

**PENGARUH RASIO MOLAR MINYAK DENGAN METANOL
TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI MENGGUNAKAN
KATALIS ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172 PADA PRODUKSI BIODIESEL**

(Skripsi)

Oleh

Partini

1957011021



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

**PENGARUH RASIO MOLAR MINYAK DENGAN METANOL
TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI MENGGUNAKAN
KATALIS ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172 PADA PRODUKSI BIODIESEL**

Oleh

Partini

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**

ABSTRAK

PENGARUH RASIO MOLAR MINYAK DENGAN METANOL TERHADAP AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI MENGGUNAKAN KATALIS ENZIM LIPASE YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172 PADA PRODUKSI BIODIESEL

Oleh

Partini

Dalam penelitian telah didapatkan enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi untuk produksi biodiesel. Dilakukan untuk mempelajari lipase yang dihasilkan oleh *Klebsiella sp.* LPG172 mengenai kemampuannya sebagai katalis dengan menentukan kurva pertumbuhan bakteri, pemurnian ekstrak kasar enzim, penentuan karakteristik enzim murni dan penggunaannya pada produksi biodiesel. Kurva pertumbuhan bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 menunjukkan aktivitas tertinggi lipase pada jam ke-66. Ekstrak kasar enzim dengan volume 2500 mL/L dengan aktivitas spesifik 13,07 U/mg. Sedangkan ekstrak kasar enzim yang dimurnikan secara bertahap dengan ammonium sulfat dan dialisis menghasilkan enzim murni dengan tingkat kemurnian sebesar 2,3 kali. Pada karakterisasi enzim didapatkan aktivitas optimum enzim murni berada pada pH 7, suhu 70 °C, waktu inkubasi 25 menit, dan metanol 75%. Produksi biodiesel menggunakan katalis enzim lipase dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 pada reaksi transesterifikasi dengan variasi rasio molar minyak kelapa sawit dan methanol 1:4, 1:5, dan 1:6 dilakukan pengujian pada nilai uji densitas dan viskositas kinematik yang relatif baik pada perbandingan rasio molar minyak kelapa sawit dan metanol yakni 1:4 dengan nilai densitas sebesar 877 Kg/m³ dan nilai viskositas kinematik 2,848 × 10⁻⁶ m²/s. Hasil analisis GC-MS dari reaksi transesterifikasi menunjukkan jumlah relatif metil ester pada sampel 1:4 sebesar 5,99%.

Kata kunci: *Klebsiella sp.*, karakteristik enzim, transesterifikasi, biodiesel.

ABSTRACT

THE EFFECT OF THE MOLAR RATIO OF OIL TO METHANOL ON THE TRANSESTERIFICATION REACTION USING THE LIPASE ENZYME CATALYST PRODUCED BY THE BACTERIA ISOLATE *Klebsiella* sp. LPG172 IN BIODIESEL PRODUCTION

By

Partini

*In research, the lipase enzyme produced from the bacteria *Klebsiella* sp. LPG172 was used as a catalyst in the transesterification reaction of palm oil for biodiesel production. Before used as catalyst, the bacterial growth curve was determined and then the crude extract of the enzyme was purified. The growth curve of the bacteria shows the highest lipase activity at the 66th hour. Enzyme crude was found to have a specific activity of 13.07 U/mg. Meanwhile, the crude extract of the enzyme was gradually purified with ammonium sulfate and dialysis to produce pure enzyme with a purity level of 2.3 times. In enzyme characterization, it was found that the optimum activity of pure enzyme was at pH 7, temperature 70 °C, incubation time 25 minutes, and 70% methanol. Biodiesel production using the enzyme catalyst was conducted with variations in the molar ratio of palm oil and methanol 1:4, 1:5, and 1:6. The biodiesel with relatively good density and kinematic viscosity was produced from the experiment with a molar ratio of palm oil and methanol is 1:4 with a density value of 877 Kg/m³ and a kinetic viscosity value of 2.848×10^{-6} m²/s. The results of GC-MS analysis of the transesterification reaction showed that the relative amount of methyl ester in the 1:4 sample was 5.99%.*

Key words: *Klebsiella* sp., enzyme characteristics, transesterification, biodiesel

Judul Penelitian

**PENGARUH RASIO MOLAR MINYAK
DENGAN METANOL TERHADAP
AKTIVITAS TRANSESTERIFIKASI
MENGUNAKAN KATALIS ENZIM LIPASE
YANG DIHASILKAN OLEH ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella sp.* LPG172 PADA
PRODUKSI BIODIESEL**

Nama Mahasiswa

Partini

Nomor Pokok Mahasiswa

1957011021

Jurusan

Kimia

Fakultas

Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

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

NIP. 197108062000032001



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

NIP. 197110012005011002

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila

Mulyono, Ph. D.

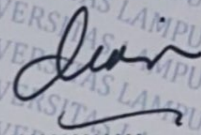
NIP. 19740611200031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

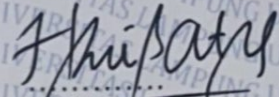
Ketua

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



Sekretaris

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



Penguji Bukan
Pembimbing

: **Prof. Drs. Wasinton Simanjuntak, Ph.D**

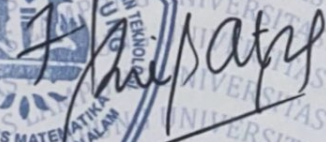


2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

NIP. 197110012005011002



Tanggal lulus ujian skripsi : 27 Desember 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

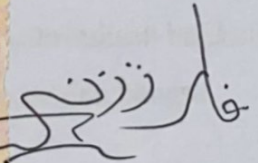
Nama : Partini
NPM : 1957011021
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Pengaruh Rasio Molar Minyak dengan Metanol terhadap Aktivitas Transesterifikasi Menggunakan Katali Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 pada Produksi Biodiesel”** ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data didalam 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 sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 28 Desember 2023
Yang Menyatakan,




Partini
NPM. 1957011021

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Partini dilahirkan di Way Kanan pada tanggal 26 Juni 2000. Anak kedua dari dua bersaudara, putri dari pasangan Bapak Anasrudin dan Ibu Samsiah. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD N 03 Gistang pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama di Miftahul Ulum Bukit Kemuning 2013, Sekolah Menengah Atas di SMA TMII Roudlatur Qur'an Metro 2016. Pada tahun 2019, penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi (SMMPTN).

Selama diperguruan tinggi penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan sebagai anggota Biro Penerbitan dari Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada periode 2021-2022. Penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) di Gunung Sulah Bandar Lampung pada tahun 2022. Pada tahun 2022 penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Badan Pengawas Obat dan Makanan di Bandar Lampung dengan judul "Penetapan Benzalkonium Klorida pada Masker Rambut secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) di Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Bandar Lampung". Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Kimia Dasar 1 untuk Jurusan Biologi dan Biologi Terapan pada tahun 2023. Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum Biokimia 1 dan Biokimia II Untuk jurusan Kimia S1 FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023.

Penulis berharap masih dapat meneruskan tulisan-tulisan berikutnya dan dapat memberikan manfaat bagi agama, keluarga, nusa dan bangsa.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan segala kerendahan hati kupersembahkan karya sederhana ini sebagai wujud tanda bakti dan tanggung jawab ku kepada:

Allah S. W. T

Kedua orang tuaku,

Bapak Anasrudin dan Ibu Samsiah yang senantiasa memberikan cinta, kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi, pengorbanan, dan doa untukku.

Saudara-saudaraku tersayang

Ayuk Nasriyati, kakak Agus, Bibi Katin dan Pakde Samidi.

Pembimbing Penelitianku

Ibu Dr. Dian Herasari S.si., M.Si.

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

Orang terkasih, kerabat dan teman.

Almamater Tercinta

MOTTO

**People don't have to like you
People don't have to love you
They don't even have to respect you
But when you look in the mirror
You have better love what you see
(Sherly Lee Raph)**

**“Teruslah berani, dunia menunggu keajaibanu”.
(Par)**

**Boleh jadi kamu membenci sesuatu padahal ia amat baik bagimu, dan
boleh jadi pula kamu menyukai sesuatu padahal ia amat buruk bagimu,
Allah mengetahui sedang kamu tidak mengetahui,”
(QS Al-Baqarah: 216)**

**Rasulullah SAW bersabda: “Barang siapa yang tidak mensyukuri yang
sedikit, maka ia tidak akan mampu mensyukuri sesuatu yang banyak,”
(HR Ahmad)**

SANWACANA

Assalamualaikum Wr.Wb.

Allhamdulillahirobil'alamin, segala puji dan syukur kepada Allah SWT. atas segala rahmat, karunia, dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini. Shalawat serta salam senantiasa penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW semoga kita termasuk umatnya yang mendapat syafa'at beliau di yaumul akhir nanti, aamin yarabbal'alamin. Skripsi dengan judul **“Pengaruh Rasio Molar Minyak dengan Metanol Terhadap Aktivitas Transesterifikasi Menggunakan Katalis Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 pada Produksi Biodiesel”** disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Penyusun skripsi ini tidak terlepas dari jasa baik segenap pihak baik moral maupun spiritual, baik berupa bimbingan, motivasi, dan doa yang senantiasa berguna bagi penulis hingga saat ini dan dimasa yang akan datang.

Ucapan terimakasih penulis haturkan kepada:

1. Pahlawan hidupku dan malaikat hidupku yaitu kedua orang tua, kakak-kakak, nenek, kakek dan bibi penulis atas cinta, kasih sayang, kesabaran, ketulusan, semangat, motivasi dukungan, keikhlasan yang tiada akhir dan selalu mendoakan untuk menyelesaikan skripsi ini. Terutama untuk Ayah saya dan Ibu saya terimakasih atas pengorbanan yang tak kenal lelah dalam bekerja, nasihat, doa, dan dedikasi dalam mendidik serta membesarkanku.

2. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si.,M.Si. selaku pembimbing pertama penelitian atas segala bimbingan,nasihat, motivasi, bantuan, saran, kesabaran, edukasi, dan segala kebaikannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si.,M.Si. selaku pembimbing kedua penelitian, atas segala bimbingan,nasihat, motivasi, bantuan, saran, kesabaran, edukasi, dan segala kebaikannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Prof. Drs. Wasinton Simanjuntak., M.Sc.,Ph.D selaku pembahas atau penguji penelitian atas segala bimbingan,nasihat, motivasi, bantuan, saran, kesabaran, edukasi, dan segala kebaikannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si. selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan, nasihat, motivasi, bantuan, saran, kesabran, edukasi dan segala kebaikannya hingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
6. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
7. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si.,M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas segala bimbingan, edukasi, dan dedikasinya dalam perkuliahan yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat kepada penulis.
10. Segenap staf dan karyawan khususnya Jurusan Kimia dan FMIPA Universitas Lampung.
11. Almarhum almaghfiroh abina K. H. Drs. Ali Qomaruddin, M.M. telah memberikan bimbingan yang luar biasa.
12. Keluarga besar Badan Pengawas Obat dan Makanan di Bandar Lampung atas bimbingan, nasihat, motivasi, bantuan,,saran, kesabran, edukasi dan segala kebaikkannya yang telah diberikan kepada penulis.
13. Teman-teman angkatan 2019 yang telah memberikan semangat, motivasi dan membantu dalam hal perkuliahan maupun penelitian.

14. Teman-teman kontrakan Nunyai : Verinda, Hilda, Anjel, Zahra dan Sinta terimakasih atas kebersamaan kita, atas bantuan, nasihat, kekonyolan yang tak terhingga. Semoga kalian selalu dalam keadaan baik dan sukses selalu.
15. Teman-teman satu bimbingan terimakasih telah kebersamai dalam penelitian semoga apa yang kalian cita-citakan tercapai.
16. Teman-teman Biokimia yang super baik dan memotivasi, membantu dalam hal penelitian kalian sangat luar biasa.
17. Semua manusia yang pernah mendoakan saya dalam hal baik terimakasih semoga doa baik kembali ke kalian.

Semoga Allah SWT melimpahkan bah pahala kebaikan atas bantuan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih terdapat kekurangan, namun penulis berharap semoga dapat bermanfaat bagi pembaca pada umumnya. Amiin.

Bandar Lampung, 28 Desember 2023

Partini

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I. PENDAHULUAN	2
1.1. Latar Belakang	2
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Bakteri	5
2.1.1. <i>Klebsiella sp.</i>	6
2.1.2. Fase Pertumbuhan Bakteri	6
2.2. Enzim.....	7
2.2.1. Enzim Lipase	11
2.1.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya.....	12
2.2.2. Aktivitas Enzim Lipase	13
2.3. Transesterifikasi.....	14
2.4. Biodiesel	17
2.4.1. Kelapa sawit.....	17
2.5. Karakterisasi Biodiesel	19
2.5.1. <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS).....	19
2.5.2. Densitas.....	21
2.5.3. Viskositas.....	22
2.6. Spektrofotometri UV-Vis	23
III. METODE PENELITIAN	25
3.1. Waktu dan Tempat	25
3.2. Alat dan Bahan	25
3.3. Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1. Tahap Persiapan.....	26
3.3.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri	27

3.3.3. Produksi Enzim	28
3.3.4. Fraksinasi.....	28
3.3.5. Karakterisasi Enzim.....	29
3.3.6. Produksi Biodiesel.....	31
3.4. Skema Penelitian	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Kurva Pertumbuhan Bakteri	34
4.2. Produksi Enzim	36
4.3. Fraksinasi.....	36
4.3.1. Fraksi Ammonium Sulfat	37
4.3.2. Fraksi Dialisis	38
4.4. Karakteristik Enzim.....	39
4.4.1. pH Optimum.....	40
4.4.2. Suhu Optimum.....	41
4.4.3. Waktu Inkubasi.....	42
4.4.4. Penambahan Konsentrasi Metanol Optimum.....	43
4.5. Produksi Biodiesel.....	45
4.5.1. Uji Densitas	47
4.5.2. Uji Viskositas	48
4.5.3. Analisis data GC-MS.....	50
V. KESIMPULAN DAN SARAN	54
DAFTAR PUSTAKA	56

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas Enzim Lipase pada Setiap Tahap	39
2. Komposisi Asam Lemak pada Minyak Komersial (Bimoli)	46
3. Perbandingan Nilai Standar SNI Densitas dan Viskositas Kinematik Biodiesel....	50
4. Identifikasi Senyawa Produk Transesterifikasi Sampel dengan Menggunakan MS	52
5. Hasil Pengukuran Absorbansi <i>p-nitrofenol palmitat</i>	63
6. Hubungan Nilai <i>Optical Density</i> (OD) dan Aktivitas (U/mL) dengan Waktu Inkubasi (Jam)	65
7. Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat Fraksi 0-20% dan 20-90% dengan Aktivitas Lipase dan <i>Klebsiella sp.</i> LPG172.....	65
8. Pengaruh pH pada Aktivitas Lipase	66
9. Pengaruh Suhu pada Aktivitas Enzim Lipase	66
10. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Aktivitas Enzi Lipase	66
11. Pengaruh Konsentrasi Metanol pada Aktivitas Enzim Lipase.....	66
12. Nilai Densitas Sampel Biodiesel.....	67
13. Nilai Viskositas Kinematik Sampel Biodiesel	68

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva Hubungan Suhu dengan Kerja Enzim	8
2. Kurva Hubungan Nilai pH dengan Aktivitas Enzim	9
3. Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat dengan Kerja Enzim	10
4. Reaksi Transesterifikasi	15
5. Mekanisme Reaksi Transesterifikasi Trigliserida oleh Lipase	16
6. Tumbuhan Kelapa Sawit	18
7. Alat Piknometer	22
8. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri <i>Klebsiella sp.</i> SPG172.....	35
9. Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat terhadap Aktivitas Spesifik (U/mg) Enzim Lipase pada Fraksi (0-20%) dan (20-90%).....	37
10. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Lipase.....	40
11. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Lipase.	41
12. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Aktivitas Enzim.	43
13. Pengaruh Konsentrasi Metanol pada Aktivitas Lipase	44
14. Proses Pemisahan Produk Biodiesel	47
15. Hubungan Rasio Molar Sampel dengan Nilai Densitas.	48
16. Hubungan Rasio Molar Sampel dengan Nilai Viskositas Kinematik.	49
17. Kromatogram GC Produk Hasil Transesterifikasi	51
18. Kurva Standar <i>p-nitrofenol</i> (μM)	64
19. Kurva Standar Bovine Serum Albumin (BSA)	64
20. Hasil GC-MS Sampel.....	70
21. Spektroskopi Massa Metil Oktanoat.	70
22. Spektroskopi Metil Laurat.	71

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan akan energi utama bahan bakar minyak terus menerus meningkat disebabkan oleh semakin bertambahnya penduduk dan teknologi dibidang industri. Oleh karena itu dibutuhkan bahan bakar alternatif untuk mengurangi terbatasnya sumber energi di Indonesia. Salah satu sumber energi yang dapat di produksi adalah biodiesel. Biodiesel merupakan mono-alkil ester yang terdiri dari asam lemak rantai panjang yang didapatkan dari minyak nabati dan lemak hewani. Mono-alkil ester dapat berupa metil ester atau etil ester, hal tersebut ditentukan oleh jenis alkohol yang digunakan. Biodiesel memiliki beberapa keunggulan yaitu tidak perlu modifikasi mesin, dikarenakan biodiesel mempunyai efek pembersihan terhadap tangki bahan bakar injektor dan slang, tidak menambah efek rumah kaca karena karbon yang dihasilkan masih dalam siklus karbon. Energi yang dihasilkan hampir sama dengan petroleum diesel (Devita, 2015). Biodiesel berasal dari minyak nabati yang berasal dari tanaman kelapa, kelapa sawit, minyak jarak, minyak biji karet dan lain sebagainya. Selain dari minyak nabati biodiesel berasal dari minyak hewani yang mengandung trigliserida, Asam Lemak Bebas (ALB), dan pencemar (Bustaman, 2009).

Pada penelitian ini menggunakan salah satu bahan baku yang produktif untuk diolah menjadi biodiesel yaitu minyak kelapa sawit (*Elaeis guineensis jacq*) karena memiliki kadar asam lemak bebas yang tinggi (Mardawati *et al.*, 2019). Kelapa sawit merupakan tanaman yang telah dibudidayakan secara intensif di Indonesia, khususnya dalam pembuatan *Crude Palm Oil* (CPO) sebagai bahan dasar pembuatan minyak goreng, sabun di dalam negeri atau dieskpor. Luas perkebunan minyak kelapa sawit mencapai 15,08 juta hektar (ha) pada 2021. Luas perkebunan tersebut naik 1,5% atau seluas 1,48 juta ha dibanding tahun

sebelumnya. Kementan juga mencatat, jumlah produksi kelapa sawit nasional sebesar 49,7 juta ton pada 2021. Angka tersebut naik 2,9% dari tahun sebelumnya yang berjumlah 48,3 juta ton (Kementan, 2021).

Biodiesel dapat diproduksi melalui reaksi transesterifikasi, yaitu reaksi yang dilakukan dengan mereaksikan trigliserida dan alkohol menggunakan katalis asam atau basa (Jumari, 2013). Reaksi transesterifikasi yaitu reaksi pertukaran antara alkohol dengan suatu ester untuk membentuk ester lain pada suatu proses yang mirip dengan hidrolisis, kecuali pada penggunaan alkohol untuk menggantikan air dan menghasilkan produk (Rasyid, 2020). Pada reaksi transesterifikasi diperlukan asil aseptor berupa alkohol. Jenis alkohol yang umum digunakan pada penelitian adalah metanol dan etanol karena kemampuan mengurainya yang lebih tinggi dibandingkan dengan alkohol rantai panjang (Gog *et al.*, 2012). Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan preaksi metanol karena mudah didapat dan harga lebih murah. Reaksi transesterifikasi lebih disukai dari pada esterifikasi karena reaksinya lebih cepat dan tidak memerlukan banyak alkohol. Untuk mempercepat jalannya reaksi dan meningkatkan hasil proses dilakuka pengadukan yang baik dan penambahan katalis (Gerpen, 2005).

Proses transesterifikasi dilakukan dengan menggunakan suatu katalis. Katalis yang umumnya dipakai adalah KOH dan NaOH (Saragih, 2021). Transesterifikasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya waktu reaksi, suhu, jenis katalis, dan rasio molar trigliserida dengan alkohol. Produk biodiesel umumnya dilakukan dengan suhu tinggi dengan sumber panas eksternal. Namun penggunaan katalis enzim juga banyak digunakan karena lebih banyak keuntungan yang didapat dibandingkan menggunakan katalis asam basa. Keuntungan menggunakan katalis enzim antara lain prosesnya dilakukan dengan suhu yang lebih rendah, hasilnya lebih tinggi, katalisnya dapat digunakan secara berulang, menghemat bahan kimia dan pemisahan gliserol lebih mudah (Aziz, 2007). Dalam penelitian Arba, 2013, menggunakan metode transesterifikasi minyak kelapa sawit dan metanol dengan enzim lipase sebagai katalis. Hasil penelitiannya menunjukkan pada rasio molar minyak kelapa sawit 1:6 menghasilkan FAME tertinggi sebesar 4.55%. Hal ini disebabkan minyak goreng komersial, telah mengalami bebrapa tahapan proses

pemurnian sehingga dapat mengurangi adanya impurities atau pengotor-pengotor dalam minyak. Dengan berkurangnya impurities maka akan meningkatkan reaksi terbentuknya FAME dalam minyak goreng komersial.

Enzim yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas, esterifikasi, aminolisis dan reaksi transesterifikasi disebut dengan enzim lipase (Sholeha *et al.*, 2021). Enzim lipase dapat dihasilkan dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 karena bakteri ini memiliki kemampuan dalam menghidrolisis minyak. Pada penelitian ini digunakan lipase dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 (Firyal, 2022). Produksi lipase dapat dilakukan melalui teknik fermentasi secara substrat padat dengan menggunakan mikroorganisme khususnya pada kelapa sawit (Indah *et al.*, 2017). *Klebsiella* penghasil lipase dibuktikan dengan adanya zona bening disekitar koloni bakteri yang tumbuh. Zona ini terbentuk karena isolat mampu menghidrolisis tween-80 menjadi asam lemak dan menghasilkan enzim lipase. Karena semakin besar daerah zona bening yang terbentuk, maka semakin besar kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim ekstraseluler lipase untuk mendegradasi lipid. (Mazhar *et al.*, 2018). Kemudian, enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG 172 digunakan sebagai katalis untuk produksi biodiesel dari minyak kelapa sawit dan metanol untuk proses reaksi transesterifikasi, lalu didapatkan nilai aktivitas transesterifikasi lipase yang tinggi. Enzim dapat digunakan secara luas dalam bidang industri, serta dapat meningkatkan informasi tentang penggunaan katalis enzim lipase sebagai biodiesel (Dewi *et al.*, 2019).

Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 merupakan sel bakteri berwarna merah menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif karena komposisi dinding sel bakteri gram negatif sebagian besar tersusun dari lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna kristal violet saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak saat dicuci dengan alkohol), sel bakteri terwarnai oleh safranin sehingga sel bakterinya berwarna merah. Beberapa contoh mikroorganisme penghasil lipase diantaranya yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Miraxella*, *Mucor meihei* dan *Candida rugosa* (Dan *et al.*, 2012). Pada penelitian ini digunakan isolat bakteri

Klebsiella sp. LPG172 sebagai penghasil lipase yang selanjutnya akan digunakan sebagai katalis pada reaksi transesterifikasi dalam produksi biodiesel. Pada uji aktivitas lipase menggunakan metode Fu, dengan cara mereaksikan substrat *P-nitrophenil palmitat*. Selain itu penelitian ini dilakukan juga untuk mengetahui hasil produk dari biodiesel dengan analisis menggunakan GC-MS.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Menentukan kurva pertumbuhan bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 dalam memproduksi enzim lipase.
2. Menentukan nilai aktivitas spesifik dan tingkat kemurnian enzim hasil pemurnian.
3. Menentukan karakteristik enzim lipase hasil pemurnian nilai pH, suhu, waktu inkubasi dan pengaruh konsentrasi metanol.
4. Mengetahui hasil produksi biodiesel melalui proses transesterifikasi.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 dalam menghasilkan enzim lipase. Serta dapat mengetahui potensi dari enzim lipase keterkaitan untuk memproduksi biodiesel sebagai bahan bakar alternatif, melalui proses transesterifikasi.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri berasal dari bahasa Latin *bacterium*; jamak: *bacteria* adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini termasuk ke dalam domain prokariota dan berukuran sangat kecil (mikroskopik). Hal ini menyebabkan organisme ini sangat sulit untuk dideteksi, terutama sebelum ditemukannya mikroskop. Dinding sel bakteri sangat tipis dan elastis, terbentuk dari peptidoglikan yang merupakan polimer unik yang hanya dimiliki oleh golongan bakteri. Fungsinya dinding sel adalah- memberi bentuk sel, member perlindungan dari lingkungan luar dan mengatur pertukaran zat-zat dari dan ke dalam sel teknik pewarnaan Gram adalah untuk menunjukkan perbedaan yang mendasar dalam organisasi struktur dinding sel bakteri atau *cell envelope*. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel relatif tebal, terdiri dari berlapis-lapis *polymer peptidoglycan* (disebut juga murein). Tebalnya dinding sel menahan lolosnya kompleks kristal violet-iodine ketika dicuci dengan alkohol atau aseton. Bakteri Gram negatif memiliki dinding sel berupa lapisan tipis *peptidoglycan*, yang diselubungi oleh lapisan tipis outer membran yang terdiri dari *lipopolysaccharide* (LPS) (Maryanti *et al.*, 2007). Bakteri merupakan golongan prokariotik karena organisme yang tidak memiliki nukleus dan membran. Patogen juga merupakan bakteri, yang memiliki ukuran kecil (0,5-0,5 μm) ada pun jenis yang lain yaitu berukuran 0,3 mm dalam diameter. Bakteri sebagai makhluk hidup tentu memiliki informasi genetik berupa DNA, tapi tidak terlokalisasi dalam tempat khusus (nukleus) dan tidak ada membran inti. DNA pada bakteri berbentuk sirkuler, panjang dan biasa disebut nukleoid DNA bakteri tidak mempunyai intron dan hanya tersusun

atas ekson saja. Bakteri juga memiliki DNA ekstra kromosomal yang bergabung menjadi plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Boleng *et al.*, 2015).

2.1.1. *Klebsiella sp.*

Salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim lipase yaitu bakteri *Klebsiella sp.* *Klebsiella sp.* merupakan bakteri gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* yang dapat ditemukan di traktus gastrointestinal dan traktus respiratorius.

Ukurannya cenderung lebih pendek dan lebih tebal., berukuran 0,3- 1,5 μm dengan panjang 0,5-5,0 μm . Pertumbuhannya idealnya pada suhu 35-37°C, sedangkan tingkat pH idealnya 7,2. Adapun beberapa bagian dari *Klebsiella sp.* antara *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae* dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Pada manusia, *K. pneumoniae* hidup secara saprofit dalam sistem pernafasan dan tinja manusia normal sebesar 5%, dengan 1% dapat menyebabkan radang paru – paru. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Klebsiella sp.* merupakan bakteri fakultatif anaerob (Ramaditya *et al.*, 2018).

Pada penelitian (Fitriasari *et al.*, 2020) menyatakan bahwa menemukan beberapa jenis bakteri yang terdapat pada tanah tempat penimbunan sampah salah satunya yaitu bakteri *Klebsiella sp.* pada penelitiannya juga menjelaskan bahwa tanah merupakan habitat bagi mikroorganisme penghasil enzim hidrolitik.

2.1.2. Fase Pertumbuhan Bakteri

Apabila bakteri ditumbuhkan kembali ke dalam medium yang baru maka bakteri tidak akan segera membelah diri akan tetapi mengalami fase pertumbuhan. Fase-fase pertumbuhan bakteri sebagai berikut:

- a) Fase permulaan. Fase ini juga dikenal sebagai fase initial atau *lag phase*. Pada fase ini bakteri belum berkembangbiak atau perbanyakkan sel. Pada fase ini biasanya terjadi pembentukan enzim induktif atau germinasi spora.

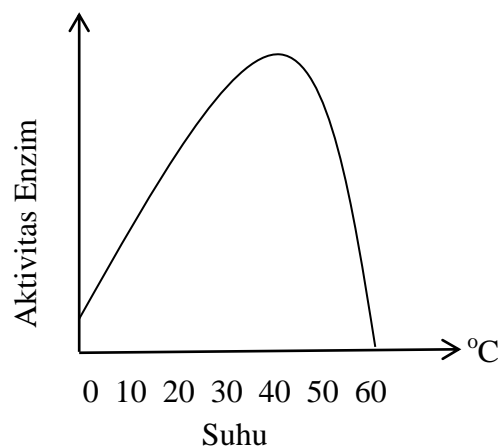
- b) Fase Pertumbuhan. Pada fase ini terjadi pertumbuhan yang dipercepat dan sel bakteri belum memperbanyak diri secara optimal.
- c) Fase Logaritma. Fase ini juga dikenal exponential phase oleh karena pada fase ini kecepatan pertumbuhan populasi sel berjalan maksimal dan konstan. Sel bakteri sangat aktif membelah diri,
- d) Fase pertumbuhan diperlambat/terhambat. Pada fase ini pertumbuhan sel bakteri mulai terhambat, kecepatan pertumbuhan makin lama makin menurun. Penurunan kecepatan pertumbuhan sel disebabkan oleh kehabisan nutrisi akumulasi substansi toksik hasil metabolisme sel dan perubahan pH yang tajam.
- e) Fase Stasioner. Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sel adalah nol. jumlah pembentukan sel baru sebagai hasil reproduksi seimbang dengan jumlah sel yang mati.
- f) Fase Kematian. Fase ini dikenal sebagai *phase of decline* oleh karena jumlah sel yang hidup makin lama makin menurun, sedangkan jumlah kematian sel makin banyak. Hal ini disebabkan oleh kondisi lingkungan yang tidak sesuai terutama adanya akumulasi toksin hasil metabolisme sel (Risna *et al.*, 2022).

2.2. Enzim

Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai katalis untuk proses biokimia. Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10^8 sampai 10^{11} kali lebih cepat daripada tanpa menggunakan katalis. Seperti katalis lainnya, enzim juga menurunkan atau memperkecil energi aktivasi suatu reaksi kimia (Poedjiadi *et al.*, 2006). Enzim dapat diproduksi oleh kelompok bakteri, kapang maupun khamir. Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai. Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Megiadari, 2009). Adapun faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah:

1. Suhu

Salah satu faktor yang mempengaruhi kerja enzim yaitu suhu. Enzim akan mengalami denaturasi pada keadaan suhu tinggi dan menurunnya aktivitas enzim. Denaturasi terjadi pada kerusakan struktur sekunder protein. Keadaan ini dapat menyebabkan terganggunya fungsi protein sebagai katalis, karena enzim diibaratkan sebagai kunci dari protein. Begitu pun dengan suhu rendah enzim tidak mendukung kerja secara efektif, enzim masing-masing memiliki suhu optimum sehingga kerja enzim dapat efektif (Murni *et al.*, 2011). Hubungan antara suhu dan kerja enzim tersebut dapat dilihat dalam gambar 1.

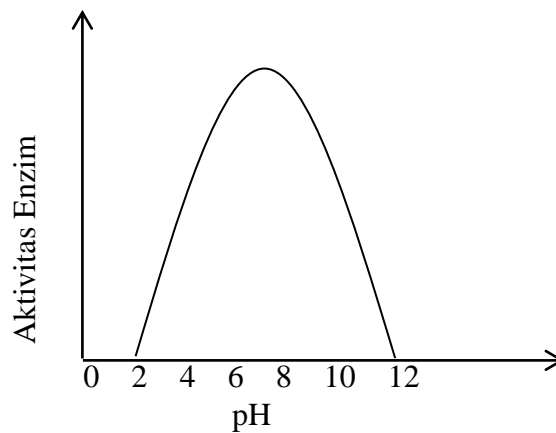


Gambar 1. Kurva Hubungan Suhu dengan Kerja Enzim

2. Tingkat Keasaman (pH)

Tingkat keasaman (pH) pada enzim harus sesuai dengan rentang pH nya masing-masing. Kondisi pH yang terlalu asam atau terlalu basa asam amino penyusun enzim in aktif. Perubahan pH tersebut akan mempengaruhi ionisasi pada molekul protein, sebagian besar pH optimum yaitu pH 7 (netral) (Risna *et al.*, 2022). Potensial Hidrogen (pH) merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Hal ini dapat dijelaskan karena diketahui bahwa enzim merupakan molekul protein, molekul protein kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, pada kondisi keasaman yang ekstrim molekul-molekul protein dari

enzim akan rusak. Kurva yang menyatakan hubungan pH dengan kerja enzim dapat dilihat pada gambar 2.

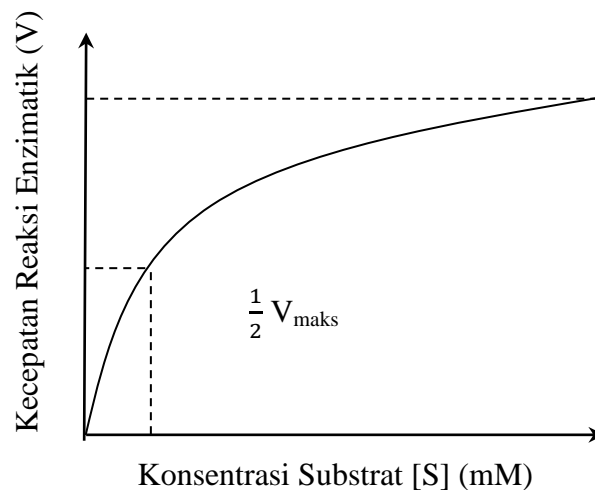


Gambar 2. Kurva Hubungan Nilai pH dengan Aktivitas Enzim

pH merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Hal ini dapat dijelaskan karena diketahui bahwa enzim merupakan molekul protein, molekul protein kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, pada kondisi keasaman yang ekstrim molekul-molekul protein dari enzim akan rusak (Poedjiadi,1994).

3. Konsentrasi Substrat

Seperti halnya konsentrasi substrat mempengaruhi kerja enzim secara optimal. Dimana naiknya konsentrasi substrat maka semakin tinggi kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim pada batas konsentrasi substrat tertentu tidak akan terjadi kenaikan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Jika konsentrasi substrat diperbesar maka makin banyak substrat yang akan bergabung pada sisi aktif enzim. Maka dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar. Sedangkan pada penambahan konsentrasi substrat yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi (Murni *et al.*, 2011). Adapun kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kerja enzim dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Kurva Hubungan Konsentrasi Substrat dengan Kerja Enzim

4. Inhibitor

Inhibitor yaitu molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut. Molekul inhibitor dapat berupa modifikasi gugus fungsi pada molekul enzim, molekul yang mirip dengan substrat. Inhibitor dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks enzim substrat dan hal ini menyebabkan berkurangnya kecepatan reaksi. Berdasarkan kerjanya inhibitor dibagi menjadi dua yakni inhibitor kompetitif dan non kompetitif.

a) Inhibitor kompetitif

Inhibitor kompetitif adalah molekul penghambat yang bersaing dengan substrat untuk mendapatkan sisi aktif enzim. Contohnya sianida bersaing dengan oksigen untuk mendapatkan hemoglobin dalam rantai respirasi terakhir. Penghambatan inhibitor kompetitif bersifat sementara dan dapat diatasi dengan cara menambah konsentrasi substrat.

b) Inhibitor non kompetitif

Inhibitor non kompetitif adalah molekul penghambat enzim yang bekerja dengan cara melekatkan diri pada luar sisi aktif enzim. Sehingga, bentuk enzim berubah dan sisi aktif enzim tidak dapat berfungsi. Hal ini menyebabkan substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif enzim. Penghambatan inhibitor non kompetitif bersifat tetap dan tidak dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat (Bariroh, 2014).

2.2.1. Enzim Lipase

Lipase (*triacylglycerol hydrolases*) (E.C.3.1.1.3) merupakan enzim golongan hidrolase yang mengkatalisis proses hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Selain itu lipase dapat mengkatalisis proses transesterifikasi ester lain serta sintesis ester. Salah satu enzim yang dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi untuk mensintesis biodiesel yaitu enzim lipase. Selama ini biodiesel diproduksi melalui proses esterifikasi diikuti dengan transesterifikasi secara kimia. Dalam satu dekade terakhir ini telah dikembangkan produksi biodiesel secara enzimatik menggunakan katalis lipase. Sintesis secara enzimatik mempunyai banyak keunggulan dibanding sintesis secara kimia antara lain prosesnya dilakukan dengan suhu yang lebih rendah, hasilnya lebih tinggi, dalam bentuk enzim. Lipase memiliki kemampuan sebagai katalis dengan reaksi yang efisien, stabil dan serbaguna sehingga lipase sangat menarik digunakan secara komersial. Selain itu lipase tidak memerlukan kofaktor, dapat bekerja dengan rentang pH yang sangat luas serta dapat dengan mudah diimobilisasi pada matriks yang berbeda, memiliki kemampuan selektivitas yang kuat dalam menghidrolisis substrat dalam molekul gliserol yang terikat pada gugus asil pada triasilgliserol.

Lipase mengkatalisis tiga jenis reaksi. Reaksi katalitik lipase bersifat bolak-balik lipase mengkatalisis sintesis ester pada sistem *microaqueous*. Namun pada beberapa biotransformasi industri oleokimia, proses transesterifikasi nampaknya lebih disukai dari pada hidrolisis dan sintesis ester. Reaksi katalitik lipase diklasifikasikan kedalam dua kategori utama, yaitu hidrolisis dan sistesis. Reaksi yang masuk dalam kategori sistesis terdiri atas reaksi esterifikasi, interesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Reaksi interesterifikasi, alkoholisis dan asidolisis dikenal dengan istilah transesterifikasi.

2.1.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya

Menurut (Sholeha, 2021) klasifikasi enzim lipase berdasarkan sumbernya dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu:

1. Pengelompokan lipase yang bersumber dari mamalia dibagi menjadi:
 - a) Lipase pada sistem pencernaan
 - b) Lipase pada jaringan, seperti hati, paru- paru, ginjal dan jantung
 - c) Lipase dalam air susu
2. Pengelompokan lipase yang bersumber dari mikroorganisme dibagi menjadi:
 - a) Bakteri, seperti *Pseudomonas* dan *Burkholderia*
 - b) Kapang, seperti *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* dan *Fusarium*
 - c) Khamir, seperti *Candida antartika* dan *C. Rugosa*
3. Pengelompokan lipase yang bersumber dari tumbuhan dibagi menjadi:
 - a) Triasilgliserol terdapat pada tanaman minyak sawit, kentang dan beras
 - b) Asil Hidrolase terdapat pada tanaman kentang
 - c) Fosfolipase terdapat pada kol dan seledri dan
 - d) Lysophospholipase terdapat pada tanaman gandum.

Menurut Klasifikasi lipase kemampuannya dalam mensintesis ikatan ester dibagi menjadi 3 golongan yaitu:

1. Lipase non spesifik
Lipase non spesifik mengkatalisis hidrolisis triasilgliserol lengkap menjadi asam lemak dan gliserol secara acak. Lipase memiliki kemampuan yang sama dalam menghidrolisis gugus asil pada nomer 1, 2 atau 3.
2. Lipase spesifik 1,3
Berbeda dengan lipase non spesifik, lipase spesifik 1,3 menghidrolisis triasilgliserol pada gugus asil nomer 1 dan 3. Produk-produk yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol oleh lipase spesifik 1,3 ini adalah 2-monoasilgliserol dan 1,2-diasilgliserol atau 2,3-diasilgliserol

3. Lipase spesifik asam lemak

Kelompok ketiga merupakan lipase yang memutus asam lemak terutama pada tipe asam lemak spesifik dari molekul gliserida. Lipase ini menghidrolisis ester asam lemak yang terletak di posisi mana saja pada triasilgliserol.

2.2.2. Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim adalah besarnya kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dengan unit/mL menit. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan 1 μmol karbon diubah menjadi 1 μmol produk per menit pada kondisi tertentu sehingga pengertian aktivitas enzim lipase adalah jumlah yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1 μmol ikatan per menit pada kondisi pengujian tertentu. Aktivitas spesifik enzim adalah jumlah unit enzim per protein. Aktivitas spesifik enzim merupakan suatu ukuran kemurnian yang ukuran nilainya akan meningkat selama proses pemurnian. Penentuan aktivitas spesifik selulase dapat diperoleh dengan cara membagi hasil aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Satuan dari aktivitas spesifik enzim yaitu jumlah unit enzim per mg (U/mg) pada kondisi optimum (Wijaya, 2002). Adapun cara penentuan aktivitas lipase dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu:

- a. Metode Titrimetri Metode Titrimetri adalah metode penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan larutan basa (KOH atau NaOH) sebagai titran serta phenolphthalein sebagai indikator. Campuran etanol-aseton (1:1) ditambahkan pada larutan untuk menghentikan reaksi.
- b. Metode Spektrofotometri Penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan spektrofotometri perlu penambahan reagen tembaga (II) asetat dan diuji pada panjang gelombang 715 nm. Prinsip reaksinya adalah asam lemak yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol akan membentuk senyawa kompleks berwarna biru dengan Cu^{2+} dari tembaga (II) asetat yang dapat diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 715 nm (Sholeha dan Agustini, 2021).

- c. Metode Kwon and Rhee dengan menggunakan substrat yang digunakan dalam metode ini adalah minyak zaitun (Isti'nah *et.al.*,2020).
- d. Metode Fuu dengan menggunakan substrat yang digunakan dalam metode ini yaitu p-Nitrofenol Palmitat (Fuu, 2021).

Pada penelitian menggunakan metode uji aktivitas lipase dengan metode Fu. Substrat yang digunakan pada metode ini adalah *p-nitrofenol palmitat*. Menggunakan *p-nitrofenol palmitat* sebanyak 10 mmol/L dengan 1 mol/L isopropanol didalam 500 μ L asetonitril. Diukur menggunakan spektrofotometri Uv-Vis dengan panjang gelombang 315 nm. Selanjutnya aktivitas enzim lipase dapat dihitung dengan menggunakan persamaan 1.

$$AU = \frac{Asp - Abi}{Ast - Abi} \times FP \times \frac{1}{T} \dots \dots \dots (1)$$

Keterangan:

Asp: Nilai absorbansi larutan sampel

Abi: Nilai absorbansi larutan blanko

Ast: Nilai absorbansi larutan standar

FP: Faktor pengenceran

T : Waktu inkubasi

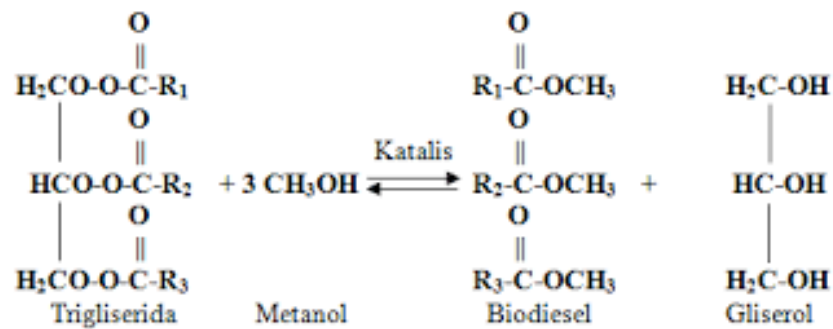
Penentuan kadar protein dalam penelitian ini dilakukan analisa secara kuantitatif dengan metode Lowry berdasarkan kurva standart BSA (Bovine Serum Albumin). Kadar protein harus diketahui agar dapat menentukan aktivitas spesifik enzim terkait per milligram protein (Cahyani dan Raharjo, 2017). Selanjutnya kadar protein dapat dihitung dengan menggunakan persamaan 2.

$$\text{Kadarprotein(mg/mL)} = \frac{((Abs.Sampel - \alpha))}{b} \dots \dots \dots (2)$$

2.3. Transesterifikasi

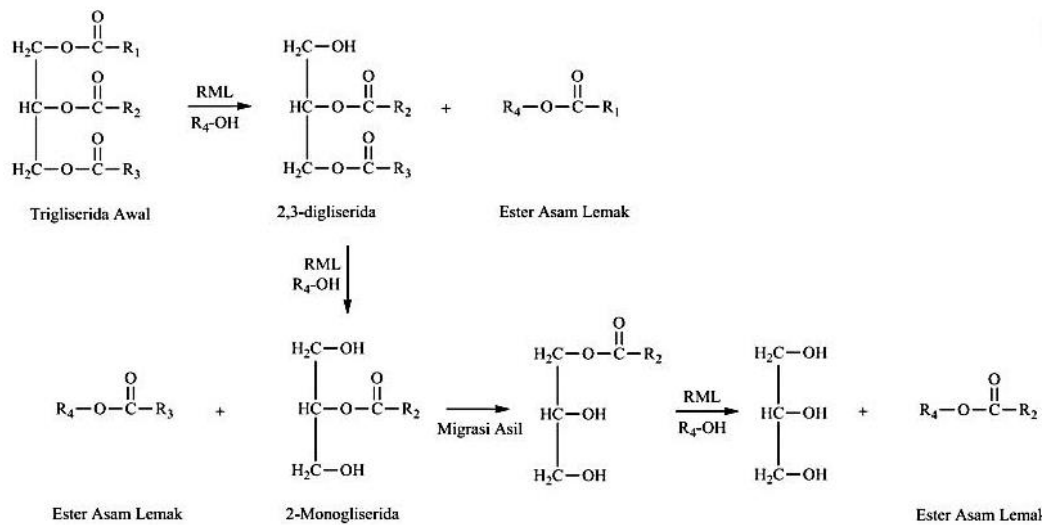
Transesterifikasi adalah salah satu metode yang digunakan untuk memproduksi biodiesel sebagai bahan bakar alternatif ramah lingkungan dan tidak beracun dari minyak tumbuhan atau hewan. Dalam reaksi ini metnaol direaksikan dengan trigliserida untuk menghasilkan metil ester (biodiesel) dan gliserol (Khazaai *et al.*,

2017). Faktor yang mempengaruhi rendemen metil ester yang dihasilkan pada reaksi transesterifikasi adalah rasio molar antara trigliserida dan alkohol, jenis katalis yang digunakan, suhu reaksi, waktu reaksi, kandungan air dan kandungan asam lemak bebas pada bahan baku yang dapat menghambat reaksi (Suleman *et al.*, 2019). Dalam reaksi transesterifikasi molekul trigliserida dalam bentuk minyak bereaksi dengan rantai pendek metil dari methanol dalam suasana katalis membentuk metil ester dan gliserol. Kemudian tahap demi tahap diikuti dengan reaksi esterifikasi secara stoikiometri, setiap mol metanol bereaksi dengan asam lemak bebas untuk menghasilkan metil ester dan air (Khazaai *et al.*, 2017) reaksi tersebut seperti disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Reaksi Transesterifikasi

Reaksi transesterifikasi merupakan reaksi bolak balik yang relatif lambat. Pada reaksi transesterifikasi membutuhkan katalis agar mempercepat proses reaksi dan meningkatkan hasilnya maka lakukan pengadukan dengan baik, dan tambahkan katalis. Pemilihan katalis dilakukan berdasarkan kemudahan penanganan dan pemisahannya dari produk (Aziz, 2007). Katalis yang dapat digunakan pada proses transesterifikasi salah satunya yaitu enzim karena saat ini lebih dinilai efektif (Azizah, 2018). Reaksi transesterifikasi menggunakan katalis lipase dapat dilihat pada gambar 5 (Toldrá-Reig *et al.*, 2020).



Gambar 5. Skema Reaksi Transesterifikasi Trigliserida oleh Katalis Lipase

Pada reaksi transesterifikasi digunakan katalis untuk meningkatkan laju reaksi dan menurunkan energi aktivasi sehingga reaksi dapat berlangsung lebih cepat. Katalis diperkenalkan oleh Baron J.J., Berzellius sebagai suatu zat atau substansi yang dapat mempercepat dan menurunkan energi aktivitas dalam reaksi kimia tanpa mengalami perubahan secara kimiawi pada akhir reaksi. Katalis mempunyai tiga fungsi: aktivitas untuk memacu laju reaksi, selektivitas untuk mengarahkan suatu reaksi menghasilkan produk tertentu, stabilitas untuk menahan hal-hal yang dapat mengakibatkan terjadinya deaktivasi katalis (Deutschmann *et.al.*, 2009).

Secara umum katalis dapat dibedakan ke dalam dua golongan utama, yaitu katalis homogen dan katalis heterogen. Katalis homogen adalah katalis yang mempunyai fase sama dengan zat yang dikatalisis. Biasanya katalis homogen adalah asam, basa, serta kompleks logam yang larut dalam medium reaksi. Katalis homogen dapat digunakan pada suhu dan tekanan rendah serta biasanya spesifik untuk reaksi tertentu. Katalis homogen yang umum digunakan adalah H_2SO_4 dan $NaOH$ (Guru *et.al.*, 2008), kompleks (Damanik, 1997).

2.4. Biodiesel

Biodiesel adalah salah satu bahan bakar alternatif yang dapat diperbarui, ramah terhadap lingkungan, dan tidak mempunyai efek terhadap kesehatan. Biodiesel dapat disintesis melalui reaksi kimia yang disebut 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 gliserida. Berdasarkan ilmu kimia biodiesel adalah metil ester sebagai bahan bakar diesel yang diperoleh dari reaksi antara trigliserida dan methanol berbasis katalis pada suhu tertentu. Biodiesel terbuat dari minyak nabati berasal dari sumberdaya yang dapat diperbarui. Beberapa bahan baku untuk pembuatan biodiesel antara lain adalah minyak kelapa sawit, kedelai, bunga matahari, dan jarak pagar. Produksi biodiesel menggunakan bahan baku minyak kelapa sawit (Kalita *et al.*, 2022), minyak kelapa (Hidayanti *et al.*, 2015), minyak jarak (Hala *et al.*, 2009), dan minyak biji karet (Shahab dan Husnah, 2022). Selain minyak nabati bahan baku lain adalah lemak hewani, misalnya lemak ayam (Broiler) menggunakan katalis kapur tohor (Marnoto dan Efendi, 2011).

Biodiesel memiliki kelebihan diantaranya, tidak memerlukan modifikasi mesin, tidak menambah efek rumah kaca karena karbon yang dihasilkan masih dalam siklus. Adapun kekurangan dari biodiesel diantaranya energi lebih kecil dibandingkan dengan solar, dan jika disimpan dalam waktu yang lama biodiesel cenderung berubah menjadi seperti gel dan berpotensi menyumbat mesin. Untuk mengatasi kelemahan tersebut, biodiesel umumnya dicampur dengan diesel petroleum (Knothe *et al.*, 2004).

2.4.1. Kelapa sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis Jacq*) adalah tumbuhan industri atau perkebunan yang berguna sebagai penghasil minyak masak, minyak industri, maupun bahan bakar. Pohon kelapa sawit terdiri dari dua spesies yaitu *elaeis guineensis* dan *elaeis oleifera* yang digunakan untuk pertanian komersil dalam pengeluaran

minyak kelapa sawit. Kelapa sawit menjadi populer setelah revolusi industri pada akhir abad ke-19 yang menyebabkan tingginya permintaan minyak nabati untuk bahan pangan dan industri sabun (Badan Statistik Perkebunan, 2007). Tumbuhan kelapa sawit dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Tumbuhan Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit adalah suatu sumber energi yang potensial. Sebagai negara yang tanahnya subur, Indonesia memiliki potensi yang sangat besar untuk berperan dalam industri kelapa sawit. Terlebih lagi pada 2007 Indonesia tercatat sebagai penghasil dan pengekspor minyak kelapa sawit terbesar di dunia. Luas area perkebunan minyak kelapa sawit di Indonesia selama 2017 – 2021 mengalami peningkatan. Kementerian Pertanian (Kementan, 2021) mencatat, luas perkebunan minyak kelapa sawit mencapai 15,08 juta hektar (ha) pada 2021. Luas perkebunan tersebut naik 1,5% atau seluas 1,48 juta ha dibanding tahun sebelumnya. Dari 15,08 juta ha, mayoritas dimiliki oleh Perkebunan Besar Swasta (PBS) yaitu seluas 8,42 juta ha (55,8%). Kemudian, Perkebunan Rakyat (PR) seluas 6,08 juta ha (40,34%) dan Perkebunan Besar Negara (PBN) seluas 579,6 ribu ha (3,84%). Kementan juga mencatat, jumlah produksi kelapa sawit nasional sebesar 49,7 juta ton pada 2021. Angka tersebut naik 2,9% dari tahun sebelumnya yang berjumlah 48,3 juta ton. Areal perkebunan kelapa sawit tersebar di 26 provinsi di Indonesia. Provinsi Riau memiliki area perkebunan kelapa sawit terluas dengan 2,89 juta ha pada 2021 atau 19,16% dari total luas areal perkebunan kelapa sawit di negeri ini. Adapun, produksi kelapa sawit di Riau mencapai 10,27 juta ton pada 2021. Jumlah ini menjadi yang terbesar di Indonesia dan menyumbang 20,66% pada produksi kelapa sawit nasional (Kementan, 2021).

Minyak kelapa sawit berpotensi besar untuk dijadikan bahan baku pembuatan biodiesel karena kelapa sawit merupakan tanaman tahan lama dan penyakit dibandingkan dengan tanaman penghasil minyak nabati lainnya. Kelapa sawit merupakan minyak yang paling produktif di dunia. Satu hektar kelapa sawit dapat meneghasilkan 5000 kg minyak mentah, atau hampir 6000 L minyak mentah. Produktifitas yang tinggi menyebabkan harga produksi menjadi lebih ringan, selain itu masa produksi kelapa sawit yang cukup panjang (22 tahun) juga akan turut mempengaruhi ringanya biaya produksi yang dikeluarkan oleh pengusaha kelapa sawit (Supraniningsih, 2012).

Minyak kelapa sawit memiliki beberapa komposisi asam lemak diantaranya asam laurat (C12), asam miristat (C14), asam palmitat (C16), asam palmitoleat (C16:1), asam stearat (C18:0), asam oleat (C18:1), asam linoleat (C18:2), dan asam linolenat (C18:3). Asam stearate merupakan asam lemak jenuh berantai panjang. Asam oleat merupakan asam lemak tidak jenuh yang memiliki satu ikatan rangkap pada atom C atau sering disebut juga monounsaturated. Asam linoleat merupakan asam lemak tidak jenuh yang memiliki ikatan rangkap ganda pada atom C atau disebut juga dengan polyunsaturated (Hasibuan, 2020).

2.5. Karakterisasi Biodiesel

Biodiesel hasil reaksi transesterifikasi akan dikarakterisasi untuk mengetahui karakteristik biodiesel yang diperoleh meliputi analisis komponen biodiesel dengan menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS), karakteristik fisik seperti densitas dan viskositas.

2.5.1. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Biodiesel hasil dari reaksi transesterifikasi dengan nilai yield tertinggi juga dianalisa kandungan metil ester dengan menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectroscopy* (GC-MS). *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS)

merupakan metode pemisahan senyawa organik yang menggunakan dua metode analisis senyawa yaitu *Gas Chromatography* (GC) untuk menganalisis jumlah senyawa atau komponen dalam suatu campuran secara kuantitatif dan spektrometri massa (MS) untuk menganalisis struktur molekul senyawa analit prinsip kerja dari GC-MS yaitu molekul-molekul gas bermuatan akan diseleksi berdasarkan massa dan beratnya, spektrum yang didapat dari perubahan sampel menjadi ion-ion yang bergerak, kemudian dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan (m/e). Ionisasi menghasilkan fragmen-fragmen yang akan menghasilkan spektrum. Spektrum massa merupakan gambar antara limpahan relatif dengan perbandingan massa per muatan (m/e) (McLafferty, 1988). Berdasarkan analisis kromatografi gas diperoleh puncak-puncak kromatogram yang memberikan informasi jumlah komponen yang ada dalam sampel berdasarkan waktu retensi dan spektra dari spektroskopi massa memberikan kunci-kunci penting dalam proses identifikasi senyawa berdasarkan fragmentasinya memuat harga massa/muatan (m/e) terhadap kelimpahan relatif. Spektra massa biasanya dibuat dari massa rendah ke massa tinggi dengan data tersebut dapat diperkirakan bagaimana struktur molekul awal dari senyawa yang dianalisis. Kromatografi gas secara umum digunakan untuk memisahkan campuran kimia menjadi komponennya berdasarkan pendistribusian sampel di antara fasa diam dan fasa gerak. Fasa gerak dalam kromatografi gas berupa gas dan fasa diamnya berupa padatan atau cairan. Fase gerak akan membawa campuran untuk dipisahkan masing-masing komponennya. Pemisahan komponen akan bergantung pada lamanya waktu relatif yang dibutuhkan oleh komponen-komponen tersebut di dalam fase diam (Sparkman *et al.*, 2011).

Spektroskopi massa diperlukan untuk identifikasi senyawa sebagai penentu bobot molekul dan penentuan rumus molekul. Prinsip dari MS adalah pengionan senyawa-senyawa kimia untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa/muatan. Molekul yang telah terionisasi akibat penembakan elektron berenergi tinggi tersebut akan menghasilkan ion dengan muatan positif, kemudian ion tersebut diarahkan menuju medan magnet dengan kecepatan tinggi. Medan magnet atau listrik akan membelokkan ion tersebut agar dapat menentukan bobot molekulnya dan bobot molekul semua fragmen yang

dihasilkan (David, 2005). Detektor kemudian akan menghitung muatan yang terinduksi atau arus yang dihasilkan ketika son dilewatkan atau mengenai permukaan, massa dan menghitung ion sebagai perbandingan massa terhadap muatan (m/e). Pada *Gas Chromatography Mass - Spectrometry* (GC-MS), setelah masing-masing komponen dalam campuran telah terpisah dalam kolom GC semua komponen akan memasuki detektor ionisasi electron (Asthasari, 2008). Bobot metil ester yang terbentuk dapat dihitung menggunakan persamaan 3 (Elma *et al.*, 2018).

$$\text{Biodiesel } \left(\frac{w}{w}\right) = \frac{\text{Berat biodiesel yang dihasilkan}}{\text{Berat minyak yang digunakan}} \times 100\% \dots\dots\dots(3)$$

2.5.2. Densitas

Densitas didefinisikan sebagai massa persatuan volume. Densitas berhubungan erat dengan nilai panas kalor dan daya yang dihasilkan oleh mesin diesel per satuan bahan bakar yang digunakan Berdasarkan SNI 7182:2015 densitas standar untuk biodiesel yakni 850-890 kg/m³ yang diukur pada suhu 40 °C. Densitas biodiesel dapat dihitung menggunakan persamaan 4.

$$\text{Densitas} = \frac{W_2 - W_1}{\rho_{\text{air}}} \dots\dots\dots(4)$$

Keterangan:

W1 : berat piknometer kosong (g)

W2 : berat piknometer dan biodiesel (g)

ρ_{air} : densitas air (g/mL)

Pengukuran densitas dapat dilakukan dengan menggunakan piknometer. Dapat dilihat contoh alat piknometer pada gambar 7.



Gambar 7. Alat Piknometer

2.5.3. Viskositas

Viskositas (kekentalan) diartikan sebagai ukuran ketahanan bahan bakar untuk mengalir yakni waktu yang diperlukan suatu volume cairan untuk mengalir secara gravitasi melalui kapiler viskometer yang terkalibrasi pada suhu yang terkendali dengan teliti. Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan Viskometer Ostwald dengan mengukur waktu yang diperlukan cairan uji untuk melewati batas yang telah ditentukan. Viskositas disebabkan oleh adanya gaya kohesi atau gaya tarik menarik antara molekul sejenis (Sari, 2007). Viskositas kinematik adalah salah satu parameter untuk menentukan mutu atau karakteristik biodiesel yang diperoleh. Jika viskotas suatu bahan bakar terlalu rendah atau encer, maka akan menyebabkan kebocoran pipa injeksi yang mengurangi daya pembakaran. Sedangkan jika viskositas terlalu tinggi atau kental, bahan bakar akan sulit displai baik dialirkan ataupun dipompa ke ruang pembakaranhal ini juga menyebabkan berkurangnya daya pembakaran (Knothe *et al.*, 2004). Viskostas biodiesel dipengaruhi oleh panjangnya rantai hidrokarbon dan jumlah ikatan rangkap asam lemak yang terkandung didalamnya Semakin banyak ikatan rangkap pada rantai hidrokarbon asam lemak akan menambah viskositas biodiesel yang dihasilkan (De Almeida *et al.*, 2015). Viskositas biodiesel dapat dihitung menggunakan persamaan 5 dan 6.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{air}} \times t_{\text{sampel}} \times \rho_{\text{biodiesel}}}{t_{\text{alirair}} \times \rho_{\text{air}}} \dots\dots\dots(5)$$

$$v = \frac{\mu}{\rho} \dots\dots\dots(6)$$

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 (s).

2.6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri *UV-Vis* salah satu instrumen yang paling sering digunakan dalam analisis kimia untuk mendeteksi senyawa padat atau cair berdasar dengan absorbansi foton. Panjang gelombang Foton biasanya (200-700 nm), sampel biasanya harus diderivatisasi, dengan penambahan Reagen dalam pembentukan garam kompleks Spektrofotometri *Uv-Vis* digunakan untuk analisis fosfat pada sedimen melalui interaksi antara interaksi antara cahaya/sinar pada panjang gelombang tertentu dengan materi yang berupa molekul atau atom (Angraini dan Yanti, 2021). Cahaya atau sinar dapat yaitu berupa cahaya *visible* (tampak), cahaya ultraviolet (tidak tampak), dan *infrared* sedangkan materi dapat berupa molekul atau atom dengan elektron valensi . Menurut (Irawan, 2019) secara sederhana, spektrofotometri *Uv-Vis* terdiri dari :

1. Sumber Cahaya, berupa cahaya polikromatis dari lampu Tungsten/Wolfram pada daerah Visibel (400-800 nm) dan lampu Deuterium pada daerah Ultraviolet (0-400 nm) (3) .
2. Monokromator untuk menyeleksi untuk menyeleksi panjang gelombang.
3. Kuvet/sel sampel sebagai tempat sampel. Berbentuk persegi panjang lebar 1 cm, memiliki permukaan lurus dan sejajar secara optis, transparan, tidak

bereaksi terhadap bahan kimia, tidak mudah rapuh, dan memiliki bentuk yang sederhana namun solid (4) .

4. Detektor untuk menangkap sinar yang melewati sampel.
5. *Read Out* yaitu suatu sistem yang menangkap isyarat listrik yang berasal dari detektor dan mengeluarkannya dalam bentuk angka transmittan dan absorbansi yang ditampilkan pada display alat.

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Agustus 2023 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Bandar Lampung. Identifikasi komponen biodiesel menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS) dilakukan di Laboratorium Kimia Poltekes Bandung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah cawan petri, tabung reaksi, tabung sentrifus, sentrifus (17250-10-*Centrifuge Cole Parmer*), labu ukur, gelas ukur, erlenmeyer, gelas piala, rak tabung reaksi, *Laminar Air Flow* (900-FL *Crumair*), autoklaf (S-90-N *Electric Steroclave*), oven, spektrofotometer *UV-Vis* (Cary-100 *UV-Vis Agilent Technologies*), mikropipet, termometer, bunsen, neraca, analitik, sumbat, pH meter, mikro tip, jarum ose, inkubator, pengaduk stirrer, *hot plate*, piknometer, labu leher tiga, corong pisah, Viskometer Ostwald, piknometer dan GC-MS (*Agilent Technologies*).

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella sp.* LPG172, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), minyak zaitun bertolli, tween 80, akuades, *p-Nitrophenol Palmitat*, *p-Nitrophenol*, isopropanol, asetonitril, ammonium sulfat, *Bovine Serum Albumin* (BSA), minyak kelapa sawit, metanol, Na_2CO_3 , NaOH, Na/K tartarat, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan reagen *folin ciocellean*.

3.3. Prosedur Penelitian

Prosedur pada penelitian ini meliputi tahap persiapan, menentukan kurva pertumbuhan bakteri, fraksinasi enzim, produksi biodiesel dan karakterisasi hasil biodiesel.

3.3.1. Tahap Persiapan

a) Persiapan Alat

Peralatan gelas yang akan digunakan dicuci, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas. Setelah dibungkus, semua peralatan disterilisasi dalam autoklaf bertekanan 1 atm dan bersuhu 121 °C selama 15 menit. Alat yang telah disterilisasi kemudian dikeringkan dalam oven selama kurang lebih 2 jam.

b) Pembuatan Media Selektif

2,8 g NA (komposisinya berupa pepton, NaCl, dan *beef extract*) ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian ditambahkan minyak zaitun sebanyak 1 mL. Media dipanaskan dengan *hot plate* dan sterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Media dituang pada cawan petri secara aseptik. Diamkan media hingga mengeras dan siap pakai.

c) Pembuatan Media Inokulum

50 mL aquades ditambahkan 1 mL minyak zaitun, *tween* 80 sebanyak 2 tetes dan metanol sebanyak 1% dari volume. Kemudian media disterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit.

d) Pembuatan Media Fermentasi

1000 mL aquades ditambahkan 20 mL minyak zaitun, 1 mL *tween* 80 dan metanol sebanyak 1% dari volume. Kemudian media disterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit.

e) Pembuatan Pereaksi untuk Penentuan Kadar Protein (Lowry *et al.*, 1951).

1. Preaksi Lowry A

Na_2CO_3 dilarutkan dalam NaOH 0,1 N, dibuat menjadi larutan dengan konsentrasi 2%.

2. Preaksi Lowry B

5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dicampurkan dengan 3 mL NaK 1%.

3. Preaksi Lowry C

2 mL preaksi Lowry B dicampurkan dengan 100 mL preaksi Lowry A.

4. Preaksi Lowry D

Folin ciocalteu dan aquades dicampurkan dengan perbandingan 1:1 (v/v).

5. Larutan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

0,037 gram padatan BSA dilarutkan dalam akuades 25 mL, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL, kemudian dihomogenkan.

f) Inokulasi bakteri

Media agar selektif dibuat sebanyak 50 mL. Media sterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian media dituang pada tabung reaksi secara aseptis. Mulut tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat, tabung diletakkan dengan kemiringan lima derajat. Tabung didiamkan hingga 3 hari hingga siap dipakai. Kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu optimum selama kurang lebih 66 jam.

g) Peremajaan isolat bakteri *Klebsiella sp.* LPG172

Isolat bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 diambil 1 ose dan digoreskan ke media NA miring dalam tabung secara aseptik, lalu biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C dan disimpan sebagai isolat stok.

3.3.2. Kurva Pertumbuhan Bakteri

Penentuan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan untuk mengetahui waktu pertumbuhan optimum bakteri yang digunakan sebagai starter, yaitu waktu ketika bakteri berada pada fase logaritmik. Kultivasi dilakukan pada 120 rpm dan suhu ruang, disesuaikan dengan kondisi alat dan lingkungan. Sebanyak 1 loop bakteri dari koloni terpilih diinokulasikan kedalam 100 mL media inokulum. Kemudian

diinkubasi menggunakan *shaker* kecepatan 120 rpm dan suhu ruang selama 72 jam. Kurva pertumbuhan bakteri ditentukan dengan mengukur *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*, setiap 6 jam dengan rentang waktu 72 jam (Risna *et al.*, 2022). Pengukuran nilai OD disertai dengan pengukuran aktivitas enzim lipase pada setiap sampel.

3.3.3. Produksi Enzim

Isolat yang telah diinkubasi selama 2 hari pada agar miring digunakan sebagai kultur bakteri. Kultur bakteri diambil menggunakan ose dan dimasukkan kedalam 50 mL media inokulum pada erlenmeyer 250 mL, lakukan hingga tiga kali pengulangan. Kemudian diinkubasi pada *shaker* dan diagitasi dengan kecepatan 114-120 rpm selama satu hari. Hasil inkubasi digunakan sebagai inokulum 10% inokulum difermentasi pada 1000 mL media fermentasi. Kemudian dilakukan kultivasi selama dua hari dan diagitasi dengan kecepatan 115-120 rpm. Setelahnya larutan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan supernatan (ekstrak kasar enzim) dari pellet nya (sisa-sisa sel) (Hernawati, 2010).

3.3.4. Fraksinasi

a. Fraksinasi Ammonium Sulfat

Fraksinasi lipase dari ekstrak kasar dilakukan menggunakan ammonium sulfat pada tingkah fraksi, yaitu fraksi 0-20% dan 20-90%. Ammonium sulfat yang telah dihaluskan ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk. Suhu lingkungannya dibuat menjadi 4 °C setelah didiamkan selama 30-60 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan $10000 \times g$ selama 15 menit pada temperature 4 °C. Supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk dan ditampung untuk fraksinasi pada tingkat berikutnya. Endapan protein pada masing-masing fraksi kemudian dilarutkan dalam 50 mm *buffer* fosfat pH optimum produksi untuk selanjutnya didialisis. Masing-masing fraksi

enzim yang diperoleh kemudian ditentukan aktivitas lipase dan kadar proteinya (Rusman, 2017).

b. Dialisis

Endapan protein yang telah dilarutkan dari setiap fraksi ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan *buffer* fosfat 0,05 M pH optimum produksi selama \pm 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis dilakukan pergantian larutan *buffer* setiap 4 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Popoola, 2021). Proses ini dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Hasil dialisis ditentukan melalui nilai aktivitas lipase dan kadar proteinnya.

3.3.5. Karakterisasi Enzim

a. Penentuan pH optimum

Penentuan pH optimum dengan cara menginkubasi (campuran enzim substrat) selama 15 menit dan suhu 50 °C pada prosedur uji aktivitas menggunakan beberapa kondisi pH (6,7,8) dengan *buffer* fosfat (Su'i *et al.*, 2013).

b. Penentuan suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menginkubasi (campuran enzim substrat) selama 15 menit pada prosedur uji aktivitas menggunakan variasi suhu (60, 65, 70, 75, 80 °C) dan pH optimum yang telah ditentukan (Su'i *et al.*, 2013).

c. Penentuan waktu inkubasi optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan cara menginkubasi (campuran enzim substrat) dengan suhu dan pH optimum pada prosedur uji aktivitas menggunakan variasi lama waktu inkubasi (10,15,20, 25, dan 30) menit (Susanti, 2011).

d. Penentuan konsentrasi metanol optimum

Penentuan konsentrasi metanol dilakukan dengan menginkubasi (campuran enzim metanol) selama 30 menit dengan suhu optimum. Konsentrasi metanol yang digunakan adalah 30,50,70 dan 90% Kemudian campuran tersebut diinkubasi kembali pada prosedur uji aktivitas menggunakan pH, suhu, dan waktu inkubasi optimum (Susanti, 2011).

e. Uji Aktivitas Enzim

Penentuan aktivitas transesterifikasi lipase dilakukan dengan menggunakan metode Fu (Fu, *et al.*, 2014). Menggunakan *p-nitrophenol palmitat* sebanyak 10 mmol/L dengan 1 mol/L isopropanol didalam 500 μ L asetonitril. Sebanyak 1 mL lipase kemudian ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 50 °C. Setelah reaksi 15 μ mL campuran diambil dan dicampurkan dengan 1485 μ L etanol dan diukur menggunakan spektrofotometri *UV-Vis* dengan panjang gelombang 315 nm. Kontrol direaksikan dengan prosedur yang sama namun tanpa penambahan enzim.

f. Uji Kadar Protein

Kadar protein dalam media kultur diukur berdasarkan metode Lowry (1951) 0,1 mL sampel enzim ditambahkan 0,9 mL akuades. Kemudian campuran ditambahkan 5 mL preaksi Lowry C, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan preaksi Lowry D (*folin ciocalteu*) sebanyak 0,5 mL dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Lalu ditentukan absorbansi spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Kadar protein diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar. Untuk larutan kontrol, larutan enzim 0,1 mL diganti dengan aquades.

3.3.6. Produksi Biodiesel

Produksi biodiesel dilakukan menggunakan minyak kelapa sawit sebagai sumber trigliserida.

a) Pembuatan Biodiesel Dengan Reaksi Transesterifikasi

Minyak kelapa sawit dan metanol dengan perbandingan 1:4;1:5 dan 1:6 (Rasio molar) (Katsiroh, 2017). Sebanyak 10% enzim lipase dicampurkan dari volume minyak. Kemudian direaksikan dalam labu leher tiga sambil dipanaskan 70 °C (dalam keadaan stabil) selama 1 jam dan diaduk menggunakan pengaduk magnetis. Ditambahkan metanol pada volume yang sudah ditentukan berdasarkan perbandingannya. Setelah semua volume metanol telah dimasukkan maka waktu reaksi transesterifikasi mulai dapat dihitung sampai 24 jam setelahnya. Sampel yang terbentuk berupa dua fasa, sehingga dibutuhkan pemisahan menggunakan corong pisah. Sampel biodiesel yang telah dipisahkan kemudian dievaporasi untuk menghilangkan impurities yang masih tersisa dan jumlah yieldnya dengan membandingkan dari jumlah berat awal minyak kelapa (Andrade *et al.*, 2017).

b) Uji Densitas

Piknometer yang telah dibersihkan kemudian ditimbang. Dimasukkan produk biodiesel kedalam piknometer kemudian ditutup, dan ditimbang. Nilai densitasnya ditentukan dengan memasukkan nilai berat piknometer kosong dan berat piknometer sampel (Hala *et al.*, 2009).

c) Uji Viskositas Kinematik

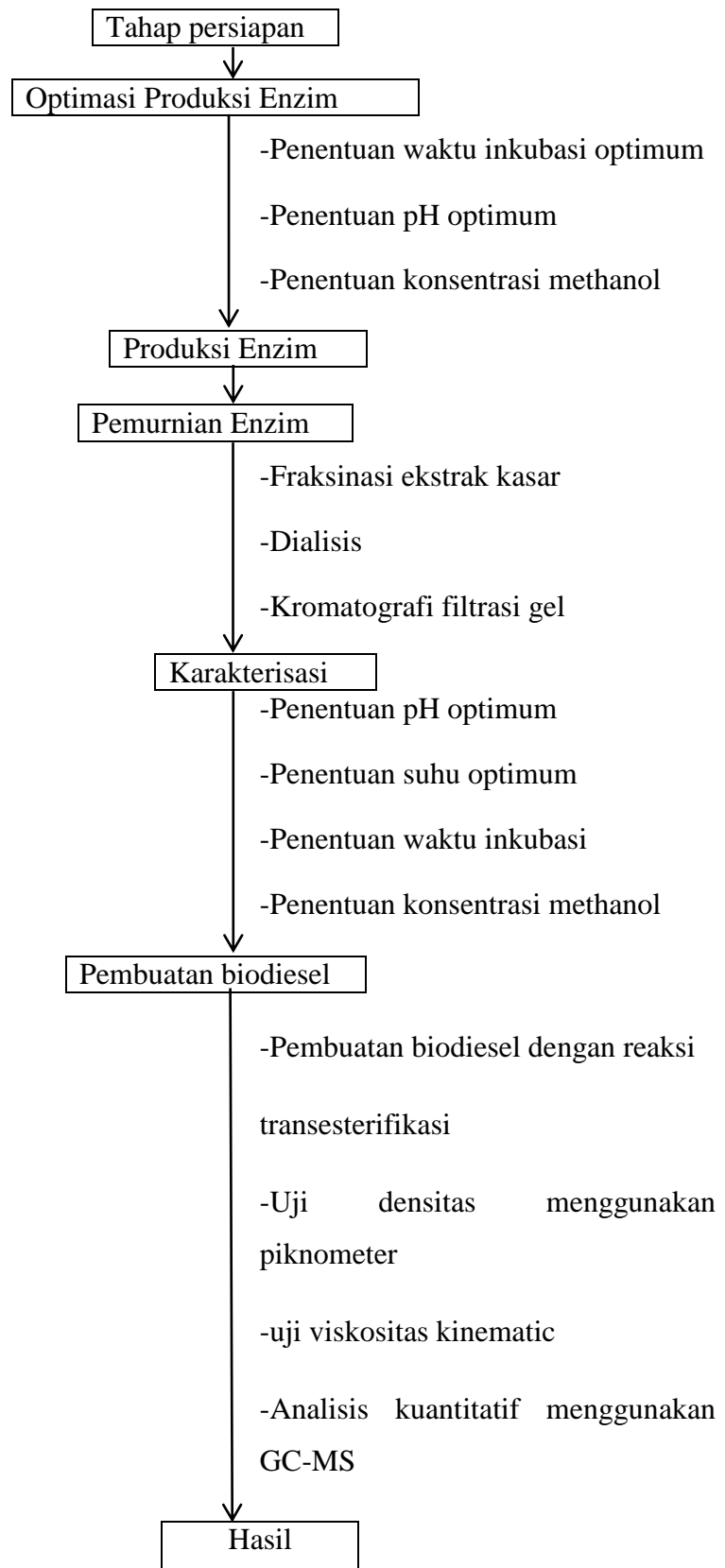
Alat viskometer dibersihkan dengan metanol hingga bersih dan kering. 10 mL aquades dimasukkan menggunakan pipet volume cairan dihisap hingga berada pada tanda atas viscometer. Cairan dibiarkan turun dan dicatat waktu yang diperlukan untuk melewati 2 tanda batas pada viskometer. Catat waktu yang diperlukan biodiesel untuk mengalir sampai batas kedua pada tabung viskometer (Nenobahan *et al.*, 2020).

d) Analisis Kuantitatif Menggunakan *GC-MS*

Analisis metil ester dilakukan di Pusat Laboratorium Kimia Poltekes Bandung.

Tujuan analisa ini untuk menentukan konsentrasi metil ester sebagai produk transesterifikasi dengan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (Aglient Technologies)* (Elma *et al.*, 2018).

3.4. Skema Penelitian



IV. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 kurva pertumbuhan optimum dalam menghasilkan enzim lipase pada waktu inkubasi 66 jam dengan nilai aktivitas sunit sebesar 11,38 U/mL.
2. Hasil pemurnian enzim lipase dengan fraksinasi ammonium sulfat didapatkan nilai aktivitas unit sebesar 12,32 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 25,20 U/mL, pada fraksinasi dialisis didapatkan nilai aktivitas unit sebesar 15,32 U/mL dan aktivitas spesifik sebesar 69,08 U/mL.
3. Enzim yang telah dimurnikan memiliki karakteristik pada reaksi transesterifikasi pada pH 7, suhu 80 °C, dan waktu inkubasi 25 menit. Penambahan methanol 70% berhasil meningkatkan nilai aktivitasnya sebesar 31,80%.
4. Hasil analisis *GC-MS* menghasilkan metil ester sebesar 5,99%. Hasil reaksi transesterifikasi yang berupa biodiesel telah memenuhi spesifikasi standar SNI 7182:2015 hasil densitas sebesar 877 kg/m³ dan nilai viskositas 2,84 mm²/s.

5.2. Saran

Beberapa hal yang disarankan untuk penelitian selanjutnya sebagai

1. Disarankan untuk mengidentifikasi lebih lanjut bakteri *Klebsiella sp.* LPG 172 untuk mengetahui spesiesnya.
2. Disarankan pada produksi biodiesel dilakukan uji titik nyala sesuai dengan SNI 7182:2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, C. H. Qureshi, A. S., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., dan Mu, B. Z. 2015. Organic Solvent Tolerant Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* FW SH-1 Purification and Characterization JSM Enzymol Protein Sel. 1(1):1-7.
- Alvi, R. F., Aslam, B., Rasool, M. H., Muzammil, S., Siddique, A. B., Yasmeen, N., Khurshid, M., Sarwar, N., Almatroudi, A., Hussain, R., & Baloch, Z. 2022. Transcriptional Response of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Ciprofloxacin Stress. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2021, 3–8.
- Andrade, T. A., Errico, M., & Christensen, K. V. 2017. Castor oil transesterification catalysed by liquid enzymes: Feasibility of reuse under various reaction conditions. *Chemical Engineering Transactions*, 57, 913–918.
- Angraini, N., & Yanti, F. 2021. Penggunaan Spektrofotometer Uv-Vis Untuk Analisis Nutrien Fosfat Pada Sedimen Dalam Rangka Pengembangan Modul Praktikum Oseanografi Kimia. *Jurnal Penelitian Sains*, 23(2), 78.
- 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.
- Bariroh, A. 2014. "Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari 1 sp, *Trichoderma* sp. Dan Campuran Kapang *Penicillium* sp. Dan *Penicillium*:52 *Trichoderma* sp. Yang Ditumbuhkan Pada Media Limbah Cair Tahu dan Dedak" .*Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang Malang.
- Bustaman, S. 2009. Strategi Pengembangan Industri Biodiesel berbasis Kelapa Di Maluku. *Jurnal Litbang Pertanian*, 28(2), 46–53.
- Cahyani, P., & Raharjo, B. 2017. Aktivitas Spesifik Selulase *Serratia Marcescens* Dengan Variasi Konsentrasi Amonium Sulfat (NH₄)₂SO₄ dan pH. *Jurnal Biologi*, 6(2), 41–49.

- Dali, S., Patong, A. R., Noor, M., & Andi, P. 2011. *Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Lipase dari Aspergillus oryzae pada Kopra Berjamur*. 14(65), 26–31.
- Dan, I., Enzim, K., & Aspergillus, D. 2012. *Beberapa Mikroorganisme Yang Menghasilkan Enzim Inulinase, Isolasi Dan Karakterisasi Enzim Dari Aspergillus flavus Gmn11.2 Galur Lokal*. 165–174.
- Devita, L. 2015. Biodiesel sebagai bioenergi alternatif dan prospektif. *Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian Medan*, 9, 23–26.
- Dewi, N., NMA Tarini, & NND Fatmawati. 2019. Deteksi Genfmh pada Isolat Klinis *Klebsiella Pneumoniae* di RSUP Sanglah Denpasar. *E-Jurnal Medika*, 8(4).
- Efri Mardawati, Mahdi Singgih Hidayat, Devi Maulida Rahmah, & SRosalinda. 2019. Produksi Biodiesel Dari Minyak Kelapa Sawit Kasar Off Grade Dengan Variasi Pengaruh Asam Sulfat Pada Proses Esterifikasi Terhadap Mutu Biodiesel Yang Dihasilkan. *Jurnal Industri Pertanian –*, 01, 46–60.
- Elma, M., Suhendra, S. A., & Wahyuddin, W. 2018. Proses Pembuatan Biodiesel Dari Campuran Minyak Kelapa Dan Minyak Jelantah. *Konversi*, 5(1), 8.
- Fitriasari, P. D., Amalia, N., & Farkhiyah, S. 2020. Isolasi Dan Uji Kompatibilitas Bakteri Hidrolitik Dari Tanah Tempat Pemrosesan Akhir Talangagung, Kabupaten Malang. *Berita Biologi*, 19(2).
- Gerpen, J. Van. 2005. *Biodiesel processing and production*. 86, 1097–1107.
- Hala, Y., Astri, Jufri, M. Z., & Tambung, A. 2009. Proses Transesterifikasi Biji Minyak Jarak Dengan Bantuan Enzim Lipase Sebagai Penghasil Biodiesel.
- Haryanto, A., Silviana, U., Triyono, S., & Prabawa, S. 2015. Produksi Biodiesel Dari Transesterifikasi Minyak Jelantah Dengan Bantuan Gelombang Mikro: Pengaruh Intensitas Daya Dan Waktu Reaksi Terhadap Rendemen Dan Karakteristik Biodiesel. *Jurnal Agritech*, 35(02), 234.
- Hasibuan, H. A. 2020. Penentuan Rendemen, Mutu dan Komposisi Kimia Minyak Sawit dan Minyak Inti Sawit Tandan Buah Segar Bervariasi Kematangan sebagai Dasar untuk Penetapan Standar Kematangan Panen. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, 28(3), 123–132.

- Hernawati, B. D. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas Aeruginosa* Sebagai Biokatalisator Dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa. *Universitas Indonesia*, 5–6.
- Hidayanti, N., Arifah, N., Jazilah, R., & Mahfud, A. S. 2015. Katalis Basa Melalui Proses Transesterifikasi Menggunakan Gelombang Mikro (Microwave). *Teknik Kimia*, 10(1), 13–18.
- Indah, I., Mappiratu, M., & Musafira, M. 2017. Produksi Enzim Lipase Dari *Aspergillus Niger* Isolat Kapang Kopra Dengan Menggunakan Medium Kelapa Parut. *Kovalen*, 3(3), 269.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(2), 1.
- Jumari, A., & Purwanto, A. 2013. Unjuk Kerja Katalis Heterogen Nanokomposit ZnO/Fe_2O_3 Untuk Reaksi Transesterifikasi Pada Pembuatan Biodiesel Dari Minyak Jelantah Dengan Tinjauan Waktu Reaksi. *Ekulibium*, 12(2), 37–41.
- Kalita, P., Basumatary, B., Saikia, P., Das, B., & Basumatary, S. 2022. Biodiesel as renewable biofuel produced via enzyme-based catalyzed transesterification. *Energy Nexus*, 6.
- Katsiroh, F. 2017. Pengaruh Rasio Molar Minyak Metanol Terhadap Konversi Biodiesel Dari Minyak Goreng Bekas Dengan Modifikasi Preparasi Katalis Cao Kulit Telur. *Skripsi*.
- Laila, L. 2017. Kaji Eksperimen Angka Asam Dan Viskositas Biodiesel Berbahan Baku Minyak Kelapa Sawit Dari Pt Smart Tbk. *Jurnal Teknologi Proses Dan Inovasi Industri*, 2(1), 3–6.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Marnoto, T., & Efendi, A. 2011. Biodiesel dari Lemak Hewani (Ayam Broiler) dengan Katalis Kapur Tohor. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan,"* 1–5.
- Maryati, R.S. Fauzia, dan T. Rahayu. 2007. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi* Vol. 8(1):30-38.
- Mazhar, H., Abbas, N., Zamir, T., Hussain, Z., & Ali, S. S. 2018. Optimization Study of Lipolytic Enzyme from *Bacillus Cereus*, PCSIR NL-37. Punjab

2023. *Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains (BIOEDUSAINS)* 6 (1):1-13
- Mirzayanti, Y. W., Udyani, K., Cahyaningsih, R., & Darmawan, M. P. T. 2022. Konversi Minyak Biji Kapuk Menjadi Biodiesel Menggunakan Katalis CaO/Htc. *Jurnal Rekayasa Mesin*, 13(2), 417–425.
- Murni, S. W., Kholisoh, S. D., & Petrissia, E. 2011. Produksi, karakterisasi, dan isolasi lipase dari *aspergillus niger*. Yogyakarta Jl. *SWK*, 104, 62–274.
- Najjar, A., Hassan, E. A., Zabermaawi, N., Saber, S. H., Bajrai, L. H., Almuhayawi, M. S., Abujamel, T. S., Almasaudi, S. B., Azhar, L. E., Moulay, M., & Harakeh, S. 2021. Optimizing the catalytic activities of methanol and thermotolerant *Kocuria flava* lipases for biodiesel production from cooking oil wastes. *Scientific Reports*, 11(1), 1–19.
- Nenobahan, M. A., Ledo, M. E. S., & Nitsae, M. 2020. Pembuatan Biodiesel Minyak Jelantah Menggunakan Biokatalis Ekstrak Kasar Lipase Dari Biji Kesambi (*Schleichera oleosa L.*). *Jurnal Saintek Lahan Kering*, 3(1), 20–25.
- Popoola, B. M., & Olateru, C. T. 2020. Purification and Kinetics of Lipase of *Pseudomonas fluorescens* from Vegetable Oil Polluted Soil. *Journal of Biological Sciences*, 21(1), 29–37.
- Raharja, S., Suryadarma, P., & Oktavia, D. T. 2011. Hidrolisis Enzimatik Minyak Ikan Untuk Produksi Asam Lemak Omega-3 Menggunakan Lipase Dari *Aspergillus niger* [Enzymatic Hydrolysis of Fish Oil for Production of Omega-3 Fatty Acids Using Lipase Derived from *Aspergillus niger*]. *Hasil Penelitian J. Teknol. Dan Industri Pangan*, XXII(1).
- Ramaditya, N. A., Tono PG, K., Suarjana, I. G. K., & Besung, I. N. K. 2018. Isolasi *Klebsiella* Sp. Pada Sapi Bali Berdasarkan Tingkat Kedewasaan Dan Lokasi pemeliharaan Serta Pola Kepekaan Terhadap Antibakteri. *Buletin Veteriner Udayana*, 10(1), 26.
- Rasyid, H. Al, & Nasir, R. 2020. Kinetika Reaksi Transesterifikasi Minyak Biji Ketapang (*Terminalia Catappa L*) Pada Proses Produksi Metil Ester. *Jurnal Pijar Mipa*, 15(1), 77–87.
- P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke, ME Leser, R. Miller. 2009. Lipase di antarmuka: review, *Adv. Sains Antarmuka Koloid* 147 dan 148, 237 dan 250.
- Reiny, S, S. 2012. Potensi *lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai biopreservatif pada rebusan daging ikan tongkol. *Jurnal IJAS*, II(2): 604±613.
- Risna, Y. K., Sri-Harimurti, S.-H., Wihandoyo, W., & Widodo, W. 2022. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal*

Science), 24(1), 1.

- 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.
- Saragih, H. 2021. Sintesis Biodiesel Menggunakan Katalis Campuran Calcium Hydroxide dan Calcite. *Indonesian Journal of Applied Physics*, 11(1), 25.
- Selvia, R. I., Wuryanti, W., & Sriatun, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase dari Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik berasal dari Kupu-kupu (*Lepidoptera*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 16(3), 97–101.
- Shahab, A., & Husnah, H. 2022. Produksi Biodiesel Dari Minyak Biji Karet Dengan Teknologi Transesterifikasi Menggunakan Katalis Koh. *Jurnal Redoks*, 7(2), 33–38.
- Sholeha, R., & Agustini, R. 2021. Lipase biji-bijian dan karakteristiknya. *Journal of Chemistry*, 10(2), 168–183.
- Su'i, M., Harijono, Yunianta, & Aulani'am. 2013. Kondisi Optimum Enzim Lipase Kasar dari Kentos Kelapa. *Jurnal Rekapangan*, 7(1), 92–97.
- Suleman, N., Abas, & Papatungan, M. 2019. Esterifikasi dan Transesterifikasi Stearin Sawit untuk Pembuatan Biodiesel. *Jurnal Teknik*, 17(1), 66–77.
- Supraniningsih, J. 2012. Pengembangan Kelapa Sawit Sebagai Biofuel Dan Produksi Minyak Sawit Serta Hambatannya. *Universitas Dharma Persada*, 1–16.
- Susanti, E. 2011. Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar*, 12(1), 40–49.
- Talha, N. S., & Sulaiman, S. 2016. Overview of catalysts in biodiesel production. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, 11(1), 439–442.
- Istia'nah, D., Utami, U., & Barizi, A. (2020). Karakterisasi Enzim Amilase dari Bakteri *Bacillus megaterium* pada Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Substrat. *Jurnal Riset Biologi Dan Aplikasinya*, 2(1), 11.
- Ramaditya, N. A., Tono PG, K., Suarjana, I. G. K., & Besung, I. N. K. 2018. Isolasi *Klebsiella* Sp. Pada Sapi Bali Berdasarkan Tingkat Kedewasaan Dan Lokasi pemeliharaan Serta Pola Kepekaan Terhadap Antibakteri. *Buletin Veteriner Udayana*, 10(1), 26.
- Sarnia, S., Natsir, H., & Dali, S. 2017. Produksi Dan Karakterisasi Enzim Kitosanase Dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. *Techno: Jurnal Penelitian*,

4(02), 08–15.

Sholeha, R., & Agustini, R. 2021. Lipase biji-bijian dan karakteristiknya. *Journal of Chemistry*, 10(2), 168–183.

Toldrá-Reig, F., Mora, L., & Toldrá, F. 2020. Developments in the use of lipase transesterification for biodiesel production from animal fat waste. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(15).

Yuliana. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolay T5 yang berasal dari tempoyak. *Jurnal teknologi industri dan hasil pertanian*. 73:2.

Yusafir Hala, Astri , Muh. Zulkifli Jufri. 2009. Astina Tambung. *Jurnal Administrasi Dan Kebijakan Kesehatan Indonesia*, 2(1), 31–38.