

**PENGARUH KOMPOSISI MOLAR MINYAK DAN METANOL
TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI LIPASE
Pseudomonas sp. LPG171 SEBAGAI KATALIS PADA PRODUKSI
BIODIESEL**

(Skripsi)

Oleh

HILDA PRIHARYATI



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

ABSTRAK

PENGARUH KOMPOSISI MOLAR MINYAK DAN METANOL TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI LIPASE *Pseudomonas sp.* LPG171 SEBAGAI KATALIS PADA PRODUKSI BIODIESEL

Oleh

Hilda Priharyati

Biodiesel merupakan bahan bakar alternatif yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi minyak dengan alkohol. Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas lipase *Pseudomonas sp.* LPG171 sebagai katalis reaksi transesterifikasi untuk produksi biodiesel. Aktivitas lipase ditentukan dengan metode *Fu* dengan substrat *P-Nitrofenol Palmitat*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171 pada media mengandung NB, minyak zaitun dan *tween* 80 menghasilkan lipase dengan aktivitas optimum pada pH 7 dan waktu pertumbuhan 24 jam dengan aktivitas sebesar 5,15 U/mL. Pemurnian lipase dengan ammonium sulfat dan dialisis menunjukkan aktivitas unit sebesar 8,12 U/mL dan aktivitas spesifik 9,598 U/mg dengan tingkat kemurnian 3,52 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Enzim lipase mencapai aktivitas optimum pada pH 7, suhu 35 °C, dan waktu inkubasi 120 menit. Penggunaan lipase *Pseudomonas sp.* LPG171 sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi dengan perbandingan molar minyak : metanol sebesar 1:3 dan 1:4 menunjukkan produk dengan nilai densitas masing-masing sebesar 859 dan 864 kg/m dan viskositas 2,41 dan 2,67 cSt. Nilai viskositas dan densitas tersebut seperti disyaratkan SNI biodiesel. Analisis menggunakan GC-MS terhadap produk reaksi transesterifikasi menunjukkan terbentuknya metil palmitat dan metil oleat. Berdasarkan hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas lipase *Pseudomonas sp.* LPG171 sebagai katalis masih perlu dioptimalkan agar produk biodiesel optimal.

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

ABSTRACT

EFFECT OF MOLAR COMPOSITION OF OIL AND Methanol ON LIPASE TRANSESTERIFICATION ACTIVITY OF Pseudomonas sp. LPG171 AS A CATALYST IN BIODIESEL PRODUCTION

By

Hilda Priharyati

Biodiesel is an alternative fuel produced from the transesterification reaction of oil with alcohol. This research examines the lipase activity of Pseudomonas sp. LPG171 as a catalyst in the transesterification reaction for biodiesel production. Lipase activity was determined using the Fu method with p-Nitrophenol Palmitate as the substrate. The research results show that the growth of Pseudomonas sp. LPG171 bacteria in media containing NB, olive oil, and Tween 80 produces lipase with optimum activity at pH 7 and a growth time of 24 hours, with an activity of 5.15 U/mL. Purification of lipase with ammonium sulfate and dialysis shows a unit activity of 8.12 U/mL, specific activity of 9.598 U/mg, and a purity level 3.52 times higher than the crude enzyme extract. The lipase enzyme achieves optimum activity at pH 7, a temperature of 35°C, and an incubation time of 120 minutes. The use of Pseudomonas sp. LPG171 lipase as a catalyst in the transesterification reaction with a molar ratio of oil:methanol of 1:3 and 1:4 produces products with respective density values of 859 and 864 kg/m and viscosities of 2.41 and 2.67 cSt. These viscosity and density values meet the requirements of biodiesel according to Indonesian National Standard (SNI). Analysis using GC-MS on the transesterification reaction products indicates the formation of methyl palmitate and methyl oleate. Based on the analysis results, the lipase activity of Pseudomonas sp. LPG171 as a catalyst still needs to be optimized for optimal biodiesel production.

Key words: Pseudomonas sp., lipase, transesterification and biodiesel.

**PENGARUH KOMPOSISI MOLAR MINYAK DAN METANOL
TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI LIPASE
Pseudomonas sp. LPG171 SEBAGAI KATALIS PADA PRODUKSI
BIODIESEL**

Oleh

HILDA PRIHARYATI

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 Penelitian

**PENGARUH KOMPOSISI MOLAR MINYAK
DAN METANOL TERHADAP AKTIVITAS
TRANSESTERIFIKASI LIPASE *Pseudomonas*
sp. LPG171 SEBAGAI KATALIS PADA
PRODUKSI BIODIESEL**

Nama

Hilda Priharyati

Nomor Pokok Mahasiswa

1957011005

Jurusan

Kimia

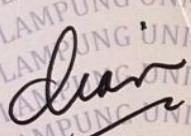
Fakultas

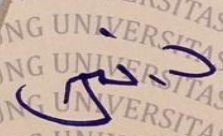
Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam



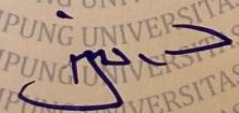
MENYETUJUI

1. **Komisi Pembimbing**


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


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP.19740611200031002

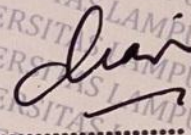
2. **Ketua Jurusan Kimia**


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP.197108062000032001

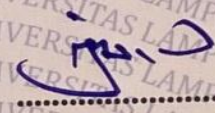
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

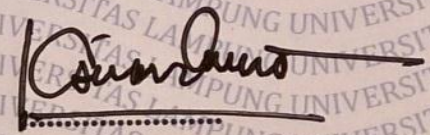
Ketua : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Sekretaris : **Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.**



Anggota : **Dr. Agung Abadi Kiswandono, S.Si., M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **27 Desember 2023**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

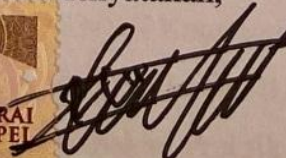
Nama : Hilda Priharyati
NPM : 1957011005
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul: **Pengaruh Komposisi Molar Minyak Dan Metanol Terhadap Aktivitas Transesterifikasi Lipase *Pseudomonas sp.* LPG171 Sebagai Katalis Pada Produksi Biodiesel** merupakan benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain kecuali disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga, apa yang tercantum di dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan.

Kemudian, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama. Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Bandar Lampung, 27 Desember 2023
Menyatakan,




Hilda Priharyati
NPM. 1957011005

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Hilda Priharyati lahir di Natar, Lampung Selatan pada tanggal 26 Februari 2001. Penulis merupakan anak Pertama dari tiga bersaudara, putri dari Bapak Roeddy Hartonoo dan Ibu Supriyatun. Penulis pertama kali menempuh pendidikan di Taman Kanak-kanak Dharma Wanita, Bumi Dipasena Utama yang diselesaikan pada tahun 2006. Kemudian dilanjutkan ke Sekolah Dasar di SD Negeri 01 Bumi Dipasena Utama dan SD Negeri 03 Rejosari yang ditamatkan pada tahun 2013. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri Satu Atap 01 Rawa Jitu Timur yang ditamatkan pada tahun 2016. Lalu penulis melanjutkan pendidikan di Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Natar, Lampung Selatan pada tahun 2016-2019.

Pada tahun 2019, penulis diterima di Jurusan S1 Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri-Barat (SMMPN-Barat). Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke 30 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2019. Penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi UNIT KEGIATAN MAHASISWA UNIVERSITAS (UKMU) SAINTEK Universitas Lampung sebagai anggota Kesekretariatan dan Rumah Tangga (KRT) periode 2020.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Kagungan Rahayu, Kecamatan Menggala, Kabupaten Tulang Bawang, selama 40 hari. Setelah melaksanakan kewajiban KKN, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dari bulan Juli

tahun 2022 hingga bulan September tahun 2022 dengan judul “Uji Efektivitas Dekomposer Biotama Terhadap Penurunan Kadar *Total Suspended Solid* (TSS) Pada Limbah Cair Industri Tahu” Selama menjalani perkuliahan, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Analisis untuk mahasiswa jurusan Biologi Terapan pada semester satu pada tahun 2022 dan menjadi asisten praktikum Biokimia untuk mahasiswa jurusan Biologi semester dua dan mahasiswa Biologi Terapan semester dua pada tahun 2023.

MOTTO

Dan aku menyerahkan urusanku kepada Allah SWT
(QS. Ghafir 40:44)

Dan ketika dunia ini melelahkanmu Allah berkata
“Aku selalu bersamamu”

“Orang lain ga akan paham *struggle* dan masa sulitnya kita, yang mereka ingin tahu hanya bagian *success stories*nya aja, Jadi berjuanglah untuk diri sendiri meskipun gak akan ada yang tepuk tangan. Kelak diri kita di masa depan akan sangat bangga dengan apa yang kita perjuangkan hari ini.

Jadi tetap berjuang ya. “

PERSEMBAHAN

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas Rahmat-Nya serta sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW.



Karya sederhana ini dipersembahkan kepada:

Kedua orang tua tercinta

Bapak Roeddy Hartono dan Ibu Supriyatun

Yang senantiasa memberikan motivasi, nasihat, cinta dan kasih, doa, serta dukungan secara moril dan finansial kepada penulis selama ini.

Rasa hormat saya kepada:

**Ibu Dr.Dian Herasari, S.Si., M.Si. | Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D. |
Dr.Agung Abadi Kiswando, S.Si., M.Sc.
Serta seluruh dosen Jurusan Kimia**

Terima kasih telah mendidik, membimbing, dan memberikan wawasan selama penulis menempuh pendidikan di kampus hingga mendapat gelar sarjana. Semoga

Allah SWT membalas kebaikan bapak dan ibu kelak, *Aamiin*.

Serta

Keluarga besar dan sahabat-sahabat seperjuangan

dan

Almamater tercinta, Universitas Lampung

SANAWACANA

Assalammu'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuuh.

Alhamdulillah *rabbil'alaamiin*. Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahuwata'aalaa, serta tak lupa pula salam cinta kepada Baginda Nabi Muhammad SAW, karena berkat Rahmat dan Hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “**Pengaruh Komposisi Molar Minyak Dan Metanol Terhadap Aktivitas Transesterifikasi Lipase *Pseudomonas sp. LPG171* Sebagai Katalis Pada Produksi Biodiesel**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Selain bersyukur kepada dzat pencipta bumi dan kekasih-Nya, penulis juga ingin berterima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Adapun pihak-pihak tersebut, antara lain:

1. Kedua orang tuaku; Bapak Roeddy Hartono dan Ibu Supriyatun orang paling berjasa dalam hidup saya terimakasih untuk segala doa, nasihat, *support*, pengorbanan, perjuangan, kesabaran, dan kasih sayangnya. Terima kasih karena selalu mendukung pilihan penulis, terima kasih atas cinta dan kasih sayang yang selalu diberikan di setiap jalan penulis menempuh pendidikan, terima kasih atas doa yang selalu dipanjatkan kepada Allah SWT sehingga penulis selalu diberikan dan diberkahi kelancaran dalam setiap urusan dalam menyelesaikan pendidikan.
2. Kepada cinta kasihku kedua Adik ku ; Dica Mayang Saputri dan Muhamad Hendar Saputra Terima kasih sudah mendengarkan keluh kesah yang hampir setiap hari dan tiada hentinya menyemangati penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

3. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., sebagai pembimbing I penulis. Terima kasih atas bimbingan, arahan, dukungan, dan ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis mulai dari saat penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan hingga melaksanakan penelitian untuk menuntaskan skripsi ini.
4. Bapak Mulyono S.Si., M.Si., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing II atas segala saran, bimbingan, ilmu, semangat, kesabaran, dan waktunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono S.Si., M.Sc selaku dosen pembahas terima kasih karena telah memberikan masukan-masukan yang membangun untuk kemudian dijadikan sebuah pembelajaran oleh penulis.
6. Bapak Prof. Dr. Buhani, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing akademik, penulis mengucapkan terima kasih banyak atas bimbingan, nasihat, motivasi, dan kesabaran dalam membimbing penulis selama masa perkuliahan.
7. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu baik dalam bidang akademik maupun non akademik.
10. Laboran laboratorium Biokimia, staff administrasi, satuan pengaman, dan seluruh pegawai di lingkungan Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
11. *Dian's Research Group 2019* : Adiya Raihan Mubarak, Partini, dan Putri Ayu Safitri, terima kasih atas bahu, telinga, pengorbanan waktu istirahat, keringat, dan air mata yang telah dikorbankan selama menjalankan penelitian bersama penulis di laboratorium.
12. Muhamad Sidiq yang selalu support dan memberikan semangat.
13. Sahabat kontrakan : Partini, Anjel, Verinda, Zahra, Sinta, dan Chinta terima kasih atas segala dukungan, bantuan, dan semangat selama masa perkuliahan.
14. Sahabat sekawan : Shely Aprilia dan Viva Tiara, yang selalu memberi motivasi, semangat, kepercayaan dan ruang hiburan bagi penulis. Sehingga

penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah memperlancar kita dalam menjalani kehidupan baik dunia maupun akhirat.

15. Teman-Teman Kimia 2019 terutama Kelas C atas segala kenangan selama kuliah.
16. Seluruh pihak yang telah membantu dan mendukung penulis yang tidak dapat dituliskan satu per satu.
17. Terakhir, Terima kasih Kepada diri saya sendiri Hilda Priharyati, terima kasih karena telah mampu berusaha keras dan berjuang sejauh ini. Mampu mengendalikan diri dari berbagai tekanan diluar keadaan dan tak pernah menyerah sesulit apapun proses penyusunan skripsi ini dengan menyelesaikan sebaik dan semaksimal mungkin, ini merupakan pencapaian yang patut dibanggakan untuk diri sendiri dan kuhadiahkan pencapaian ini untuk kedua orangtuaku tercinta.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat beberapa ketidaksempurnaan, tetapi penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan di masa depan.

Bandar Lampung, 27 Desember 2023

Penulis,

Hilda Priharyati
NPM. 1957011005

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	ii
DAFTAR GAMBAR	iii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas sp</i>	5
2.2 Enzim Lipase.....	6
2.2.1. Sumber Enzim Lipase.....	10
2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	11
2.2.3. Aktivitas Enzim Lipase.....	14
2.2.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry.....	15
2.2.5. Pemanfaatan Enzim Lipase.....	16
2.3 Biodiesel.....	17
2.3.1. Minyak Kelapa Sawit.....	17
2.4 Spektrofotometer UV-Vis.....	20
2.5 <i>Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry</i> (GC-MS).....	21
III. METODE PENELITIAN	23
3.1 Waktu Dan Tempat.....	23
3.2 Alat Dan Bahan.....	23

3.2.1. Alat-Alat.....	23
3.2.2. Bahan-Bahan.....	23
3.3. Prosedur Penelitian.....	24
3.3.1. Tahap Persiapan.....	24
3.3.2. Penentuan Aktivitas Transesterifikasi Enzim Lipase.....	25
3.3.3. Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase.....	26
3.3.4. Penentuan Kurva dan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri.....	26
3.3.5. Produksi Enzim Lipase.....	27
3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase.....	27
3.3.7. Karakterisasi Enzim Lipase.....	28
3.3.8. Pembuatan Biodiesel.....	29
3.3.9. Karakterisasi Sampel Biodiesel.....	30
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1. Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri.....	34
4.1.1. Penentuan Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	34
4.1.1. pH Optimum Pertumbuhan Bakteri.....	37
4.2. Produksi Enzim Lipase.....	38
4.3. Pemurnian Enzim Lipase.....	39
4.3.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat.....	39
4.3.2. Dialisis.....	40
4.4. Karakterisasi Enzim Lipase.....	41
4.4.1. pH Optimum Enzim.....	42
4.4.2. Suhu Optimum Enzim.....	43
4.4.3. Waktu Inkubasi Optimum Enzim.....	44
4.5. Proses Transesterifikasi.....	46
4.5.1. Densitas.....	47
4.5.2. Viskositas.....	47
4.5.3. Analisis <i>Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry</i> (GC-MS).....	48

V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1. Kesimpulan.....	54
5.2. Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55
LAMPIRAN.....	Er

ror! Bookmark not defined.

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Asam Lemak Dalam Minyak Kelapa Sawit.....	18
2. Standar dan Mutu (Spesifikasi) Bahan Bakar Nabati (<i>Biofuel</i>).....	20
3. Pemurnian Enzim Lipase dari Bakteri <i>Pseudomonas sp.</i> LPG171.....	41
4. Hasil Uji Kuantitatif Karakterisasi Biodiesel.....	48
5. Komposisi Hasil Percobaan dengan Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan 1:3	49
6. Komposisi Hasil Percobaan dengan Nisbah Minyak Kelapa Terhadap Metanol dengan Perbandingan 1:4.....	50
7. Hubungan Nilai <i>Optical Density</i> (OD) dengan Aktivitas Enzim (U/mL).....	Error! Bookmark not defined.
8. Nilai Aktivitas Unit Pada Penentuan pH Optimum Produksi Enzim Lipase....	Error! Bookmark not defined.
9. Hubungan Antara Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat Fraksi 0-20 % dan 20-90% Dengan Aktivitas Enzim Lipase Dari <i>Pseudomonas sp.</i> LPG171.....	Error! Bookmark not defined.
10. Pengaruh pH Pada Aktivitas Enzim Lipase.....	Error! Bookmark not defined.
11. Pengaruh Suhu Pada Aktivitas Enzim Lipase.....	Error! Bookmark not defined.
12. Pengaruh Waktu Inkubasi Pada Aktivitas Enzim Lipase.....	Error! Bookmark not defined.
13. Nilai Densitas Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol.....	Error! Bookmark not defined.
14. Nilai Viskositas Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol.....	Error! Bookmark not defined.

15. Nilai Absorbansi dari Kurva Standar *P-Nitrophenol*
Palmitat.....**Error! Bookmark not defined.**

16. Nilai Absorbansi dari Kurva Standar *Bovine Serum Albumin*
(BSA).....**Error! Bookmark not defined.**

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mekanisme Reaksi Esterifikasi.....	8
2. Mekanisme Reaksi Transesterifikasi.....	8
3. Mekanisme Reaksi Hidrolisis.....	9
4. Hubungan Aktivitas Enzim dengan Suhu.....	12
5. Hubungan Laju Reaksi dengan pH.....	13
6. Hubungan Laju Reaksi dengan Konsentrasi.....	14
7. Skema Fraksinasi Enzim.....	28
8. Diagram Alir Penelitian.....	33
9. Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Lipase <i>Pseudomonas sp.</i> LPG171.....	35
10. pH Optimum Pertumbuhan Bakteri <i>Pseudomonas sp.</i> LPG171.....	37
11. Hubungan Antara Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat Terhadap Aktivitas Spesifik (U/mg) Enzim Lipase dari <i>Pseudomonas sp.</i> LPG171 pada Fraksi (0-20)% dan (20-90) %.....	40
12. Pengaruh pH Pada Aktivitas Enzim Lipase.....	42
13. Pengaruh Suhu Pada Aktivitas Enzim Lipase.....	43
14. Pengaruh Waktu Inkubasi Pada Enzim Lipase.....	45
15. Produk Biodiesel.....	46
16. Kromatogram Hasil Percobaan Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan 1:3.....	49
17. Kromatogram Hasil Percobaan Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan 1:4.....	50
18. Spektroskopi Massa Metil Palmitat Dari Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan 1:3.....	Error! Bookmark not defined.

19. Spektroskopi Massa Metil Oleat Dari Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan

1:3.....**Error! Bookmark not defined.**

20. Spektroskopi Massa Metil Oleat Dari Nisbah Minyak Kelapa Sawit Terhadap Metanol dengan Perbandingan

1:4.....**Error! Bookmark not defined.**

I. PENDAHULUAN

1.1 . Latar Belakang

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

Indonesia negara pengekspor minyak bumi yang mengalami permasalahan energi di masa datang dikarenakan cadangan minyak bumi di Indonesia semakin terbatas karena produk-produknya yang tidak terbarukan. Bahan bakar alternatif dibutuhkan untuk mensubstitusi bensin dan solar yang ramah terhadap lingkungan. Pengembangan bahan bakar alternatif merupakan alat strategis untuk mengurangi ketergantungan pada bahan bakar fosil dan menciptakan kelestarian lingkungan (Dewi, 2018).

Terdapat beberapa macam bahan bakar nabati, digunakan pada bidang transportasi adalah biodiesel dan bioetanol. Biodiesel adalah bahan bakar alternatif yang dapat diperbarui, ramah terhadap lingkungan. Biodiesel dapat disintesis melalui reaksi kimia yang disebut reaksi transesterifikasi dimana reaksi antara senyawa trigliserida (komponen utama minyak nabati) dengan senyawa alkohol (biasanya metanol). Reaksi ini menghasilkan dua produk yaitu metil ester asam lemak (biodiesel) dan gliserin. Biodiesel terbuat dari minyak nabati berasal dari sumberdaya yang dapat diperbarui. Beberapa bahan baku untuk pembuatan biodiesel antara lain kelapa sawit, kedelai, bunga matahari, dan jarak pagar (Armalita *et al.*, 2015).

Produksi tradisional biodiesel dapat membutuhkan lebih banyak waktu dan lebih banyak energi. Oleh karena itu perlu adanya strategi yang dapat menghemat biaya. Reaksi transesterifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, basa dan enzim lipase dengan kondisi optimal melibatkan suhu yang sesuai, rasio molar antara minyak dan metanol, serta waktu reaksi yang optimal (Buchori *et al.*, 2015). Enzim lipase sebagai biokatalis mampu mengarahkan reaksi secara spesifik ke arah produk yang diinginkan tanpa terjadinya reaksi samping yang merugikan. Biokatalis ini merupakan katalis heterogen, sehingga pemisahannya dari produk setelah reaksi berakhir dapat dilakukan dengan mudah (Buchori *et al.*, 2015). Enzim lipase dapat diperoleh dari bakteri yang memiliki sifat lipolitik, bakteri lipolitik merupakan bakteri yang memiliki kemampuan untuk memecah atau menghidrolisis lemak, fosfolipid, dan turunannya (Winarno, 2008). Bakteri *Pseudomonas sp.* merupakan salah satu bakteri yang bersifat lipolitik dan banyak terdapat di tanah, air, tanaman, dan hewan. *Pseudomonas sp.* sering terdapat pada flora normal usus dan kulit manusia (Jawetz dan Adelberg's, 2008).

Pada penelitian ini produksi biodiesel terdapat beberapa kondisi reaksi yang mempengaruhi konversi produk pada reaksi transesterifikasi salah satunya adalah rasio molar pelarut. Menurut Katsiroh (2017), reaksi transesterifikasi diperlukan variasi mol alkohol per mol minyak untuk menghasilkan biodiesel dan gliserin. Mengingat reaksi transesterifikasi merupakan reaksi bolak-balik maka diperlukan jumlah metanol yang berlebih untuk mendapatkan produk dengan jumlah yang

maksimal. Jumlah metanol yang berlebih pada reaksi transesterifikasi dibutuhkan untuk menggeser kesetimbangan ke arah kanan sehingga rendemen biodiesel dan gliserol meningkat. Namun, diperlukan penggunaan jumlah metanol yang tepat untuk mendapatkan rendemen biodiesel yang maksimal. Hal ini disebabkan jumlah metanol yang berlebih juga dapat memberikan kerugian antara lain pemisahan ester dari lapisan gliserol menjadi lebih sulit dan kemungkinan katalis basa, asam atau enzim akan larut dalam alkohol yang berlebih. Lipase adalah enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis atau memecahan ikatan ester dalam lemak, seperti trigliserida, menjadi komponen yang lebih sederhana, seperti asam lemak dan gliserol. Ini terjadi pada *interface* antara minyak dan air. (Djarkasi dan Raharjo, 2017).

Pembuatan biodiesel pada penelitian ini menggunakan minyak goreng sawit. Komposisi asam lemak dalam minyak kelapa sawit bervariasi tergantung pada berbagai faktor, termasuk sumber dan metode pengolahan minyak tersebut. Minyak kelapa sawit sebagai sumber yang tepat untuk dijadikan salah satu bahan baku pembuatan biodiesel dengan komposisi asam stearat 3-5%, asam linoleat 10-15%, asam oleat 40-50%, dan asam palmitat 40-45% (Suleman *et al.*, 2019). Alkohol yang sering dipakai dalam proses transesterifikasi yaitu metanol, karena harganya yang relatif lebih murah serta paling reaktif dibandingkan jenis alkohol lainnya (Santoso *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini digunakan isolat bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171, isolat dari penelitian sebelumnya Pretti (2022) melaporkan *Pseudomonas sp.* LPG171 menghasilkan enzim lipase dan telah diteliti kemampuan aktivitas hidrolisis lemaknya. Meskipun demikian aktivitas transesterifikasi dari lipase tersebut belum diketahui. Dari latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas transesterifikasi enzim lipase dari *Pseudomonas sp.* LPG171. Tahap penelitian meliputi produksi, pemurnian, dan karakterisasi aktivitas transesterifikasi (yang meliputi pH, suhu, dan waktu inkubasi). Selanjutnya enzim lipase hasil pemurnian digunakan sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi minyak dan metanol yang dikhususkan pada pengaruh perbandingan molar-nya, dengan batas toleran metanol 75% sebagaimana

dilaporkan Astuti (2022). Dengan mempertimbangkan pengaruh metanol dalam jumlah berlebih terhadap reaksi transesterifikasi dan berdampak mengurangi efisiensi reaksi, maka pada penelitian ini diselidiki perbandingan komposisi molar minyak dan metanol 1:3 dan 1:4 dengan batas toleran metanol 41,26% dan 55%.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah sebagai berikut .

1. Mengetahui waktu pertumbuhan optimum dari bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171 untuk menghasilkan lipase dengan aktivitas transesterifikasi.
2. Melakukan produksi, pemurnian, dan karakterisasi lipase *pseudomonas sp.* LPG171 dengan aktivitas transesterifikasi lipase.
3. Memperoleh biodiesel dengan variasi molar melalui reaksi transesterifikasi yang dikatalis oleh lipase *pseudomonas sp.* LPG171.
4. Mengkarakterisasi sampel biodiesel berdasarkan standar bahan bakar nabati SNI 7182:2015.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kemampuan enzim lipase *Pseudomonas sp.* LPG171 dalam mengkatalis reaksi transesterifikasi berdasarkan nilai kualitatif dan kuantitatif yang diperoleh dari perbandingan komposisi molar, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai katalis dalam produksi biodiesel dan bidang industri lainnya.

II. TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Bakteri *Pseudomonas sp.*

Bakteri *Pseudomonas sp.* memiliki karakteristik gram negatif (Sidauruk *et al.*, 2021). Bakteri *Pseudomonas sp.* sendiri memiliki karakteristik gram negatif, berbentuk batang (*rods*) atau kokus (*coccus*), *aerob obligat, motil* mempunyai flagel polar. Bakteri ini, mempunyai karakteristik biokimia seperti, *oksidase positif, katalase positif, nonfermenter* dan tumbuh dengan baik pada suhu 4 °C atau dibawah 43 °C. *Pseudomonas sp.* banyak ditemukan pada tanah, tanaman dan air. Beberapa spesies *Pseudomonas* seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas stutzeri* dan lain-lain (Suyono dan Farid, 2011).

Bakteri genus ini memproduksi beberapa enzim seperti protease, amilase, dan lipase. Selain itu bakteri *Pseudomonas* juga dapat menguraikan protein, karbohidrat dan senyawa organik lain menjadi CO₂, gas amoniak, dan senyawa-senyawa lain yang lebih sederhana. Bakteri *Pseudomonas sp.* senang hidup di lingkungan yang bersuhu antara 15-30 °C. Bakteri *Pseudomonas sp.* mempunyai batas-batas pH tertentu untuk pertumbuhannya.

Bakteri yang diperoleh dari isolasi merupakan famili *Pseudomonadaceae* genus *Pseudomonas* dan spesiesnya *Pseudomonas sp.* yaitu *Pseudomonas sp.* 1 dan *Pseudomonas sp.* 2. Memiliki ciri-ciri terpilih dengan morfologi, bentuk batang, motil karena flagella dan gram negatif. Pertumbuhan bersifat aerobik, suhu pertumbuhan 20-40 °C dan pH 5-9. Sifat biokimianya adalah katalase-positif, indol negatif, fermentasi karbohidrat (glukosa, sukrosa dan laktosa) negatif dan *urease negative* serta mempunyai kemampuan tumbuh pada kondisi yang ekstrim (Suyono dan Farid, 2011).

Bakteri *Pseudomonas sp.* pH 5,3-9,7 umumnya berkembang dengan baik pada pH antara 5,5-9,0. pH rendah merupakan keadaan yang optimal bagi berkembang biaknya beberapa jenis bakteri patogen seperti bakteri *Pseudomonas sp.* dan perubahan pH yang drastis dapat menyebabkan ikan menjadi stress (Rahmadian *et al.*, 2018).

Pseudomonas sp. yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri yang diambil dari tanah tercemar. Isolat bakteri *pseudomonas sp.* LPG171 yang diidentifikasi secara morfologi. Bakteri *pseudomonas sp.* LPG171 ini teridentifikasi sebagai bakteri gram negative dengan kondisi optimum pH 7, Suhu 40 °C (Pretti, 2022).

1.2. Enzim Lipase

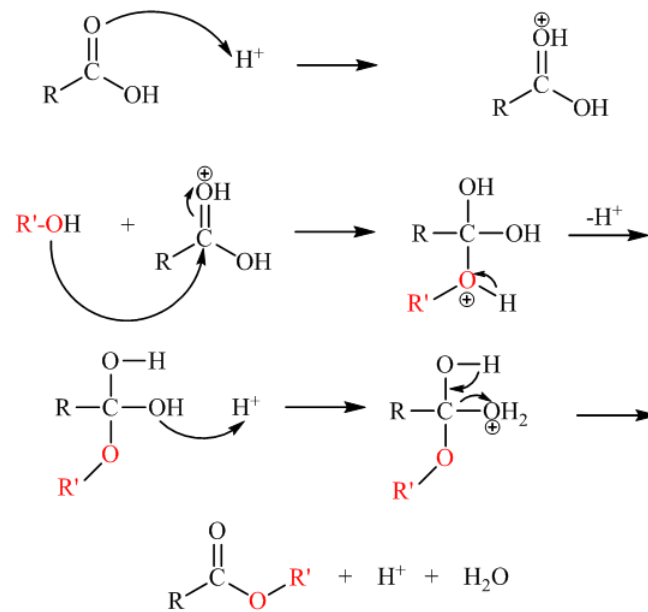
Lipase (EC 3.1.1.3) adalah jenis enzim yang memiliki peran khusus dalam pemecahan atau hidrolisis senyawa-senyawa lipid atau lemak. Enzim ini bekerja dengan memecah ikatan ester dalam molekul lipid, menghasilkan asam lemak dan gliserol. Lipase dapat ditemukan dalam berbagai organisme, termasuk manusia, hewan, dan mikroorganisme. Lipase (EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang berperan sebagai biokatalis untuk reaksi hidrolisis, esterifikasi, transesterifikasi. (Khumairah, 2022). Lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas sp.* memiliki peranan yang sangat penting dalam bidang bioteknologi. Enzim yang dihasilkan dari genus ini merupakan katalis yang sangat baik untuk reaksi sintesis transformasi organik (Pratiwi *et al.*, 2013).

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). Dalam konteks

tersebut, lipase berperan sebagai biokatalis yang dapat mengkatalisis berbagai reaksi kimia, tergantung pada kondisi lingkungan di sekitarnya. Beberapa reaksi yang dapat dikatalisis lipase melibatkan esterifikasi, transesterifikasi dan hidrolisis.

a. Reaksi Esterifikasi

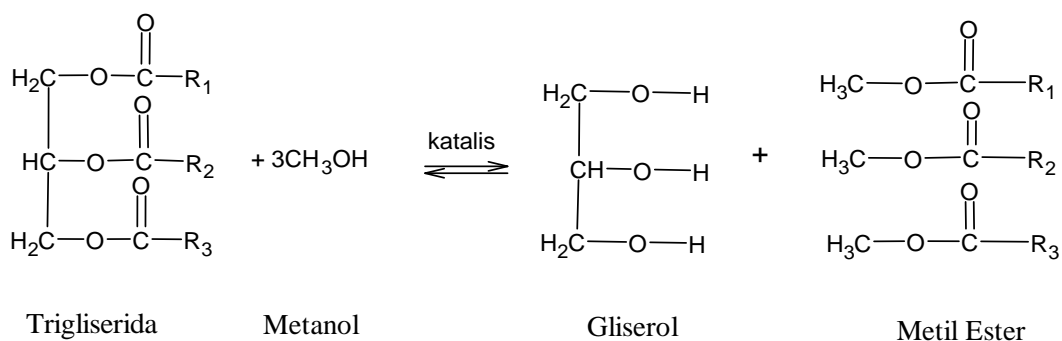
Esterifikasi merupakan langkah dalam proses konversi asam lemak bebas menjadi ester. Proses ini melibatkan reaksi antara asam lemak dan alkohol. Katalis yang umumnya digunakan untuk mengkatalisis reaksi esterifikasi adalah zat dengan sifat asam kuat, seperti asam sulfat, asam sulfonat, asam sulfonat organik, atau resin penukar kation asam kuat. Pilihan untuk menggunakan asam-asam ini dalam praktik industri. Reaksi esterifikasi umumnya digunakan untuk menghasilkan biodiesel dari minyak yang memiliki kandungan asam lemak bebas yang tinggi. Minyak yang umumnya digunakan dalam produksi biodiesel meliputi minyak nabati seperti minyak kedelai, minyak sawit, minyak biji rami, atau minyak jarak. Minyak-minyak ini seringkali mengandung asam lemak bebas yang perlu diubah menjadi ester melalui reaksi esterifikasi. Proses ini penting ketika minyak yang digunakan untuk biodiesel memiliki tingkat FFA yang signifikan (bilangan asam > 5 mg-KOH/g). Esterifikasi membantu mengubah asam lemak bebas dalam minyak menjadi metil atau etil ester asam lemak, yang merupakan komponen utama biodiesel. 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. Mekanisme reaksi esterifikasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Mekanisme reaksi esterifikasi

b. Reaksi Transesterifikasi

Transesterifikasi adalah suatu reaksi yang menghasilkan ester dimana salah satu pereaksinya juga merupakan senyawa ester. Jadi disini terjadi pemecahan senyawa trigliserida dan migrasi gugus alkil antara senyawa ester. Ester yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi ini disebut biodiesel. R' adalah gugus alkil dan $R_1 - R_3$ merupakan gugus asam lemak jenuh dan tak jenuh rantai panjang (Aziz, 2007).



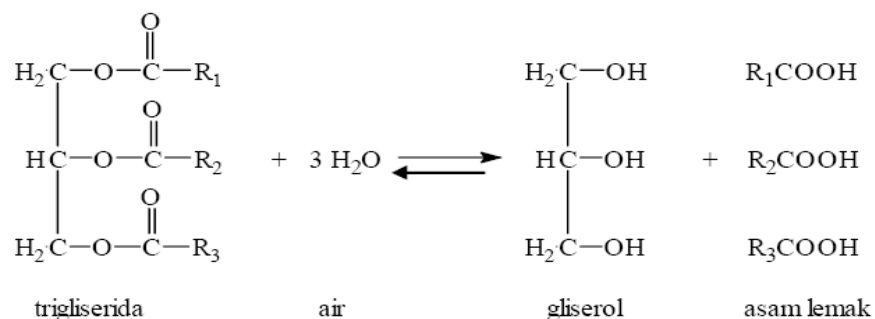
Gambar 2. Mekanisme reaksi transesterifikasi

Reaksi transesterifikasi secara umum dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, basa dan enzim. Enzim merupakan katalis homogen dan penggunaan katalis homogen tersebut memiliki kekurangan terbesar yaitu, dibutuhkannya tahap pemurnian reaksi yang tidak ramah lingkungan karena menghasilkan

sejumlah besar limbah air. Untuk mengatasi permasalahan pada penggunaan katalis homogen ini maka digunakanlah katalis enzim. Enzim yang digunakan biasanya adalah enzim lipase terimobilisasi. Kelebihan penggunaan enzim ini adalah dapat digunakan kembali tanpa proses pemisahan, beroperasi pada suhu rendah (50 °C), mudah untuk diregenerasi, mudah dipisahkan dari produk biodiesel, nonpolusi, dan tidak terbentuk sabun. Namun proses transesterifikasi dengan enzim ini memiliki beberapa kelemahan diantaranya adalah harga enzim yang sangat mahal, volume reaksi yang sangat besar dan mudah terdenaturasi pada suhu tinggi (Buchori *et al.*, 2015).

c. Reaksi Hidrolisis

Dalam reaksi hidrolisis trigliserida, katalis yang sering digunakan adalah enzim lipase. Lipase adalah jenis enzim yang dapat mengkatalisis pemecahan ikatan ester dalam molekul trigliserida, menghasilkan gliserol dan asam lemak. Proses ini terjadi di antarmuka antara fasa air dan fasa minyak, di mana molekul air ditambahkan untuk membantu pemecahan ikatan ester (Andaka, 2008). Reaksi hidrolisis dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme reaksi hidrolisis

Dalam konteks biologis, lipase dapat ditemukan dalam sistem pencernaan manusia, terutama di pankreas, dan berperan dalam pemecahan lemak dari makanan menjadi bentuk yang dapat diserap oleh tubuh. Selain enzim lipase, dalam kondisi tertentu, katalis kimia tertentu juga dapat digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida, seperti katalis asam atau basa. Namun, dalam kebanyakan proses biologis dan industri, lipase adalah katalis pilihan

karena dapat bekerja secara spesifik pada ikatan ester dalam molekul trigliserida. (Andaka, 2008).

2.2.1. Sumber Enzim Lipase

Lipase dapat diproduksi dari fermentasi, rekayasa genetika, tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme, Mikroorganisme penghasil lipase ditemukan dalam bermacam-macam habitat seperti limbah industri, pabrik pengolahan minyak sayur, perusahaan susu, tanah yang terkontaminasi dengan minyak, makanan yang membusuk dan timbunan kompos serta batubara (Wirajana, 2014).

Menurut Zamrodah (2016) enzim lipase dikelompokkan berdasarkan sumbernya yaitu :

a. Enzim lipase pada mamalia

Lipase yang berasal dari mamalia dikelompokkan menjadi :

- a. Lipase pada sistem pencernaan: Lingual, lambung dan pankreas .
- b. Lipase pada jaringan: Hati, paru, jantung dan ginjal .
- c. Lipase dalam susu.

b. Enzim lipase dari tanaman

Menurut Zamrodah (2016) enzim Lipase yang bersumber dari tumbuhan, dikelompokkan menjadi empat jenis, yaitu :

- a. Triasilgliserol lipase, terdapat pada tanaman jagung, minyak sawit, kacang, beras dan kentang.
- b. Silhidrolase, terdapat pada tanaman kentang.
- c. Phospolipase, terdapat pada tanaman seledri, kol dan kacang.
- d. Liphospolipase, terdapat dalam tanaman jagung.

c. Enzim lipase dari mikroorganisme

Menurut Zamrodah (2016) Enzim lipase yang dihasilkan oleh *mikroorganisme* dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu:

- a. Bakteri : Lipase *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* dan *Miraxella*.
- b. Kapang : Lipase *Penicillium camberti*, *Geotrichum candidum*, dan *Mucor meihei*.
- c. Khamir : Lipase *Candida antartika*, *Candida rugosa* dan *Candida cylindraceae*.

Lipase merupakan salah satu enzim yang telah diaplikasikan pada proses industri baik industri pangan maupun non pangan. Lipase dikenal sebagai *lipolytic enzyme* dan didefinisikan sebagai hidrolase ester asam lemak berantai panjang. Lipase berfungsi sebagai katalis pada reaksi hidrolisis triasilgliserol dan ester selain dari asilgliserol. Enzim lipase secara luas dapat ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme. Lipase mikroorganisme dapat diproduksi dari golongan bakteri, khamir dan jamur, baik sendiri maupun bersama-sama dengan jenis lain dari famili hidrolase, seperti esterase. Metode yang umum digunakan untuk memproduksi enzim lipase adalah metode fermentasi semi padat atau fermentasi medium cair. Fermentasi medium cair merupakan suatu fermentasi dengan menggunakan media cair yang substratnya terlarut atau terdispersi dalam cairan dan mikroorganismenya berada di bawah permukaan cairan pada kondisi aerob dengan bantuan aerasi dan agitasi (Kasipah *et al.*, 2013).

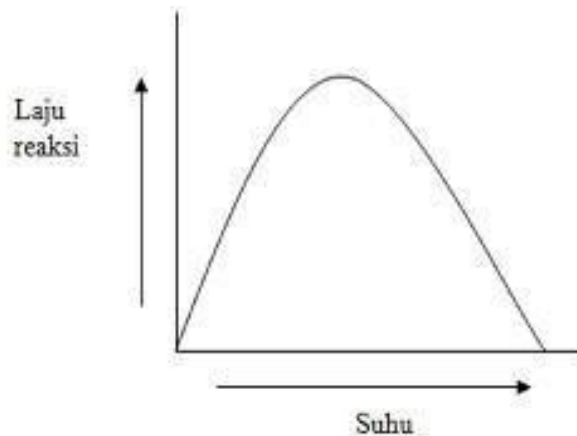
2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Menurut Rusman (2017) terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim sebagai berikut :

a. Suhu

Suhu berperan penting dalam meningkatkan kemampuan enzim sebagai biokatalis. Peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan energi kinetik sehingga menambah intensitas tumbukan antara enzim dengan substrat. Pada suhu optimum, tumbukan antara enzim dengan substrat menjadi sangat efektif sehingga pembentukan kompleks enzim-substrat semakin mudah. Di atas suhu optimum, enzim akan mengalami denaturasi dan kehilangan aktivitas katalitiknya. Proses denaturasi diawali dengan pembentukan parsial struktur

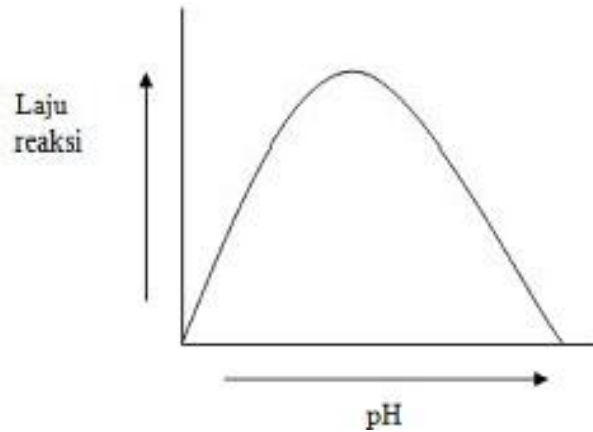
sekunder, tersier, dan kuartener molekul enzim sebagai akibat dari pemutusan ikatan fisik maupun kimia pada molekul enzim. Selanjutnya terjadi perubahan struktur primer enzim yang disebabkan karena adanya kerusakan molekul-molekul asam amino tertentu akibat pemanasan. Hal ini akan memperbesar peluang enzim dan substrat bereaksi yang dapat dilihat pada Gambar 4. (Rusman, 2017).



Gambar 4. Hubungan Aktivitas Enzim dengan Suhu

b. pH (tingkat keasaman)

Enzim memiliki pH optimum yang khas karena perubahan pH berpengaruh terhadap ikatan atau interaksi ionik pada muatan residu asam amino seperti $RCH_2(NH_3^+)COO^-$ yang berfungsi untuk membentuk dan mempertahankan konformasi struktur tersier enzim. Dengan demikian, pH yang bervariasi akan menghasilkan konformasi struktur enzim yang berbeda. Hal ini menyebabkan peningkatan atau penurunan jumlah molekul substrat yang dapat diikat oleh enzim. Perubahan pH dapat mempengaruhi asam amino kunci pada sisi aktif, sehingga menghalangi sisi aktif enzim membentuk kompleks dengan substratnya yang dapat dilihat pada Gambar 5. (Rusman, 2017).



Gambar 5. Hubungan Laju Reaksi dengan pH

c. Konsentrasi enzim

Konsentrasi enzim berbanding lurus dengan meningkatnya aktivitas enzim dimana semakin banyak enzim yang digunakan pada konsentrasi substrat yang tetap maka aktivitas enzim akan semakin meningkat (Rusman, 2017).

a. Konsentrasi Substrat

Jika konsentrasi enzim dibuat tetap dan konsentrasi substrat secara perlahan ditingkatkan maka kecepatan reaksi akan meningkat sampai tercapainya titik maksimum; dan setelah itu, peningkatan konsentrasi substrat tidak akan meningkatkan kecepatan reaksi. Hal ini terjadi karena semua sisi aktif enzim sudah berikatan dengan substrat dan membentuk kompleks enzim-substrat. Peningkatan kecepatan reaksi ini akan semakin kecil hingga tercapai suatu titik batas yang pada akhirnya penambahan konsentrasi substrat hanya akan sedikit meningkatkan kecepatan reaksi yang dapat dilihat pada Gambar 6. (Rusman, 2017).



Gambar 6. Hubungan Laju Reaksi dengan Konsentrasi

b. Adanya Kofaktor dan Inhibitor

Kofaktor adalah suatu zat yang dapat mengaktifkan dan meningkatkan kerja enzim, sedangkan inhibitor adalah zat yang dapat menghambat kerja enzim (Rusman, 2017).

2.2.3. Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas lipase mempunyai satuan unit (U). Satu Unit aktivitas enzim lipase setara dengan 1 μmol asam lemak bebas yang dihasilkan dari hidrolisis substrat yang dikatalisis oleh lipase tiap satuan menit. Untuk menentukan aktivitas optimum pada kondisi optimum lipase, maka perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzimatis pada variasi temperatur dan pH, sehingga akan diketahui aktivitas lipase disetiap rentang temperatur dan pH yang ditentukan. Metode yang digunakan untuk memperkirakan aktivitas lipase secara kuantitatif adalah metode interfacial, tensiometri, kromatografi, konduktometri, titrimetri, spektrofotometri (Kasipah *et al.*, 2013).

Aktivitas lipase dapat diukur dengan menggunakan Persamaan 1 (Azizah, 2018) .

$$\text{Aktivitas unit (U/mL)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 1000}{V_e \times t} \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :	V_1	=	Volume NaOH sampel (mL)
	V_e	=	Volume enzim (mL)
	N	=	Normalitas NaOH (0,01-0,05 N)
	1000	=	Konversi dari mmol ke μ mol
	t	=	Waktu Inkubasi

Aktivitas optimum lipase tergantung dari senyawa pengemulsi yang digunakan karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air. Substrat perlu diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air. Substrat yang sering digunakan dalam penelitian adalah minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein (Azizah, 2018).

Aktivitas spesifik enzim memiliki satuan U/mg Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim tiap miligram protein menyatakan bahwa aktivitas spesifik enzim dapat dihitung menggunakan Persamaan 2 (Azizah, 2018).

$$\text{Aktivitas Spesifik Lipase} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/mL)}}{\text{Kadar Protein (mg/mL)}} \dots\dots\dots(2)$$

2.2.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Dalam metode ini terlibat 2 reaksi. Awalnya, kompleks Cu(II) protein akan terbentuk sebagaimana metode biuret, yang dalam suasana alkalis Cu(II) akan tereduksi menjadi Cu(I). Ion Cu^+ kemudian akan mereduksi reagen Folin-Ciocalteu, kompleks phosphomolibdat-phosphotungstat, menghasilkan heteropoly-molybdenum blue akibat reaksi oksidasi gugus aromatik (rantai samping asam amino) terkatalis Cu, yang memberikan warna biru intensif yang dapat dideteksi secara kolorimetri. Kekuatan warna biru terutama bergantung pada kandungan residu tryptophan dan tyrosine-nya. Keuntungan metode Lowry adalah lebih sensitif (100 kali) daripada metode Biuret sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya berkisar pada konsentrasi 0.01 mg/mL. Namun metode Lowry lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya. (Lowry *et al.*, 1951).

2.2.5. Pemanfaatan Enzim Lipase

Pemanfaatan enzim dalam bidang bioteknologi dan industri semakin meningkat, oleh karena itu pengkajian enzim perlu dilakukan untuk dapat digunakan dalam bidang tersebut. Sifat enzim yang sangat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik menyebabkan enzim banyak digunakan dalam berbagai proses industri pangan maupun non pangan. Selain itu, lebih dari 70% industri kimia menggunakan enzim sebagai katalis. Hal tersebut dikarenakan penggunaan enzim mempunyai beberapa keuntungan, yaitu mempunyai aktivitas yang selektif, aman, mudah dikontrol, dapat didegradasi secara biologis, memiliki daya katalitik yang tinggi. Selain itu, reaksi enzimatis yang terjadi tidak menghasilkan produk samping dan enzim dapat aktif pada suhu dan pH tertentu, sehingga enzim sangat potensial untuk menggantikan katalis kimiawi dalam bidang industri (Indah *et al.*, 2017).

Pemanfaatan enzim dalam bidang bioteknologi dan industri semakin meningkat, oleh karena itu pengkajian enzim perlu dilakukan untuk dapat digunakan dalam bidang tersebut. Sifat enzim yang sangat spesifik dibandingkan dengan katalis anorganik menyebabkan enzim banyak digunakan dalam berbagai proses industri pangan maupun non pangan. Selain itu, lebih dari 70% industri kimia menggunakan enzim sebagai katalis. Hal tersebut dikarenakan penggunaan enzim mempunyai beberapa keuntungan, yaitu mempunyai aktivitas yang selektif, aman, mudah dikontrol, dapat didegradasi secara biologis, memiliki daya katalitik yang tinggi. Selain itu, reaksi enzimatis yang terjadi tidak menghasilkan produk samping dan enzim dapat aktif pada suhu dan pH tertentu, sehingga enzim sangat potensial untuk menggantikan katalis kimiawi dalam bidang industri. (Murni *et al.*, 2011). Penggunaan lipase sebagai biokatalis pada konversi (transesterifikasi minyak nabati) menghasilkan reaksi kondisi yang lebih aman dan memudahkan recovery katalis dan gliserol tanpa purifikasi atau produksi limbah kimia (Mulya *et al.*, 2020).

2.3. Biodiesel

Biodiesel secara umum didefinisikan sebagai ester monoalkil dari minyak tanaman dan lemak hewan. Minyak yang berasal dari tumbuhan dan lemak hewan serta turunannya mempunyai kemungkinan sebagai pengganti bahan bakar diesel. Biodiesel dihasilkan melalui proses transesterifikasi minyak atau lemak dengan alkohol. Gugus alkil dalam alkohol akan menggantikan gugus hidroksil pada struktur ester minyak dengan dibantu katalis. NaOH dan KOH adalah katalis yang umum digunakan. Alkohol yang dapat digunakan antara lain metanol, etanol, propanol, dan butanol (Putri *et al.*, 2012).

2.3.1. Minyak Kelapa Sawit

Kelapa sawit adalah tumbuhan yang menghasilkan minyak masak, minyak industri maupun bahan bakar. Bagian terpenting dari kelapa sawit adalah buahnya yang dapat menghasilkan minyak kelapa sawit mentah yang diolah menjadi minyak goreng. Minyak kelapa sawit adalah bahan baku utama pembuatan minyak goreng. Minyak kelapa sawit merupakan salah satu komoditas unggulan ekspor Indonesia. Menurut Nurmalita (2019) Produksi minyak kelapa sawit di Indonesia adalah salah satu yang terbesar di dunia. Kelapa sawit adalah sumber utama minyak nabati di Indonesia dan telah menjadi komoditas ekspor yang sangat penting bagi negara ini. Berikut adalah beberapa informasi penting tentang produksi minyak kelapa sawit di Indonesia: Produksi minyak kelapa sawit Indonesia juga sangat tinggi. Pada tahun 2020, Indonesia memproduksi sekitar 42 juta ton minyak kelapa sawit mentah *Crude Palm Oil* (CPO) dan lebih dari 4 juta ton minyak kelapa sawit kasar *Palm Kernel Oil* ini adalah jumlah produksi yang signifikan. Selain minyak kelapa sawit, industri kelapa sawit juga menghasilkan produk-produk lain seperti inti sawit, serat sawit, dan biodiesel dari minyak kelapa sawit. Selain itu, pengolahan kelapa sawit juga menciptakan pekerjaan bagi ribuan orang di Indonesia (Nurmalita, 2019).

Tabel 1. Komposisi Asam Lemak Dalam Minyak Kelapa Sawit

Asam Lemak	Kadar (%)
Asam Stearat	3-5
Asam Linoleat	10-15
Asam Palmitat	40-45
Asam Oleat	40-50

Pada Tabel 1 menunjukkan komposisi asam lemak dalam minyak kelapa sawit berdasarkan analisa *Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry* (GC-MS) dapat diketahui bahwa komposisi asam lemak minyak kelapa sawit merek *Rose Brand* didominasi oleh asam palmitat 39-40 % dan asam oleat sebesar 44-55% (Nurmalita, 2019). Terdapat beberapa kondisi reaksi yang mempengaruhi konversi produk biodiesel pada reaksi transesterifikasi sebagai berikut ;

a. Rasio molar

Rasio molar antara alkohol dan minyak nabati tergantung dari jenis katalis yang digunakan, untuk menjamin reaksi transesterifikasi berlangsung ke arah kanan maka direkomendasikan menggunakan katalis berlebih, perbandingan rasio molar 1:3 dan 1:4 dari minyak dan metanol terhadap katalis basa bisa digunakan untuk mendapat rendemen ester yang maksimum atau sekitar 20% metanol menghasilkan Rendemen minyak biodiesel tertinggi pada perlakuan transesterifikasi (Wahyuni, 2015).

b. Pengaruh suhu

Suhu selama reaksi transesterifikasi dapat dilakukan pada rentang suhu 30 – 65 °C dan dijaga selama proses, tergantung dari jenis minyak yang digunakan. Dalam proses transesterifikasi perubahan suhu reaksi menyebabkan gerakan molekul semakin cepat (tumbukan antara molekul pereaksi meningkat) atau energi yang dimiliki molekul bisa mengatasi energi aktivasi dengan kata lain perubahan suhu akan mempengaruhi probabilitas/peluang molekul dengan energi yang sama atau lebih tinggi dari energi aktivasi. Suhu mempengaruhi viskositas dan densitas,

karena viskositas dan densitas merupakan dua parameter fisis penting yang mempengaruhi pemanfaatan biodiesel sebagai bahan bakar. Semakin tinggi suhu menyebabkan gerakan molekul semakin cepat atau energi kinetik yang dimiliki molekul-molekul pereaksi semakin besar sehingga tumbukan antara molekul pereaksi juga meningkat (Wahyuni, 2015).

3. Waktu Reaksi

Pengaruh waktu reaksi terhadap yield yang dihasilkan. Proses transesterifikasi dengan menggunakan variabel daya dan waktu yang telah ditentukan. Hasil yang diperoleh yaitu waktu reaksi transesterifikasi berbanding lurus dengan persentase hasil biodiesel yang diperoleh dan laju konversi meningkat dengan lamanya waktu reaksi (Mulya *et al.*, 2020).

4. Jenis Katalis

Katalis dalam proses produksi biodiesel misalnya esterifikasi atau transesterifikasi merupakan suatu bahan (misalnya basa, asam atau enzim) yang berfungsi untuk mempercepat reaksi dengan jalan menurunkan energi aktivasi (*actifation energy*) dan tidak mengubah kesetimbangan reaksi, serta bersifat sangat spesifik. Proses produksi bisa berlangsung tanpa katalis tetapi reaksi akan berlangsung sangat lambat dan membutuhkan suhu yang tinggi dan tekanan yang tinggi untuk mencapai hasil atau rendemen yang maksimum. Saat ini hampir seluruh reaksi pengolahan biodiesel skala komersial menggunakan katalis basa homogen. Katalis yang bersifat basa lebih umum digunakan pada reaksi transesterifikasi karena menghasilkan metil ester yang tinggi dan waktu yang cepat. Konsentrasi katalis yang umum digunakan adalah 0,5 - 4% dari berat minyak (Kuss *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini, enzim lipase digunakan sebagai katalis dalam reaksi transesterifikasi untuk pembuatan bioiesel, beberapa literatur yang juga menggunakan enzim lipase sebagai katalis dari isolat bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171.

Tabel 2. Standar dan mutu (Spesifikasi) bahan bakar nabati (biofuel)**Keputusan direktur jenderal EBTKE nomor 189K/10/DJE/2019.**

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

2.4. Spektrofotometer UV-Vis

Dalam analisis kimia dikenal berbagai macam cara untuk mengetahui data kualitatif dan kuantitatif baik yang menggunakan suatu peralatan optik

(instrumen) ataupun dengan cara basah. Alat instrumen biasanya dipergunakan untuk menentukan suatu zat berkadar rendah, biasanya dalam satuan ppm (*part per million*) atau ppb (*part per billion*). Salah satu metode sederhana untuk menentukan zat organik dan anorganik secara kualitatif dan kuantitatif dalam contoh air laut, yaitu dengan metode Spektrofotometri Ultra-violet dan Sinar Tampak. Prinsip kerjanya berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh larutan. Jumlah cahaya atau energi radiasi yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerap dalam larutan secara kuantitatif. Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm dan sinar tampak (*visible*) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Spektrofotometri digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorpsi atau diteruskan. Sinar radiasi monokromatik akan melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap sinar radiasi tersebut. Spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif. Konsentrasi analit di dalam larutan dapat ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Triyati, 1985). Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam Persamaan 3.

$$A = a \times b \times c \quad \dots\dots\dots(3).$$

Keterangan :

A	=	Absorban
a	=	Absorptivitas molar
b	=	Tebal Kuvet (cm)
c	=	Konsentrasi

2.5. Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry (GC-MS)

Gas chromatography (GC) adalah metode pemisahan yang digunakan untuk menganalisis senyawa yang mudah menguap atau senyawa yang mudah diuapkan. Senyawa yang mudah terdegradasi oleh panas tidak dapat dianalisis dengan metode ini. *Mass Spectrometer* (MS) adalah suatu metode analisis instrumental yang dipakai untuk identifikasi dan penentuan struktur dari komponen sampel dengan cara menunjukkan massa relatif dari molekul komponen dan massa relatif

hasil *Gas Chromathography-Mass Spectrometer* merupakan gabungan metode analisis antara GC dan MS. Dalam hal ini GC berfungsi sebagai sarana pemisah tanpa dilengkapi dengan detektor sebagaimana GC pada umumnya, tetapi yang berfungsi sebagai detektornya adalah MS. Kemampuan dan aturan pemisahannya akan mengikuti aturan pada GC, demikian pula aturan fragmentasi dan pola spektrum massa akan mengikuti aturan MS. Dengan adanya gabungan kedua metode tersebut akan memberikan keuntungan yang lebih baik karena senyawa yang telah terpisahkan oleh GC dapat langsung dideteksi oleh MS. Detektor MS untuk kromatografi gas mempunyai beberapa keuntungan, antara lain yaitu penggunaan senyawa yang telah diketahui isotopnya sebagai standar meningkatkan ketelitian analisis serta pada resolusi tinggi dapat menentukan komposisi dasar dari senyawa yang dianalisis. Dengan adanya penggabungan kedua alat tersebut, maka GC-MS mampu memisahkan komponendalam suatu analit sekaligus menentukan jenis komponen tersebut melalui spektrum massanya (Darmapatni,2016).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu Dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 sampai Mei 2023 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Analisis densitas dan viskositas sampel biodiesel dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Lampung. Analisis uji transesterifikasi menggunakan kromatografi *Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry* (GC-MS) dilakukan di Laboratorium Terpadu Pengujian dan Kalibrasi , Universitas Islam Indonesia .

3.2. Alat Dan Bahan

3.2.1. Alat-Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu tabung reaksi, Erlenmeyer , gelas beaker, gelas ukur, corong pisah, autoklaf, *shaker incubator*, *waterbath*, sentrifus, jarum ose, spatula, pipet tetes, tabung sentrifus, *mikropipet*, termometer, bunsen, oven, *hot plate*, pengaduk stirrer, neraca analitik, pH meter, piknometer, viskometer Ostwald, *Gas chromatography-Mass Spectrofotometry* (GC-MS) *Shimadzu QP2010 SE*, *spektrofotometer UV- Vis Carry Win UV 32*, *Laminar Air Flow* (LAF) *CURMA* model 9005-FL.

3.2.2. Bahan-Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu isolat bakteri *pseudomonas sp.* LPG- 171, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), minyak zaitun, tween 80, akuades, amonium sulfat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), buffer fosfat, *pNP-palmitat*, asetonitril, etanol, minyak kelapa Sawit (Rose Brand),

metanol, pereaksi Lowry A, pereaksi Lowry B, kain kasa, aluminium foil, plastik wrap, kapas, dan tisu.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

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

b. Pembuatan Media Selektif

Media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung *nutrient* dengan komposisi pepton, NaCl dan *beef extract*. ditimbang 2,8 g NA yang dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian tambahkan minyak kelapa sawit sebanyak 1 mL. dipanaskan media dengan *hot plate* dan disterilisasi media menggunakan autoklaf pada tekanan .1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. dituang media pada cawan secara aseptis. Didiamkan media hingga mengeras dan siap pakai.

c. Pembuatan Media Starter

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

d. Pembuatan Media Produksi

Media yang mengandung tween 80, minyak kelapa sawit dan buffer fosfat. *Tween* 80 sebanyak 10 tetes dan 20 mL minyak kelapa sawit yang dilarutkan dalam 1000 mL buffer fosfat. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit.

e. Inokulasi Bakteri

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

3.3.2. Penentuan Aktivitas Transesterifikasi Enzim Lipase

Penentuan aktivitas transesterifikasi enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Fu (Fu *et al.*, 2014).

- a. Sebanyak 0,25 mL Substrat p-NPP ditambahkan 0,25 mL asetonitril.
- b. Campuran ditambahkan enzim 1 ml diinkubasi pada suhu 30 °C selama 10 menit.
- c. Setelah proses inkubasi, diambil 0,045 mL ditambahkan 4,455 mL etanol
Kemudian dilakukan penentuan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 315 nm.

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

$$\text{Aktivitas Lipase} = \frac{\mu\text{mol p-NPP}}{t (\text{menit})} \times Fp \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan : μmol p-NPP = Konsentrasi p-NPP
 Fp = Faktor Pengenceran
 T = Waktu Inkubasi

Satu unit (U) aktivitas enzim setara dengan 1 μmol p-NPP per satu menit pada kondisi optimumnya.

3.3.3. Penentuan Kadar Protein dari Enzim Lipase

Kadar protein dapat diukur berdasarkan metode Lowry, yaitu ;

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

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

Pereaksi B : 5 mL $\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan NaK-tartarat 1%.

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

Pereaksi D : Reagen *folin ciocalteu* diencerkan dengan akuades (1:1).

Larutan Standar : Larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA).

3.3.4. Penentuan Kurva dan Kondisi Optimum Pertumbuhan Bakteri

Media yang digunakan pada penentuan kondisi optimum bakteri untuk menghasilkan enzim lipase adalah media *Nutrient Broth* (NB). Pada media diberikan kondisi lingkungan yang bervariasi, yaitu variasi pH, dan waktu inkubasi. Variasi pH yang dilakukan adalah 6; 7; dan 8. Dan variasi waktu inkubasi yang dilakukan adalah 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, dan 72 jam. Media inokulum sebanyak 10% dipindahkan secara aseptis ke media produksi, kemudian di simpan dalam shaker inkubator pada suhu kamar selama 72 jam. Setelah waktu pengamatan selesai, dilakukan pengukuran jumlah sel dengan melakukan pembacaan *optical density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm menggunakan *spektrofotometri* Uv – Vis. Dari data hasil pengukuran OD dapat diketahui kondisi lingkungan yang tepat untuk produksi enzim dan digunakan untuk membuat kurva pertumbuhan bakteri.

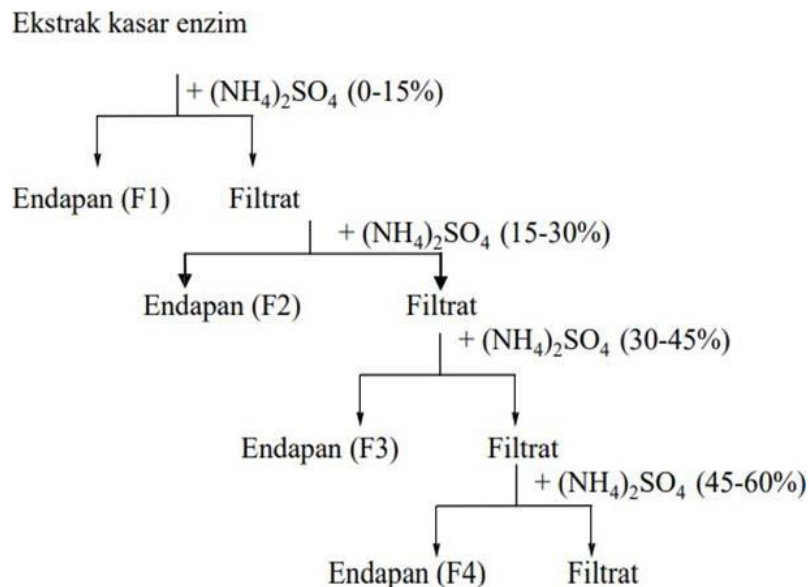
3.3.5. Produksi Enzim Lipase

Produksi enzim lipase dilakukan setelah diketahui kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Isolat *Pseudomonas sp.* LPG171 yang ditumbuhkan dan disimpan di dalam medium agar miring diambil sebanyak 5 ose dari medium tersebut dimasukkan dalam 50 mL starter kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 110 rpm selama 24jam. Sebanyak 2% *starter* dipindahkan ke media kultur (media fermentasi) dan diinkubasi kembali sesuai dengan waktu pertumbuhan optimum bakteri. Media produksi disentrifugasi untuk memisahkan filtrat. Filtrat merupakan ekstrak kasar enzim, selanjutnya diuji aktivitas analisa protein dengan metode *Fu*.

3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase

a. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat

Ekstrak kasar enzim yang diperoleh dimurnikan dengan cara fraksinasi menggunakan garam ammonium sulfat pada berbagai derajat kejenuhan yaitu (0-20) %; (20-40) %; (40-60) %; (60-80) %; dan (80- 100) %. Selanjutnya, filtrat yang didapat dari fraksi (0-20) % digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (20-40) %, dengan prosedur yang sama dilakukan hingga fraksi kejenuhan (80-100) %. Sejumlah ekstrak kasar enzim ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan *magnetic stirrer*. Endapan protein enzim yang didapatkan pada tiap fraksi kejenuhan ammonium sulfat dipisahkan dari filtratnya dengan sentrifugasi dingin pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Kemudian endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan diuji aktivitasnya dengan metode spektrofotometri serta diukur kadar proteinnya dengan metode Lowry untuk mengetahui pada fraksi mana saja terdapat enzim lipase dengan aktivitas spesifik yang tinggi.



Gambar 7. Skema Fraksinasi Enzim

b. Dialisis

Endapan protein yang memiliki aktivitas tertinggi dari fraksinasi menggunakan ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 7 selama \pm 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis dilakukan pergantian larutan buffer setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan.

3.3.7. Karakterisasi Enzim Lipase

a. Optimasi pH

Fraksi 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 6, 7, dan 8. Larutan substrat dan enzim diinkubasi pada suhu optimum selama 15 menit. Kemudian campuran larutan tersebut ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang tertentu dengan melakukan *scan* panjanggelombang pada spektrofotometer UV-Vis untuk pengambilan data absorbansi sampel dan di peroleh panjang gelombang 315 nm (Fu *et al.*, 2014).

b. Optimasi Suhu

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: 30, 35, 40, 45, dan 50 °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 30-40 °C selama 15 menit. Kemudian absorbansi larutan ditentukan dengan panjang gelombang 315 nm (Fu *et al.*, 2014).

c. Optimasi Waktu Inkubasi

Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas enzim dilakukan dengan cara menginkubasi campuran enzim substrat dengan pH dan suhu optimum menggunakan variasi waktu inkubasi, yaitu: 30, 60, 90, dan 120 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 315 nm (Fu *et al.*, 2014).

3.3.8. Pembuatan Biodiesel

Transesterifikasi dilakukan menggunakan minyak kelapa sawit sebagai substrat dan metanol pro-analis sebagai reaktan. Proses transesterifikasi menggunakan dua variasi perbandingan komposisi molar antara minyak kelapa sawit dan metanol yaitu 1:3,1:4. Enzim lipase yang dihasilkan dari biakan mikroba *Pseudomonas sp.* LPG171 yang digunakan sebagai katalis sebanyak 10% dari volume minyak kelapa sawit yang dipakai, dengan proses sebagai berikut :

1. Minyak kelapa sawit dan enzim lipase dimasukkan ke dalam labu tiga yang kemudian dipanaskan pada suhu 40 °C (keadaan stabil) selama satu jam dan diaduk menggunakan pengaduk magnetis.
2. Ditambahkan metanol secara perlahan dengan perbandingan molar 1:3,1:4.

3. Dilakukan proses transesterifikasi selama 24 jam, waktu dihitung dari penambahan metanol yang terakhir kalinya.
4. Produk hasil transesterifikasi kemudian pisah dan didiamkan selama 12 jam. Campuran akan membentuk 2 fasa, bagian bawah merupakan gliserol sedangkan bagian atas merupakan metil ester.
5. Produk biodiesel hasil transesterifikasi kemudian dievaporasi untuk menghilangkan impurities yang masih tersisa dan jumlah yield produk biodiesel dapat diperoleh dengan membandingkan dari jumlah berat mula-mula dari minyak kelapa sawit.

3.3.9. Karakterisasi Sampel Biodiesel

a. Analisis Densitas

Sampel biodiesel diukur densitasnya menggunakan alat piknometer yang berukuran 10 mL. Piknometer kosong dikeringkan di dalam oven kemudian ditimbang terlebih dahulu, lalu piknometer diisi dengan akuades dan ditimbang beratnya. Berat akuades diperoleh dari selisih berat piknometer berisi akuades dan berat piknometer kosong. Pada tahap selanjutnya sampel minyak dimasukkan ke dalam piknometer hingga meluap dan tidak terbentuk gelembung udara pada bagian atasnya serta bagian luar piknometer dikeringkan. Selanjutnya piknometer berisi sampel ditimbang dan berat sampel diperoleh dengan menghitung selisih berat piknometer berisi sampel dan berat piknometer kosong. Densitas dapat dihitung dengan Persamaan 5.

$$p \text{ sampel} = \frac{w_1}{w_2} \times p \text{ air} \dots\dots\dots (5)$$

Keterangan : *p sampel* : Massa atau berat sampel.
 w₁ : Berat sampel yang diukur.
 w₂ : Berat air yang diukur.
 p air : Densitas air

b. Analisis Viskositas

Sampel biodiesel diukur viskositasnya menggunakan metode Ostwald menggunakan alat viskometer Ostwald. Metode ini dilakukan dengan cara mengukur waktu yang dibutuhkan pada saat sampel mengalir dari batas atas sampai batas bawah dan membandingkan dengan waktu yang dibutuhkan oleh larutan pembanding. Setelah itu, waktu yang didapatkan dari sampel dimasukkan ke dalam persamaan Poisseulle dan dihitung dengan Persamaan 6 dan 7.

$$\mu = \mu_0 \frac{t \times p}{t_0 \times p_0} \dots\dots\dots (6)$$

- Keterangan :
- μ : Viskositas sampel.
 - μ_0 : Viskositas referensi atau viskositas standar.
 - t : Waktu aliran sampel.
 - p : Tekanan aliran sampel.
 - t_0 : Waktu aliran referensi atau waktu aliran standar.
 - p_0 : Tekanan aliran referensi atau tekanan aliran standar.

Rumus ini umumnya digunakan untuk mengukur viskositas suatu cairan dengan membandingkannya dengan viskositas standar pada kondisi tertentu (waktu dan tekanan aliran tertentu).

$$v = \frac{\mu}{p} \dots\dots\dots (7)$$

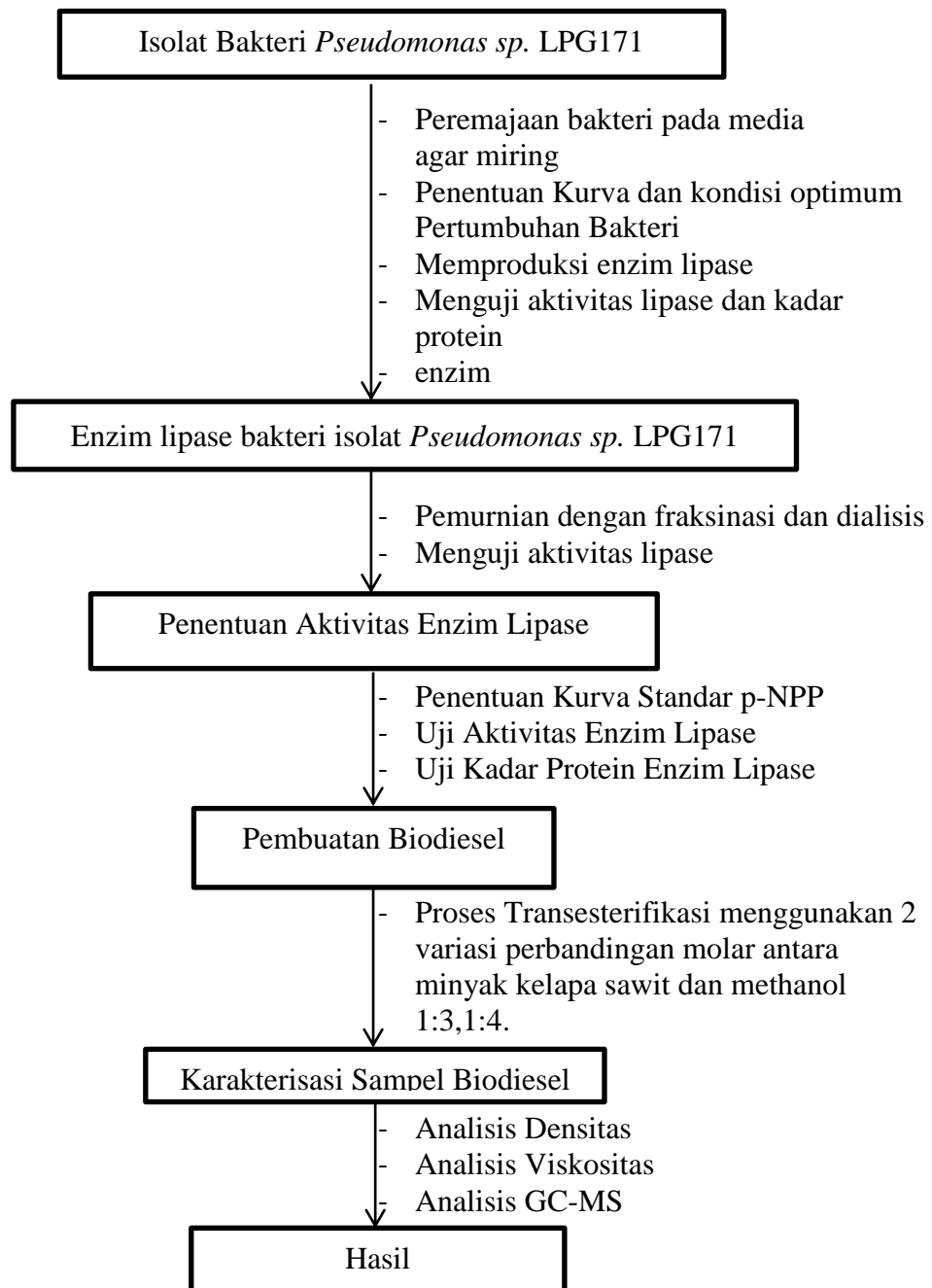
- Keterangan :
- v : Kecepatan aliran fluida atau cairan.
 - μ : Viskositas fluida atau cairan. Viskositas adalah ukuran seberapa tahan fluida terhadap aliran atau pergerakan internalnya. Semakin tinggi viskositas, semakin sulit fluida mengalir.
 - p : Tekanan fluida.

Rumus ini mencerminkan hukum dasar aliran fluida, di mana kecepatan aliran sebanding dengan *invers* viskositas dan tekanan. Dalam banyak kasus, hubungan

ini digunakan dalam konteks fluida Newtonian, di mana viskositas tidak bergantung pada kecepatan aliran.

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

Karakterisasi sampel biodiesel secara kuantitatif setelah transesterifikasi dengan katalis enzim lipase dilakukan dengan menggunakan dengan kromatografi GC-MS.



Gambar 8. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

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

1. Isolat bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171 memiliki kondisi pertumbuhan optimum pada pH 7 jam 24 dengan uji aktivitas transesterifikasi.
2. Enzim lipase memiliki aktivitas transesterifikasi optimum pada pH 7, suhu 35 °C, dan waktu inkubasi 120 menit.
3. Enzim lipase yang telah dimurnikan memiliki kemurnian 3,52 kali lipat dari ekstrak kasar enzim dengan aktivitas spesifik 9,60 U/mg.
4. Hasil analisis nisbah minyak kelapa terhadap metanol (perbandingan 1:3, dan 1:4) menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa asam lemak yang terkandung dalam biodiesel sepenuhnya terkonversi menjadi metil ester dan, parameter uji analisis densitas dan viskositas sampel 1:3 dan 1:4 juga telah memenuhi standar SNI 7182:2015.

5.2. Saran

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

1. Produksi biodiesel dilakukan dengan variasi konsentrasi reaktan alkohol selain dari yang telah dilakukan, dan variasi waktu lamanya transesterifikasi.
2. Uji karakterisasi biodiesel pada hasil biodiesel dilakukan juga uji titik nyala sesuai dengan SNI 7182:2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamopoulos, L. 2006. Understanding the Formation of Sugar Fatty Acid Esters. Faculty of North Carolina State University. United State.
- Andaka, G. 2008. Hidrolisis Minyak Biji Kapuk dengan Katalisator Asam Klorida. *Jurnal Rekayasa Proses*. 2(2): 45-48.
- Andayani, P. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Lipase *Pseudomonas fluorescens* yang Ditumbuhkan pada Media dengan Sumber Karbon Solar dan Minyak Sawit. *Tesis*. Universitas Brawijaya.
- Aisjah, G. 1993. Biokimia I. PT Gramedia Pustaka. Jakarta.
- Alkusma, Y. M., Hermawan dan Hadiyanto. 2016. Pengembangan Potensi Energi Alternatif Baru Terbarukan dengan Pemanfaatan Limbah Cair Kelapa Sawit sebagai Sumber Energi Terbarukan Di Kabupaten Kotawaringin Timur. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 14(2). 96-102.
- Armalita, R. D., Bahri, S., dan Yusnimar. 2015. Pembuatan Biodiesel dari Minyak Biji Bintaro dengan Reaksi Transesterifikasi dan Katalis Lempung. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Teknik*. Vol. 2.
- Arrachman, K. 2016. *Mikrobiologi Pewarnaan*. Skripsi. Jurusan Analisis Kesehatan. Fakultas Ilmu Keperawatan Dan Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang.
- Astuti S. 2022. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lipase Toleran Alkohol Dari Lingkungan Tanah Berminyak Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi Untuk Pembuatan Biodiesel. Skripsi. Jurusan Kimia. Unrivversitas Lampung.
- Aziz, I. 2007. Kinetika Reaksi Transesterifikasi Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(1). 19–23.
- Azizah, M. Al. 2018. *Produksi Enzim Lipase dari Kapang dengan Metode Solid State Fermentation pada Media Ampas Kelapa*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. Jawa Tengah.

- Buchori, L., Istadi, I., dan Purwanto, P. 2015. Perkembangan Proses Produksi Biodiesel sebagai Bahan Bakar Alternatif. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*. 1–9.
- Darmapatni, K. A. G. 2016. Pengembangan Metode GC-MS untuk Penetapan Kadar Acetaminophen pada Spesimen Rambut Manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 18(3). 255.
- Dewi, R. P. dan Kholik, M. 2018. Kajian Potensi Pemanfaatan Biogas Sebagai Salah Satu Sumber Energi Alternatif Di Wilayah Magelang. *Journal of Mechanical Engineering*. Vol. 2. No. 1.
- Djarkasi, G. S. S., Raharjo, S., and Noor, Z. 2017. Isolation and Specific Activity of Indigenous Lipase Enzyme in Canarium Nut. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 8. 28–35.
- Fu, X., Zheng, J., Ying, X., Yan, H., Wang, Z. 2014. Investigation Of Lipozyme TL IM- Catalyzed Transesterification Using Ultraviolet Spectrophotometric Assay. *Chinese Journal of Catalysis*. 553–559.
- Handayani, S. H., Lestari, P., Oedjijiono., Raharjo, T. J., dan Matsjeh, S. 2011. Karakterisasi Sifat-Sifat Biokimia Ekstrak Kasar Lipase Ekstraseluler Bakteri *Azospirillum Sp.Prd1*. *Jurnal Molekul*. Vol. 6. No. 2. (74 – 83).
- Indah, I., Mappiratu, M., dan Musafira, M. 2017. Produksi Enzim Lipase dari *Aspergillus Niger* Isolat Kapang Kopra dengan Menggunakan Medium Kelapa Parut. *Jurnal Riset Kimia*. 3(3). 269.
- Jawetz, M. dan Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Kasipah, C., Rismayani, S., and Nurachman, Z. 2013. Isolation and Characterization of Bacteriaproducer Extracellular Lipase Enzyme from an Activated Sludge. *Jurnal Ilmiah Arena Tekstil*. 28(1). 1–7.
- Katsiroh, F. 2017. *Pengaruh Rasio Molar Minyak Metanol terhadap Konversi Biodiesel dari Minyak Goreng Bekas dengan Modifikasi Preparasi Katalis Cao Kulit Telur*. *Karya Ilmiah*. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Jawa Tengah.
- Khaira, N. 2019. *Gambaran Hasil Bakteri pada Telapak Tangan Sebelum dan Sesudah Penggunaan Handsanitaizer*. Karya Tulis Ilmiah. STIKes Perintis Padang. Sumatra Utara.
- Khumairah, A. 2022. *Isolasi Karakterisasi dan Amobilisasi Lipase dari *Rhizopus oryzae* Menggunakan Substrat Ampas Kelapa Melalui Fermentasi Fase Padat*. Skripsi. Universitas Hasanudin. Makasar.

- Kordi, M. G. H. K. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta. Jakarta.
- Kurniawan, F. N. R. 2020. *Pengaruh Waktu Pada Proses Transesterifikasi Terhadap Karakteristik Biodiesel Dan Performa Mesin Diesel*. Skripsi. Jurusan Teknik Mesin. Universitas Negeri Semarang. Jawa Tengah.
- Kusnaa, O. L. 2022. *Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon sebagai Penghasil Enzim Lipase dan Protease dari Tanah Tercemar Minyak Bumi Di Kecamatan Wonocolo Kabupaten Kabupaten Bojonegoro*. Skripsi. Jurusan Biologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Jawa Timur.
- Kuss, D. J., Griffiths, M. D., Binder, J. F., and Street, B. 2013. *Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk*. 1–19.
- 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 Letter*. 179. 393 – 400.
- Lehninger, A. L. 1982. *Principles Of Biochemistry*. Worth Publisher, Inc. New York.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1). 265–275.
- Mangunwardoyo, W., Lusini, Y., & Gandjar, I. (2009). *Karakterisasi, Pengaruh Sumber Nitrogen dan Karbon terhadap Produktivitas Enzim Lipase Rhizopus microsporus var oligosporus UICC 550 Partial Characterization, Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Production of Lipase of Rhizopus microsporus var oligos*. 14(2), 115–124.
- Mulya, D., Zahrina, I., dan Helwani, Z. 2020. Esterifikasi Asam Lemak dengan Katalis Enzim pada Sintesis Emulsifier. *Jom Fteknik*. 7(2). 1–5.
- Murni, S. W., Kholisoh, S. D., dan Petrissia, E. 2011. Produksi, Karakterisasi, dan isolasi lipase dari *aspergillus niger*. *Jurnal Agri Techno*. 104. 62–274.
- Muslimah. 2017. Dampak Pencemaran Tanah dan Langkah Pencegahan. *Jurnal Penelitian Agrisamudra*. 2(1). 11–20.
- Nopiani, AS, Yandri, Hadi, S. 2016. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 Dengan Amobilisasi Menggunakan Bentonit. *Jurnal Analisis Kesehatan* (5).

- Norjannah, B., Ong, H. C., Masjuki, H. H., Cuan, J. C., and Chong, W. T. 2016. Enzymatic Transesterification for Biodiesel Production a Comprehensive Review. *RSC Advances*. 65.
- Nurmalita, V., dan Wibowo, A. P. 2019. Analisis Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ekspor Minyak Kelapa Sawit Indonesia ke India. *Economic Education Analysis Journal*. 8(2). 605–618.
- 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). 1–5.
- Pretti, G. S. 2022. *Pemanfaatan Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri Pseudomonas Sp. dari Tanah Tercemar Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi Dalam Produksi Biodiesel*. Skripsi. Jurusan Kimia. Universitas Lampung. Lampung .
- Putri, S. K., Supranto, dan Sudiyo, R. 2012. Studi Proses Pembuatan Biodiesel dari Minyak Kelapa (*Coconut Oil*) dengan Bantuan Gelombang Ultrasonik. *Jurnal Rekayasa Proses*. 6(1). 20–25.
- Rahmadian, C. A., Ismail, Abrar, M., Erina, Rastina, dan Fahrimal, Y. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Pseudomonas* sp pada Ikan Asin di Tempat Pelelangan Ikan Labuan Haji Aceh Selatan. *Jurnal Jimvet*. 2(4). 493–502.
- Rahmi, H., Hariyanti, R., Putri, A., dan Wulandari, D. 2020. Analisis Hasil Fraksinasi Protease dan Lipase yang Berasal dari Saluran Pencernaan Udang Vaname (*Litopenaeus Vannamei*). *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 194–202.
- Rusman, H. J. 2017. Potensi dan Imobilisasi Enzim Lipase dari Dedak Padi (*Oryza Sativa* L.) serta Aplikasinya dalam Mengkatalis Reaksi Trans-Esterifikasi dan Amidasi Menggunakan Substrat Minyak Kelapa Murni. *Africa's Potential for the Ecological Intensification of Agriculture*. 1–213.
- Santoso, A., Rizky, M., Sumari, S., Wijaya, A. R., Retnosari, R., dan Asrori, M. R. 2021. Pengaruh Jenis Alkohol dalam Trans-Esterifikasi Minyak Sawit (CPO) dengan Katalis Heterogen CaO- MgO. *Jurnal Rekayasa Bahan Alam dan Energi Berkelanjutan*. Vol. 5. No. 1. Hal. 1-9.
- Sidauruk, S. W., Ira Sari, N., Diharmi, A., dan Arif, I. 2021. Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Sargassum plagyophyllum* terhadap Bakteri *Listeria monocytogenes* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(1).
- Suleman, N., Abas, dan Paputungan, M. 2019. Esterifikasi dan Transesterifikasi Stearin Sawit untuk Pembuatan Biodiesel. *Jurnal Teknik*. 17(1). 66–77.

- Suyono, Y., dan Farid, S. 2011. *Pseudomonas* pada Tanah yang Terindikasi Kontaminasi Logam. *Jurnal Biopopral Industri*. 02(01). 8–13.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., and Wang, F. 2010. Biodiesel Production with Immobilized Lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28(5):628–634.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi. *Oseana*. 10(1). 39–47.
- Wahyuni, S., Ramli dan Mahrizal. 2015. Pengaruh Suhu Proses dan Lama Pengendapan terhadap Kualitas Biodiesel dari Minyak Jelantah Mahasiswa Fisika, FMIPA Universitas Negeri Padang 2. *Pillar of Physics*. 6. 33–40.
- Winarno, F. G. 2008. *Enzim Pangan*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wirajana, I. N. 2014. Pengaruh Minyak Jelantah dan Waktu Inkubasi Terhadap Aktivitas Lipase pada Tanah Hutan Mangrove Pantai Tablolong Kupang. *Cakra Kimia*. 2(2). 25–31.
- Zamrodah, Y. 2016. Agen Hayati; Komoditas Agribisnis di era global. *Jurnal Agri-Tek*. 15(2). 1–23.
- 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.