalan dengan baik karena hanya sedikit asam lemak penyusun minyak yang terkonversi menjadi metil ester.

Kata kunci : lipase, *Pseudomonas* sp., alkohol, transesterifikasi, biodiesel

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ALCOHOL-TOLERANT LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM OILY SOIL ENVIRONMENT AS CATALYST FOR TRANSESTERIFICATION REACTION FOR BIODIESEL PRODUCTION

By

SRI ASTUTI

Biodiesel production through enzymatic transesterification reactions has been widely developed. Therefore, the enzyme used as a catalyst must have good stability in alcohol. In this study, the isolation and identification of alcohol-tolerant lipase-producing bacteria from soil samples in the fried rice seller's environment was carried out. The bacterial isolates obtained were identified and tested for their lipolytic activity in alcohol solvents (methanol and ethanol) using the plate assay method. Enzyme production is also carried out to obtain lipase enzymes which are then used as a catalyst for transesterification reactions between coconut oil and methanol with a ratio of 1:6 as much as 10% of the volume of oil. Identification of bacterial isolates showed a positive test for *Pseudomonas* sp.. *Pseudomonas* sp. more stable in methanol than ethanol with optimum growth conditions at pH 7 media and incubation time of 36 hours with unit activity value of 23,06 U/mL. The purified lipase enzyme has a specific activity value of 22,48 U/mg and has optimum activity at a temperature of 35°C, pH 6, and 75% methanol concentration with a specific activity of 22,76 U/mg. The results of the analysis of the product of the transesterification reaction using GC-MS showed the presence of methyl ester compounds formed, namely methyl laurate 4,6%; methyl myristate 1,53%; and methyl palmitate 1,11%. The amount of methyl ester produced indicates that the transesterification reaction has not gone well because only a few fatty acids that make up the oil are converted into methyl esters.

Keywords : lipase, *Pseudomonas* sp., alcohol, transesterification, biodiesel

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL LIPASE
TOLERAN ALKOHOL DARI LINGKUNGAN TANAH BERMINYAK
SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI UNTUK
PEMBUATAN BIODIESEL**

Oleh

SRI ASTUTI

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENGHASIL LIPASE TOLERAN ALKOHOL DARI LINGKUNGAN TANAH BERMINYAK SEBAGAI KATALIS REAKSI TRANSESTERIFIKASI UNTUK PEMBUATAN BIODIESEL**

Nama Mahasiswa : **Sri Astuti**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1617011024**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.
NIP 19710806 200003 2 001

Dr. Kamisah Dehlawati P., S.Si., M.Si.
NIP 19721205 199703 2 001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

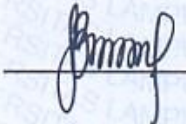
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : **Dr. Kamisah Delilawati P., S.Si., M.Si.**



Penguji
Bukan Pembimbing : **Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

NIP 19740705 200003 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **12 Juli 2022**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sri Astuti
NPM : 1617011024
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lipase Toleran Alkohol dari Lingkungan Tanah Berminyak sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi untuk Pembuatan Biodiesel”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Saya tidak keberatan jika 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. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya sehingga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 12 Juli 2022

menyatakan



Sri Astuti
1617011024

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Sri Astuti, dilahirkan di Mulyo Aji pada tanggal 05 Juli 1998, merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Anang Sugito dan Ibu Ratiyah.

Pendidikan Taman kanak-kanak di TK Setya Bhakti diselesaikan pada tahun 2004, Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SDN 01 Marga Jaya tahun 2004-2010, kemudian melanjutkan pendidikan di Madrasah Tsanawiyah (MTs) Mathla'ul Anwar pada tahun 2010-2013, dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAN 1 Meraksa Aji pada tahun 2013-2016.

Pada tahun 2016, penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Unila melalui jalur SNMPTN. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah aktif di Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila pada tahun 2016-2017, Lembaga Kemahasiswaan Rois FMIPA Unila pada tahun 2016-2018, dan Unit Kegiatan Mahasiswa (UKM) Birohmah Unila pada tahun 2016-2019.

KATA INSPIRASI

“Barang siapa yang menempuh jalan menuntut ilmu, maka Allah mudahkan baginya jalan menuju surga”

(HR. Muslim)

“Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(Qs. Al-Insyirah : 6)

“Dan janganlah kamu merasa lemah, dan jangan pula bersedih hati sebab kamu paling tinggi derajatnya jika kamu orang beriman”

(Qs. Ali Imran : 139)

PERSEMBAHAN

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya. Dengan penuh rasa syukur dan dengan segala kerendahan hati penulis persembahkan skripsi ini kepada:

Orangtua Tercinta

Terimakasih atas segala cinta, kasih sayang, perhatian, dan do'a yang tak pernah putus mengiringi setiap langkah perjalanan panjang ini.

Dosen Jurusan Kimia

Atas segala ilmu dan pelajaran berharga yang diberikan selama menempuh pendidikan di kampus

Sahabat-sahabat Terbaik

Menjadi pengingat agar selalu dalam kebaikan, do'a dan semangatnya yang menjadikan hari-hari terasa ringan

Almamater Tercinta, Universitas Lampung

SANWACANA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas Limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lipase Toleran Alkohol dari Lingkungan Tanah Berminyak sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi untuk Pembuatan Biodiesel”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains di Universitas Lampung

Penulis menyadari bahwa bisa berada di tahap ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, kritik, dan saran dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si. selaku pembimbing 1 atas segala motivasi, waktu, materi, bimbingan, serta kesabaran tanpa batas selama membersamai penulis menyelesaikan skripsi.
2. Ibu Dr. Kamisah Delilawati P., S.Si., M.Si. selaku pembimbing 2 atas segala motivasi, ilmu, bimbingan, kritik, dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si. selaku penguji atas kritik dan saran penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, S.Si., M.Sc selaku pembimbing akademik atas kesediaannya membimbing dan memberikan motivasi untuk menyelesaikan skripsi.
5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
6. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Unila.

7. Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas segala ilmu , nasihat, waktu yang diberikan selama perkuliahan.
8. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung
9. Ibu tersayang, kedua kakak perempuan, dan keluarga besar yang tiada hentinya memberikan do'a, semangat, dan dukungan materi sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
10. Ustadzah RQM atas segala bimbingan dan motivasi yang diberikan selama kebersamaan di Rumah Qur'an.
11. Teman-teman RQM 2 atas segala do'a, bantuan dan motivasinya.
12. Teman-teman Mahakarya Birohmah 2019 dan Rois Fmipa 2018 atas segala kesempatan, ilmu, pengalaman berharga, dan do'a-do'a yang tak pernah luput.
13. Keluarga Kimia 2016 atas segala bantuan selama menjadi mahasiswa di jurusan Kimia.
14. Tim "*Dian's Research*" atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian.

Terimakasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, terlepas dari itu semua semoga masih ada manfaat yang bisa diambil oleh pembaca.

Bandar Lampung, 6 Agustus 2022
Penulis,

Sri Astuti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tanah.....	5
2.2 Mikroorganisme	6
2.3 Bakteri	7
2.4 Nutrien untuk Pertumbuhan Bakteri	8
2.5 Enzim	9
2.6 Enzim Lipase.....	13
2.7 Biodiesel.....	14
2.8 Reaksi Transesterifikasi	15
2.9 Analisis Produk Transesterifikasi menggunakan <i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (GC-MS).....	17
III. METODE PENELITIAN	18
3.1 Waktu dan Tempat	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.3 Prosedur Penelitian.....	19
3.3.1 Tahap persiapan	19
3.3.2 Skrining bakteri lipolitik	21
3.3.3 Peremajaan isolat	21
3.3.4 Identifikasi bakteri lipolitik.....	21
3.3.5 Uji kualitatif aktivitas lipolitik	22
3.3.6 Penentuan kurva standar asam oleat	22
3.3.7 Optimasi produksi enzim lipase	22
3.3.8 Produksi enzim lipase	23
3.3.9 Pemurnian enzim.....	23
3.3.10 Uji aktivitas enzim lipase.....	24
3.3.11 Penentuan kadar protein.....	24
3.3.12 Karakterisasi enzim.....	25

3.3.13	Sintesis biodiesel secara enzimatik	25
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1	Isolat Bakteri Lipolitik	27
4.2	Karakteristik Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak	28
4.2.1	Klasifikasi	29
4.2.2	Morfologi	29
4.3	Uji Kualitatif Bakteri Lipolitik Toleran Alkohol	29
4.4	Optimasi Produksi Enzim Lipase	32
4.5	Produksi Lipase	33
4.6	Pemurnian Enzim	34
4.6.1	Fraksinasi	34
4.6.2	Dialisis	36
4.7	Karakterisasi Enzim Lipase	37
4.7.1	Penentuan pH optimum	37
4.7.2	Penentuan suhu optimum	38
4.7.3	Penentuan konsentrasi optimum metanol	39
4.8	Biodiesel	41
4.8.1	Transesterifikasi biodiesel	41
4.8.2	Karakterisasi biodiesel menggunakan <i>Gas Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (GC-MS)	42
V.	SIMPULAN DAN SARAN	46
5.1	Simpulan	46
5.2	Saran	47
	DAFTAR PUSTAKA	48
	LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengukuran diameter zona bening <i>Pseudomonas</i> sp. pada pelarut metanol dan etanol	31
2. Tingkat kemurnian enzim lipase dari <i>Pseudomonas</i> sp.	37
3. Komposisi asam lemak dalam minyak kelapa	42
4. Identifikasi senyawa berdasarkan fragmentasi <i>Mass Spectroscopy</i> (MS)	44
5. Data hubungan nilai <i>Optical Density</i> (OD) dan aktivitas unit (U/mL) dengan waktu inkubasi (jam)	59
6. Nilai aktivitas unit enzim pada variasi pH	59
7. Hubungan konsentrasi dengan absorbansi asam oleat	59
8. Hubungan antara konsentrasi <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) dengan absorbansi	61
9. Aktivitas enzim pada tingkat kejenuhan ammonium sulfat (0-100%).....	62
10. Aktivitas enzim pada tingkat kejenuhan ammonium sulfat	62
11. Penentuan aktivitas enzim pH optimum	63
12. Penentuan aktivitas enzim pada suhu optimum	63
13. Penentuan aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi metanol	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Lokasi pengambilan sampel.....	27
2. Isolat bakteri dari sampel tanah pengenceran 10^{-3}	28
3. Uji kualitatif aktivitas lipolitik <i>Pseudomonas</i> sp. .	30
4. Kurva pertumbuhan bakteri dengan waktu inkubasi 72 jam.....	32
5. Grafik hubungan antara aktivitas ekstrak kasar enzim dengan pH pada waktu inkubasi ke-36 jam.	33
6. Data hasil penentuan pola fraksinasi enzim menggunakan ammonium sulfat fraksi 0-100%.	35
7. Data hasil fraksinasi enzim dengan ammonium sulfat fraksi 0-20% dan 20-90%.....	36
8. Pengaruh pH pada aktivitas spesifik enzim lipase.	37
9. Pengaruh suhu terhadap aktivitas spesifik enzim lipase.	38
10. Pengaruh konsentrasi metanol terhadap aktivitas enzim lipase.	40
11. Kromatogram sampel hasil reaksi transesterifikasi minyak kelapa.	43
12. Hasil identifikasi isolat bakteri positif <i>Pseudomonas</i> sp. .	58
13. Kurva hubungan antara konsentrasi asam oleat dengan absorbansi	60
14. Kurva hubungan antara konsentrasi <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) dengan absorbansi.	61

15. Proses transesterifikasi minyak kelapa dan metanol dengan katalis lipase.....	64
16. Proses pemisahan biodiesel dengan gliserol menggunakan corong pisah.	64
17. Gliserol yang diperoleh dari hasil reaksi transesterifikasi.	65
18. Biodiesel yang diperoleh dari hasil reaksi transesterifikasi.	65
19. Proses evaporasi biodiesel.....	65
20. Hasil akhir biodiesel setelah dievaporasi.	66
21. Spektrum <i>Mass Spectroscopy</i> (MS) senyawa metil laurat.	66
22. Spektrum <i>Mass Spectroscopy</i> (MS) senyawa metil miristat.....	66
23. Spektrum <i>Mass Spectroscopy</i> (MS) senyawa metil palmitat.	67

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertambahan jumlah penduduk telah meningkatkan kebutuhan sarana transportasi dan aktivitas industri yang berakibat pada peningkatan kebutuhan dan konsumsi bahan bakar minyak (BBM) nasional. Sementara itu, ketersediaan bahan bakar minyak konvensional yang berasal dari fosil dalam beberapa dekade terakhir telah mengalami penyusutan. Selain itu polusi akibat emisi pembakaran bahan bakar fosil ke lingkungan menjadi ancaman yang cukup serius karena memiliki dampak negatif bagi kesehatan. Hal ini terjadi karena bahan bakar fosil menghasilkan emisi gas buang NO_x, SO_x, CO, partikel-partikel padat, dan komponen organik volatil (VOCs) (Marchetti and Errazu, 2008).

Saat ini banyak dilakukan penelitian untuk menemukan bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan dalam rangka mengatasi krisis energi serta mengurangi dampak negatif bahan bakar fosil bagi lingkungan, salah satunya yaitu biodiesel. Biodiesel merupakan salah satu bahan bakar alternatif sebagai pengganti bahan bakar diesel dari sumber yang dapat diperbarui seperti minyak nabati dan lemak hewan. Kelebihan biodiesel dibandingkan dengan bahan bakar fosil diantaranya bersifat *biodegradable*, *non-toxic*, mempunyai angka emisi CO₂ dan gas sulfur yang rendah, dan sangat ramah terhadap lingkungan (Marchetti dan Errazu, 2008). Produksi biodiesel secara enzimatik menggunakan katalis lipase telah dikembangkan dalam satu dekade terakhir ini. Sintesis secara enzimatik mempunyai banyak keunggulan dibanding sintesis secara kimia antara lain prosesnya dilakukan pada suhu rendah, hasilnya lebih tinggi, katalisnya dapat digunakan secara berulang dalam bentuk enzim amobil, menghemat bahan kimia,

dan pemisahan gliserol lebih mudah (Susanty dkk., 2013). Enzim lipase merupakan bagian dari enzim hidrolase yang bekerja pada ikatan ester. Lipase dapat menghidrolisis trigliserida menjadi digliserida, monogliserida, asam lemak, dan gliserol. Pada kondisi tertentu lipase juga mampu mengkatalisis reaksi kebalikannya, yaitu sintesis ester dari asam lemak bebas dan gliserol atau substrat lainnya (Pera dkk., 2006). Selain menghidrolisis ikatan ester, lipase juga dapat mengkatalisis reaksi esterifikasi, interesterifikasi, dan transesterifikasi pada media tanpa air (Momsia and Momsia, 2013). Salah satu yang menarik saat ini adalah pemanfaatan lipase untuk produksi biodiesel dari minyak nabati melalui reaksi transesterifikasi. Reaksi transesterifikasi dalam produksi biodiesel terjadi dalam lingkungan organik karena menggunakan sejumlah besar alkohol (metanol atau etanol) sebagai pendonor gugus alkil. Untuk itu, lipase yang digunakan harus memiliki stabilitas yang baik dalam pelarut alkohol (Parwata dan Martiningsih, 2014).

Kemampuan enzim untuk mempertahankan aktivitasnya di hadapan pelarut organik merupakan sifat yang menarik, karena banyak media reaksi untuk reaksi enzimatik melibatkan penggunaan pelarut organik. Pelarut organik pada dasarnya diketahui beracun bagi kebanyakan bakteri karena merusak integritas struktural dan fungsional sel. Bakteri toleran pelarut organik menunjukkan adaptasi tertentu untuk menghindari efek toksik dengan memiliki pompa pembuangan pelarut, perbaikan membran yang cepat, penurunan hidrofobisitas permukaan sel, permeabilitas membran sel yang lebih rendah dan peningkatan kekakuan membran. Enzim yang dihasilkan oleh mikroba toleran pelarut organik ini secara logis stabil dalam lingkungan yang kaya pelarut (Gupta dan Khare, 2009). Mikroorganisme penghasil lipase ditemukan dalam bermacam-macam habitat seperti limbah industri, pabrik pengolahan minyak sayur, perusahaan susu, tanah yang terkontaminasi dengan minyak, makanan yang membusuk, dan timbunan kompos (Sharma *et al.*, 2001). Tanah yang terkontaminasi oleh minyak menjadi salah satu habitat bagi mikroorganisme ekstremofil. Mikroba-mikroba yang mampu menghasilkan enzim-enzim yang stabil terhadap lingkungan ekstrim dapat ditemukan dalam tanah tersebut. Sebagai contoh, lipase hasil kloning dari bakteri

Staphylococcus epidermis yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak di bengkel mobil menunjukkan ketahanan terhadap berbagai pelarut organik seperti toluena, oktanol, p-xilena, dan n-hexana (Rahman *et al.*, 2010). Sementara itu, Parwata dan Sukarta (2013) melaporkan lipase yang diisolasi dari tanah terkontaminasi minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali menunjukkan stabilitas yang baik dalam pelarut organik polar (metanol dan etanol) maupun pelarut non polar (n-heksana).

Mengingat pentingnya peran lipase dalam dunia industri khususnya sebagai katalis pada pembuatan biodiesel, maka pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri penghasil enzim lipase toleran terhadap alkohol dari sampel tanah yang terkontaminasi minyak di lingkungan tanah penjual nasi goreng kedaton, Bandar Lampung.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Memperoleh isolat tunggal bakteri penghasil enzim lipase toleran alkohol
2. Melakukan identifikasi biokimia bakteri penghasil lipase toleran alkohol
3. Melakukan uji aktivitas dan mengetahui stabilitas lipase terhadap alkohol
4. Melakukan karakterisasi lipase yang diperoleh dengan parameter suhu, pH, dan alkohol
5. Melakukan sintesis biodiesel secara enzimatik
6. Mengidentifikasi komponen biodiesel menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS)

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu diharapkan dapat memberikan informasi berkaitan dengan isolat bakteri dan stabilitas enzim lipase yang diperoleh terhadap alkohol serta penggunaannya untuk biokatalis reaksi transesterifikasi pembuatan biodiesel sebagai energi terbarukan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanah

Tanah terbentuk secara alami melalui kombinasi proses fisik, kimia dan biologi. Sebagian besar mikroba tumbuh dan berkembang biak di permukaan tanah, bahkan dapat tumbuh pada petak tanah yang sama dengan mikroorganisme yang berbeda (Panagan, 2011). Partikel mineral utama dalam tanah adalah silikon, aluminium, dan besi. Mineral lain yang juga berperan adalah kalsium, magnesium, kalium, titanium, mangan, natrium, nitrogen, fosfor, dan belerang. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme dalam tanah adalah:

1. Jumlah dan macam zat hara
2. Kelembaban
3. Tingkatan
4. Suhu
5. pH
6. Perlakuan pada tanah seperti penambahan pupuk atau banjir menyebabkan peningkatan jumlah mikroorganisme (Lay, 1992).

Produktivitas tanah tidak hanya tergantung pada komposisi kimianya, tetapi juga pada sifat alami mikroorganisme yang hidup di dalamnya. Mikroorganisme yang hidup di tanah dapat dibagi menjadi bakteri, actinomycetes, fungi, alga dan protozoa. Bakteri adalah kelompok mikroorganisme yang paling dominan di dalam tanah dan dapat menyumbang setengah dari biomassa mikroba di dalam tanah. Bakteri ditemukan di banyak jenis tanah, tetapi jumlahnya berkurang dengan bertambahnya kedalaman tanah. Bakteri hidup dalam tanah sebagai kokus (bulat $0,5 \mu$), basil (batang $0,5 - 3,0 \mu$) atau spirillum (spiral). Basil umum

terdapat dalam tanah sedangkan spirillum sangat jarang terdapat dalam lingkungan alami. Bakteri tanah yang paling umum termasuk dalam genus *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, dan *Mycrobacterium* (Rao, 1994).

Menurut Waluyo (2004) , populasi mikroba di dalam tanah terbagi menjadi tiga golongan besar yaitu:

1. Golongan autohtonous

Kelompok autohtonous adalah kelompok mikroba yang masih ada di dalam tanah dan tidak bergantung pada pengaruh lingkungan luar, seperti iklim, suhu dan kelembaban.

2. Golongan zimogenik

Kelompok zimogen adalah sekelompok mikroba yang keberadaannya di dalam tanah karena pengaruh dari luar, misalnya penambahan senyawa organik.

3. Golongan transien

Golongan transien merupakan golongan mikroba yang kehadirannya bersama dengan adanya penambahan secara buatan, misalnya dalam bentuk inokulum (preparat hidup mikroba) *Rhizobium* atau *Azotobacter* ke dalam tanah.

2.2 Mikroorganisme

Mikroorganisme ada di berbagai habitat, di tubuh kita, di dalam tubuh kita, dan di sekitar kita. Mikroorganisme juga dapat diperoleh dari lingkungan air, tanah, udara, substrat berupa makanan, tumbuhan dan hewan. Populasi mikroba di lingkungan ini sangat beragam. Jenis mikroorganisme dapat berupa bakteri, khamir, kapang, dan lain-lain. Isolasi mikroba memerlukan beberapa langkah kultur untuk mendapatkan satu koloni mikroba. Koloni tunggal yang diperoleh dapat diperbanyak untuk keperluan penelitian, misalnya mengisolasi DNA mikroba yang mampu menghasilkan enzim tertentu atau menentukan mikroba mana yang digunakan untuk bioremediasi (Fardiaz, 1992). Pada lingkungan alamnya, mereka hidup dengan spesies biologis lain dalam komunitas yang

terdiri dari berbagai jenis mikroorganisme. Dalam komunitas ini, satu spesies mikroba dapat mempengaruhi spesies lain, beberapa spesies dapat bermanfaat dan beberapa spesies dapat merugikan (Pelczar *et al.*, 1988).

Mikroorganisme merupakan sumber potensial sebagai bahan baku untuk produksi berbagai jenis enzim. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: ekonomis (dapat dilakukan dalam waktu yang sangat singkat dan media yang sangat murah), kondisi reaksi seperti pH dan suhu yang mudah dikontrol, dan peningkatan produksi enzim dapat dikondisikan dengan menambahkan penginduksi tertentu (Wang *et al.*, 1979).

2.3 Bakteri

Bakteri adalah organisme bersel tunggal yang terlalu kecil untuk dilihat kecuali di bawah mikroskop, dengan struktur sel yang relatif sederhana tanpa nukleus, sitoskeleton, dan organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. Seperti makhluk hidup lainnya, bakteri membutuhkan makanan, air, dan suhu yang tepat untuk hidup dan tumbuh. Bakteri potensial dapat diperoleh dengan menyaring mikroorganisme dari lingkungan (Dwijoseputro, 1986). Umumnya, isolat bakteri diperoleh sesuai dengan habitatnya. Hal ini karena bakteri biasanya menggunakan kondisi lingkungan tersebut sebagai substrat utama, misalnya bakteri amilolitik dari sampel limbah pengolahan singkong, limbah sayuran (Chakrabarty and Sen, 1998), babat (Freer, 1993), ikan hasil fermentasi dan bahan lainnya dari makanan berbasis beras (Olympia *et al.*, 1995). Bakteri lipolitik telah diisolasi dari tanah, limbah susu (Duangsong *et al.*, 2002) dan susu mentah (Hantsis-Zacharov dan Halpern, 2007). Beberapa di antaranya telah diidentifikasi sebagai *Pseudomonas* dan *Bacillus* (Amara *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012; Krishnaveni *et al.*, 2012), *Serratia marcescens* (Prakash *et al.*, 2007), *Arthrobacter*, *Staphylococcus* (Shivsharan *et al.*, 2013) dan *Acinetobacter* (gamma proteobacteria) (Hantsis-Zacharov dan Halpern, 2007)

Bakteri lipolitik adalah bakteri yang dapat mendegradasi atau menghidrolisis lemak, fosfolipid, dan turunannya (Winarno, 1983). Banyak bakteri aerob dan proteolitik juga memiliki kemampuan lipolitik (Fardiaz, 1992). Jenis-jenis mikroorganisme yang mempunyai sejumlah spesies bersifat lipolitik misalnya bakteri *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, dan *Staphylococcus*; kapang termasuk jenis *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*; serta khamir termasuk jenis *Candida*, *Rhodotorula*, dan *Hansenula*. Salah satu contoh yang bersifat lipolitik kuat misalnya *P. Fluorescens* (Buckle, 1987). Jaeger *et al.* (1998) menyatakan bahwa aktivitas lipolitik yang dihasilkan oleh bakteri merupakan metabolit utama dari bakteri tersebut yang digunakan untuk memecah lipid. Dalam hampir semua kasus, bakteri lipolitik bekerja dengan baik dalam emulsi minyak dalam air dimana kandungan airnya tinggi dan area antarmuka tersedia luas untuk degradasi dan substrat trigliserida dapat digunakan.

2.4 Nutrien untuk Pertumbuhan Bakteri

Mikroorganisme tumbuh subur di lingkungan yang kaya nutrisi. Nutrisi untuk pertumbuhan bakteri mengandung bahan kimia organik atau anorganik. Bahan kimia organik dan anorganik diekstraksi dari lingkungan dalam berbagai bentuk. Nutrisi diambil dari lingkungan kemudian diangkut melalui membran plasma ke dalam sel. Beberapa nutrisi diproses dalam sel untuk menghasilkan energi yang digunakan dalam proses seluler. Misalnya, mikroba yang tumbuh pada makanan biasanya bersifat heterotrof karena menggunakan karbohidrat sebagai sumber energi dan karbon, meskipun komponen karbon organik lainnya juga dapat digunakan. Sebagian besar organisme heterotrofik menggunakan komponen organik yang mengandung protein sebagai sumber N, tetapi beberapa mikroba juga dapat menggunakan sumber nitrogen anorganik (Lim, 1998).

Nutrisi pertumbuhan terdiri dari makronutrien dan mikronutrien. Mikronutrien terdiri dari mikronutrien organik dan anorganik. Zat yang berperan sebagai mikronutrien organik adalah beberapa asam amino (triptofan) dan beberapa

komponen DNA dan RNA (purin dan pirimidin). Beberapa unsur logam yang terdapat dalam *trace element* anorganik adalah Co, Mo, Cu, Zn. Unsur logam ini sangat penting untuk kehidupan sel, meskipun jumlahnya sangat kecil. Ada tujuh unsur dasar yang dibutuhkan semua makhluk hidup, yaitu karbon, oksigen, nitrogen, hidrogen, fosfor, belerang, dan kalium. Kebutuhan akan sumber karbon dipenuhi dengan adanya gula, pati dan karbohidrat lainnya (Irianto, 2006).

2.5 Enzim

Enzim merupakan molekul biopolimer protein yang tersusun dari serangkaian asam amino dalam komposisi dan susunan rantai yang teratur dan tetap. Enzim berfungsi sebagai aktivator dalam reaksi biokimia dan bersifat spesifik terhadap substrat, sehingga mempermudah proses pemutusan suatu rantai kompleks tertentu (Syamsudin dkk., 2008). Enzim bekerja mengubah substrat menjadi produk dengan cara menurunkan energi aktivasi. Substrat akan terikat pada bagian permukaan sisi aktif enzim yang terdiri atas residu asam dengan gugus fungsi yang dapat mengikat substrat dan mengkatalisis transformasi kimianya sehingga terjadi penggabungan antara enzim dan substrat yang bersifat sementara. Selain itu, sisi aktif enzim akan mengelilingi substrat dan memisahkannya dari larutan. Dengan demikian, keadaan transisi dicapai dengan energi aktivasi yang lebih rendah dibandingkan dengan energi aktivasi yang dibutuhkan untuk mencapai keadaan transisi tanpa bantuan enzim biokatalis (Hasna, 2012). Mengingat bahwa enzim memiliki sifat yang sesuai dengan mikroorganisme yang memproduksinya, kemungkinan untuk menghasilkan enzim yang serupa dengan sifat yang berbeda tetap terbuka (Sunaryanto dan Kaseno, 2004).

Enzim adalah biokatalis yang sangat efektif secara signifikan meningkatkan laju reaksi kimia tertentu yang akan berjalan lambat tanpa enzim (Lehninger, 1995). Ciri khusus enzim adalah kemampuan katalitik dan spesifisitasnya yang sangat tinggi. Selain itu, enzim berperan dalam konversi berbagai jenis energi (Winarno, 1986). Menurut tempat kerjanya, enzim dapat dibedakan menjadi dua golongan,

yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endoenzim juga disebut enzim intraseluler, yang diproduksi di dalam sel, yaitu di membran sitoplasma, dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) adalah enzim yang diproduksi oleh sel dan kemudian dilepaskan melalui dinding sel sehingga bebas di media sekitarnya dan bereaksi menghancurkan bahan organik secara independen dari sel yang menghasilkan. Menurut biosintesisnya, enzim dibagi menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu ada dalam jumlah yang relatif konstan dalam sel mikroba, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah yang bervariasi dalam sel tergantung pada adanya penginduksi (Soedigdo, 1988).

Menurut Poedjadi (1994), enzim dibagi kedalam enam berdasarkan pada jenis reaksi yang dikatalisis, keenam golongan enzim tersebut yaitu :

a. Oksido-reduktase

Enzim oksido-reduktase adalah enzim yang terlibat dalam reaksi oksidasi dan reduksi. Ada dua jenis enzim yaitu dehidrogenase dan oksidase. Contoh enzim dehidrogenase adalah alkohol dehidrogenase dan glutamat dehidrogenase.

Contoh enzim oksidase adalah glukosa oksidase dan glisin oksidase.

b. Transferase

Enzim transferase adalah enzim yang terlibat dalam reaksi transfer gugus tertentu.

Contoh enzim dalam kelompok ini adalah metiltransferase, hidroksimetiltransferase, dan aminotransferase.

c. Hidrolase

Enzim hidrolase merupakan enzim yang terlibat dalam reaksi hidrolisis. Ada tiga jenis enzim hidrolase, enzim yang memecah ikatan ester, glikosida, dan ikatan peptida. Contoh enzim hidrolase adalah esterase, lipase, amilase, aminopeptidase, karboksipeptidase, pepsin, tripsin, dan kimotripsin.

d. Liase

Enzim yang termasuk golongan enzim liase berperan penting dalam reaksi pemisahan gugus dari substrat (bukan hidrolisis) atau sebaliknya. Contoh enzim dalam kelas ini adalah: dekarboksilase, aldolase, dan hidratase.

e. Isomerase

Enzim yang termasuk dalam golongan isomerase bekerja pada reaksi perubahan intramolekular misalnya reaksi perubahan glukosa menjadi fruktosa. Contoh: ribulosafosfat epimerase dan glukosafosfat isomerase.

f. Ligase

Enzim ligase adalah enzim yang berperan dalam penggabungan dua molekul, sehingga enzim ini disebut juga sintetase. Ikatan yang terbentuk merupakan ikatan C-O, C-S, C-N atau C-C. Contohnya yaitu glutamin dan piruvat karboksilase.

Enzim dapat bekerja secara efektif apabila faktor-faktor yang mendukung kerja enzim dapat dikondisikan. Adapun faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut.

a. Suhu

Suhu inkubasi memiliki pengaruh yang besar terhadap kinerja enzim, suhu inkubasi di bawah suhu kinerja enzim yang optimal dapat mengakibatkan denaturasi protein enzim (Arbianto, 1989). Sebagian besar enzim mengalami denaturasi pada suhu di atas 50°C (Wolfe, 1993). Pada kisaran suhu tertentu, laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim meningkat dengan kenaikan suhu. Reaksi tercepat terjadi pada suhu optimum (Rodwell, 1987). Pada suhu 0°C, enzim menjadi tidak aktif dan dapat diaktifkan kembali pada suhu normal (Lay and Sugyo, 1992).

b. pH (Derajat keasaman)

Enzim umumnya bersifat amfolit, artinya enzim memiliki konstanta disosiasi baik pada gugus asam maupun gugus basa, terutama residu terminal karboksil dan

gugus terminal amino. Perubahan reaktivitas enzim merupakan akibat dari perubahan pH lingkungan (Winarno, 1989). Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif dan mencegah sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya (Page, 1989).

c. Konsentrasi enzim

Laju reaksi enzim berhubungan langsung dengan konsentrasi enzim dan substrat (Orten and Neuhaus, 1970). Konsentrasi enzim secara langsung mempengaruhi laju reaksi enzim, laju reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi enzim (Poedjiadi, 1994).

d. Konsentrasi substrat

Secara umum, laju reaksi enzimatik tergantung pada konsentrasi substrat. Kecepatan reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat. Peningkatan laju reaksi ini melambat hingga tercapai titik kritis, dimana penambahan konsentrasi substrat akhirnya hanya meningkatkan sedikit laju reaksi (Lehninger, 1982).

e. Aktivator dan inhibitor

Beberapa enzim memerlukan aktivator untuk reaksi katalitiknya. Aktivator adalah senyawa atau ion yang dapat meningkatkan laju reaksi enzimatik. Komponen kimia yang membentuk enzim juga disebut kofaktor. Kofaktor tersebut dapat berupa ion anorganik seperti Zn, Fe, Ca, Mn, Cu, Mg atau molekul organik kompleks yang disebut koenzim (Martoharsono dan Soeharsono, 1997). Menurut Wirahadikusumah (2001), inhibitor adalah suatu zat kimia tertentu yang dapat menghambat aktivitas suatu enzim. Secara umum inhibitor bekerja dengan cara menyerang sisi aktif enzim, mencegah pengikatan enzim dengan substrat, dan menghentikan fungsi katalitik enzim (Winarno, 1989).

Enzim adalah kelas protein, sehingga memiliki sifat fisik dan kimia yang mirip dengan protein. Beberapa enzim tidak stabil dan mudah mengalami denaturasi hingga kehilangan aktivitas enzimatiknya. Aktivitas enzim tergantung pada lingkungannya. Efek ini dapat mengganggu kestabilan enzim, sehingga menjadi

masalah yang sering dihadapi oleh industri. Stabilitas adalah properti penting yang harus dimiliki enzim ketika digunakan sebagai biokatalis. Stabilitas enzim dapat didefinisikan sebagai stabilitas aktivitas enzim selama penyimpanan dan penggunaan enzim, serta ketahanan terhadap senyawa pendegradasi seperti pelarut tertentu, paparan pH, dan temperatur. Ada dua prinsip utama untuk memperoleh enzim yang sangat stabil, yaitu penggunaan enzim dengan stabilitas alami yang ekstrim dan upaya untuk meningkatkan stabilitas enzim yang kurang stabil atau tidak stabil secara alami. Meningkatkan stabilitas enzim dapat dicapai dengan imobilisasi enzim, modifikasi kimia, rekayasa protein, dan perlakuan enzim dalam kondisi terbatas air atau dalam pelarut organik (Saktiwansyah, 2001).

2.6 Enzim Lipase

Enzim lipase atau asilgliserol hidrolase (E.C 3.1.1.3) adalah enzim yang mampu menghidrolisis trigliserida rantai panjang. Deskripsi kode enzim ini adalah 3 *Hydrolases, 1 Acting on ester bonds, 1 Carboxylic-ester hydrolases, 3 triacylglycerol lipase* (Bornscheuer, 1995). Lipase merupakan enzim induktif yang sangat dipengaruhi konsentrasi lemak atau minyak dalam substrat. Enzim lipase merupakan enzim hidrolase yang berfungsi sebagai biokatalis dalam hidrolisis lemak mono-, di-, dan trigliserida menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol (Winarno, 1986). Selain enzim lipase termolabil, berbagai laporan penelitian mengungkapkan bahwa enzim lipase termostabil diproduksi dari bakteri termofilik, misalnya *Bacillus thermotenus* (Schmidt *et al.*, 1997). *Bacillus thermotenus* menghasilkan dua jenis lipase yaitu lipase BTL 1 dan BTL 2. Gen lipase BTL 2 telah diklon dan urutan nukleotida serta sifat-sifat enzimnya telah diketahui (Schmidt *et al.*, 1998). Enzim lipase sebagai biokatalisator mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan katalisator alkali diantaranya: bekerja secara spesifik, aktivitas katalitik enzim yang tinggi dan kemampuannya bekerja pada suhu yang relatif rendah sekitar 30°C, katalisator alkali bekerja pada suhu (220-250)°C. Suhu yang tinggi menghasilkan produk berwarna coklat (gelap) dan bau tidak diinginkan (Noureddini, 2004).

Enzim lipase yang dihasilkan oleh mikroba memiliki sifat utama yaitu enzim ini dapat bekerja pada lapisan antarmuka karena adanya perbedaan polaritas antara substrat dengan lipase yang mengkatalisisnya. Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya merupakan senyawa non polar (Seniwati dkk., 2010).

Aktivasi pada lapisan antar muka lipase ini meningkat bila substrat yang tersedia berupa emulsi. Karena karakteristik ini, kinetika lipase tidak mengikuti aturan klasik model Michaelis-Menten. Substrat dan produk yang dibentuk oleh lipase ini terkadang tidak larut dengan baik dalam media berair. Hal ini memungkinkan enzim untuk dengan mudah dipisahkan dari substrat dan produknya.

Secara umum, enzim tidak stabil dalam pelarut organik dan dapat mengalami denaturasi atau kehilangan aktivitas katalitiknya. Namun, lipase dapat stabil dan aktif dalam pelarut organik tanpa penambahan senyawa penstabil. Jenis substrat lipase terkadang larut atau sedikit larut dalam air. Pada kondisi tersebut, pelarut organik atau larutan organik-air digunakan sebagai media reaksi. Karena kemampuannya mempertahankan kemampuan katalitik dalam pelarut organik, lipase banyak digunakan dalam bioteknologi (Jaeger *et al.*, 1994)

Lipase yang dihasilkan oleh bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah lamanya masa inkubasi. Masa inkubasi mempengaruhi jumlah lipase yang dihasilkan. Kemampuan bakteri untuk menghasilkan lipase telah ditunjukkan selama masa inkubasi yang panjang mulai dari beberapa jam hingga beberapa hari. Penelitian yang dilakukan oleh Pabai *et al* (1996) menunjukkan bahwa *Pseudomonas* spp., *P. fragi*, dan *P. fluorescens* BW 96CC dapat menghasilkan lipase maksimum setelah 72 hingga 96 jam inkubasi.

2.7 Biodiesel

Biodiesel didefinisikan sebagai bahan bakar diesel non-minyak bumi yang terdiri dari alkil (metil atau etil) ester rantai pendek, biasanya dibuat melalui transesterifikasi minyak nabati atau lemak hewani yang dapat digunakan pada

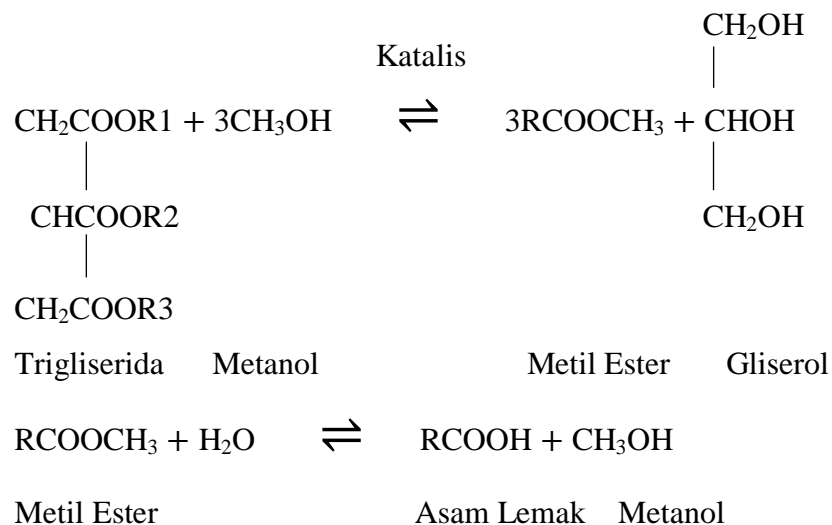
kendaraan bermesin diesel yang tidak dimodifikasi. Biodiesel dapat terurai secara hayati, tidak beracun, memiliki emisi rendah, dan bermanfaat bagi lingkungan. Namun, biaya biodiesel merupakan rintangan utama untuk komersialisasi produk. Ada empat cara untuk membuat biodiesel yaitu penggunaan dan pencampuran langsung, mikroemulsi, pirolisis, dan transesterifikasi. Metode yang sering digunakan adalah transesterifikasi dimana minyak atau lemak bereaksi dengan alkohol monohidrat dengan adanya katalis seperti asam, basa atau lipase (Krawczyk, 1996). Biodiesel merupakan bahan bakar alternatif dari sumber daya terbarukan (*renewable resources*) dengan komposisi ester asam lemak dari minyak nabati, antara lain minyak kelapa sawit, minyak kelapa, minyak jarak pagar, minyak biji kapuk, dan masih ada lebih dari 30 macam tumbuhan Indonesia yang memiliki potensi untuk dijadikan bahan baku pembuatan biodiesel (Lemigas, 2005).

Sebagai bahan bakar alternatif, biodiesel memiliki banyak keunggulan dibandingkan bahan bakar minyak bumi, antara lain: ramah lingkungan, emisi polutan udara yang relatif rendah, dapat terdegradasi secara alami (*biodegradable*) dan dapat digunakan tanpa perlu proses modifikasi. Biodiesel diproduksi melalui reaksi transesterifikasi, yaitu reaksi antara minyak nabati atau lemak hewani dan alkohol untuk menghasilkan alkil ester (biodiesel) dan produk samping gliserol dengan bantuan katalis (Noiroj dkk., 2009). Katalis digunakan untuk meningkatkan laju reaksi dan hasil produk karena reaksi ini merupakan reaksi reversibel dan diperlukan alkohol berlebih untuk menggeser kesetimbangan menjadi produk. Konversi trigliserida menjadi metil ester atau etil ester melalui proses transesterifikasi dapat menurunkan sepertiga berat molekul trigliserida, viskositas seperdelapan, dan sedikit meningkatkan titik nyala (Lemigas, 2005).

2.8 Reaksi Transesterifikasi

Reaksi transesterifikasi merupakan reaksi antara trigliserida dengan alkohol membentuk *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) dan gliserol sebagai produk

samping. Umumnya, agar asam lemak penyusun minyak dapat sepenuhnya diubah menjadi triasilgliserol melalui reaksi transesterifikasi diperlukan paling sedikit tiga mol alkohol untuk setiap satu mol trigliserida. Pada proses transesterifikasi menggunakan berbagai jenis minyak, triasilgliserol bereaksi dengan alkohol, umumnya metanol atau etanol menghasilkan ester dan gliserol. Keseluruhan prosesnya biasanya merupakan urutan tiga langkah berturut-turut dan merupakan reaksi yang dapat balik. Metanol lebih disukai untuk semua pengembangan komersial karena biayanya yang rendah dan keunggulan fisik dan kimianya (alkohol rantai kutub dan terpendek). Meskipun etil ester dapat diproduksi tetapi tidak ada permintaan komersial saat ini untuk memproduksinya (Meher *et al.*, 2006). Persamaan umum reaksi transesterifikasi sebagai berikut.



Proses transesterifikasi dipengaruhi oleh beberapa faktor penting antara lain:

1. Lama reaksi

Semakin lama waktu reaksi, semakin banyak produk yang dihasilkan karena keadaan ini memungkinkan molekul-molekul reaktan saling bertumbukan. Namun, ketika kesetimbangan tercapai, penambahan waktu reaksi tidak mempengaruhi reaksi, tetapi dapat menyebabkan penurunan produk, karena reaksi sebaliknya, yaitu pembentukan metil ester menjadi trigliserida (Affandi dkk., 2013).

2. Rasio perbandingan alkohol dengan minyak

Rasio molar antara alkohol dengan minyak sangat mempengaruhi metil ester yang dihasilkan. Semakin banyak jumlah alkohol yang digunakan maka konversi metil ester yang dihasilkan akan bertambah banyak. Perbandingan molar antara alkohol dan minyak nabati yang biasa digunakan dalam proses industri untuk mendapatkan produksi metil ester yang lebih besar dari 98% berat adalah 6:1 (Freedman *et al.*, 1984).

2.9 Analisis Produk Transesterifikasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS)

GC-MS adalah kombinasi analisis dari kromatografi gas dan spektroskopi massa. Spektroskopi massa digunakan sebagai detektor yang memberikan informasi tentang struktur kimia senyawa yang tidak diketahui. Ketika gas terlarut memasuki spektroskopi massa, molekul organik dibombardir dengan elektron berenergi tinggi dan dipecah menjadi molekul yang lebih kecil. Komponen-komponen campuran yang dipisahkan dengan kromatografi gas kemudian disajikan dalam spektrum massa (Hendayana, 2006).

Analisis GC-MS merupakan kombinasi dua teknik analisis berbeda yang digunakan untuk menganalisis dan mengidentifikasi campuran senyawa organik dan biokimia kompleks (Hussain dan Maqbool, 2014). Karakterisasi menggunakan GC-MS ini digunakan untuk mengetahui komponen yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi (Cao *et al.*, 2005). Metode GC-MS ini dapat digunakan untuk mengkonfirmasi komponen metil ester yang dihasilkan dan memberikan informasi mengenai mono-, di-, dan tri-gliserida yang berhasil dikonversi menjadi *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME). Hasil analisa menggunakan GC-MS berupa kromatogram dan spektrum massa yang nantinya dibandingkan dengan standar internal dari GC-MS (Zhang *et al.*, 2010).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2020 sampai dengan Desember 2021 di Laboratorium Biokimia Fmipa Unila. Pengambilan sampel dilakukan di lingkungan penjual nasi goreng, Jl. Bumi Manti 1 No. 107 Kampung Baru, Kec. Kedaton, Bandar Lampung. Identifikasi bakteri dilakukan di Balai Veteriner Bandar Lampung dan identifikasi komponen biodiesel menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS) dilakukan di Laboratorium Universitas Negeri Semarang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: autoklaf, oven, neraca analitik, Erlenmeyer, gelas beaker, tabung reaksi, pipet tetes, mikro pipet, jarum ose, sumbat, aluminium foil, spatula, bunsen, labu ukur, pH meter, termometer, botol urin, label, shaker inkubator, inkubator, kertas saring, corong kaca, corong pisah, cawan petri, *magnetic stirrer*, *Laminar Air Flow* (LAF), sentrifius, vorteks, kantong selofan, labu leher tiga, kondensor, *hot plate*, Spektrofotometer UV-Vis Agilent Cary 100, dan GC-MS Shimadzu QP2010 SE.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sampel tanah, *Nutrient Agar* (NA), akuades, minyak zaitun, asam oleat, Cu asetat, piridin, *coconut oil*, tween 80, metil merah, *Nutrient Broth* (NB), HCl, NaCl, Na₂CO₃, NaOH, KOH, CuSO₄.5H₂O, Na (K)-tartarat, reagen Folin Ciocelteau, metanol, etanol,

alkohol 70%, ammonium sulfat, buffer fosfat, $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 , aseton, *Bovine Serum Albumin* (BSA), dan n-heksana.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap persiapan

3.3.1.1 Persiapan alat

Semua peralatan gelas yang digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disterilisasi agar terhindar dari mikroba yang tidak diinginkan. Sterilisasi alat dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Alat-alat tersebut kemudian dimasukkan ke dalam oven selama kurang lebih 2 jam.

3.3.1.2 Pembuatan media padat

Media padat yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri adalah *Nutrient Agar* (NA). Media NA dibuat dengan menimbang 2,8 g NA, kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades, ditambah 1000 μL minyak zaitun, kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 1 atm.

3.3.1.3 Pembuatan media selektif

Substrat untuk *skinning* lipase toleran pelarut terdiri dari Tween 80 2 gram, agar-agar 2,5 gram, dan Metil Merah 0,01 gram. Seluruh bahan dilarutkan dalam 100 mL akuades dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit (Samad *et al.*, 1989)

3.3.1.4 Pembuatan media kultur

Media kultur lipase dibuat dengan komposisi 1,3 gram Nutrient Broth (NB) dilarutkan dalam 100 mL akuades ditambah dengan 2 tetes tween 80 dan 2 mL minyak zaitun kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm.

3.3.1.5 Pembuatan media produksi lipase toleran metanol

Media produksi lipase toleran metanol dibuat dengan komposisi 2 mL minyak zaitun, 2 tetes tween 80, 1% metanol dalam 100 mL buffer fosfat 0,05 M yang kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.3.1.6 Pembuatan larutan fisiologis

Bubuk NaCl ditimbang sebanyak 0,85 g menggunakan neraca analitik lalu dilarutkan dengan 100 mL akuades dan ditutup menggunakan kapas dan aluminium foil. Larutan tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Larutan ini digunakan sebagai larutan pengencer sampel tanah yang akan digunakan.

3.3.1.7 Pembuatan pereaksi

Pereaksi yang digunakan pada penelitian ini adalah pereaksi Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Pereaksi Lowry digunakan untuk menguji kadar protein ekstrak kasar enzim lipase. Pereaksi Lowry terdiri atas 4 macam, yaitu:

- i. Pereaksi A: 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N
- ii. Pereaksi B: 5 mL larutan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% (w/v) ditambahkan 5 mL larutan Na(K)-tartarat 1% (w/v)
- iii. Pereaksi C: 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
- iv. Pereaksi D: reagen Folin-Ciocalteu diencerkan dengan akuades 1:1

3.3.1.8 Pengambilan dan penyiapan sampel

Pengambilan sampel tanah yang tercemar minyak dilakukan di kawasan Kampung Baru dengan cara sebagai berikut.

- i. Membersihkan permukaan tanah yang tercemar limbah minyak di lokasi/titik pengambilan sampel
- ii. Menggali tanah dengan sendok tanah atau spatula
- iii. Mengambil sampel tanah dengan menggunakan botol yang telah disterilkan dan diberi label

3.3.2 Skrining bakteri lipolitik

Sebanyak 1 gram sampel tanah dimasukkan ke dalam gelas beaker dan dilarutkan dengan larutan fisiologis (NaCl 0,85% (w/v)) sebanyak 100 mL lalu dishaker selama 15 menit. Kemudian sampel disaring, diambil larutannya dan dilakukan pengenceran bertingkat hingga 5 kali (10^{-5}). Setelah itu diambil 1-2 mL kemudian dituangkan dengan metode *pour plate* pada media Nutrien Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.3 Peremajaan isolat

Isolat diremajakan pada media NB dan NA. Isolat ditumbuhkan dalam 100 mL media NB secara aseptik dan diinkubasi dalam shaker inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Sebanyak 100 μ L kultur cair dipindahkan ke media NA plate secara aseptik dengan metode *spread plate* lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C, lalu isolat dipindahkan ke media NA miring sebagai isolat stok.

3.3.4 Identifikasi bakteri lipolitik

Identifikasi bakteri secara biokimia dilakukan cara mengirimkan sampel ke Balai Veteriner untuk mengetahui jenis isolat yang diperoleh.

3.3.5 Uji kualitatif aktivitas lipolitik

Isolat terpilih dari hasil skrining ditumbuhkan secara aseptis dalam media NB steril yang telah ditambahkan pelarut organik (metanol dan etanol) dengan variasi konsentrasi 1%, 3% dan 5%, untuk mencegah pelarut organik menguap maka sumbat dilapisi dengan plastik wrap. Selanjutnya dishaker selama 48 jam dan diuji aktivitas lipolitiknya (Jaiganesh dan Jaganathan, 2018). Uji aktivitas lipolitik dilakukan menggunakan metode *plate-assay* yang dikembangkan oleh Samad *et al.* (1989).

3.3.6 Penentuan kurva standar asam oleat

Pembuatan kurva standar lipase dibuat dengan larutan stok asam oleat 2000 ppm, dari stok tersebut dibuat beberapa variasi konsentrasi yaitu 200, 300, 400, 500, dan 600 ppm. Selanjutnya campuran masing-masing variasi diambil 4 mL dan ditambahkan reagen tembaga (II) asetat sebanyak 1 mL lalu divorteks selama 1 menit. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 715 nm.

3.3.7 Optimasi produksi enzim lipase

Penentuan pH optimum untuk pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dilakukan pada pH 5, 6, 7, dan 8. Optimasi diawali dengan pembuatan media starter yang mengandung 0,5 ml minyak zaitun, 5 tetes metanol, 1 tetes Tween 80 dan 25 ml buffer fosfat 0,05 M pH 7. Isolat yang dipilih diambil sebanyak dua ose lalu dimasukkan ke dalam 25 mL starter kemudian diinkubasi pada shaker inkubator kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Sebanyak 2% starter dipindahkan ke media kultur (media fermentasi) lalu diinkubasi selama 72 jam. Aktivitas dan *Optical Density* (OD) diukur setiap 6 jam. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara menggabungkan data antara nilai absorbansi dan waktu inkubasi.

3.3.8 Produksi enzim lipase

Satu ose kultur isolat tunggal ditumbuhkan dalam 25 mL media inokulum dengan komposisi 2 mL minyak zaitun, 1 mL metanol, 2 tetes Tween 80 dalam 100 mL buffer fosfat pH 7 0,05M kemudian diinkubasi menggunakan inkubator kocok pada suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Sebanyak 2% inokulum kemudian dipindahkan secara aseptik ke dalam 500 mL media produksi lipase dengan komposisi yang sama, diinkubasi dalam inkubator kocok pada suhu ruang dengan kecepatan 110 rpm selama 36 jam. Sel dipisahkan dari ekstrak kasar enzim melalui sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit.

3.3.9 Pemurnian enzim

3.3.9.1 Fraksinasi dengan ammonium sulfat

Ekstrak kasar lipase difraksinasi dengan penambahan ammonium sulfat pada berbagai tingkat kejenuhan pada fraksi 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Caranya sebagai berikut: amonium sulfat dimasukkan secara perlahan ke dalam gelas piala yang berisi ekstrak lipase sambil diaduk dengan magnetik stirrer hingga terbentuk endapan. Ekstrak kasar lipase kemudian disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Endapan yang diperoleh dinamakan Fraksi (F1). F1 dilarutkan menggunakan buffer fosfat 0.01M dan disimpan pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan prosedur yang sama sehingga diperoleh F2, F3, F4, dan F5. Fraksi enzim dengan aktivitas tertinggi didialisis menggunakan kantong selofan (Saxena *et al.*, 2003).

3.3.9.2 Dialisis

Endapan protein terlarut dari fraksi dengan aktivitas tertinggi dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,005M pH 7 selama \pm 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis, dilakukan pergantian larutan buffer setiap 4-6 jam sekali untuk mengurangi konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis. Proses ini dilakukan terus menerus sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi

kandungan ion-ion garam di dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Apabila masih terdapat ion sulfat maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 .

3.3.10 Uji aktivitas enzim lipase

Pengukuran aktivitas enzim ekstrak kasar dilakukan dengan metode Kwon and Rhee (1986). Substrat yang digunakan dalam metode ini adalah minyak zaitun. Ekstrak kasar enzim sebanyak 0,7 mL ditambah dengan 0,35 mL buffer fosfat 0,05 M pH 6,5 dan 0,7 mL minyak zaitun. Campuran dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu 30°C selama 15 menit. Setelah proses inkubasi, ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana, dikocok dengan kuat lalu didiamkan selama 15 menit. Setelah terbentuk dua fase, fase minyak diambil sebanyak 2,5 mL kemudian ditambah n-heksana sebanyak 1,25 mL dan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% pH 6 lalu dikocok dengan kuat. Campuran pada bagian atas diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 715 nm.

3.3.11 Penentuan kadar protein

Jumlah protein enzim ditentukan dengan metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Sebanyak 0,1 ml enzim lipase ditambahkan ke dalam 0,9 ml akuades, kemudian ditambahkan 5 ml pereaksi C, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,5 ml pereaksi D dengan cepat. dihomogenkan dan dibiarkan dingin kemudian diamkan selama 30 menit, lalu diukur pada panjang gelombang maksimum 750 nm. Kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) digunakan untuk menentukan konsentrasi protein enzim.

3.3.12 Karakterisasi enzim

3.3.12.1 Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan menguji aktivitas enzim lipase menggunakan metode Kwon and Rhee pada pH yang bervariasi yaitu: 5, 6, 7, dan 8.

3.3.12.2 Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim lipase menggunakan metode Kwon and Rhee pada variasi suhu inkubasi 30, 35,40,45,50,55, dan 60°C.

3.3.12.3 Penentuan konsentrasi optimum metanol

Penentuan konsentrasi optimum metanol dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim lipase setelah ditambahkan metanol dengan variasi konsentrasi 25, 50,75, dan 100% .

3.3.13 Sintesis biodiesel secara enzimatik

3.3.13.1 Transesterifikasi pembuatan biodiesel

Transesterifikasi pembuatan biodiesel dilakukan dengan cara memasukkan minyak kelapa ke dalam labu leher tiga kemudian dipanaskan terlebih dahulu dengan enzim lipase 10% dari volume minyak pada suhu 35°C selama 1 jam agar enzim menghidrolisis minyak kelapa terlebih dahulu. Setelah itu ditambah metanol (perbandingan metanol-minyak 6:1) secara bertahap. Penambahan metanol secara bertahap akan mencegah inaktivasi enzim dan metanol dapat bereaksi secara perlahan dengan minyak. Campuran kemudian direaksikan selama 24 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan gliserol (lapisan bawah) dengan metil ester (lapisan atas) yang terbentuk. Metil ester yang diperoleh kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarut yang tercampur.

3.3.13.2 Analisis biodiesel menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GC-MS)

Analisis ini dilakukan untuk mengidentifikasi komponen apa saja yang menyusun produk tersebut dan untuk melihat apakah semua trigliserida yang terdapat pada minyak nabati telah diubah menjadi metil ester. Selain itu untuk menguji kelayakan biodiesel sebagai bahan bakar aplikasi, biodiesel hasil proses transesterifikasi dianalisis untuk menentukan beberapa parameter teknis meliputi titik nyala, viskositas, dan densitas berdasarkan SNI 7182:2015. Analisis dilakukan dengan cara mengirimkan sampel yang diperoleh ke laboratorium Universitas Negeri Semarang.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini, diperoleh kesimpulan sebagai berikut.

1. Identifikasi isolat bakteri menunjukkan uji positif *Pseudomonas* sp.
2. Aktivitas lipolitik *Pseudomonas* sp. lebih besar dengan penambahan metanol dibandingkan etanol.
3. Kondisi optimum pertumbuhan *Pseudomonas* sp. terjadi pada lingkungan media pertumbuhan pH 7 dan waktu inkubasi ke-36 jam.
4. Aktivitas enzim tertinggi diperoleh pada tahap fraksinasi dengan nilai aktivitas spesifik 43,6 U/mg.
5. Enzim lipase yang dihasilkan mampu mengkatalisis reaksi transesterifikasi minyak kelapa pada kondisi optimum pH 6, suhu 35°C, dan konsentrasi metanol 75% dengan aktivitas spesifik 22,76 U/mg.
6. Metil ester yang dihasilkan berdasarkan analisis produk transesterifikasi menggunakan GC-MS yaitu metil laurat, metil miristat, dan metil palmitat dengan jumlah relatif 4,6%; 1,53%; 1,11%.
7. Reaksi belum berlangsung dengan baik ditandai dengan banyaknya asam lemak penyusun minyak kelapa yang belum terkonversi menjadi metil ester.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh dan beberapa tahapan yang belum dilakukan pada penelitian ini, beberapa saran untuk penelitian selanjutnya sebagai berikut.

1. Identifikasi lebih lanjut *Pseudomonas* sp. menggunakan analisis gen 16S rRNA.
2. Menentukan kondisi optimum pertumbuhan *Pseudomonas* sp. dengan memvariasikan konsentrasi substrat.
3. Menentukan pengaruh variasi konsentrasi pelarut, konsentrasi enzim, suhu, dan waktu reaksi transesterifikasi terhadap jumlah metil ester yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandi, R.D.N., Aruan, T.R., Taslim, A. 2013. Produksi Biodiesel dari Lemak Sapi dengan Proses Transesterifikasi dengan Katalis Basa NaOH. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 2(1):1–6.
- Allimoun, O.M., Mayssa, R.A., and Khaled, M.K. 2015. Screening Selection and Optimization of Extracellular Methanol and Ethanol Tolerant Lipase from *Acinetobacter sp.* K5b4. *International Journal Biosciences*. 6(10):44–56.
- Amara, A. A., Salem, S. R and Shaheb, M. S. A. 2009. The possibility to use bacterial protease and lipase as biodetergent. *Global Journal Biotechnology and Biochemistry*. 4(2):104114.
- Amini, Z., Ong, H.C., Harrison, M.D., Kusumo, F., Mazaheri, H., dan Ilham, Z. 2017. Biodiesel Production By Lipase Catalyzed Transesterification of *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil) Seed Oil. *Energy Conversion and Management*. 132:8290.
- Arbianto, P. 1989. *Biokimia Konsep-Konsep Dasar*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Jakarta.
- Bornscheuer, U.T. 2003. Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts. *Angewandte Chemie International Edition*. 42(29):3336–3337.
- Buckle, K. A., Edwards, R. A., Fleet, G. H., and Wotton, M. 1987. *Ilmu Pangan*. Penerjemah Hari Purnomo dan Adiono. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Cao, W., Han., dan zhang, J. 2005. Preparation of Biodiesel from Soybean Oil Using Supercritical Methanol and Co-Solvent. *Fuel*. 8(4):347–351.
- Chakrabarty, S.L. and S. Sen. 1984. Amylase from *Lactobacillus* Isolate from Vegetables Wastes. *Journal of Fermentation Technology*. 62(5):407–413.
- Chaplin, J.P. 2004. *Kamus Lengkap Psikologi (Terjemahan Kartini Kartono)*. PT. Raja Grafindo persada. Jakarta.
- De Bont, J. 1998. Solvent-Tolerant Bacteria in Biocatalysis. *TIBTECH*. 16:493–499.

- Dossat, V., Combes, D. dan Marty, A. 1999. Continuous Enzymatic Transesterification of High Oleic Sunflower Oil in a Packed Bed Reactor: Influence of the Glycerol Production. *Enzyme and Microbial Technology*. 25(3-5):194–200.
- Duangsong, K. I. Khumhom, M. Anthachai, S. Iamsa-ard, S. Muangpool, S. Phornphisutthimas, S. Kongvittaya, T. Pharamard and Laloknam, S. 2002. Isolation of protease-producing bacteria 28th Congress Science and Technology of Thailand 342.
- Dwijoseputro, D. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Malang.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Freedman B., Pryde, E.H., and Mounts, T.L. 1984. Variables Affecting The Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 61(10):1638–1643.
- Freer, S.N. 1993. Purification and Characterization α -Amylase from *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(5):1398–1402.
- Fukuda, H., Kondo, A. dan Noda, H. 2001. Review Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92(5):405–416.
- Gupta, A. and Khare, S.K. 2009. Enzymes from Solvent-Tolerant Microbes: Useful Biocatalyst for Nonaqueous Enzymology. *Critical Reviews in Biotechnology*. 29(1):44–54.
- Hadioetomo, R. S. 1993. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek : Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Hantsis-Zacharov, E. and Halpern, M. 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(22):7162–7168.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. PT Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Hidayanti, N., Nurcahyanti, A., Rahmawati, J., A. Suryanto, dan Mahfud. 2015. Produksi Biodiesel dari Minyak Kelapa dengan Katalis Basa melalui Proses Transesterifikasi menggunakan Gelombang Mikro (*Microwave*). *Jurnal Teknik Kimia*. 10(1):13–18.
- Holt, JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, dan William ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Lippincott William and Wilkins. New York.

- Hun, C. J., Rahman R. N. Z. A., Salleh A. B., and Basri M., 2003. A Newly Isolated Organic Solvent Tolerant *Bacillus sphaericus* 205y Producing Organic Solvent-Stable Lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 15(2):147–151.
- Hussain, S. Z. dan Khushnuma, M. 2014. GC-MS: Principle, Technique, and its Application in Food Science. *International Journal Current Science*. 13(2):116–126.
- Inoue, A. and Horikoshi, K. 1989. A *Pseudomonas putida* Thrives in High Concentrations of Toluene. *Nature*. 338:264–266.
- Irianto, K. 2006. *Mikrobiologi: Mengungkap Dunia Mikroorganisme*. Yrama Media. Bandung.
- Isken, S., and De Bont, J. 1998. Active Efflux of Organic Solvents by *Pseudomonas putida* is Induced by Solvents. *Journal Bacteriology*. 180:6769–6772.
- Ismadi, M. 1998. *Biokimia*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Jaeger, K. E., Ransac S., Dijkstra B. W, Colson C., van Heuvel M., and Misset O. 1994. Bacterial Lipases. *FEMS Microbiology Reviews*. 15(1):29–63.
- Jaeger, K.E. and M.T. Reetz, 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16(9):396–403.
- Jaiganesh, R and Jaganathan, M.K. 2018. Isolation, Purification, and Characterization of Lipase from *Bacillus sp.* from Kitchen Grease. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 11:224–227.
- Judoamidjojo, M., Abdul , A.D., Endang, G.S., 1992. *Teknologi Fermentasi*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Kanjanavas P; Khuchareontaworn S; Khawsak P; Pakpitcharoen A; Pothivejkul K; Santiwatanakul S; Matsui K; Kajiwara T; Chansiri K. 2010. Purification and Characterization of Organic Solvent and Detergent Tolerant Lipase from Thermotolerant *Bacillus sp.* RN2. *International Journal Molecular Science*. 11(10):3783–3792.
- Klibanov AM. 1990. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Accounts of Chemical Research*. 23(4):114–120.
- Krawczyk, T. 1996. Biodiesel Alternative Fuel Makes Inroads but Hurdles Remain. *Inform*. 7:801–829.

- Krishnaveni, K., Kumar, D. J. M, Balakumaran, M. D, Ramesh, S and Kalaichelvan P. T. 2012. Production and Optimization of Extracellular Alkaline Protease from *Bacillus subtilis* Isolated from Dairy Effluent. *Der Pharmacia Lettre*. 4(1):98–109.
- Kumar, D. J., Rajan R, Lawrence. L, Priyadarsini. S, Sandhiyachittybabu and Kalaichelvan P. T. 2012. Destaining and Dehairing Capability of Partially Purified *Bacillus subtilis* Protease from Optimized Fermentation Medium. *Asian Journal Expression Biological Science*. 3(3):613–620.
- Lay, B. 1994. *Ansaktialisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lay, B. W. dan Sugyo,H. 1992. *Mikrobiologi*. Rajawali Pers. Jakarta.
- Lee, C. H. T.S. Lin and C.Y. Mou, 2009. Mesoporous materials for Encapsulating Enzymes. *Nanotoday*. 4(2):165–179.
- Lee, J.H, K.J.L. Choi, J.Y. Choi, Y.S. Lee, I.B. Kwon, and J.H. Yu. 1992. Enzymatic Production of Cyclomaltodextrin Glucanotransferase of *Klebsiella oxytoca* 19-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(12):1017–1020.
- Lehninger, A. L. 1995. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Lehninger, A. L.1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lemigas. 2005. *Naskah Akademik Rancangan Kebijakan Biodiesel*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Minyak dan Gas Bumi. Jakarta.
- Lim, D. 1998. *Microbiology 2nd Edition*. McGraw-Hill Book. New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. dan Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265–275.
- Malcata, F.X., H.R. Reyes, H.S. Garcia, C.G. Hill and C.H. Amundson. 1990. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils-A Review. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 67(12):890–910.
- Marchetti, J.M. and Errazu, A.F. 2008. Comparison of Different Heterogeneous Catalysts and Different Alcohols For The Etherification Reaction of Oleic Acid. *Fuel*. 87(15-16):3477–3480.
- Martoharsono dan Soeharsono. 1997. *Biokimia Jilid II*. UGM Press. Yogyakarta.

- Mateo, C., J.M. Palomo, G.F. Lorente, J.M. Guisan and R.F. Lafuente. 2007. Improvement of Enzyme Activity, Stability and Selectivity via Immobilization Techniques. *Journal of Enzyme and Microbiol Technology*. 40(6):1451–1463.
- Meher, L.C., D.V. Sagar, S.N. Naik. 2006. Technical Aspects of Biodiesel Production by Transesterification-a review. *Renewable Sustainable Energy Reviews*. 10(3):248–268.
- Momsia, T and Momsia, P., 2013. A Review on Microbial Lipase-Versatile Tool for Industrial Applications . *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2(4):2250–3137.
- Noiroj, K., P, Intarapong., A. Luengnaruemitchai, and S. Jai-In. 2009. A Comparative Study of KOH /Al₂O₃ and KOH/NaY Catalysts for Biodiesel Production via Transesterification from Palm Oil. *An International Journal Renewable Energy*. 34(4):1145–1150.
- Noureddini, H., Gao, H. dan Philkana R. S., 2004. Immobilized *Pseudeumonas cepacia* Lipase for Biodiesel Fuel Production from Soybean Oil. *Bioresource Technology*. 96(7):769–777.
- Olympia, M., H. Fukuda, H. Ono, Y. Kaneko, and M. Takano. 1995. Characterization and Hydrolyzing Lactic Acid Bacteria Isolated from A Fermented Fish and Rice Food “Burong Isda” and It’s Amylolytic Enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 80(2):124–130.
- Orten, J.M., and O.W. Neuhaus. 1970. *Biochemistry* 8th Ed. Mosby Company.. Saint Louis.
- Pabai F, Kermasha S, Morin A. 1995, Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: Partial Purification, Characterization and Interesterification of Butter fat. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 43(1):42–51.
- Page, D. S. 1989. *Prinsip-Prinsip Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Panagan, T. A. 2011. Isolasi Mikroba Penghasil Antibiotika dari Tanah Kampus UNSRI Indralaya Menggunakan Media Ekstrak Tanah. www.akademikunsri.ac.id. Jakarta. Diakses pada 18 Desember 2019.
- Prakash, M., Rajasekar and Karmegam, N. 2007. Bacterial Population of Raw Milk and their Proteolytic and Lipolytic Activities. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 3(6):848–851.
- Parwata, I .P., Mukhamad Asyari and Rukman Hertadi. 2014. Organic Solvent-Stable Lipase from Moderate Halophilic Bacteria *Pseudomonas stutzeri* Isolated from the Mud Crater of Bleduk Kuwu, Central Java, Indonesia. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 8(1):31–40.

- Parwata, I. P., dan Sukarta, I N. 2013. Lipase Stabil Pelarut Organik dari Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali. *Prosiding Seminar Nasional Riset Inovatif I*. 573–579.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D., Castro, G. R. 2006. Catalytic Properties of Lipase Extracts From *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2):247–252
- Pereira, E.B, Castro,H.F, Morais, F.F, Zanin, G.M. 2001. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: a Comparative Study Between Free and Enzyme Immobilized Aonto Porous Chitosan Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 91-93:739–752.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Pratiwi, D., Firman, S., dan It, J. 2013. Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung Serta Kofaktor Na^+ dan Co^{2+} . *Jurnal Sainia Kimia*. 1(2):1–5.
- Pulido, I.Y., Erlide P., Gilles P., Lina, and Carlos,A..J. 2020. Functional Heterologous Expression of Mature Lipase LipA from *Pseudomonas aeruginosa* PSA01 in *Escherichia coli* Shuffle and BL21 (DE3): Effect of the Expression Host on Thermal Stability and Solvent Tolerance of the Enzyme Produced. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:1-19.
- Rahman, R.N., Baharum, S.N., Basri, M., Salleh, A.B. 2005. High-yield purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas* sp. strain S5. *Analytical Biochemistry*. 341(2):267–274.
- Rahman, A. R. N. Z. R., Kamarudin, N. H. A., Yunus, J., Salleh, A. B., Basri, M., 2010. Expression of an Organic Solvent Stable Lipase From *Staphylococcus epidermidis* AT2. *International Journal of Molecular Science*. 11:3195–3208.
- Rao, S.N.S. 1994. *Mikroorganisme Tanah dan Pertumbuhan Tanaman*. UI Press. Jakarta.
- Rodwell, V.W.1987. *Harper's Review of Biochemistry*. EGC Kedokteran. Jakarta.

- Saeid, M., Arastoo, B.D., and Zahra, K. 2018. Biochemical Characterization of a Novel Cold-Active, Halophilic, and Organic Solvent-Tolerant Lipase from *B. licheniformis* KM12 with Potential Application for Biodiesel Production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 109:389–398.
- Salwoom, L., Rahman, R.N., Saleh AB., Shariff, F.M., Peter, C., Ali, M.S.M. New Recombinant Cold-Adapted and Organic Solvent Tolerant Lipase from Psychrophilic *Pseudomonas* sp. LSK25 Isolated from Signy Island Antarctica. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(1–21).
- Saktiwansyah, E. 2001. Karakterisasi Enzim Lipase Intraselular dengan Aktivitas Esterifikasi dari Kapang *Rhizopus oryzae* Tr 32. *Tesis*. IPB. Bogor.
- Samad, M.Y.A., C. Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Yunus, W.M., Ampon, K., and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 9(1):51–56.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B. & Davidson, W.S. 2003. Purification Strategies for Microbial Lipases. *Journal of Microbiological Methods*. 52 (1):1–18.
- Schmidt, R.D. C. Schmid-Dannert, C. M.L. Rua. S.Wahl. and A. Sprauer. 1997. Thermoalkalophilic Lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large Scale Production, Purification and Properties: Aggregation Behaviour and its Effect on Activity. *Journal of Biotechnology*. 56(2):89–102.
- Schmidt, R.D. S.Minning and C. Schmid-Dannert. 1998. Functional Expression of *Rhizopus oryzae* Lipase in *Pichia Pastoris* : High-Level Production and Some Properties. *Journal of Biotechnology*. 66(2-3):147–156.
- Seniwati, Dali1, Abd. Rauf Patong1, M. Noor Jalaluddin1, A.P. Pirman, 2010 Pengaruh Substrat dan Ion Logam Terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* Pada Kopro Berjamur. *Tesis*. UNHAS, Makassar.
- Shariff M. F; Zaliha R. N; Rahman R. A; Basri M; dan Salleh A. B. 2011. A Newly Isolated Thermostable Lipase from *Bacillus* sp. *International Journal Molecular Sciences*. 12(5):2917–2934.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee U.C. 2001. Production, Purification, Characterization and Application of Lipases. *Biotechnology Advances*. 19(8):627–662.
- Shivsharan, V. S., Wani, M. P and Kulkarani. 2013. Isolation of Microorganism from Dairy Effluent for Activated Sludge Treatment. *International Journal of Computational Engineering Research*. 3(3):161–167.

- Sikkema, J., De Bont, J.A., and Poolman, B. 1994. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 269(1):8022–8028.
- Sikkema, J., De Bont, J.A., and Poolman, B. 1995. Mechanisms of Solvent Toxicity of Hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59(2):201–222.
- Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Sagung Seto. Jakarta.
- Soedigdo. 1988. *Metode Penelitian Biokimia*. PAU Bioteknologi Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Su'I M., and Suprihana. 2013. Lipase Fractionation of Coconut Endosperm by Salting Out Method. *Agritech*. 33(4):377–383.
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty Yogyakarta. Yogyakarta.
- Sunaryanto, R dan Kaseno. 2004. Pemisahan Enzim Glukoamilase dari Kaldu Fermentasi Menggunakan Membran Ultrafiltrasi. *Prosiding Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses*. ISSN:1411–4216.
- Susanty A; Sukartin, Fitriani, Candra K.P. (2013). Produksi Biodiesel dari Crude Palm Oil Menggunakan Katalis Enzim Lipase *Pseudomonas Fluorescens* Amobil. *Journal of Industrial Research*. 7(2):111–118.
- Suyono, S. dan Farid, S. 2011. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* pada Tanah yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal Biopropal Industri*. 2(1):1–2.
- Syamsudin, Purwanti, S dan Taufick, A. 2008. Efektivitas Aplikasi Enzim dalam Sistem Lumpur Aktif pada Pengolahan Air Limbah Pulp dan Kertas. *Berita Selulosa*. 43(2):83–92.
- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Substitute dan Karakterisasi Lipasenyanya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*. ISBN: 978-602-97522-0-5.
- Tielen P, F. Rosenau, S. Wilhelm, K.E. Jaeger, H.C. Flemming, J. Wingender. 2010. Extracellular Enzymes Affect Biofilm Formation of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 156(7):2239–2252.
- Tupufia, S.C., Young, J., Christopher, M., Adesoji A.A., and Peter L. Rogers. 2013. Enzymatic Conversion of Coconut Oil for Biodiesel Production. *Fuel Processing Technology*. 106:721–726.
- Waluyo, L. 2004. *Mikrobiologi umum*. Penerbit Universitas Muhammadiyah Malang. Malang.

- Wang, Y, Srivastava, KC, Shen, GJ and Wang, HY. 1995. Thermostable Alkaline Lipase from a Newly Isolated Thermophilic *Bacillus* Strain, A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79(5):433–438.
- Wehtje, E. dan Adlercreitz, P. (1997). Water Activity and Substrat Concentration Effect on Lipase Activity. *Biotechnology and Bioengineering*. 55(5):798–806.
- Winarno, F. G. 1986. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Winarno, F.G. 1983. *Kimia Pangan*. PT Gramedia. Jakarta.
- Wirahadikusumah, M. 2001. *Biokimia Protein Enzim dan Asam Nukleat*. Penerbit ITB. Bandung.
- Wolfe, S. L. 1993. *Mollecular and Cellular Biology*. Wadsworth Publishing Company. California.
- Zhang, K.P., Lai, J.Q., Huang ZL, Yang Z. 2011. Penicillium Expansum Lipase-Catalyzed Production of Biodiesel in Ionic Liquids. *Bioresource Technology*. 102(3):2767–2772.
- Zhang, L., Sun, S., Xin, Z., Sheng, B., dan Liu, Q. 2010. Synthesis and Component Confirmation of Biodiesel from Palm Oil and Dimethyl Carbonate Catalyzed by Immobilized-Lipase in Solvent-Free System. *Fuel*. 8(12):3960–3965.
- Zhao, X.S., X.Y. Bao, W. Guo and F.Y. Lee. 2006. Immobilizing Catalysts on Porous Materials. *Materials Today*. 9(3):32–39.