

**PENGOPTIMALAN KONDISI AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI
LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp. UNTUK PRODUKSI
BIODIESEL**

(Skripsi)

Oleh

RISNA MILENIA WIDYA UTAMI



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

ABSTRAK

PENGOPTIMALAN KONDISI AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp. UNTUK PRODUKSI BIODIESEL

Oleh

Risna Milenia Widya Utami

Saat ini, enzim banyak dimanfaatkan untuk berbagai produk komersial karena bersifat selektif, efisien, dan ramah lingkungan. Salah satu enzim yang sering digunakan adalah enzim lipase yang berasal dari bakteri. Lipase memiliki kemampuan untuk mengkatalisis beberapa reaksi sintesis seperti hidrolisis, esterifikasi, dan transesterifikasi. Pada penelitian ini dilakukan untuk mempelajari lipase yang dihasilkan dari *Klebsiella* sp. mengenai kemampuannya sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi untuk produksi biodiesel. Penelitian ini dilakukan bertahap, yaitu dengan menentukan kondisi optimum pertumbuhan bakteri, produksi enzim, pemurnian ekstrak kasar enzim, penentuan karakteristik enzim hasil pemurnian, dan penggunaan untuk produksi biodiesel. Pada tahap penentuan kondisi optimum pertumbuhan isolat *Klebsiella* sp. didapatkan waktu inkubasi optimum pada jam ke-48 pada media minyak zaitun dengan pH optimum pH 7. Produksi enzim menghasilkan ekstrak kasar dengan aktivitas spesifik 2,52 U/mg. Ekstrak kasar yang dimurnikan secara bertahap menghasilkan enzim murni dengan tingkat kemurnian sebesar 12,54 kali. Aktivitas optimum dari enzim lipase murni berada pada pH 7, suhu 80°C, dan waktu inkubasi selama 25 menit. Produksi biodiesel menggunakan katalis enzim lipase dari *Klebsiella* sp. pada reaksi transesterifikasi minyak kelapa dan metanol yaitu dengan variasi rasio molar 1:3, 1:4, dan 1:5 memberikan nilai uji densitas dan viskositas kinematik yang relatif baik pada perbandingan 1:3 dengan nilai sebesar 876 kg/m³ dan 2,403 × 10⁻⁶ m²/s. Hasil analisis GC-MS dari reaksi transesterifikasi menunjukkan jumlah relatif metil ester tertinggi pada rasio molar 1:4.

Kata kunci: enzim lipase, *Klebsiella* sp., transesterifikasi, biodiesel, katalis

ABSTRACT

OPTIMIZING THE CONDITIONS OF LIPASE TRANSESTERIFICATION ACTIVITY FROM *Klebsiella* sp. FOR PRODUCTION BIODIESEL

By

Risna Milenia Widya Utami

Currently, enzymes are widely used for various commercial products because they are selective, efficient, and environmentally friendly. One of the enzymes that are often used is the lipase enzyme derived from bacteria. Lipase has the ability to catalyze several synthesis reactions such as hydrolysis, esterification, and transesterification. This research was conducted to study lipase produced from *Klebsiella* sp. regarding its ability as a catalyst in the transesterification reaction for biodiesel production. This research was carried out in stages, namely by determining the optimum conditions for bacterial growth, enzyme production, purification of crude enzyme extracts, determining the characteristics of the purified enzymes, and using them for biodiesel production. At the stage of determining the optimum conditions for the growth of *Klebsiella* sp. The optimum incubation time was obtained at 48 hours in olive oil media with an optimum pH of pH 7. Enzyme production resulted in a crude extract with a specific activity of 2.52 U/mg. The purified crude extract gradually produced pure enzymes with a purity level of 12.54 times. The optimum activity of pure lipase enzyme is at pH 7, temperature 80°C, and incubation time is 25 minutes. Biodiesel production using the lipase enzyme catalyst from *Klebsiella* sp. in the transesterification reaction of coconut oil and methanol, namely with variations in molar ratios of 1:3, 1:4, and 1:5 gave relatively good kinematic density and viscosity test values at a ratio of 1:3 to value of 876 kg/m³ and 2.403 × 10⁻⁶ m²/s. The results of the GC-MS analysis of the transesterification reaction showed the highest relative amount of methyl ester at a molar ratio of 1:4.

Keywords: lipase enzyme, *Klebsiella* sp., transesterification, biodiesel, catalyst

**PENGOPTIMALAN KONDISI AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI
LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp. UNTUK PRODUKSI
BIODIESEL**

Oleh

Risna Milenia Widya Utami

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
2023**

Judul : **PENGOPTIMALAN KONDISI AKTIVITAS
TRANSESTERIFIKASI LIPASE DARI BAKTERI
Klebsiella sp. UNTUK PRODUKSI BIODIESEL**

Nama : **Risna Milenia Widya Utami**

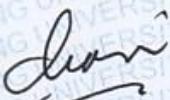
NPM : **1817011045**

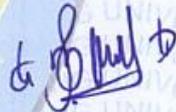
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing


Dr. Dian Herasari, M.Si.
NIP. 197108062000032001


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

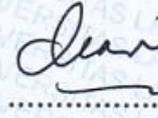
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

I. Tim Penguji

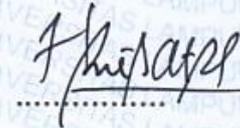
Ketua : Dr. Dian Herasari, M.Si.



Sekretaris : Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.



Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.



2. Plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 29 Maret 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Risna Milenia Widya Utami
NPM : 1817011045
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“PENGOPTIMALAN KONDISI AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp. UNTUK PRODUKSI BIODIESEL”** adalah benar karya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga 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 untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 02 Mei 2023

Menyatakan,



Risna Milenia Widya Utami

NPM. 1817011045

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Risna Milenia Widya Utami, dilahirkan di Warnasari, Pesawaran pada tanggal 08 Juli 2000. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara, putri dari pasangan Bapak Widiyo dan Ibu Elia Mustika. Penulis mengawali jenjang pendidikan dari Taman Kanak-Kanak Aisyiyah yang diselesaikan pada tahun 2006. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 1 Gaya Baru II pada tahun 2012, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMPN 1 Seputih Surabaya yang diselesaikan pada tahun 2015 dan pada tahun 2018 penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Seputih Surabaya. Pada tahun 2018, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) yang diselesaikan pada tahun 2023.

Selama menempuh pendidikan sebagai mahasiswa di Universitas Lampung, penulis aktif dalam kegiatan organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2018, dan kemudian menjadi anggota Biro Penerbitan dari Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada periode 2019. Pada tahun 2021, penulis melakukan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Gaya Baru, Kec. Seputih Surabaya, Kab. Lampung Tengah dan menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Pada tahun 2022, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia dan Biokimia Kelas Biologi. Kemudian sebagai bentuk aplikasi bidang ilmu di dunia kerja, penulis telah menyelesaikan Skripsi yang berjudul “Pengoptimalan Kondisi Aktivitas Transesterifikasi Lipase Dari Bakteri *Klebsiella* sp. Untuk Produksi Biodiesel”.

MOTTO

“Cukuplah Allah menjadi Penolong kami dan Allah adalah sebaik-baik Pelindung.”

[Ali Imran:173]

“Allah SWT. tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kemampuannya.”

[Al-Baqarah:286]

“If you can't be a good person, then don't be a bad person.”

[Syekh Ali Jaber]

“Sendiri tapi pelan-pelan bergerak lebih baik daripada ramai-ramai tapi sekedar berteriak”

[Boy Candra]

“Ga semua yang kita rencanakan akan terjadi seperti yang kita inginkan, kita cuma bisa berusaha, berdoa, dan bersabar. Tunggu aja waktunya akan tiba.”

[Ibu]

“Lakukan yang kita bisa lakukan di masa kini dengan sebaik-baiknya, karena mungkin kesempatan tidak akan datang untuk yang kedua.”

“Pada akhirnya, ini semua hanyalah permulaan”

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang

Dengan mengucap *Alhamdulillah rabbil 'alamin* atas ridho Allah dengan segala rasa syukur kupersembahkan karya kecil ini kepada:

Keluargaku tercinta

Bapak Widiyo, Ibu Elia Mustika, dan Adikku tersayang yang selalu mendoakan dan mendukung penulis.

Dengan rasa hormat kepada:

Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., dan Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. serta seluruh dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membimbing dan memberikan ilmu serta nasehatnya hingga penulis mencapai gelar sarjana.

Sahabat-sahabatku dan semua orang baik yang telah mendukung dan memberikan semangat kepada penulis.

Almamater Universitas Lampung

Dan untuk diriku sendiri yang telah mampu melewati semuanya sampai di titik ini, *kamu hebat Na.*

Ku Persembahkan Skripsi Ini Untuk Yang Selalu Bertanya:

“Kapan skripsimu selesai?”

Terlambat lulus atau lulus tidak tepat waktu bukanlah sebuah kejahatan, bukan pula sebuah aib. Alangkah kerdilnya jika mengukur kecerdasan seseorang hanya dari siapa yang paling cepat lulus. Bukankah sebaik-sebaiknya skripsi adalah skripsi yang selesai?

Karena mungkin ada suatu hal dibalik terlambatnya mereka lulus, dan percayalah alasan saya disini merupakan alasan yang sepenuhnya baik.

SANWACANA

Alhamdulillah Segala puji bagi Allah SWT. atas segala rahmat, nikmat dan ridho-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Pengoptimalan Kondisi Aktivitas Transesterifikasi Lipase dari Bakteri *Klebsiella* sp. untuk Produksi Biodiesel**’ sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat penulis lalui berkat rahmat dan ridho Allah SWT. serta bantuan dan dukungan dari orang-orang terdekat penulis. Maka dari itu, pada kesempatan ini sebagai wujud rasa hormat penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada:

1. Ayah dan Ibu yang telah melimpahkan kasih sayang dan doa. Serta segala kesabaran, keikhlasan, dan perjuangan untuk mendukung Penulis agar dapat sampai di titik ini. Ayah dan Ibuku, semoga kalian diberi kesehatan, umur yang panjang, serta keberkahan di dalamnya, dilancarkan rezekinya, dan kebaikan kalian dapat dibalas oleh Allah SWT, aamiin.
2. Adikku, Chelsian Adyatama, terimakasih telah membanggakan ayah dan ibu. Semoga selanjutnya aku juga bisa terus mendukung dan menjadi teman yang lebih baik buatmu. Semoga Allah SWT. memberikan jalan terbaik untuk hidupmu dan kebaikanmu dibalas oleh-Nya, aamiin.
3. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I, yang selalu memberikan bimbingan, ilmu, nasehat, semangat, saran, motivasi, serta meluangkan waktu, pikiran, tenaga dan kesabaran kepada Penulis selama proses penyelesaian skripsi ini. Semoga segala kebaikan Ibu dibalas oleh Allah SWT. serta dimudahkan segala urusannya, aamiin.

4. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Dosen Pembimbing II yang juga selalu memberikan ilmu dan meluangkan waktu untuk membimbing Penulis dengan sabar dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Ibu selalu sehat serta diberikan keberkahan dalam setiap langkahnya, aamiin.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan ilmu, bantuan, motivasi, kritik, dan saran yang membangun sehingga Penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga bapak selalu diberikan nikmat sehat dan nikmat iman dari Allah SWT. serta diberikan keberkahan dalam setiap langkahnya, aamiin.
6. Bapak Prof. Sutopo Hadi, M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah meluangkan waktu serta memberikan bimbingan, nasehat, dan saran kepada Penulis.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan bimbingan dan ilmu secara akademik maupun non-akademik, motivasi, dan segala pengalaman kepada penulis selama perkuliahan.
9. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., sebagai Plt. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
10. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas waktu dan pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
11. Sahabat-sahabatku, Olivia Novianti, Rista Anggi Pramudia, Ramah Nia Faliha, dan Ofriani Fatrika. Terima kasih atas kerja sama, kesabaran, dorongan semangat, hiburan, kepedulian, dukungan, serta waktu yang diluangkan untuk mendengar keluh kesah Penulis. Semoga kita bisa sukses bersama dan bertemu kembali di keadaan yang lebih baik dari saat ini.
12. Untuk laki-laki yang saat ini sedang bersamaku, terimakasih sudah menghibur, memberikan dukungan dan semangat, tempat cerita sedih ataupun senang, dan lainnya yang tidak bisa diungkapkan. Semoga diberi kesehatan, kebahagiaan, semoga cepat bertemu. (Muhammad Rayhan Nanda).

13. Kakak tingkat satu bimbingan penelitian, Firyal Humaira Arif, S.Si, Grace Sondang Pretti, S.Si., Arifa Rahmatika Salsabila, S.Si., dan Indah Parwati, S.Si., terimakasih atas ilmu dan saran yang diberikan kepada penulis selama mengerjakan penelitian ini.
14. Teman satu Laboratorium penulis, Olivia, Vivi, Raifar, Ecan, Lily, Dwi, Lupia, Salsa, Aulia, Vei, Beta, dan April, terimakasih untuk kebersamaan, kerjasama, dan bantuannya selama penelitian sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
15. Teman-teman Kimia angkatan 2018, terimakasih telah kebersamai selama kurang lebih 4 tahun di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
16. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang sudah membantu dalam hal penelitian ataupun penyusunan skripsi ini, terimakasih.

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 Allah SWT. selalu memberi kita nikmat sehat, kelancaran, serta kemudahan dalam segala urusan, Aamiin.

Bandar Lampung, 02 Mei 2023
Penulis,

Risna Milenia Widya Utami

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 <i>Klebsiella</i> sp.....	6
2.2 Enzim	7
2.3 Enzim Lipase	13
2.3.1 Sifat-Sifat Enzim Lipase.....	17
2.3.2 Sumber Enzim Lipase.....	18
2.4 Aplikasi Enzim Lipase	19
2.5 Biodiesel	22
2.5.1 Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Transesterifikasi.....	24
III. METODE PENELITIAN.....	26
3.1 Waktu dan Tempat	26
3.2 Alat dan Bahan.....	26
3.3 Prosedur Penelitian	27
3.3.1 Tahap Persiapan.....	27
3.3.2 Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri	28

3.3.3	Produksi Enzim Lipase	28
3.3.4	Pemurnian Enzim Lipase	29
3.3.4.1	Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	29
3.3.4.2	Dialisis	29
3.3.4.3	Kromatografi Filtrasi Gel	30
3.3.5	Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase	31
3.3.5.1	Penentuan pH Optimum	31
3.3.5.2	Penentuan Suhu Optimum	31
3.3.5.3	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum.....	31
3.3.6	Penentuan Aktivitas Enzim Lipase.....	32
3.3.6.1	Uji Aktivitas Transesterifikasi Enzim Lipase.....	32
3.3.6.2	Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase	33
3.3.7	Produksi Biodiesel.....	33
3.3.8	Karakterisasi Sampel Biodiesel.....	34
3.3.8.1	Analisis Densitas	34
3.3.8.2	Analisis Viskositas.....	35
3.3.8.3	Analisis Kromatografi <i>Gass Chromatography - Mass Spectrophotometry</i> (GC-MS)	35
3.4	Skema Penelitian.....	37
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1	Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri	38
4.1.1	Waktu Inkubasi dan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	38
4.1.2	pH Optimum Pertumbuhan Bakteri.....	40
4.2	Produksi Enzim Lipase	41
4.3	Pemurnian Enzim Lipase	42
4.3.1	Fraksinasi Amonium Sulfat dan Dialisis	42
4.3.2	Kromatografi Filtrasi Gel	44
4.4	Kondisi Optimum Enzim Lipase Hasil Pemurnian.....	47
4.4.1	pH Optimum.....	47
4.4.2	Suhu Optimum.....	48
4.4.3	Waktu Inkubasi Optimum	50
4.5	Produksi Biodiesel	51

4.5.1 Produksi Biodiesel dengan Reaksi Transesterifikasi.....	51
4.5.2 Uji Densitas	52
4.5.3 Uji Viskositas	54
4.5.4 Analisis Biodiesel menggunakan GC-MS.....	55
V. KESIMPULAN DAN SARAN	62
5.1 Kesimpulan	62
5.2 Saran	63
DAFTAR PUSTAKA	64
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penggunaan enzim dalam industri	21
2. Aktivitas enzim lipase pada setiap tahap pemurnian	47
3. Komposisi asam lemak pada minyak kelapa (Barco)	52
4. Perbandingan nilai standar SNI densitas dan viskositas kinematik biodiesel dengan nilai sampel hasil transesterifikasi dengan katalis enzim lipase.....	56
5. Identifikasi produk transesterifikasi rasio molar 1:3 dengan menggunakan MS	58
6. Identifikasi produk transesterifikasi rasio molar 1:4 dengan menggunakan MS	59
7. Identifikasi produk transesterifikasi rasio molar 1:5 dengan menggunakan MS	60
8. Perbandingan metil ester pada rasio molar 1:3, 1:4, dan 1:5	60
9. Hubungan nilai OD (<i>Optical Density</i>) dan aktivitas enzim (U/mL) dengan waktu inkubasi (jam).....	74
10. Nilai aktivitas unit pada penentuan pH optimum produksi enzim.....	74
11. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat pada berbagai fraksi dengan aktivitas enzim lipase dari <i>Klebsiella</i> sp.	75
12. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat fraksi 0-20% dan 20-90% dengan aktivitas enzim lipase dari <i>Klebsiella</i> sp.....	75
13. Nilai A ₂₈₀ enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel	76
14. Hubungan fraksi dengan nilai aktivitas enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel	77
15. Pengaruh pH pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase	78
16. Pengaruh suhu pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase.....	78
17. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase.....	78
18. Nilai Densitas	79
19. Nilai Viskositas Kinematik	81
20. Absorbansi BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	84

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Isolat bakteri <i>Klebsiella</i> sp.	7
2. Hubungan aktivitas enzim dengan pH.....	9
3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu	10
4. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi enzim.....	11
5. Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal reaksi yang dikatalisis oleh enzim	12
6. Mekanisme reaksi esterifikasi	15
7. Reaksi transesterifikasi lipid.....	15
8. Reaksi hidrolisis lipid	17
9. Biodiesel dan gliserol menggunakan katalis basa dan katalis enzim	22
10. Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.....	30
11. Diagram Alir Penelitian	37
12. Hubungan aktivitas unit dan OD terhadap waktu inkubasi pada kurva pertumbuhan bakteri.....	39
13. pH optimum pertumbuhan bakteri <i>Klebsiella</i> sp	41
14. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (%) dengan aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase	42
15. Hubungan antara tingkat kejenuhan amonium sulfat (%) dengan aktivitas spesifik (U/mg) pada fraksi (0-20%) dan (20-90%)	43
16. Hubungan antara A ₂₈₀ dengan nilai aktivitas unit enzim (U/mL) hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.....	45
17. Pengaruh pH pada aktivitas enzim lipase dalam reaksi transesterifikasi.....	47
18. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase dalam reaksi transesterifikasi	49
19. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase dalam reaksi transesterifikasi	50
20. Hubungan rasio molar sampel biodiesel dengan nilai densitas.....	53
21. Hubungan rasio molar sampel biodiesel dengan nilai viskositas kinematik...54	

22. Kromatogram GC produk hasil transesterifikasi rasio molar 1:3	56
23. Kromatogram GC produk hasil transesterifikasi rasio molar 1:4	56
24. Kromatogram GC produk hasil transesterifikasi rasio molar 1:5	56
25. Spektroskopi Massa Metil Oktanoat Sampel 1:3	82
26. Spektroskopi Massa Metil Laurat Sampel 1:3	82
27. Spektroskopi Massa Metil Laurat Sampel 1:4	82
28. Spektroskopi Massa Metil Oktanoat Sampel 1:5	83
29. Spektroskopi Massa Metil Laurat Sampel 1:5	83
30. Kurva Standar BSA.....	84

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Saat ini, perkembangan enzim sedang mengalami pertumbuhan yang pesat dan menempati posisi penting dalam industri. Penggunaan enzim sebagai biokatalisator yang efisien, selektif, mengkatalisis reaksi tanpa produk samping, dan ramah lingkungan menjadikan enzim sebagai salah satu faktor utama dalam pengembangan industri. Kemajuan dalam bioteknologi, rekayasa genetika, teknologi fermentasi, dan aplikasi enzim telah menyebabkan meluasnya penggunaan enzim, terutama dalam bidang industri (Putri, 2012).

Menurut Sharma (2001), total pasokan enzim di dunia masih didominasi oleh negara Eropa, volume produksi enzim dunia juga terus meningkat sejak tahun 2002. Eropa memproduksi sekitar 60% dari semua enzim yang sebagian besar adalah enzim hidrolitik, seperti amilase, selulase, protease, dan lipase. Produksi lipase pada tahun 2008 hanya sekitar 21% dari total jumlah enzim yang diproduksi di dunia. Salah satu enzim yang banyak digunakan untuk diaplikasikan secara komersial dalam proses industri adalah enzim lipase yang berperan dalam hidrolisis substrat polipeptida. Enzim lipase yang berasal dari bakteri banyak digunakan dalam berbagai bidang industri seperti industri detergen, tekstil, makanan, susu, kosmetik, dan farmasi (Sirisha *et al.*, 2010).

Aplikasi dalam industri membutuhkan lipase yang dapat diproduksi dalam kapasitas besar dan aktivitas yang tinggi dengan biaya produksi yang ekonomis. Banyak jenis mikroorganisme dapat menghasilkan lipase yang potensial untuk keperluan industri. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengembangkan lipase, khususnya dari mikroorganisme yang menghasilkan enzim dengan karakteristik yang unik untuk memenuhi kebutuhan industri.

Seiring meningkatnya kebutuhan akan energi menyebabkan penggunaan dan konsumsi energi dari minyak bumi semakin tinggi, serta cadangan minyak bumi juga semakin berkurang. Selain berkurangnya cadangan 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 upaya untuk mengatasi masalah kelangkaan energi yaitu dengan mengembangkan sumber energi alternatif. Oleh karena itu, diperlukan sumber energi alternatif yang dapat diperbaharui dan ramah bagi lingkungan.

Salah satu jenis energi alternatif yang sedang banyak dikembangkan saat ini adalah bioenergi, yaitu jenis energi yang dapat diperoleh dengan mengolah biomassa menjadi biodiesel, bioetanol, dan biogas sebagai sumber energi alternatif. Tujuannya yaitu untuk mengurangi viskositas dan meningkatkan daya pembakaran minyak, sehingga dapat memenuhi syarat sebagai bahan bakar alternatif. Biodiesel umumnya didefinisikan sebagai ester monoalkil dari tumbuhan dan lemak hewan sebagai bahan bakar alternatif yang berpotensi untuk digunakan sebagai pengganti solar karena sifatnya yang mirip. Selain itu, biodiesel yang diperoleh dari minyak nabati adalah bahan bakar yang dapat diperbaharui (*renewable*), mudah diproses, harganya relatif stabil, tidak menghasilkan polusi yang berbahaya bagi lingkungan, dan mudah terurai secara alami (Wijaya, 2011).

Biodiesel dapat diproduksi melalui proses transesterifikasi, yaitu dengan mengubah trigliserida menjadi metil ester dan gliserol. Pada umumnya, reaksi transesterifikasi menggunakan katalis yang bersifat asam atau basa (Haryanto, 2002). Namun, penggunaan asam atau basa sebagai katalis memiliki kekurangan seperti pemulihan katalis dan gliserol yang sulit dan membutuhkan banyak air untuk pencucian residu katalis. Penggunaan enzim sebagai katalis dalam reaksi transesterifikasi dapat mengatasi kekurangan tersebut. Enzim sebagai katalis memiliki beberapa keunggulan, yaitu biaya pengolahan limbah yang rendah, konversi yang tinggi, dapat bereaksi pada kondisi suhu moderat, rasio alkohol

terhadap minyak yang rendah, dapat digunakan pada kadar FFA (*free fatty acid*), dan pemulihan produk yang lebih mudah (Dean, 2012).

Dalam beberapa tahun terakhir telah banyak dikembangkan produksi biodiesel secara enzimatik dengan menggunakan katalis enzim lipase. Enzim lipase sebagai biokatalis dapat mengarahkan reaksi secara spesifik ke arah produk tanpa terjadinya reaksi samping yang tidak diinginkan. Biokatalis ini adalah katalis heterogen, sehingga pemisahannya dari produk setelah reaksi berakhir dapat dilakukan dengan mudah (Bajaj *et al.*, 2010). Enzim lipase dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi untuk sintesis biodiesel. Enzim lipase dapat diperoleh dari bakteri yang memiliki sifat lipolitik, yaitu bakteri yang memiliki kemampuan untuk memecah atau menghidrolisis lemak, fosfolipid, dan turunannya (Winarno, 2008). Salah satu bakteri yang bersifat lipolitik adalah bakteri *Klebsiella* sp. yang banyak terdapat di selaput lendir, mulut, dan usus sebagai flora normal, tetapi habitat alaminya terdapat di tanah (Syarurachman dkk., 1993).

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

Seiring dengan kemampuan enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella* sp. untuk mengkatalisis reaksi transesterifikasi lemak, maka perlu dilakukan penentuan kondisi optimum pada enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. Penentuan kondisi optimum ini dilakukan untuk menentukan pH, suhu, waktu inkubasi optimum, dan aktivitas enzim lipase yang tinggi. Kemudian, enzim lipase hasil optimasi dapat digunakan sebagai katalis untuk produksi biodiesel pada campuran minyak kelapa dan metanol untuk menguji aktivitas transesterifikasinya, lalu didapatkan nilai aktivitas transesterifikasi lipase yang tinggi, dan enzim dapat digunakan secara luas dalam bidang industri, serta meningkatnya pengetahuan tentang enzim lipase sebagai katalis dalam proses produksi biodiesel.

Penelitian ini akan menggunakan isolat bakteri hasil isolasi dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian Firyal (2022) menunjukkan bahwa lipase dari *Klebsiella* sp. mempunyai aktivitas hidrolisis optimum sebesar 21,86 U/mL pada pH 7, suhu 80°C, dan waktu inkubasi 25 menit. Tetapi belum diketahui aktivitas esterifikasi dan transesterifikasi dari lipase tersebut. Dari latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum lipase dari bakteri *Klebsiella* sp., hasil uji transesterifikasi, serta aktivitas transesterifikasi untuk produksi biodiesel dengan katalis lipase.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menentukan karakteristik enzim lipase berdasarkan kondisi optimum (pH, suhu, dan waktu inkubasi) dari bakteri *Klebsiella* sp.
2. Menentukan kurva pertumbuhan dengan aktivitas transesterifikasi lipase.
3. Menentukan aktivitas optimum transesterifikasi lipase
4. Memperoleh biodiesel melalui reaksi transesterifikasi yang dikatalisis oleh 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 dari bakteri *Klebsiella* sp., kemampuan enzim lipase untuk mengkatalisis reaksi transesterifikasi berdasarkan uji kualitatif dan kuantitatif yang diperoleh, serta dapat digunakan sebagai katalis dalam produksi biodiesel dan bidang industri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella* sp.

Klebsiella sp. pertama kali diteliti dan diberi nama oleh *bacteriologist* Jerman yang bernama Edwin J. Klebs (1834-1913). *Klebsiella* sp. merupakan genus bakteri gram-negatif dengan kapsul yang terbuat dari polisakarida, termasuk ke dalam famili *Enterobacteriaceae* yang bersifat non motil, memiliki ciri-ciri berbentuk batang pendek, tidak membentuk spora, dan mempunyai selubung atau kapsul yang tebal memiliki ukuran 0,3-1,5 μm dengan panjang 0,5-5,0 μm . Bakteri ini cenderung lebih pendek dan lebih tebal jika dibandingkan dengan *Enterobacteriaceae*. Berdasarkan kebutuhan oksigennya, *Klebsiella* sp. adalah bakteri anaerob fakultatif (Brooks *et al.*, 2012) yang dapat menguraikan laktosa, membentuk kapsul baik *in vivo* atau *in vitro*, dan koloninya berlendir. *Klebsiella* sp. terdapat di selaput lendir mulut dan usus manusia sebagai flora normal, namun habitat alaminya terdapat di tanah (Syarurachman dkk., 1993). Secara makroskopis koloni *Klebsiella* sp. berwarna merah muda pada media selektif, mukoid, dan cenderung bersatu apabila diinkubasikan (Brisse *et al.*, 2006).

Klebsiella terdiri dari tiga spesies yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Spesies anggota *Klebsiella* sp. banyak ditemukan di alam. Organisme ini dapat ditemukan di air, tanah, tumbuhan, serangga, dan hewan, termasuk manusia. Bakteri ini juga merupakan bakteri *coli fecal* yang sering dijumpai pada kotoran, air, udara, dan tanah. *Klebsiella* sp. dapat tumbuh pada kisaran suhu 12-43°C, dengan suhu optimal 37°C dan pH 7,0 (Mardiyantoro, 2018).

Klebsiella sp. tidak dapat bergerak karena tidak memiliki flagela, tetapi dapat memfermentasikan karbohidrat membentuk asam dan gas (Syarurachman dkk., 1993). Spesies *Klebsiella* sp. menunjukkan adanya pertumbuhan mukoid dan

kapsul polisakarida yang besar, beberapa spesies di antaranya *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Infeksi nosokomial dari *Klebsiella* sp. sebagian besar disebabkan oleh spesies *Klebsiella pneumoniae* dan *Klebsiella oxytoca* (Mardiyantoro, 2018).

Berikut ini adalah klasifikasi dari bakteri *Klebsiella* sp. (Garrity *et al.*, 2001):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella</i> sp.

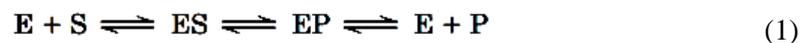


Gambar 1. Isolat bakteri *Klebsiella* sp.

2.2 Enzim

Kata enzim berasal dari bahasa Yunani *enzyme*, yang berarti di dalam sel. Willy Kuchne (1876) mendefinisikan enzim sebagai ragi (*yeast*) dengan bentuk tidak beraturan, yang dapat bekerja tanpa adanya mikroorganisme dan bekerja di luar mikroorganisme itu. Definisi tersebut telah berubah setelah penelitian oleh Buchner pada tahun 1897. Enzim dapat diproduksi oleh mikroorganisme, seperti hewan dan tumbuhan. Enzim dapat diisolasi dalam bentuk murni (Winarno, 2008).

Enzim adalah senyawa protein yang berperan sebagai biokatalisator dalam suatu reaksi kimia, yang akan meningkatkan kecepatan reaksi tanpa ikut bereaksi. Enzim dapat mempercepat laju reaksi dari 10^3 sampai 10^{12} kali lebih cepat daripada reaksi yang dilakukan tanpa katalis. Laju reaksi dapat terjadi dikarenakan enzim menurunkan energi aktivasi yang akan mempermudah terjadinya reaksi tersebut. Enzim akan mengikat molekul substrat untuk membentuk kompleks enzim-substrat yang bersifat sementara dan kemudian terdegradasi untuk membentuk enzim bebas dan produknya (Lehninger, 1995). Peningkatan laju reaksi enzim dilakukan secara efisien dan selektif sesuai dengan hukum kinetika dan termodinamika enzim. Persamaan reaksi umum enzim dapat dilihat pada Persamaan 1.



(Lehninger, 2004).

Keterangan:

E : Enzim
 S : Substrat
 ES : Kompleks Enzim-Substrat
 EP : Kompleks Enzim Produk
 P : Produk

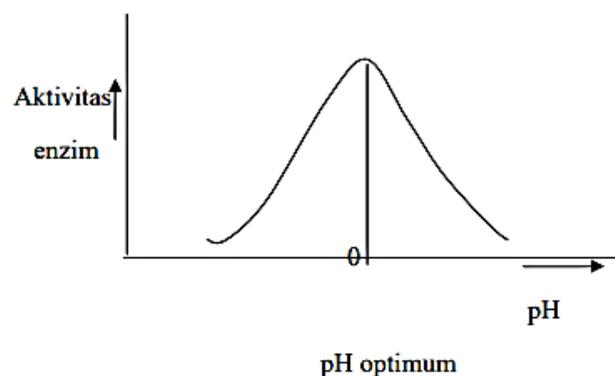
Pada tahap awal reaksi enzimatik, enzim (E) dan substrat (S) membentuk kompleks enzim-substrat (ES), yang kemudian terurai menjadi produk (P). Enzim tidak habis dalam reaksi itu, tetapi dilepaskan kembali untuk reaksi lanjutan dengan molekul substrat lain. Proses ini berulang sampai semua molekul substrat yang tersedia habis terpakai. Pokok utama dari teori mekanisme kerja enzim adalah konsep aktivasi substrat, yang terjadi setelah pembentukan kompleks enzim-substrat (ES).

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya pH, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, serta adanya aktivator dan inhibitor (Pelczar dan Chan, 2005). Berikut ini adalah faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas katalitik enzim:

a. pH

Enzim umumnya bersifat amfoter, artinya enzim memiliki konstanta disosiasi pada gugus asam dan gugus basa, terutama gugus residu terminal karboksil dan gugus terminal amino. Suatu keadaan pH dimana enzim mampu bekerja dengan aktivitas tertinggi disebut pH optimum. Di sisi lain, pada pH tertentu, enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak.

Hal ini dapat dijelaskan bahwa enzim dikenal sebagai molekul protein, kestabilan molekul protein dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, dengan keasaman yang kuat molekul protein dari enzim menjadi rusak (Poedjadi dan Sipriyanti, 1994). Pada pH optimum, enzim memiliki struktur tiga dimensi yang tepat berkaitan dengan substrat. Perubahan pH menyebabkan perubahan muatan residu asam amino yang melibatkan sisi aktif enzim dan substrat, sehingga menurunkan efektivitas pengikatan enzim dengan substrat (Sari, 2010). Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva yang dapat dilihat pada Gambar 2.



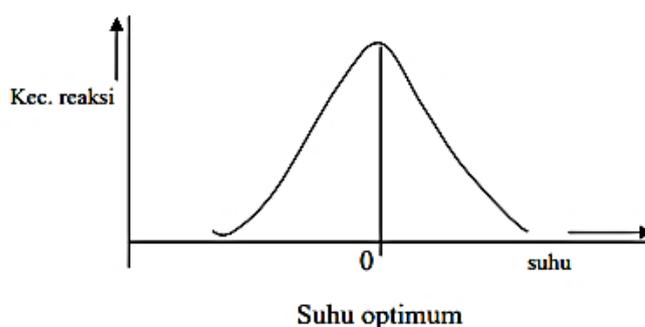
Gambar 2. Hubungan aktivitas enzim dengan pH (Lehninger, 1998).

Perubahan aktivitas enzim akibat perubahan pH lingkungan karena adanya perubahan ionisasi enzim, substrat, atau kompleks enzim substrat, serta perubahan kemampuan peningkatan dan pengaruh laju reaksi. Enzim menunjukkan aktivitas tertinggi dalam pH optimum, yang biasanya antara pH 4,5-8,0 (Winarno, 2008).

b. Suhu

Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh suhu lingkungan tempat enzim bekerja. Suhu dapat mempercepat proses reaksi, tetapi pada suhu tertentu laju reaksi yang dikatalisis oleh enzim mulai menurun, bahkan aktivitasnya tidak lagi terlihat. Enzim membutuhkan panas, terutama untuk dapat aktif. Aktivitas enzim juga akan meningkat dengan meningkatnya suhu.

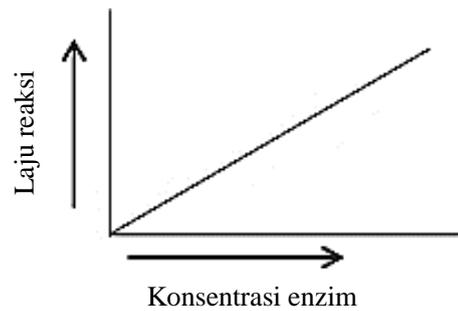
Aktivitas enzim meningkat dua kali lipat di atas suhu minimum untuk setiap 10°C. Peningkatan suhu di atas suhu maksimum menyebabkan ikatan enzim menjadi lemah (Pratiwi dkk., 2013). Kondisi suhu dimana enzim dapat menghasilkan aktivitas tertinggi disebut suhu optimum. Karena enzim memiliki struktur protein yang dapat dirusak oleh panas, sehingga pada suhu tinggi aktivitas enzim mulai menurun bahkan aktivitasnya dapat menghilang. Hal ini diakibatkan terjadinya denaturasi atau kerusakan struktur enzim, yang dapat menyebabkan kerusakan pada enzim terutama sisi aktifnya. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Lehninger, 1998).

c. Konsentrasi Enzim

Pada konsentrasi substrat tertentu, laju reaksi meningkat dengan meningkatnya konsentrasi enzim. Semakin tinggi konsentrasi enzim maka semakin cepat laju reaksi sampai batas konsentrasi, dimana hasil hidrolisis akan konstan yang menyebabkan peningkatan konsentrasi enzim karena penambahan enzim tidak efektif lagi (Poedjiadi dan Titin, 2006). Pengaruh konsentrasi enzim terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan aktivitas enzim dengan konsentrasi enzim (Lehninger, 1998).

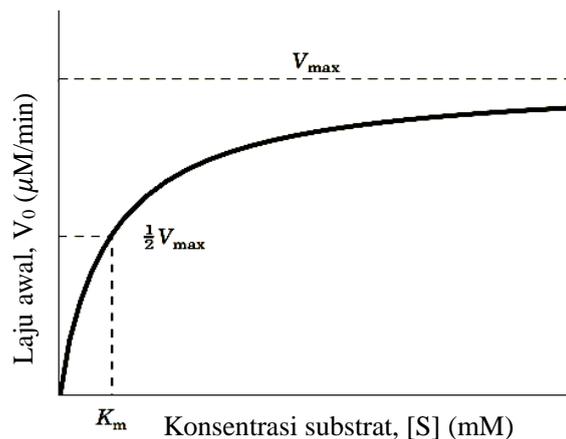
d. Konsentrasi Substrat

Reaksi yang dikatalisis oleh enzim dipengaruhi oleh jumlah substrat. Ketika konsentrasi substrat dari rendah ke tinggi terhadap laju reaksi enzimatis, pada awalnya diperoleh hubungan proporsional yang menyatakan bahwa laju reaksi akan meningkat dengan meningkatnya konsentrasi substrat, tetapi diperoleh data yang menunjukkan konsentrasi substrat tinggi dan laju reaksi tidak meningkat. Dalam hal ini konsentrasi substrat menjadi jenuh dan laju reaksi menjadi tinggi, yang juga disebut kecepatan maksimum (V_{max}) (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

Peningkatan konsentrasi substrat akan meningkatkan laju reaksi selama konsentrasi enzim tetap. Kompleks enzim-substrat terbentuk ketika ada kontak antara enzim dan substrat. Kontak ini terjadi di daerah atau bagian dari enzim yang disebut sisi aktif. Pada konsentrasi substrat yang rendah, bagian aktif enzim hanya menampung sedikit substrat. Dengan meningkatnya konsentrasi substrat, substrat akan lebih banyak mengikat disisi aktif enzim. Bertambahnya konsentrasi kompleks enzim-substrat, menyebabkan laju reaksi meningkat. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim digambarkan dengan kurva yang dapat dilihat pada Gambar 5.

e. Aktivator dan Inhibitor

Sebagian besar enzim membutuhkan komponen yang bertindak sebagai katalis. Komponen kimia yang membentuk enzim disebut kofaktor. Kofaktor dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu gugus prostetik, koenzim, dan aktivator.



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi substrat pada kecepatan awal reaksi yang dikatalisis oleh enzim (Lehninger, 2004).

Koenzim adalah kofaktor yang tidak terikat kuat dalam enzim biasanya berupa molekul organik, sedangkan gugus prostetik adalah kofaktor yang terikat kuat dalam enzim biasanya berupa molekul anorganik, seperti Fe, Mn, Mg, Cu, Zn, dan Ca. Aktivator merupakan senyawa kofaktor berupa ion logam yang dapat meningkatkan aktivitas enzim. Aktivator umumnya adalah ion logam yang dapat terikat atau mudah dipisahkan dari enzim. Contoh aktivator logam adalah K^+ , Mn^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} atau Zn^{++} (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994).

Mekanisme enzim dalam reaksi melalui pembentukan kompleks enzim-substrat (ES). Oleh karena itu, reaksi dengan enzim sebagai katalis dapat terjadi hambatan atau inhibisi jika penggabungan substrat pada sisi aktif enzim mengalami hambatan. Senyawa atau ion yang menurunkan laju reaksi enzimatik disebut inhibitor (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Inhibitor merupakan molekul atau ion logam yang terikat secara selektif pada enzim dan dapat menghambat aktivitas suatu enzim (Bresnick, 2003). Berdasarkan sifat kinetiknya, inhibitor dapat dibagi menjadi tiga jenis, yaitu inhibitor kompetitif, non-kompetitif *reversible*, dan non-kompetitif *irreversible*.

Pada inhibitor kompetitif dapat menghambat kerja enzim dengan menempati sisi aktif enzim, inhibitor ini bersaing dengan substrat untuk mengikat sisi aktif enzim, sehingga laju reaksi menurun. Inhibitor non-kompetitif *reversible*, berupa senyawa

kimia yang tidak menyerupai substrat dan tidak berikatan dengan sisi aktif enzim, ikatan ini menyebabkan perubahan bentuk enzim sehingga sisi aktif tidak sesuai dengan substrat. Inhibitor non-kompetitif *irreversible* dapat mengikat kuat sisi aktif enzim, sehingga tidak terlepas dan enzim menjadi tidak aktif dan tidak dapat kembali ke keadaan semula (Pratiwi dkk., 2013).

2.3 Enzim Lipase

Lipase (*triacylglycerol ester hydrolases* E.C. 3.1.1.3) merupakan enzim yang memiliki fungsi untuk mengkatalisis suatu proses hidrolisis ikatan ester triasilgliserol menjadi gliserol dan asam lemak yang melepaskan alkohol dan gugus asam (Damaso *et al.*, 2008). Dalam dunia industri, enzim lipase menjadibiokatalis yang efisien dan selektif seperti farmasi, kimia, biosensor, makanan, pestisida, detergen, dan kosmetik (Pera *et al.*, 2006), serta alternatif yang ramah lingkungan pada penggunaan pengurangan jumlah bahan kimia (Turati *et al.*, 2019). Berdasarkan klasifikasi yang direkomendasikan oleh *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry*, lipase termasuk kelompok enzim yang dikenal sebagai ester hidrolase sehingga diklasifikasikan sebagai enzim kelas 3.1 (Kurniawan dan Indra, 2018).

Enzim lipase biasanya bersifat polar, sedangkan triasilgliserol sebagai substrat adalah senyawa bersifat nonpolar, sehingga lipase bekerja pada bagian antarmuka (*interface*) fasa air dan fasa minyak (Yapasan, 2008). Lipase berperan sebagai biokatalis berbagai reaksi di antaranya reaksi esterifikasi, transesterifikasi (asidolisis, interesterifikasi, dan alkoholisis), hidrolisis, serta aminolisis (Ozturk, 2001). Lipase akan bertindak sebagai enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis apabila berada dalam medium dengan kandungan air yang tinggi atau dengan kata lain medium yang digunakan adalah air (*aqueous medium*). Namun, dalam kondisi terdapat pelarut organik dan kandungan air yang sedikit, lipase cenderung bekerja dalam reaksi esterifikasi dan transesterifikasi, daripada reaksi hidrolisis (Adamopoulos, 2006).

a. Reaksi Esterifikasi

Esterifikasi merupakan tahap mengubah asam lemak bebas menjadi ester.

Esterifikasi mereaksikan asam lemak dengan alkohol. Katalis yang cocok yaitu zat dengan sifat asam kuat, seperti asam sulfat, asam sulfonat, asam sulfonat organik atau resin penukar kation asam kuat. Asam-asam ini sering dipilih dalam praktik industri (Soerawidjaja, 2006).

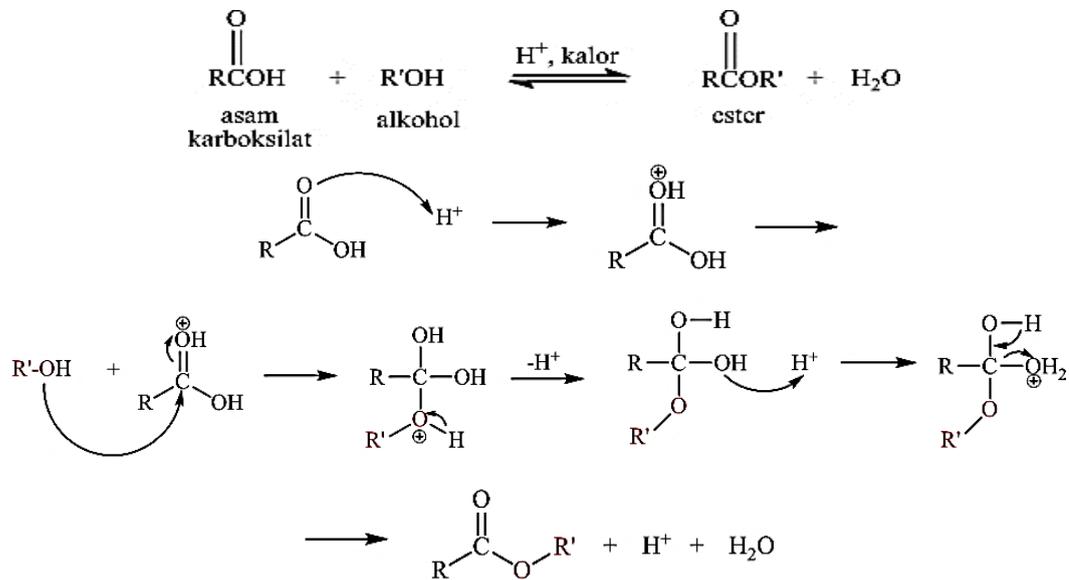
Reaksi esterifikasi biasanya dilakukan untuk memproduksi biodiesel dari minyak dengan kandungan FFA yang tinggi (bilangan asam > 5 mg-KOH/g). Pada tahap ini, asam lemak bebas akan diubah menjadi metil ester. Tahap esterifikasi biasanya diikuti oleh tahap transesterifikasi, tetapi sebelum produk esterifikasi dibawa ke tahap transesterifikasi, air dan katalis asam yang ada di dalamnya harus dihilangkan terlebih dahulu.

Proses esterifikasi merupakan reaksi *reversible* dimana asam lemak bebas (*free fatty acid*/FFA) diubah menjadi alkil ester melalui katalis asam (HCl atau biasanya H_2SO_4). Ketika konsentrasi asam lemak bebas dalam minyak tinggi seperti dalam minyak jelantah, reaksi esterifikasi dan transesterifikasi melalui katalis asam dapat berpotensi untuk mendapatkan konversi biodiesel yang hampir sempurna. Proses esterifikasi mengikuti mekanisme reaksi yang sama seperti transesterifikasi katalis asam (Nourredine, 2010). Mekanisme reaksi esterifikasi dapat dilihat pada Gambar 6.

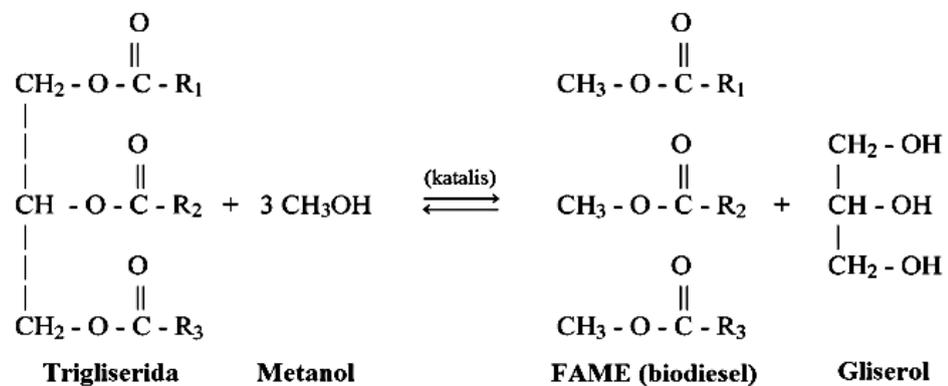
b. Reaksi Transesterifikasi

Transesterifikasi merupakan suatu reaksi yang menghasilkan ester (biodiesel) dimana salah satu pereaksinya yaitu senyawa ester. Ester merupakan turunan dari asam karboksilat yang mengalami perubahan gugus OH (hidrokarbon) menjadi gugus OR (alkil atau aril). Senyawa ester bersifat netral yang dapat dihasilkan dari reaksi *reversible* antara asam karboksilat dan alkohol (Nabilasani, 2018). Bentuk reaksi yang terjadi yaitu antara minyak (trigliserida) dan alkohol. Proses terjadinya reaksi dimulai dengan pemecahan senyawa trigliserida dan migrasi gugus alkil antara senyawa ester. Ester yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi ini disebut

biodiesel (Aziz, 2007). Reaksi transesterifikasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Mekanisme reaksi esterifikasi.



Gambar 7. Reaksi transesterifikasi lipid.

Pada Gambar 7, terdapat alkil pada trigliserida yang ditandai dengan huruf R. Dalam reaksi ini penandaan alkil sebagai R₁-R₃ adalah bentuk gugus asam lemak jenuh dan tak jenuh rantai panjang.

Reaksi transesterifikasi adalah reaksi bolak balik yang relatif lambat. Untuk mempercepat jalannya reaksi dan meningkatkan hasil yang diperoleh, maka proses dilakukan dengan pengadukan yang baik, penambahan katalis, dan pemberian

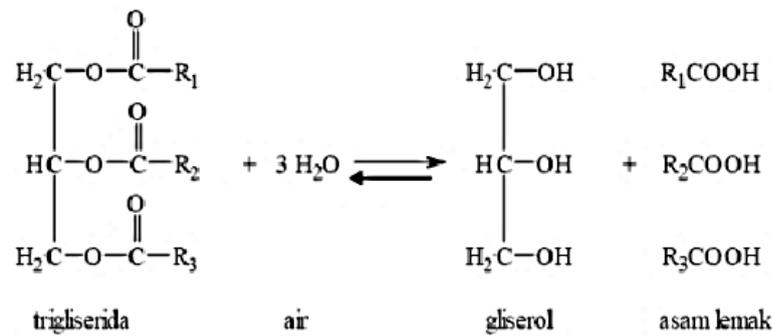
reaktan berlebih agar reaksi bergeser ke kanan. Pemilihan katalis dilakukan berdasarkan kemudahan penanganan dan pemisahannya dari produk (Aziz, 2007). Katalis yang dapat digunakan dapat berupa katalis asam, basa, maupun enzim. Saat ini penggunaan enzim sebagai katalis dinilai lebih efektif.

Beberapa keuntungan dalam penggunaan enzim sebagai katalis. Reaksi transesterifikasi secara enzimatik dapat mencegah terbentuknya sabun, reaksi terjadi pada pH netral, dan suhu reaksi yang lebih rendah sehingga lebih bersifat ekonomis. Beberapa metode secara enzimatik bertujuan untuk memecah ikatan kovalen, ikatan silang (*cross-linking*), dan enkapsulasi mikro. Lipase merupakan enzim yang paling banyak digunakan pada reaksi transesterifikasi karena harganya lebih murah dibandingkan dengan enzim lain dan mampu mengkatalisis baik reaksi hidrolisis maupun transesterifikasi trigliserida dalam kondisi biasa untuk menghasilkan biodiesel (Manullang, 2014).

c. Reaksi Hidrolisis

Proses hidrolisis ini bertujuan untuk mencari waktu optimum dan meningkatkan konsentrasi enzim (% lipase) terbaik yang akan diaplikasikan untuk proses esterifikasi. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 40°C. Pada akhir proses hidrolisis, akan terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan atas sebagai asam lemak dan lapisan bawah sebagai gliserol. Salah satu parameter yang menunjukkan tingkat konversi trigliserida menjadi asam lemak adalah angka asam dari produk hidrolisis. Angka asam menyatakan mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan 1 g minyak (Moentamaria, 2016).

Reaksi hidrolisis minyak sebagian besar menggunakan katalis homogen, misalnya KOH, NaOH, dan lain sebagainya. Katalis homogen berada dalam satu fasa dengan reaktan. Hal ini menyebabkan molekul katalis dan reaktan dapat berinteraksi dengan mudah sehingga reaksi mudah berlangsung. Akan tetapi proses pemisahan katalis dengan produk lebih sulit dibandingkan dengan katalis heterogen. Reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi hidrolisis lipid.

2.3.1 Sifat-Sifat Enzim Lipase

Enzim lipase memiliki sifat yang sama dengan enzim lainnya. Lipase adalah protein kompleks yang berfungsi sebagai biokatalisator. Fungsi enzim sebagai biokatalisator adalah untuk mempercepat reaksi dengan cara menurunkan energi aktivasi, sehingga reaksi dapat berlangsung lebih cepat pada suhu atau kondisi normal. Beberapa sifat yang berbeda dari enzim lipase adalah sebagai berikut:

a. Biokatalisator

Lipase berfungsi sebagai katalisator dalam hidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol. Lipase dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi, dan perhidrolisis.

b. Bersifat Termolabil

Lipase termasuk sebagai protein yang membuat aktivitasnya bergantung pada suhu. Lipase membutuhkan suhu yang cocok untuk dapat menghasilkan produk katalisis optimal. Suhu yang terlalu tinggi dapat merusak struktur protein lipase yang disebut dengan denaturasi protein.

Penelitian mengenai suhu optimum pada bakteri lipolitik yang diisolasi dari minyak yang terkontaminasi tanah telah dilakukan. Penelitian tersebut menggunakan minyak kelapa sawit sebagai substrat. Kemudian hasil yang didapatkan menunjukkan enzim lipase yang diisolasi memiliki aktivitas tertinggi pada suhu

37°C (Sirisha *et al.*, 2010). Kemudian penelitian Sya'bani, dkk (2017) dilakukan dengan menggunakan lipase yang diisolasi dari biji alpukat. Substrat yang digunakan adalah minyak zaitun. Kemudian hasil yang didapatkan dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa lipase dari biji alpukat tersebut memiliki aktivitas tertinggi pada suhu 35°C.

c. Bekerja secara spesifik dan selektif

Beberapa enzim hanya dapat membuat perubahan pada zat tertentu. Lipase memiliki sifat khusus mengenai kemampuannya untuk menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol, yaitu regioselektivitas. Lipase mempunyai kemampuan selektivitas yang kuat dalam menghidrolisis substrat pada molekul gliserol yang terikat oleh gugus asil 1 dan 3 (sn-1,3) pada triasilgliserol.

2.3.2 Sumber Enzim Lipase

Enzim lipase dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme. Lipase dari mikroorganisme lebih banyak digunakan dalam bidang industri karena lebih stabil dan spesifik terhadap sebagian besar substrat (Treichel., 2010). Di antara sumber lipase yang berasal dari tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme, lipase mikroorganisme adalah yang paling banyak digunakan. Hal ini disebabkan karena mikroorganisme dapat dengan mudah dibudidayakan. Selain itu, enzim lipase dari mikroorganisme biasanya tahan terhadap panas, meskipun jasad penghasilnya tidak tahan (Hidayat *et al.*, 2014).

a. Lipase dari Tumbuhan

Mukherjee dan Hills (1994) mengelompokkan enzim lipase dari tumbuhan menjadi lipase triasilgliserol, asil hidrolase, fosfolipase, dan lisofosfolipase. Lipase tumbuhan telah diisolasi dari daun, minyak, batang, getah, dan biji tumbuhan serta biji-bijian yang mengandung minyak (Santos *et al.*, 2013). Enzim ini memiliki keuntungan yaitu pemurnian yang mudah dan biaya rendah (De Sousa *et al.*, 2010). Substrat lipase tumbuhan untuk aplikasi industri belum ditentukan karena kurangnya penelitian tentang produksi lipase tumbuhan (Hidayat *et al.*, 2014).

b. Lipase dari Hewan

Svendsen (1994) mengelompokkan enzim lipase berdasarkan sumbernya yaitu: lipase pada sistem pencernaan, lipase yang terdapat pada jaringan seperti hati, paru-paru, dan ginjal serta lipase dalam air susu. Dalam proses industri lipase hewan yang digunakan yaitu lipase pankreas dan *pregastric* yang berasal dari babi (fosfolipase A2). Lipase dalam industri digunakan untuk memproduksi zat pengemulsi dan anti jamur dalam makanan *lysophosphatidylcholine* atau makanan *lysolecithin*. Kelemahan dari lipase dari hewan ini adalah harganya yang mahal (Borelli and Trono, 2015).

c. Lipase dari Mikroorganisme

Lipase yang berasal dari mikroorganisme dibagi menjadi lipase yang berasal dari bakteri, jamur, dan khamir. Sebagian besar lipase mikroorganisme bersifat ekstraseluler dan produksinya sangat dipengaruhi oleh komposisi medium. Limbah agroindustri dapat dimanfaatkan sebagai pakan dengan biaya produksi yang rendah (Bose and Keharia, 2013). Jenis mikroorganisme yang paling banyak untuk produksi lipase adalah *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum*, dan *Fusarium* (Colla *et al.*, 2016).

Lipase bakteri sering dipengaruhi oleh kondisi nutrisi seperti sumber karbon, lipid, nitrogen, dan garam anorganik (Liew *et al.*, 2015). Spesies yang paling umum digunakan untuk produksi lipase bakteri adalah *Pseudomonas* dan *Burkholderia* karena aktivitas enzim yang tinggi pada suhu dan nilai pH yang berbeda serta enantioselektivitas tinggi (Gupta *et al.*, 2007). Selain itu, lipase jamur berasal dari jamur yang dapat tumbuh di beberapa habitat, antara lain biji, minyak nabati bekas, tanah yang terkontaminasi minyak, serta makanan busuk, dan produk susu yang rusak (Singh and Mukhopadhyay, 2011).

2.4 Aplikasi Enzim Lipase

Lipase (*triacylglycerol acylhydrolase*; EC 3.1.1.3) yang berasal dari bakteri termofilik dapat digunakan di berbagai industri di antaranya industri farmasi,

makanan dan minuman, detergen, pengolahan coklat, dan biodiesel. Sintesis biodiesel menggunakan minyak rumput laut *Sargassum* sp, yang memiliki kandungan minyak tinggi sehingga berpotensi sebagai bahan baku pembuatan biodiesel (Syihab, 2011). Sebagian besar lipase digunakan untuk industri makanan yaitu lemak dan minyak, pembuatan deterjen, sintesis kertas, dan sintesis organik. Penggunaan lipase pada industri minyak meningkat seiring berjalannya pengetahuan bahwa enzim dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis serta mengkatalis reaksi sintesis seperti esterifikasi, transesterifikasi, serta interesterifikasi (Sharma *et al.*, 2001).

Aplikasi utama dari lipase biasa digunakan di rumah tangga yaitu detergen yang dapat menghidrolisis lemak. Penggunaan enzim dalam formulasi detergen bertujuan untuk meningkatkan kemampuan detergen dalam menghilangkan noda dan menjadikan detergen yang aman bagi lingkungan (Weerasooriya dan Kumarasinghe, 2012). Pada industri kertas, pemanfaatan lipase digunakan bersama selulase dan ligninase yang dapat menghilangkan *pitch* pada *pulp* yang dihasilkan untuk membuat kertas. *Pitch* adalah komponen hidrofobik kayu yang komponen utamanya adalah trigliserida (Jaeger and Reetz, 1998). Dalam industri susu, lipase digunakan untuk menghidrolisis lemak susu menjadi produk susu seperti keju.

Enzim lipase juga digunakan sebagai biokatalis untuk sintesis biodiesel. Lipase sebagai biokatalis mampu mengarahkan reaksi spesifik ke produk yang diinginkan tanpa reaksi samping yang merugikan. Produksi biodiesel membutuhkan lipase yang toleran terhadap alkohol dan memiliki sifat termostabil. Penggunaan lipase sebagai biokatalis dalam proses konversi (transesterifikasi minyak nabati) menghasilkan reaksi yang lebih aman dan memudahkan *recovery* katalis serta gliserol tanpa pemurnian atau produksi limbah kimia. Keuntungan menggunakan lipase terdapat pada proses enzimatik yang toleran terhadap kadar air minyak dan meningkatkan rendemen produk bioteknologi yang dihasilkan dengan menghindari saponifikasi (Sari, 2010). Penggunaan enzim dalam industri dan fungsinya dapat dilihat seperti pada Tabel 1 berikut.

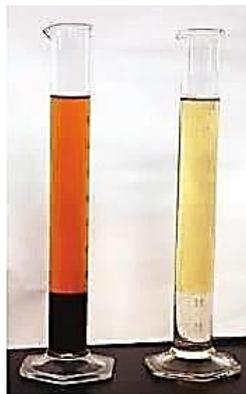
Tabel 1. Penggunaan enzim dalam industri

Industri	Fungsi	Produk	Jenis Reaksi
<i>Bakery</i>	Meningkatkan aroma, rasa (kualitas) dan umur simpan produk	Kue kering	Hidrolisis
<i>Brewing</i>	Meningkatkan aroma, mempercepat reaksi dengan menghilangkan lemak	Minuman ringan beralkohol	Hidrolisis
Kosmetik	Menghilangkan lemak	Kosmetik umum (pelembab, <i>emulsifier</i>).	Sintesis
<i>Dairy</i>	Hidrolisis lemak susu, pematangan keju, modifikasi lemak mentega	<i>Flavoring agent</i> untuk produk harian seperti susu, keju dan mentega.	Hidrolisis
Detergen	Menghilangkan noda minyak dan lemak pada kain	Detergen untuk mencuci dan kebersihan rumah.	Hidrolisis
Lemak dan Minyak	Hidrolisis lemak dan minyak, transesterifikasi minyak alam	Asam lemak, digliserida, dan monogliserida. Reagen untuk analisa lemak Biodiesel	Hidrolisis dan transesterifikasi
Bahan Bakar	Mengubah minyak sayur menjadi ester	Biopolimer	Transesterifikasi
Pengolahan daging dan ikan	Memperbaiki rasa dan menghilangkan kelebihan lemak	-	Hidrolisis
Polimer	Katalis sintesis polimer	-	Sintesis

(Sharma *et al.*, 2001).

2.5 Biodiesel

Biodiesel adalah metil ester atau etil ester yang merupakan bahan bakar alternatif asam lemak yang terbuat dari minyak nabati (kelapa sawit, kedelai, biji bunga matahari, kacang-kacangan, dan kelapa), lemak hewani, serta minyak jelantah (Widayat dkk., 2013). Biodiesel umumnya diproduksi melalui proses transesterifikasi, yaitu proses alkoholisis. Dimana trigliserida bereaksi dengan alkohol, jenis alkohol yang sering digunakan adalah metanol (CH_3OH) atau etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dengan penambahan katalis homogen atau heterogen yang berfungsi untuk mempercepat laju reaksi. Dalam prosesnya, minyak atau lemak ini diubah menjadi ester dan gliserin. Ester yang dihasilkan disebut biodiesel (Khalid, 2011), ketika trigliserida terurai menjadi tiga metil ester, maka akan menurunkan sepertiga dari berat awal molekul dan menurunkan viskositasnya. Hasil perbedaan uji transesterifikasi dalam pembuatan biodiesel menggunakan katalis basa dan enzim dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Biodiesel dan gliserol menggunakan katalis basa (kiri) dan katalis enzim (kanan) (Burton, 2008).

Katalis yang biasa digunakan dalam industri adalah katalis basa (NaOH), kelemahan katalis ini adalah dapat membentuk sabun (saponifikasi) jika bahan baku memiliki kandungan asam lemak bebas atau *Free Fatty Acid* (FFA) yang tinggi yaitu $> 1\%$, hal ini dikarenakan katalis basa bereaksi dengan asam lemakbebas untuk menghasilkan sabun dan air. Sehingga diperlukan tahap *pretreatment* yaitu reaksi esterifikasi untuk menurunkan FFA yang terkandung dalam minyak.

Biodiesel umumnya disintesis dari ester asam lemak dengan rantai karbon C8- C22. Minyak goreng di Indonesia didominasi oleh minyak kelapa sawit yang diproses dengan *refined-bleached-deodorized* menghasilkan minyak kelapa sawit pada suhu kamar dalam bentuk cair yang digunakan sebagai bahan baku minyak goreng. Minyak kelapa sawit adalah minyak nabati dengan asam lemak rantai karbon C12- C18 yang berpotensi menjadi bahan baku biodiesel yang mana biodiesel itu berasal dari minyak kelapa sawit sehingga memiliki sifat fisik dan kimia yang mirip dengan petrodiesel dan dapat dicampur dengan petrodiesel, tetapi biodiesel memiliki titik nyala yang lebih tinggi lebih tinggi dari petrodiesel, sehingga tidak mudah terbakar. Biodiesel tidak mengandung sulfur dan benzena yang dapat menyebabkan kanker, sehingga lebih bersih dan aman dibandingkan dengan petrodiesel (Widayat dkk., 2013).

Pada proses transesterifikasi terdapat beberapa variabel yang dapat menentukan hasil biodiesel di antaranya, yaitu sumber lipid, asil akseptor, pelarut organik, suhu, dan kandungan air. Sumber lipid yang meninjau nilai ekonomis dalam pembuatan biodiesel, biasanya digunakan minyak bekas. Selain itu minyak kulit beras juga merupakan bahan baku yang baik untuk menghasilkan biodiesel karena murah, tidak dikonsumsi, dan mengandung asam lemak bebas sebanyak 80%. Asil akseptor yang umum digunakan adalah metanol dan etanol, karena kemampuan mengurai yang lebih tinggi dibandingkan alkohol rantai panjang. Pelarut organik yang cocok digunakan dalam produksi biodiesel yaitu yang bersifat hidrofobik seperti isooktan, n-heksana, dan petroleum eter. Akan tetapi pelarut organik hidrofobik dapat menyebabkan gliserol tidak larut dan menimbulkan permasalahan yang sama seperti menggunakan sistem reaksi dengan bebas pelarut. Meskipun pelarut organik yang bersifat hidrofobik lebih jarang digunakan dalam produksi biodiesel, 1,4-dioksan, dan butanol tersier hidrofilik dipastikan dapat menghasilkan transesterifikasi yang tinggi (Ponnusami dan Arumugam, 2017).

Karakteristik hasil produksi biodiesel perlu dibandingkan dengan karakteristik biodiesel yang telah ditentukan oleh standar nasional. Beberapa karakteristik yang perlu dipenuhi yaitu nilai densitas dan viskositas. Direktorat Jenderal Energi Baru

Terbarukan dan Konservasi Energi (EBTKE) (2019) memaparkan standar dan mutu bahan bakar nabati (*biofuel*) jenis biodiesel, nilai densitas atau massa jenis pada suhu 25°C yang memenuhi standar yaitu 850-890 kg/m³, sedangkan nilai viskositas pada suhu 25°C yang memenuhi standar yaitu 2,3-6,0 mm²/s.

2.5.1 Faktor yang Mempengaruhi Reaksi Transesterifikasi

Beberapa kondisi reaksi yang mempengaruhi konversi produk pada reaksi transesterifikasi sebagai berikut.

1. Jenis dan Rasio Molar Pelarut

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. Hal ini disebabkan jumlah metanol yang berlebih 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. 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)

3. Suhu Reaksi

Reaksi transesterifikasi dapat dilakukan pada temperatur 30-65°C (titik didih metanol 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).

4. Jenis Katalis

Penggunaan jenis katalis dalam proses transesterifikasi akan mempengaruhi produk yang dihasilkan. Penggunaan jenis katalis yang berbeda pun mempengaruhi 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, H₂SO₄ sebagai katalis asam, dan enzim lipase sebagai katalis yang berasal dari enzim (Marchetti *et al.*, 2007).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga November 2022 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Analisis densitas dan viskositas sampel biodiesel dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Analisis hasil uji transesterifikasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu cawan petri, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, autoklaf, batang pengaduk, spatula, *shaker incubator*, *hot plate*, kantong selofan, *Laminar Air Flow* (LAF) CURMA model 9005-FL, *micropipet*, sentrifus, *waterbath*, pH meter, kolom kromatografi, spektrofotometer UV-Vis Carry Win UV 32, dan instrumen GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry*) Shimadzu QP2010 SE.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu isolat bakteri LPG- 171, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), minyak zaitun, tween 80, akuades, *sephadex G-75*, amonium sulfat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), buffer fosfat, pNP-palmitat, asetonitril, etanol, buffer kalium fosfat, minyak kelapa (Barco), metanol, pereaksi Lowry A, pereaksi Lowry B, kain kasa, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kapas, dan tisu.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Peralatan gelas yang digunakan dicuci hingga bersih lalu dikeringkan. Sebelum disterilisasi, alat dibungkus dengan kertas dan disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Keringkan alat yang telah disterilisasi ke dalam oven selama kurang lebih 2 jam.

b. Pembuatan Media Selektif

Media *Nutrient Agar* (NA) terdiri dari 2,8 g *Nutrient Agar*, 1 mL minyak zaitun, dilarutkan dalam 100 mL aquades. Kemudian, media NA dipanaskan di atas *hotplate* hingga larut dan media disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Tuang media pada cawan petri secara aseptik di dalam *Laminar Air Flow* (LAF), biarkan media hingga mengeras dan siap digunakan.

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 dilarutkan kedalam 100 mL buffer fosfat. Media disterilisasi dalam autoklaf 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 ke dalam 1000 mL buffer fosfat. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit.

e. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri ini menggunakan media agar selektif sebanyak 50 mL. Media disterilisasi dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media dituang ke dalam tabung reaksi secara aseptis. Mulut tabung

ditutup dengan menggunakan sumbat. Tabung diposisikan dengan kemiringan 5° dan media didiamkan dalam tabung selama 3 hari. Isolat yang telah tumbuh pada cawan selanjutnya dapat dipindahkan ke dalam media agar miring yang telah dibuat. Kemudian, diinkubasi pada inkubator dengan suhu optimal selama kurang lebih 48 jam.

3.3.2 Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pada umumnya bakteri tumbuh pada suhu di atas 35°C. Suhu optimum lebih mendekati suhu maksimum, sedangkan pada suhu minimum pertumbuhan akan menjadi lebih lambat. Pada bakteri *Klebsiella* sp. suhu optimum bagi pertumbuhan bakteri yaitu pada suhu 25-30°C (Elfidasari, 2013). Media yang digunakan pada penentuan kondisi optimum bakteri untuk menghasilkan enzim lipase adalah media yang berisi buffer fosfat dan minyak zaitun. Dari hasil penelitian Sun *et al.*, (2015) mengatakan bahwa pH netral pada pertumbuhan *Klebsiella* sp. mendukung pertumbuhan sel bakteri, yaitu pada rentang pH 6, 7, dan 8. Berdasarkan penelitian Fauziah (2016), menjelaskan bahwa *Klebsiella* sp. mempunyai waktu inkubasi optimal 60 jam. Pengamatan dilakukan dengan mengukur *Optical Density* (OD).

Kurva pertumbuhan bakteri dimulai dari pembuatan media inokulum. Bakteri diinokulasi ke dalam 100 mL media inokulum. Kemudian bakteri diinkubasi dengan kecepatan 120 rpm menggunakan *shaker* selama 72 jam dan suhu ruang. Kurva pertumbuhan bakteri diukur dengan pengukuran OD menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm, lalu dilakukan pengambilan sampel setiap 6 jam dengan rentang waktu 72 jam.

3.3.3 Produksi Enzim Lipase

Bakteri yang disimpan di dalam media agar miring diambil dan dimasukkan ke dalam 50 mL media inokulum kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 115-120 rpm selama 24 jam. Hasil inkubasi kemudian digunakan

sebagai inokulum sebanyak 10% dan difermentasi pada 1000 mL media fermentasi. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan supernatan (ekstrak kasar enzim) dan *pellet* (sisa-sisa sel). Supernatan diambil, dan dilakukan uji aktivitas unit enzim lipase.

3.3.4 Pemurnian Enzim Lipase

3.3.4.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

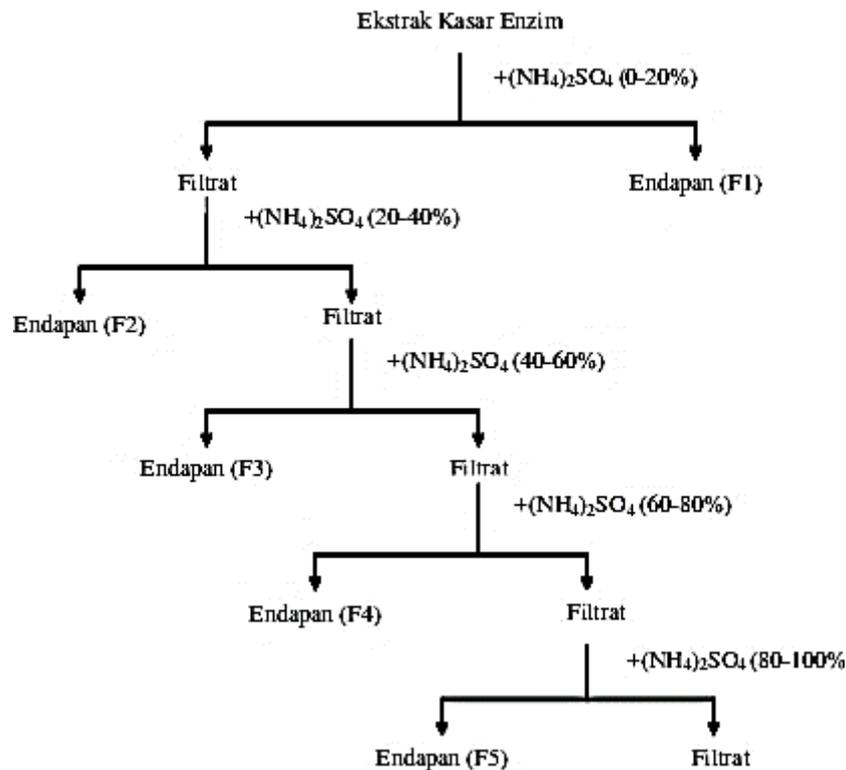
Fraksinasi enzim lipase dari supernatan (ekstrak kasar enzim) dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat dengan berbagai fraksi, yaitu 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80%, dan 80-100%. Ekstrak enzim kasar ditambahkan garam amonium sulfat sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat dipisahkan dari filtratnya kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10000xg selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk, endapan protein pada masing-masing fraksi dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan diuji aktivitas unitnya serta diukur kadar proteinnya (Parwata dan Martiningsih, 2014). Hal yang sama dilakukan pada konsentrasi akhir 100% amonium sulfat sehingga didapatkan fraksi endapan. Fraksi-fraksi endapan kemudian didialisis.

3.3.4.2 Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari masing-masing fraksi amonium sulfat kemudian dimurnikan dengan dialisis melalui membran semipermeabel (selofan). Endapan dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis menggunakan buffer fosfat 0,05 M pH 7 selama 24 jam pada suhu dingin. Selama proses dialisis, dilakukan pergantian larutan buffer setiap 6 jam agar dapat mengurangi konsentrasi ion yang ada dalam kantong dialisis (Popoola and Olateru, 2021), dan dapat berfungsi untuk mencegah kantong selofan tidak pecah. Untuk mengetahui di dalam kantong sudah tidak ada ion-ion garam lagi, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Jika masih ada ion sulfat di dalam kantong, maka endapan putih BaSO_4 akan terbentuk. Semakin banyak endapan

yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat di dalam kantong. Fraksi hasil dari dialisis kemudian ditentukan nilai aktivitas lipase dan kadar proteinnya.

Skema fraksinasi enzim dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema proses fraksinasi enzim dengan amonium sulfat.

3.3.4.3 Kromatografi Filtrasi Gel

Kolom (*sephadex G-75*) dilakukan kalibrasi dengan mencuci buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan eluen sejumlah dua kali volume tabung kolom. Matriks *sephadex G-75* ditimbang sebanyak 5 g dan dilarutkan dalam aquades, kemudian *distirrer* selama 2 jam. Dilakukan dekantasi selama beberapa menit sampai terbentuk dua fase, yaitu aquades dan gel. Fase aquades dikeluarkan sampai hanya fase gel yang tersisa. Buffer fosfat pH 7 ditambahkan sebanyak dua kali volume fase gel. Kemudian dibiarkan mengembang selama semalam di dalam kulkas dan matriks dicuci dengan buffer fosfat pH 7.

Enzim hasil dialisis sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam kolom berisi matriks *sephadex G-75* yang telah diaktivasi dengan buffer fosfat pH 7, kemudian dielusi menggunakan buffer fosfat 0,05 M pH 7. Sampel ditampung sebanyak 5 mL dengan menentukan laju alir 3 mL/menit pada tiap sampel. Kemudian diuji aktivitas lipase menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 280 nm dan ditentukan kadar proteinnya (Rusman, 2017).

3.3.5 Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase

3.3.5.1 Penentuan pH Optimum

Frakasi enzim yang memiliki aktivitas tertinggi dilakukan karakterisasi pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum. Untuk menentukan pH optimum, dilakukan uji aktivitas dengan menggunakan substrat pNP-palmitat pada beberapa pH yang berbeda. Variasi pH yang digunakan yaitu: pH 5, 6, 7, dan 8. Larutan substrat dan enzim diinkubasi pada suhu optimum selama 15 menit. Kemudian campuran larutan tersebut ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm (Telussa, 2013).

3.3.5.2 Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasi campuran enzim substrat selama 15 menit dan diuji dengan pH optimum dan variasi suhu, yaitu: 70, 75, 80, 85, dan 90°C. Setelah didapatkan pH optimum, maka dilakukan penentuan suhu optimum. Uji aktivitas yang dilakukan sama seperti sebelumnya yaitu menggunakan substrat pNP-palmitat. Campuran larutan enzim dan substrat diinkubasi pada rentang suhu 70-90°C selama 15 menit. Kemudian absorbansi larutan ditentukan dengan panjang gelombang 405 nm (Telussa, 2013).

3.3.5.3 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasi campuran enzim substrat dengan pH dan suhu optimum menggunakan variasi waktu inkubasi, yaitu: 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Uji aktivitas juga dilakukan dengan substrat pNP-palmitat. Campuran dari larutan

enzim dengan substrat diinkubasi pada rentang waktu 10-30 menit dan ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 405 nm (Telussa, 2013).

3.3.6 Penentuan Aktivitas Enzim Lipase

3.3.6.1 Uji Aktivitas Transesterifikasi Enzim Lipase

Saat dilakukan pembuatan kurva pertumbuhan untuk setiap pengukuran OD diambil juga 1 mL biakan dalam media *Nutrient Broth* untuk uji aktivitas optimumnya. Media ini lalu dimasukkan dalam tabung Eppendorf 1,5 mL dan disentrifugasi pada 12.000xg selama 15 menit menggunakan mikrosentrifuga (Micro 22R, Zentrifugen) pada suhu 4°C. Kemudian, supernatan dipindahkan ke tabung *Eppendorf* 1,5 mL yang steril. Aktivitas enzim pada fasa supernatan diuji menggunakan substrat pNP-palmitat yang dilarutkan dalam asetonitril hingga konsentrasi 10 mM. Substrat ini lalu ditambahkan etanol dan buffer kalium fosfat (pH 7,5) sehingga komposisi akhir yaitu asetonitril : etanol : buffer = 1 : 4 : 95 (v/v/v). Selanjutnya, larutan campuran tersebut sebanyak 0,6 mL ditambahkan dengan 0,4 mL enzim (supernatan hasil sentrifugasi) dan diinkubasi pada suhu 55°C menggunakan *waterbath* selama 15 menit. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi larutan pada panjang gelombang 405 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Lee *et al.*, 1999). Penentuan nilai aktivitas unit dapat dihitung menggunakan Persamaan 2.

$$AU = \frac{Asp - Abl}{Ast - Abl} \times FP \times \frac{1}{T} \quad (2)$$

Keterangan:

Asp : Nilai absorbansi larutan sampel

Abl : Nilai absorbansi larutan blanko

Ast : Nilai absorbansi larutan standar

FP : Faktor Pengenceran

T : Waktu inkubasi

3.3.6.2 Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase

Pada penelitian ini penentuan kadar protein yang dilakukan menggunakan metode Lowry. Penentuan kadar protein yaitu hasil dari aktivitas permukaan protein yang berhubungan dengan sifat hidrofobik dan hidrofiliknya. Kadar protein dapat diukur berdasarkan metode Lowry adalah sebagai berikut:

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

Pereaksi A	: 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 M
Pereaksi B	: 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan NaK-tartarat 1%
Pereaksi C	: 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A
Pereaksi D	: Reagen <i>folin ciocalteu</i> diencerkan dengan aquades (1:1)
Larutan standar	: Larutan BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>).

3.3.7 Produksi Biodiesel

Uji aktivitas transesterifikasi dilakukan menggunakan minyak kelapa sebagai substrat dan metanol sebagai reaktan. Proses transesterifikasi menggunakan tiga variasi perbandingan molar antara minyak kelapa dan metanol yaitu 1:3, 1:4, dan 1:5 yang digunakan enzim lipase yang dihasilkan dari biakan mikroba *Klebsiella* sp. yang digunakan sebagai katalis sebanyak 10% dari volume minyak kelapa yang dipakai dengan proses sebagai berikut:

- a. Minyak kelapa dan enzim lipase dimasukkan ke dalam labu tiga yang kemudian dipanaskan pada suhu 50°C selama 1 jam dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*.
- b. Ditambahkan metanol secara perlahan dengan rasio molar 1:3, 1:4, dan 1:5.

- c. Dilakukan proses transesterifikasi selama 24 jam, waktu dihitung dari penambahan metanol yang terakhir kali.
- d. Produk hasil transesterifikasi kemudian dipisah dan didiamkan selama 12 jam. Campuran akan membentuk 2 fasa, fasa bagian atas adalah metil ester, sedangkan fasa bagian bawah adalah gliserol.
- e. Produk biodiesel hasil dari transesterifikasi kemudian dievaporasi untuk menghilangkan *impurities* atau pengotor yang masih tersisa dan jumlah *yield* produk biodiesel dapat diperoleh dengan membandingkan jumlah berat awal dari minyak kelapa.

3.3.8 Karakterisasi Sampel Biodiesel

3.3.8.1 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 aquades dan ditimbang beratnya. Berat aquades diperoleh dari selisih berat piknometer berisi aquades 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 yang berisi sampel ditimbang dan serta sampel diperoleh dengan menghitung selisih berat piknometer berisi sampel dan berat piknometer kosong. Densitas dapat dihitung dengan rumus pada Persamaan 3.

$$\rho = \frac{B-A}{V} \quad (3)$$

Keterangan:

- ρ (densitas) g/mL : massa jenis sampel
 B (g) : berat piknometer + sampel
 A (g) : berat piknometer kosong
 V (mL) : volume piknometer

3.3.8.2 Analisis Viskositas

Sampel biodiesel diukur viskositasnya menggunakan metode *Ostwald* dengan alat viskometer *Ostwald*. Metode ini dilakukan dengan cara mengukur waktu yang diperlukan pada saat sampel mengalir dari batas atas sampai batas bawah dan membandingkan dengan waktu yang dibutuhkan. Setelah itu, waktu yang didapatkan dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan *Poiseuille* dan dihitung dengan rumus pada Persamaan 4 dan 5.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{air}} \times t_{\text{sampel}} \times \rho_{\text{biodiesel}}}{t_{\text{air}} \times \rho_{\text{air}}} \quad (4)$$

$$v = \frac{\mu}{\rho} \quad (5)$$

Keterangan:

μ : viskositas dinamis (cP)

μ_{air} : viskositas dinamis air ($8,9 \times 10^{-1}$ cP)

v : viskositas kinematik (m^2/s)

ρ_{air} : massa jenis air ($1000 \text{ kg}/\text{m}^3$)

$\rho_{\text{biodiesel}}$: massa jenis biodiesel (kg/m^3)

t_{air} : waktu aliran air (s)

$t_{\text{biodiesel}}$: waktu aliran larutan biodiesel (s)

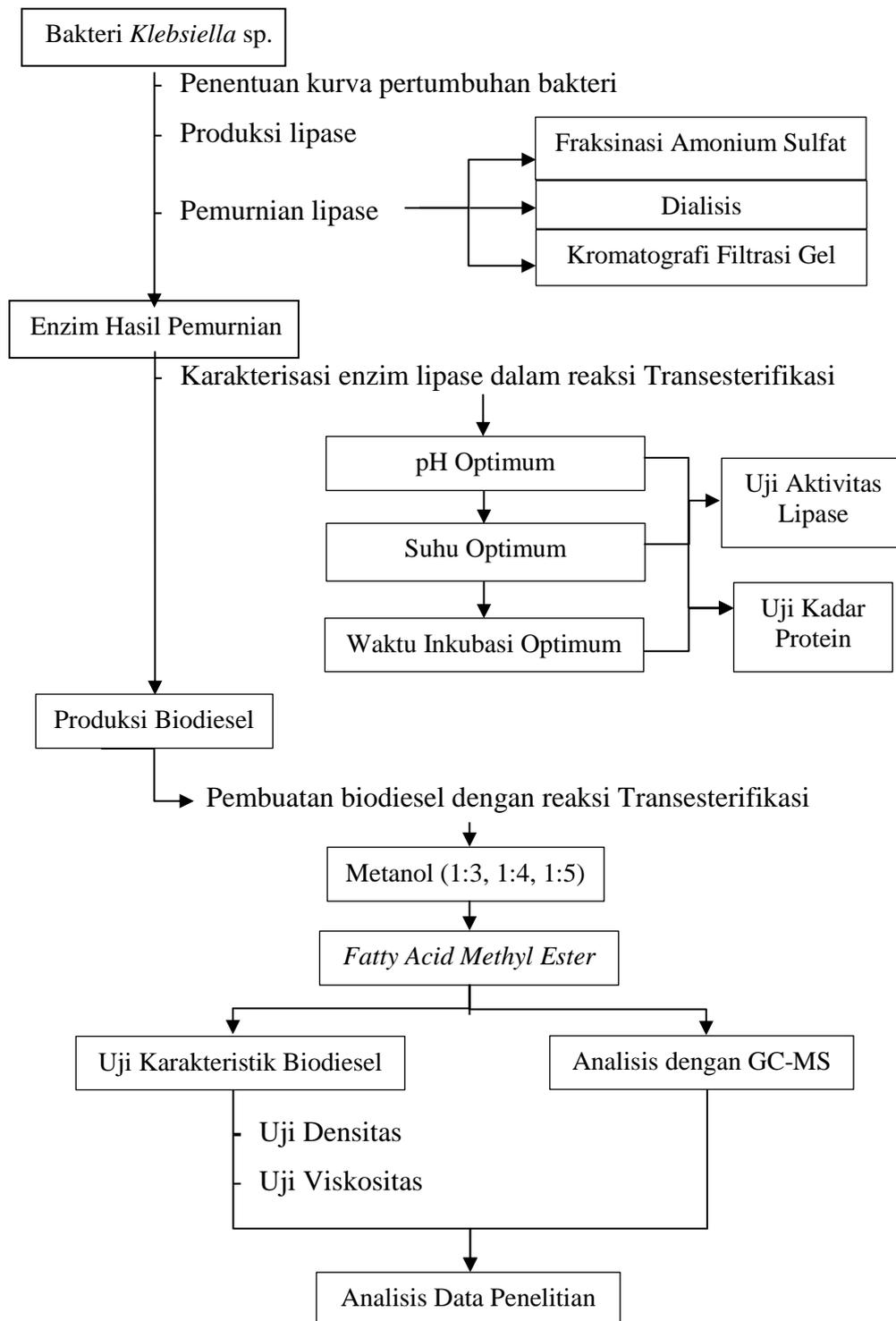
3.3.8.3 Analisis Kromatografi *Gass Chromatography - Mass Spectrophotometry* (GC-MS)

Analisis biodiesel dilakukan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung. Analisa ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi biodiesel (metil ester) sebagai produk transesterifikasi dengan menggunakan *Gass Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) (Shimadzu QP2010 SE).

Berat metil ester yang terbentuk dapat dihitung menggunakan Persamaan 6 (Sari, 2014).

$$\text{Biodiesel } \left(\frac{w}{w} \right) = \frac{\text{Berat biodiesel yang dihasilkan}}{\text{Berat minyak yang digunakan}} \times 100\% \quad (6)$$

3.4 Skema Penelitian



Gambar 11. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

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

1. *Klebsiella* sp. memiliki kondisi optimum pertumbuhan untuk menghasilkan lipase pada pH 7 dengan waktu inkubasi selama 48 jam.
2. Enzim lipase yang dimurnikan melalui fraksinasi amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi filtrasi gel memiliki kemurnian akhir sebesar 12,54 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar dan aktivitas spesifiknya sebesar 41,02 U/mg.
3. Enzim lipase yang telah dimurnikan memiliki karakteristik pada reaksi transesterifikasi dengan pH 7, suhu 80°C, dan waktu inkubasi 25 menit.
4. Hasil analisis rasio molar 1:3, 1:4, dan 1:5 menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa reaksi transesterifikasi dengan rasio molar 1:4 berupa metil laurat memberikan jumlah relatif metil ester tertinggi sebesar 4,46% yang paling baik untuk produksi biodiesel.
5. Hasil dari rasio molar 1:3 yang berupa biodiesel telah memenuhi spesifikasi standar SNI 7128:2015 (densitas: 870-890 kg/m³, viskositas kinematik: 2,3-6,0 × 10⁻⁶ m²/s) dengan nilai densitas dan viskositasnya sebesar 876 kg/m³ dan 2,403 × 10⁻⁶ m²/s. Rasio molar 1:4 dan 1:5 telah memenuhi spesifikasi viskositas kinematik dengan nilai masing-masing 2,322 × 10⁻⁶ m²/s dan 3,448 × 10⁻⁶ m²/s, namun belum memenuhi spesifikasi densitas dengan nilai keduanya sebesar 902 kg/m³.

5.2 Saran

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

1. Produksi biodiesel dilakukan variasi rasio molar, variasi konsentrasi katalis enzim lipase, dan variasi waktu lamanya transesterifikasi menyesuaikan kondisi optimum kerja enzim.
2. Analisis biodiesel menggunakan GC-MS dengan variasi molar yang lebih beragam agar mendapatkan metil ester yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamopoulos, L. 2006. *Understanding the Formation of Sugar Fatty Acid Esters*. Faculty of North Carolina State University. United State.
- Adinarayana, K. P., Ellaiah, D. S., and Prasad. 2003. Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from A Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-II, AAPS. *Pharmacy Science Technology*. 56(4): 1-9.
- Andaka, G. 2008. Hidrolisis Minyak Biji Kapuk dengan Katalisator Asam Klorida. *Jurnal Rekayasa Proses*. 2(2): 45-48.
- Arif, F. H. 2022. Studi Produksi Biodiesel dengan Katalis Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. dari Tanah Tercemar Minyak. *Skripsi*. Universitas Lampung.
- Aziz, I. 2007. Kinetika Reaksi Transesterifikasi Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(1): 19-23.
- Bajaj, A, Lohan, P., Jha, P. N., and Mehrotra, R. 2010. Biodiesel Production Through Lipase Catalyzed Transesterification: An Overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62(1): 9-14.
- Barbosa, J. M. P., Souza, R. L., De Melo, C. M., Fricks, A. T., Soares, C. M. F., Lima, A. S. 2012. Biochemical Characterization of Lipase from a New Strain of *Bacillus* sp. ITP-001. *Quim. Nova*. 35(6).
- Bora, L. and Bora, M. 2012. Optimization of Extracellular Thermophilic Highly Alkaline Lipase from Thermophilic *Bacillus* sp. Isolated from Hotspring of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(1): 30-42.
- Borelli, G. and Trono, D. 2015. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Uses as Biocatalysts for Industrial Application. *International Journal Molecular Science*. 16(9): 774-840.
- Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R., and Khobragade, C. N. 2009. Purification and Characterization of Extracellular Lipase from a New Strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(2): 358-366.

- Bose, A. and Keharia, H. 2013. Production, Characterization, and Applications of Organic Solvent Tolerant Lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2(3): 255–266.
- Bresnick, S. D. 2003. *Kimia Organik*. Hipokrates. Jakarta.
- Brisse S., Grimont F., and Grimont P. A. D. 2006. The genus *Klebsiella*. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd edition. Springer. New York.
- Brooks, G. F., Butel, J. S., Morse, S. A., and Mietzner, T. A. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 25*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Budhwani, A. A. A., Maqbool, A., Hussain, T., and Syed, M. N. 2019. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification of Non-Edible *Salvadora persica* (Pilu) Oil and Crude Coconut Oil in a Solvent-Free System. *Bioresources and Bioprocessing*. 6(41): 1-9.
- Burton, R. 2008. *Biodiesel Standards and Testing Methods*. Central Carolina Community College Piedmont Biofuels. Carolina.
- Colla, L. M., Primaz, A. L., Benedetti, S., Loss, R. A., de Lima, M., and Reinehr, C. O. 2016. Surface Response Methodology for The Optimization of Lipase Production Under Submerged Fermentation by Filamentous Fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(2): 461–467.
- Da Silva, G. P., De Lima, C. J. B., and Contiero, J. 2015. Production and Productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catalysis Today*. 257: 259-266.
- De Sousa, J. S., Cavalcanti-Oliveira, E. D. A., Aranda, D. A. G., and Freire, D. M. G. 2010. Application of Lipase from The Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) to a New Hybrid (Enzyme/Chemical) Hydroester-Ification Process for Biodiesel Production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 65(1–4): 133–137.
- Del Rio, J. L., Serra, P., Valero, F., Poch, M., and Sola, C. 1990. Reaction Scheme of Lipase Production by *Candida rugosa* Growing on Olive Oil. *Biotechnology Letters*. 12: 835-838.
- Damaso, M. C. T., Passianoto, M. A., de Freitas, S. C., Freire, D. M. G., Lago, R. C. A., and Couri, S. 2008. Utilization of Agroindustrial Residues for Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 676-681.

- 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).* Forensic Microscopy for Skeletal Tissues Springer. New York.
- Destianna, M. 2007. *Intensifikasi Proses Produksi Biodiesel.* LKIM. Institut Teknologi Bandung.
- Devanesan, M. G., Viruthagiri, T., and Sugumar, N. 2007. Transesterification of Jatropha Oil Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology*. 6: 2497-2501.
- Elfidasari, D. 2013. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada Beberapa Jenis Rokok Konsumsi Masyarakat. *Jurnal Masyarakat*. 2(1): 41-47.
- Emmanuel, M. B., Evans, E. C., Abubakar, A., Labaran, L. M., Ali, A. V., dan Zabe, M. 2020. Production, Partial Purification, and Characterization of Lipase Enzyme Expressed by *Klebsiella pneumoniae* of Vegetable Oil Contaminated Soil. *International Journal of Biochemistry and Biophysics*. 8(2): 30-39.
- Estiasih, Harijono, W. E., dan Fibrianto, K. 2016. *Kimia dan Fisik Pangan.* Bumi Aksara. Jakarta.
- Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D., and Hernández. 2006. Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food, Technology, Biotechnology*. 44(2): 235–240.
- Fauziah, S. R. 2016. Identifikasi *Klebsiella* sp. pada Es Campur yang dijual di Jalan William Iskandar Medan. *Skripsi*. Jurusan Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Medan.
- Garrity, G. M., Benner, D. J., Krieg, N. R., and Stanley, J. T. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Pp 685.
- Gupta, N., Sahai, V., and Gupta, R. 2007. Alkaline Lipase from a Novel Strain *Burkholderia multivorans*: Statistical Medium Optimization and Production in A Bioreactor. *Process Biochemistry*. 42(4): 518–526.
- Haryanto, B. 2002. *Bahan Bakar Alternatif Biodiesel.* Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- 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, C., Hastuti, P., Utazmi, S., Wardhani, A. K., and Pradipta, D. S. 2014. Enhancing Indigenous Lipase Activity of Germinated *Jatropha curcas* L. Seeds for The Enzymatic Degradation of Phorbol Ester. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3(3): 71-76.
- Jaeger, K. and Reetz, M. T. 1998. Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. *Trends Biotechnology*. 16: 396-403.
- Jawetz, E., Melnick, J., and Adelberg. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Khalid, K. 2011. Transesterification of Palm Oil for The Production of Biodiesel. *American Journal of Applied Sciences*. 8(8): 804-809.
- 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.
- Kurniawan, F. B., dan Indra, T. S. 2018. *Bakteriologi*. EGC. Jakarta.
- Lay, W. B. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium Edisi Pertama*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lee, D., Koh, Y., Kim, K., Choi, H., Kim, D., Suhartono, M. T., and Pyun, Y. 1999. Isolation and Characterization of a Thermophilic Lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*. 179: 393-400.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Li, Y., Liu, T., Zhao, M., Zhang, H., and Feng, F. 2019. Screening, Purification, and Characterization of an Extracellular Lipase from *Aureobasidium pullulans* Isolated from Stuffed Buns Steamers. *Journal of Zhejiang University Science*. 20(4): 332-342.
- Liew, Y. X., Chan, Y. J., Show, P. L., Manickam, S., and Chong, M. F. 2015. Optimization of Alkaline Lipase Production from *Burkholderia cepacia* Through Submerged Fermentation. *Chemical Engineering*. 45: 1675-1680.
- Ma, F., Hanna, M. A. 1999. Biodiesel Production: a Review. *Bioresource Technology*. 70: 1-15.
- Mangunwardoyo, W., Lusini, Y., dan Gandjar, I. 2009. Karakterisasi, Pengaruh Sumber Nitrogen dan Karbon terhadap Produktivitas Enzim Lipase *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* UICC 550. *Biota*. 14(2): 115-124.

- Manullang, W. F. 2014. 1,2-Dimetil-1,1,2,2-Tetrafenildisilana Sulfonat Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi CPO (*Crude Palm Oil*) Berkadar Asam Lemak Bebas Tinggi untuk Menghasilkan Biodiesel. *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Marchetti, J. M., Miguel, V. U., Errazu, A. F. 2007. Possible Methods for Biodiesel Production. *Renew Sustain Energy Rev.* 11:1300-1311.
- Mardiyantoro, F., Munika, K., Sutanti, V., Cahyati, M., dan Pratiwi, A. R. 2018. *Penyembuhan Luka Rongga Mulut*. UB Press. Malang.
- Moentamaria, D. G. 2016. Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Lipase Terimobilisasi Zeolit pada Pembuatan Perisa Alami. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan.* 5(2): 84-91.
- Mukherjee, K. D., and Hill, M. J. 1994. *Lipase from Plants*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Nabilasani, G. C. 2018. Produksi dan Karakterisasi Lipase untuk Reaksi Transesterifikasi dari Kapang Mutan. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. 2004. *Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Edition*. W. H. Freeman and Company. New York.
- Norjannah, B., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Cuan, J. C., and Chong, W. T. 2016. Enzymatic Transesterification for Biodiesel Production a Comprehensive Review. *RSC Advances.* 65.
- Nourredine, A. 2010. *Sulfate and Hydroxide Supported on Zirconium Oxide Catalysts for Biodiesel Production*. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Octavia, R. Z. 2011. Pembuatan dan Uji Kualitas Bahan Bakar Alternatif (Biodiesel) dari Minyak Kelapa (*Cocos nucifera*). *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri (UIN) Alauddin. Makassar.
- Ozturk, B. 2001. *Immobilization of Lipase from Candida rugosa On Hydrophobic and Hydrophilic Support*. Dissertation Master of Science. Izmir Institute of Technology. Turki
- Parwata, I. P. dan Martiningsih, N. W. 2014. Lipase Alkali dan Stabil Alkohol dari Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali. *Seminar Nasional Riset Inovatif II.* 900-906.

- Pelczar, M. J. dan Chan, E. C. S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi 1*, Alih bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S. S. dan Angka, S. L. UI Press. Jakarta.
- Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D., and Castro, G. R. 2006. Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technology. Biotechnology*. 44(2): 247–252.
- Pereira-Meirelles, F. V., Rocha-Leao, M. H. M., and Sant' Anna Jr., G. L. 2000. Lipase Location in *Yarrowia Lipolytica* Cells. *Biotechnology Letter*. 22(1): 71-75.
- Poedjiadi, A dan Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Poedjiadi, A dan Titin, F. M. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI Press. Jakarta.
- Ponnusami, V. dan Arumugam, A. 2017. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification of Waste Sardine Oil and Evaluation of Its Engine Performance. *Heliyon*. 3(12): 1-18.
- Popoola, B. M and Olateru, C. T. 2021. Purification and Kinetics of Lipase of *Pseudomonas fluorescens* from Vegetable Oil Polluted Soil. *Journal of Biological Sciences*. 21:29-37.
- 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 Sainia Kimia*. (1): 2.
- Putri, S. K. 2012. Penambahan Enzim Bromelin untuk Meningkatkan Pemanfaatan Protein Pakan dan Pertumbuhan Benih Nila Larasati (*Oreochromis niloticus* var). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 1(1): 63-76.
- Regina, O., Sudrajad, H., dan Syaflita, D. 2018. Measurement of Viscosity Uses an Alternative Viscometer. *Jurnal Geliga Sains*. 6(2): 127-132.
- 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. *Tesis*. Program Pascasarjana. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Santos, K. C., Cassimiro, D. M. J., Avelar, M. H. M., Hirata, D. B., de Castro, H. F., and Fernández-Lafuente, R. 2013. Characterization of The Catalytic Properties of Lipases from Plant Seeds for The Production of Concentrated Fatty Acids from Different Vegetable Oils. *Industrial Crop. Products*. 49(1): 462-470.

- Sari, D. K. 2010. *Modifikasi Lipase Isolat Lokal pada Sintesis Biodiesel*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Sari, R. F. 2010. Optimasi Aktivitas Selulase Ekstraseluler dari Isolat Bakteri RF-10. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L., and Gupta, J. 2002. Purification and Characterization of a Thermostable Alkaline Lipase from a New Thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochemistry*. 37(3): 1075-1084.
- Singh, A. K. and Mukhopadhyay, M. 2011. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Application Biochemistry Biotechnology*. 486-520.
- Sirisha, E., Rajasekar, N., dan Narasu, M. N. 2010. Isolation and Optimization of Lipase Producing Bacteria from Oil Contaminated Soils. *Advances in Biological Research*. 4(5): 249-252.
- Soerawidjaja. 2006. *Intensifikasi Proses Produksi Biodiesel*. Departemen Teknik Kimia, ITB. Bandung.
- Sun, J., Zhang, W., Ding, W., Lin, J., Tian, T., Liu, X., Shen, X., Qian, P. Y. 2015. Extracellular Matrix-Associated Protein Form an Integral and Dynamic System during *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 5: 1-10.
- Susilo, B. 2006. *Biodiesel: Pemanfaatan Biji Jarak Pagar sebagai Alternatif Bahan Bakar*. Trubus Agrisarana. Surabaya.
- Svendsen, A. 1994. Sequence Comparison Within the Lipase Family. Lipases, Their structure, *Biochemistry and Application*. 15.
- Sya'bani, N., Astuti, W., dan Pratiwi, D. R. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Lipase dari Kecambah Biji Alpukat. *Jurnal Atomik*. 209-212.
- Syarurachman, A., Chatim, A., Soebandrio, A., Karuniawati, A., dan Harun, H. 1993. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Syihab, F. S. 2011. *Modifikasi dan Penentuan Berat Molekul Lipase Isolat serta Aplikasinya pada Sintesis Biodiesel dari Minyak Rumpun Laut (Sargassum sp.)*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Talha, N. S. and Sulaiman, S. 2016. Overview of Catalysis in Biodiesel Production. *ARPN Journal of Engineering and Applied Science*. 11(1): 439-448.

- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Subtitute dan Karakterisasi Lipasenya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura*. 5(1): 62-71.2112
- Treichel, H., Oleivera, D., Mazzuti, M. A., Luccio, M. D., and Oleivera, J. V. 2010. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technology*. 3: 182-196.
- Turati, D., Almeida, A., Terrone, C., Nascimento, J., Terrasan, C., Lorente, G., Pessela, B., Guisan, J., and Carmona, E. 2019. Thermotolerant Lipase from *Penicillium* sp. section Gracilenta CBMAI 1583: Effect of Carbon Sources on Enzyme Production, Biochemical Properties of Crude and Purified Enzyme and Substrate Specificity. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17(10): 15-24.
- Weerasooriya, M. K. B., and Kumarasinghe, A. A. N. 2012. Isolation of Alkaline Lipase from Rubber Seed-Partial Purification, Characterization and its Potential Applications as a Detergent Additive. *Indian Journal of Chemical Technology*. 19: 244-249.
- Widayat, Suherman, dan Haryani, K. 2013. Optimasi Proses Adsorpsi Minyak Goreng Bekas dengan Adsorbent Zeolit Alam: Studi Pengurangan Bilangan Asam. *Jurnal Teknik Gelegar*. 17(1): 77-82.
- Wijaya, K. 2011. *Biodiesel dari Minyak Goreng Bekas*. Pusat Studi Energi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Winarno, F. G. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wright, R. T., Wiyono, I. E., and Abdi, A. 2014. *Indonesia biofuels annual. Global Agricultural Information Network (GAIN)*. ID1420.
- Yapasan, E. 2008. *Partial Purification and Characterization of Lipase Enzyme from a Pseudomonas Strain*. Izmir Institute of Technology. Turki.
- Zalfiatri, Y., Restuhadi, F., dan Zulhardi, R. 2019. Karakteristik Biodiesel dari Minyak Jelantah Menggunakan Katalis Abu Gosok dengan Variasi Penambahan Metanol. *Chempublish Journal*. 4(1): 1-8.