

**IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI BAKTERI *Pseudomonas* sp. LPG171
DENGAN METODE ADSORPSI PADA Matriks Hidroksiapatit**

(Skripsi)

Oleh

M. Fahrezi Cahaya Saputra
NPM 205701109



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRAK

IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI BAKTERI *Pseudomonas* sp. LPG171 DENGAN METODE ADSORPSI PADA MATRIKS HIDROKSIAPATIT

Oleh

M. FAHREZI CAHAYA SAPUTRA

Kebutuhan industri yang meningkat terhadap katalis tidak sebanding dengan ketersediaannya, sehingga perlu cara yang optimal dalam penggunaannya. Salah satu katalis yang efisien dan ekonomis adalah enzim lipase. Enzim lipase memiliki aktivitas katalitik yang tinggi namun tidak bisa digunakan berulang kali. Untuk mengatasi hal tersebut, solusi yang efektif adalah dengan mengimobilisasi enzim tersebut, agar dapat digunakan secara berulang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengimobilisasi enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 melalui metode adsorpsi pada matriks hidroksiapatit. Prosedur yang dilakukan meliputi: peremajaan bakteri, produksi enzim, pemurnian, imobilisasi enzim, dan karakterisasi enzim lipase. Aktivitas hidrolisis enzim lipase diukur dengan metode Kwon *and* Rhee, aktivitas transesterifikasi dengan metode Fu, serta kadar protein dengan metode Lowry.

Hasil aktivitas hidrolisis pada tahap pemurnian kromatografi filtrasi gel menunjukkan aktivitas spesifik 80,15 U/mg, meningkat kemurniannya 16,18 kali dibandingkan dengan ekstrak kasar yang memiliki aktivitas spesifik 4,95 U/mg. Aktivitas hidrolisis enzim lipase yang diimobilisasi dan enzim lipase bebas tidak mengubah kondisi pH dan waktu inkubasi, tetapi suhu optimalnya meningkat dari 35 °C menjadi 50 °C. Uji pemakaian berulang menunjukkan bahwa aktivitas enzim lipase pada reaksi hidrolisis menurun dari 2,53 U/mL menjadi 1,25 U/mL setelah 5 kali pemakaian, menunjukkan penurunan aktivitas hingga 50% dari aktivitas awal.

Kata kunci: *Pseudomonas* sp. LPG171., lipase, imobilisasi, hidroksiapatit.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LIPASE ENZYMES FROM THE BACTERIA *Pseudomonas* sp. LPG171 USING ADSORPTION IN HYDROXYAPATITE MATRIX

By

M. FAHREZI CAHAYA SAPUTRA

The increasing industrial demand for catalysts is not matched by their availability, necessitating optimal methods for their use. One efficient and economical catalyst is lipase enzyme. Lipase has high catalytic activity but cannot be reused multiple times. To address this issue, an effective solution is to immobilize the enzyme, allowing it to be used repeatedly.

This research aims to immobilize lipase enzyme from *Pseudomonas* sp. LPG171 bacteria using an adsorption method on hydroxyapatite matrix. The procedures involved include: bacterial rejuvenation, enzyme production, purification, enzyme immobilization, and characterization of lipase enzyme. The hydrolysis activity of lipase enzyme is measured using the Kwon and Rhee method, transesterification activity is measured using the Fu method, and protein concentration is determined using the Lowry method.

Transesterification activity in gel filtration chromatography showed unit activity of 31,08 U/mL. While hydrolysis activity at the purification stage using gel filtration chromatography showed a specific activity of 80.15 U/mg, increasing its purity by 16.18 times compared to the crude extract, which had a specific activity of 4.95 U/mg. The hydrolysis activity of both immobilized lipase enzyme and free lipase enzyme did not change the pH conditions and incubation time, but the optimal temperature increased from 35 °C to 50 °C. The repeated use test showed that the activity of lipase enzyme in the hydrolysis reaction decreased from 2.53 U/mL to 1.25 U/mL after 5 uses, indicating a 50% reduction in activity from the initial value.

Keywords: *Pseudomonas* sp. LPG171., lipase, immobilization, hydroxyapatite.

**IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI BAKTERI *Pseudomonas* sp. LPG171
DENGAN METODE ADSORPSI PADA Matriks HIDROKSIPATIT**

Oleh

M. Fahrezi Cahaya Saputra

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
2024**

Judul Skripsi : **Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri
Pseudomonas sp. LPG171 dengan Metode
Adsorpsi pada Matriks Hidroksiapatit**

Nama Mahasiswa : **M. Fahrezi Cahaya Saputra**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2057011009**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dian", with a horizontal line underneath.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Kamisah", with a horizontal line underneath.

Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan., M.Si.
NIP. 197212051997032001

MENGESAHKAN

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

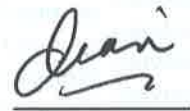
A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Mita Rilyanti", with a horizontal line underneath.

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

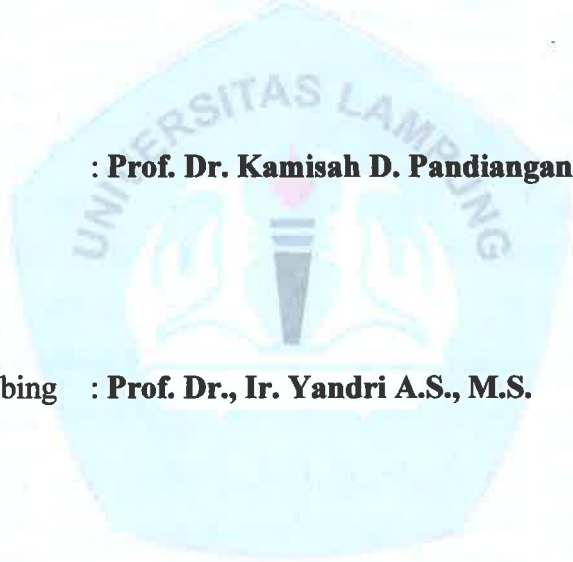
Ketua : Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.



Sekretaris : Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan., M.Si.



**Anggota
Bukan Pembimbing : Prof. Dr., Ir. Yandri A.S., M.S.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 18 Oktober 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : M.Fahrezi Cahaya Saputra
Nomor Pokok Mahasiwa : 2057011009
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 Dengan Metode Adsorpsi Pada Matriks Hidroksiapatit”** adalah benar karya sendiri dan tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis tercantum dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Saya tidak keberatan jika seluruh data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 18 Oktober 2024
Yang Menyatakan



M.Fahrezi Cahaya Saputra
NPM. 2057011009

RIWAYAT HIDUP



Penulis Bernama lengkap M. Fahrezi Cahaya Saputra, lahir di Bandar Lampung, 28 Mei 2002. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, putra dari Bapak Jamalludin S.Ag dan Ibu Meisori. Saat ini penulis bertempat tinggal di Jl. Tamin, Gg. Hj. Abdurrahman, No.7, Kelurahan Tanjung Karang Barat, Kecamatan Sukajawa Baru, Kota Bandar Lampung.

Penulis mengawali Pendidikan di Sekolah Dasar (SD) Negeri 3 Sukajawa Baru, Bandar Lampung pada tahun 2008 penulis melanjutkan Pendidikan di Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 10 Bandar Lampung. Tahun 2014 penulis melanjutkan Pendidikan di Sekolah Menengah Kejuruan (SMK) Negeri SMTI Bandar Lampung. Tahun 2020 penulis diterima sebagai mahasiswa Universitas Lampung, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) melalui jalur Mandiri. Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi. Organisasi yang diikuti yaitu Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) sebagai anggota muda Bidang Sosial dan Masyarakat tahun 2020-2021 dan anggota inti Bidang Sosial dan Masyarakat 2021-2022, Badan Ekstusif Mahasiswa Tingkat Universitas (BEM U) sebagai Jendral Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Anggota Kementrian Luar Negeri 2020, Badan Ekstusif Mahasiswa Tingkat Fakultas (BEM F) sebagai anggota Pemberdayaan Sumber Daya Manusia (PSDM) 2022 dan Program Kreatif Mahasiswa Bidang Seni (PKMBS) sebagai anggota musik 2021.

Periode Agustus – Desember 2022, penulis melaksanakan Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) BKP Membangun Desa sekaligus Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Rejomulyo, Kecamatan Jati Agung, Kabupaten Lampung Selatan, Provinsi Lampung. Kemudian pada bulan Januari - Februari 2023 penulis melaksanakan Praktek Kerja Lapangan di PT. Bukit Asam Tbk Pelabuhan Tarahan., Kota Bandar Lampung. Periode Oktober 2023 – Juni 2024 penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung yang diberi judul “**Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG 171 Dengan Metode Adsorpsi Pada Matriks Hidroksiapatit**”.

PERSEMBAHAN

Puji Syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunianya serta iringan sholawat dan salam pada Nabi Muhammad SAW sehingga terciptalah karya ini yang dapat kupersembahkan sebagai wujud baktiku pada :

Kedua orang tuaku tersayang, Bapak (Jamalludin S.Ag) dan Ibu (Meisori) yang telah mendidik dan membesarkanku dengan penuh kasih sayang, memberikanku dukungan dan Do'a sepanjang hari yang tiada henti serta rela mengorbankan segalanya demi memberikan yang terbaik bagi anak-anaknya.

Kepada kakakku tercinta Gusti Nurta Sari Amd. Keb dan adikku tersayang Adjie Salman Alfarizi yang telah memberikan Do'a, dukungan dan semangat kepada penulis dalam keadaan apapun sehingga terselesaikan nya karya tulis ilmiah ini.

Dosen-Dosen pembimbing dan pembahas yang selalu sabar membimbingku dan membantuku dalam belajar menuntut ilmu serta memberikan dukungan untuk dapat menjadi manusia lebih baik,

Sahabat serta teman-teman yang selalu menemani, menyemangati, mendukung dan memotivasi.

Dan Almamter tercinta Universitas Lampung

MOTTO

“Sungguh atas kehendak Allah semua ini terwujud, tiada kekuatan kecuali dengan pertolongan Allah”.

(Qs. Al-Kahfi 39)

“Sungguh kita kelak akan dimintai tanggungjawab tentang apa saja yang kita lakukan di dunia”.

(Qs. An-Nahl 93)

“Rasakanlah setiap proses yang kamu tempuh dalam hidupmu, sehingga kamu tau betapa hebatnya dirimu sudah berjuang sampai detik ini”.

Dari jabir rodhiyallahuanhu dia berkata Rasulullah SAW Bersabda : “Sebaik-baiknya manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia lainnya”.

(HR. Ath-Thabrani)

Ya Tuhanku, Jadikanlah aku dan anak cucuku orang yang tetap melaksanakan shalat, Ya Tuhan kami, perkenankanlah doaku. Ya Tuhan kami, ampunilah aku dan kedua ibu bapakku dan semua orang yang beriman pada hari diadakan perhitungan (Hari Kiamat)”.

(Qs. Ibrahim 40-41)

“Wahai insan mulia yang bersemayam dibawah kubah hijau, yang mencintai umatnya melebihi dirinya, Wallahi aku selalu merindui dan mencintaimu (Rasulullah Saw) semoga kelak umatmu ini layak bertemu denganmu dan mendapat syafaat darimu, aamiin ya rabbal alamin”.

SANWACANA

Alhamdulillah, segala puji bagi Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya beserta iringan sholawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang selalu kita nantikan syafaatnya di Yaumul Akhir nanti sehingga penulis berhasil menyelesaikan skripsi dengan baik yang berjudul **“Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 Dengan Metode Adsorpsi Pada Matriks Hidroksiapatit”**.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan serta penyusunan skripsi masih ditemui banyak kesalahan dan kekurangan namun dengan adanya rahmat serta ridho Allah SWT serta bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik sehingga menyandang gelar sarjana. Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih serta apresiasi setinggi-tingginya kepada :

1. Allah SWT beserta Nabi Muhammad SAW atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsinya dengan baik.
2. Kedua orang tua tercinta, Bapak Jamalludin S.Ag dan Ibu Meisori yang telah membesarkan dan mendidik penulis dengan kasih sayang dan cinta serta rela berkorban demi memberikan yang terbaik. Semoga Allah mengantikan pengorbanan dan perjuangannya dengan surga, aamiin yarabbal'amin.
3. Saudara/i tercinta, Kakakku Gusti Nurta Sari Amd. Keb dan Adjie Salman Alfarizi yang selalu mendukung, memberi bimbingan, dukungan finansial dan mendoakan penulis.
4. Bapak Dr. Sonny Widiarto, S.Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik yang mendukung, memotivasi, mengayomi serta memberi bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.

5. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing utama yang selalu memberi arahan dan bimbingan, nasihat dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
6. Ibu Prof. Dr, Kamisah D. Pandiangan., M.Si. selaku dosen pembimbing kedua yang sangat sabar dalam membimbing, mengarahkan, memberi saran dan kritik, memberi ilmu sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
7. Bapak Prof. Dr., Ir. Yandri A.S., M.S. selaku dosen pembahas yang sudah memberikan ilmu, kritik, saran dan motivasi sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah menyetujui skripsi ini.
9. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung yang sudah mengesahkan skripsi ini.
10. Seluruh dosen, staf dan laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah memberi ilmu serta pengalaman dengan penulis selama menjalani perkuliahan.
11. Bapak/Ibu staff administrasi di Jurusan Kimia FMIPA yang telah membantu penulis dalam mengurus segala keperluan administrasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. Mbak Della selaku laboran Laboratorium Biokimia terima kasih telah membantu penulis selama proses penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
13. Teman - teman seperbimbingan Bunga Mega Nurlinda, Dyasmin Dwi Larasati, Fitriana Artika Sari yang telah bekerja sama, memotivasi, menemani dan memberi dukungan selama penelitian tugas akhir.
14. Kementrian Luar Negeri *Squad* : Kak Burhannudin, Kak Munif, Kak Sahrul, Kak Muadz, Kak Krisna, Kak Hijrah Kak Tasya, Kak Ajeng, Kak Cindy, Kak Diana, Kak Clara dan Kak Rani yang mewarnai kehidupan organisasi dengan canda tawa.
15. Kakak - kakak seperbimbingan : Kak Adiya, Kak Partini, Kak Hilda, Kak Putri, Kak Citra dan Kak Ridho yang telah banyak membantu penulis.
16. Rekan - rekan Biokim's *Club* : Rahmadtullah, Ratih, Ribka, Maria, Stephani, Defa, Avi, Geo, Muti, Anggun, Agil, Bunga, Dyasmin, Fitriana, Fathia, Gita,

Leoni, Najla, Nisa, Sabrina, Umi dan Widya yang telah memberikan bantuan, semangat dan dukungannya.

17. Rekan - rekan “*Dragon Family*” : Muhammad Sabil, Franky Gomgom, Rekia Enrik, Muhammad Dwi Fansang, Muhammad Dwi Febriyanto, Arip Ramadani, Ahmad Sulaiman, Surya Ibrahim Samany, Muhammad Rifqi Aufa, M. Zidan Al - Aqli, Muhammad Irfan Hanafi, M. Sultan Gusti Ramadan, dan Roni Setiawan yang telah selalu memberikan semangat, bantuan dan dukungannya. Semoga sukses kedepannya teman-teman.
18. Keluarga besar “Kimia Angkatan 2020” yang sudah menjadi tempat berproses bersama dari awal perkuliahan hingga akhir. Semoga kita semua menjadi orang sukses, Aamiin.
19. Keluarga Besar Himaki yang tidak bisa penulis sebut satu persatu.
20. Rekan - rekan Keluarga KKN dan MBKM Desa Rejomulyo : Rekia Enrik, Fadhillah, Ibnah Warda Naila, Wikka, Anggun, Ummi, Fayza, Sevi, Qori, Rizkohayu atas pengalaman dan bantuannya.
21. Rekan - rekan saleh jaminan surga : Arman nopri, Ahok Cahyo, Rijal, Pandi Alek, Wahyu way, dan Akbar, yang telah memberikan bantuan dan semangatnya.
22. Almamaterku tercinta, Universitas Lampung.

Semoga dengan terciptanya karya tulis ini dapat memberi manfaat untuk wawasan ilmu pengetahuan dan berguna untuk perkembangan di bidang kimia khususnya. Penulis memohon maaf sebesar-besarnya jika terdapat banyak sekali kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih.

Bandar Lampung, 18 Oktober 2024
Penulis

M. Fahrezi Cahaya Saputra

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|--|-------------|
| DAFTAR TABEL | iii |
| DAFTAR GAMBAR..... | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| 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 | 5 |
| 2.1.1. Identifikasi Bakteri..... | 6 |
| 2.1.2. Klasifikasi Bakteri | 7 |
| 2.1.3. Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 | 8 |
| 2.2. Enzim | 9 |
| 2.2.1. Mekanisme Reaksi Enzim..... | 10 |
| 2.2.2. Klasifikasi Enzim..... | 11 |
| 2.2.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim..... | 13 |
| 2.3. Enzim Lipase | 16 |
| 2.3.1. Karakteristik Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Mikroba..... | 17 |
| 2.3.2. Pemanfaatan Enzim Lipase..... | 18 |
| 2.3.3. Aktivitas Enzim Lipase..... | 19 |
| 2.3.4. Uji Aktivitas Lipase Metode Kwon <i>and</i> Rhee..... | 19 |
| 2.3.5. Uji Aktivitas Lipase Metode Fu..... | 20 |
| 2.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry | 20 |
| 2.5. Reaksi Hidrolisis | 21 |
| 2.6. Reaksi Transesterifikasi | 22 |
| 2.7. Imobilisasi Enzim | 23 |
| 2.8. Metode Adsorpsi | 24 |
| 2.9. Hidroksiapatit [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂]..... | 25 |
| III. METODE PENELITIAN | 27 |
| 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian | 27 |
| 3.2. Alat dan Bahan..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Metode Penelitian | 28 |
| 3.3.1. Tahap Persiapan Alat | 28 |
| 3.3.2. Pembuatan Media..... | 28 |
| 3.3.3. Produksi Enzim Lipase | 30 |
| 3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase Metode Lowry..... | 30 |
| 3.3.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase..... | 31 |
| 3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase | 33 |
| 3.3.7. Imobilisasi Enzim | 35 |
| 3.3.8. Karakterisasi Enzim Lipase | 35 |
| 3.3.9. Uji Pemakaian Berulang Enzim Lipase Hasil Imobilisasi..... | 36 |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 38 |
| 4.1. Peremajaan Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 | 38 |
| 4.2. Produksi Enzim Lipase | 38 |
| 4.3. Pemurnian Enzim Lipase | 39 |
| 4.3.1. Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat [(NH ₄) ₂ SO ₄] | 40 |
| 4.3.2. Dialisis | 41 |
| 4.3.3. Kromatografi Filtrasi Gel..... | 42 |
| 4.4. Imobilisasi Enzim Lipase..... | 47 |
| 4.5. Karakterisasi Enzim Lipase | 47 |
| 4.6. Uji Pemakaian Berulang Enzim Lipase Hasil Imobilisasi | 54 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | 56 |
| 5.1. Kesimpulan | 56 |
| 5.2. Saran | 57 |
| DAFTAR PUSTAKA | 58 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 1. Klasifikasi enzim berdasarkan tipe reaksi. | 12 |
| 2. Klasifikasi subkelas enzim. | 12 |
| 3. Pemurnian enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171. | 45 |
| 4. Persentase sisa aktivitas pemakaian berulang enzim lipase hasil imobilisasi. . | 55 |
| 5. Hubungan nilai <i>optical density</i> (OD) dengan aktivitas unit enzim (U/mL) | 66 |
| 6. Nilai aktivitas unit pada penentuan pH optimum produksi enzim | 66 |
| 7. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, hasil dialisis, dan hasil kromatografi filtrasi gel. | 67 |
| 8. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, hasil dialisis, dan hasil kromatografi filtrasi gel. | 67 |
| 9. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Lowry (λ_{maks} 750 nm) pada ekstrak kasar enzim, hasil fraksinasi, hasil dialisis, dan hasil kromatografi filtrasi gel. | 68 |
| 10. Data nilai kadar protein pada ekstrak kasar enzim, hasil dialisis, dan hasil kromatografi filtrasi gel. | 68 |
| 11. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Fu (λ_{maks} 315 nm) pada hasil kromatografi filtrasi gel. | 69 |
| 12. Data hasil persamaan linear metode Fu pada hasil kromatografi filtrasi gel. .. | 69 |
| 13. Hubungan antara persentase kejenuhan ammonium sulfat (0-20) dan (20-90) % dengan aktivitas spesifik enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171. | 71 |

| | |
|---|----|
| 14. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada profil protein enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel. | 72 |
| 15. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) dan Fu (λ_{maks} 315 nm) pada hasil kromatografi filtrasi gel. | 73 |
| 16. Hubungan profil protein dengan nilai aktivitas enzim lipase. | 73 |
| 17. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi pH enzim lipase bebas. | 74 |
| 18. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi pH enzim lipase bebas. | 74 |
| 19. Pengaruh pH pada aktivitas unit enzim lipase bebas. | 74 |
| 20. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi pH enzim lipase hasil imobilisasi. | 75 |
| 21. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi pH enzim lipase hasil imobilisasi. | 75 |
| 22. Pengaruh pH pada aktivitas unit enzim lipase hasil imobilisasi. | 75 |
| 23. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi suhu enzim lipase bebas. | 76 |
| 24. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi suhu enzim lipase bebas. | 76 |
| 25. Pengaruh suhu pada aktivitas unit enzim lipase bebas. | 76 |
| 26. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi suhu enzim lipase hasil imobilisasi. | 77 |
| 27. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi suhu enzim lipase hasil imobilisasi. | 77 |
| 28. Pengaruh suhu pada aktivitas unit enzim lipase hasil imobilisasi. | 77 |
| 29. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi waktu inkubasi enzim lipase bebas. | 78 |
| 30. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi waktu inkubasi enzim lipase bebas. | 78 |
| 31. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas unit enzim lipase bebas. | 79 |
| 32. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Kwon <i>and</i> Rhee (λ_{maks} 715 nm) pada karakterisasi waktu inkubasi enzim lipase hasil imobilisasi. | 79 |

| | |
|---|----|
| 33. Data hasil persamaan linear metode Kwon <i>and</i> Rhee pada karakterisasi waktu inkubasi enzim lipase hasil imobilisasi. | 80 |
| 34. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas unit enzim lipase hasil imobilisasi. ... | 80 |
| 35. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (λ_{maks} 715 nm) pada uji pemakaian berulang hasil imobilisasi enzim lipase. ... | 81 |
| 36. Data nilai aktivitas unit enzim lipase hasil imobilisasi pada uji pemakaian berulang. | 81 |
| 37. Nilai absorbansi dari kurva standar asam oleat. | 83 |
| 38. Nilai absorbansi dari kurva standar <i>p</i> - Nitrofenol Palmitat. | 85 |
| 39. Nilai absorbansi dari kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA). | 87 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. Bakteri gram positif..... | 7 |
| 2. Bakteri gram negatif..... | 8 |
| 3. Mekanisme reaksi enzim (a) <i>Lock and Key</i> (b) <i>Induced fit</i> | 11 |
| 4. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu..... | 13 |
| 5. Efek pH pada aktivitas enzim..... | 14 |
| 6. Efek konsentrasi substrat..... | 14 |
| 7. Mekanisme reaksi hidrolisis..... | 22 |
| 8. Mekanisme reaksi transesterifikasi..... | 23 |
| 9. Skema proses pengendapan protein enzim dengan ammonium sulfat..... | 34 |
| 10. Diagram alir penelitian..... | 37 |
| 11. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase dari <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 pada fraksi (0-20) dan (20-90) %..... | 41 |
| 12. Profil elusi pemurnian enzim lipase pada kromatografi filtrasi gel dan hubungan absorbansi 280 nm dengan aktivitas unit hidrolisis enzim lipase (U/mL)..... | 43 |
| 13. Profil elusi pemurnian enzim lipase pada kromatografi filtrasi gel dan hubungan absorbansi 280 nm dengan aktivitas unit transesterifikasi enzim lipase (U/mL). | 44 |
| 14. (a) Pengaruh pH pada aktivitas enzim lipase bebas dan (b) enzim lipase hasil imobilisasi..... | 48 |
| 15. (a) Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase bebas dan (b) enzim lipase hasil imobilisasi..... | 50 |
| 16. (a) Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase bebas dan (b) enzim lipase hasil imobilisasi..... | 52 |
| 17. Waktu pertumbuhan optimum bakteri berdasarkan nilai optikal..... | 65 |
| 18. pH optimum pertumbuhan bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171..... | 65 |

| | |
|---|----|
| 19. Kurva standar asam oleat | 83 |
| 20. Kurva standar <i>p</i> - Nitrofenol Palmitat | 85 |
| 21. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA) | 87 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| 1. Kondisi optimum pertumbuhan bakteri..... | 65 |
| 2. Data hasil pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer Uv-Vis dan nilai persamaan linearnya. | 67 |
| 3. Data pola fraksinasi. | 71 |
| 4. Profil protein dan pengukuran absorbansi hasil kromatografi filtrasi gel. | 72 |
| 5. Aktivitas unit karakterisasi enzim lipase bebas dan enzim lipase hasil imobilisasi | 74 |
| 6. Perhitungan aktivitas unit dan aktivitas sisa uji pemakaian berulang. | 81 |
| 7. Kurva standar asam oleat. | 83 |
| 8. Kurva Standar <i>p-Nitrofenol Palmitat</i> | 85 |
| 9. Kurva Standar <i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i> | 87 |

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim memiliki peranan yang sangat penting dalam berbagai industri, termasuk makanan, farmasi, dan bioteknologi, karena kemampuannya untuk mempercepat reaksi biokimia secara efisien dan spesifik. Riset biokimia dan bioteknologi juga selama bertahun-tahun telah meningkatkan pemanfaatan enzim untuk industri. Banyak teknologi baru dikembangkan untuk memodifikasi enzim agar lebih stabil, lebih murah dan memperluas ruang lingkup aplikasinya. Penggunaan enzim dalam proses industri memungkinkan peningkatan produktivitas serta pengurangan penggunaan bahan kimia berbahaya, sehingga mendukung praktik berkelanjutan. Salah satu enzim yang banyak digunakan adalah lipase, yang berfungsi menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Pada industri makanan, lipase berkontribusi pada peningkatan kualitas produk seperti keju dan roti, sedangkan di sektor farmasi, lipase digunakan dalam formulasi obat berbasis lipid untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa aktif. Di bidang bioteknologi, lipase juga berperan dalam proses biokatalitik, seperti sintesis ester dan produksi biodiesel (Supriyatna dkk., 2015).

Enzim lipase secara luas dapat ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme. Pada hewan, lipase dihasilkan oleh pankreas, pada enzim ini berkontribusi pada proses pencernaan lemak dalam saluran pencernaan. Lipase pankreas memecah lemak yang dikonsumsi menjadi komponen yang lebih kecil, sehingga memudahkan penyerapan oleh tubuh. Lipase juga terdapat dalam jaringan adiposa dan hati, yang berperan dalam regulasi metabolisme lipid. Selain itu, pada tumbuhan juga dapat memproduksi lipase, meskipun dalam jumlah yang

lebih sedikit dibandingkan hewan. Lipase pada tumbuhan berfungsi dalam proses pengolahan lipid yang tersimpan dalam biji, serta berperan dalam perkembangan dan perkecambahan biji. Enzim ini dapat membantu dalam mobilisasi lipid untuk menyediakan energi bagi pertumbuhan tanaman. Selain itu, beberapa jenis tumbuhan menghasilkan lipase yang memiliki potensi aplikasi industri, seperti dalam pengolahan makanan dan produksi biodiesel (Damaso, 2008). Lipase yang berasal dari mikroorganisme dapat diproduksi dari bakteri, khamir dan jamur (Falony *et al.*, 2006) baik sendiri maupun bersama-sama dengan hidrolase lainnya, seperti esterase (Pera *et al.*, 2006). Sebagian besar lipase yang dimurnikan sebagai glikoprotein yang mengandung 2 hingga 15 persen karbohidrat (August, 2020). Produksi enzim lipase akan meningkat jika ada induser yang sesuai dalam medium. Enzim lipase tanpa induser tetap diproduksi, tetapi dalam jumlah yang kecil (Pratiwi dkk, 2013). Lipase komersial pada umumnya berasal dari jamur (*Rhizomucor*, *Rhizopus*, dan *Candida*) dan bakteri (*Pseudomonas* dan *Chromobacterium*) (Shah *et al.*, 2009). Pada sumber lipase baik berasal dari hewan, tumbuhan dan mikroba, ternyata lipase mikroba paling banyak digunakan. Hal ini disebabkan karena mikroba dapat dengan mudah dibudidayakan. Selain itu, enzim lipase dari mikroba umumnya tahan terhadap panas meskipun jasad penghasilnya tidak tahan (Hidayat, 2006).

Enzim lipase dari *Pseudomonas* sp. LPG171 dikatakan sebagai enzim ekstraselular yang relatif lebih mudah diisolasi dan diproduksi karena lebih stabil dibandingkan enzim intraselular. Enzim lipase memiliki sub unit berupa glikoprotein dan lipoprotein. Sub unit tersebut dapat sebagai monomer, dimer, oligomer, atau polimer. Enzim lipase stabil pada suhu optimumnya yaitu 30°C, walaupun masih aktif pada 51°C (Nishio *et al.*, 1987). Lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 memiliki peranan yang sangat penting dalam bidang bioteknologi. Saat ini enzim sebagai biokatalis telah banyak diaplikasikan secara komersial untuk proses-proses industri. Enzim lipase menjadi salah satu enzim yang sering digunakan dalam industri, terutama dalam proses yang melibatkan lemak dan asam lemak. Selain itu, lipase juga berperan sebagai katalis dalam sintesis organik, industri polimer, dan proses pembuatan bioenergi (Kamelia dkk., 2005).

Enzim lipase memiliki daya katalitik yang sangat spesifik sehingga dapat meminimalisir adanya reaksi samping yang terjadi. Namun, enzim sangat mudah terpengaruh oleh kondisi pH dan juga suhu serta mahalnya harga enzim lipase. Kestabilan enzim juga mudah terkontaminasi dengan produk yang dihasilkan karena enzim sulit dipisahkan setelah digunakan dalam suatu reaksi (Krajewska, 2004). Sulitnya memisahkan enzim di akhir reaksi ini menyebabkan sebagian besar enzim hanya digunakan untuk satu kali reaksi. Untuk memisahkan enzim di akhir reaksi, agar dapat digunakan kembali, diperlukan suatu metode dengan cara mengikat enzim pada padatan yang tidak larut dalam air. Metode ini biasa disebut sebagai imobilisasi enzim.

Imobilisasi enzim artinya melokalisasi enzim, sehingga enzim dapat digunakan secara berkelanjutan. Keuntungan dari imobilisasi enzim yakni, enzim dapat dipisahkan di akhir reaksi, tanpa mengkontaminasi hasil reaksi, sehingga enzim dapat digunakan kembali untuk reaksi selanjutnya dan menurunkan penggunaan biaya. Salah satu metode imobilisasi enzim yang paling sederhana adalah dengan cara adsorpsi pada suatu padatan pendukung. Menurut Cahyaningrum (2009) padatan pendukung yang dapat digunakan dalam imobilisasi enzim harus area permukaan yang luas, dapat ditembus, tidak dapat larut, memiliki stabilitas kimia, stabilitas termal, kekakuan yang tinggi, mempunyai bentuk dan ukuran pori yang cocok, tahan terhadap serangan mikrobial dan dapat diregenerasi. Imobilisasi enzim menggunakan metode adsorpsi sebagai metode penjeratan enzim berdasarkan interaksi ikatan ionik, interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik antara enzim atau sel mikroba dengan bahan penyangga. Metode ini tidak menyebabkan kerusakan konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim (Wang *et al.*, 2009).

Kesesuaian matriks yang digunakan terhadap imobilisasi yang dilakukan menggunakan hidroksiapatit dengan enzim lipase yang menjadi target pengikatan. Metode adsorpsi dapat dilakukan dengan pengondisian reaksi yang relatif mudah, dan matriks dapat digunakan kembali untuk imobilisasi. Hidroksiapatit memiliki permukaan yang berpori dan area permukaan yang luas, memungkinkan enzim lipase menempel secara efektif melalui interaksi fisik, seperti ikatan van der

Waals dan interaksi hidrofobik. Secara umum matriks hidroksiapatit termasuk kategori matriks anorganik yang digunakan dalam metode adsorpsi. Matriks tersebut dapat dimodifikasi secara kimia untuk disesuaikan dengan kondisi enzim dan aplikasinya. Selain itu, hidroksiapatit dapat meningkatkan ketahanan lipase terhadap suhu dan pH ekstrem, serta memperpanjang masa pakainya. Kesesuaian ini membuat hidroksiapatit menjadi pilihan yang ideal untuk aplikasi imobilisasi enzim lipase, memungkinkan reaksi berlangsung secara efisien dalam berbagai kondisi industri.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 hasil pemurnian yang memiliki aktivitas spesifik lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar enzim lipase.
2. Mendapatkan enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 yang memiliki penurunan aktivitasnya lebih stabil dan tidak mudah terdenaturasi dibandingkan enzim lipase hasil pemurnian melalui metode imobilisasi dengan penggunaan matriks hidroksiapatit menggunakan parameter uji pemakaian berulang.
3. Mendapatkan kondisi optimum pH, suhu dan waktu inkubasi dari enzim lipase bebas dan enzim lipase hasil imobilisasi menggunakan metode Kwon *and* Rhee.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dilakukannya penelitian ini adalah untuk mendapatkan enzim lipase yang efisien digunakan secara berulang khususnya pada skala industri dengan kualitas lipase hasil pemurnian agar dapat mengurangi biaya dan meningkatkan daya guna, serta meminimalkan pembuangan air limbah.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri adalah organisme prokariotik yang umumnya tidak mempunyai klorofil, dan produksi aseksualnya terjadi melalui pembelahan sel. Bakteri pada umumnya merupakan makhluk hidup yang juga memiliki DNA, akan tetapi DNA bakteri tidak berada pada nukleus yang juga tidak mempunyai membran sel. DNA ekstrakromosomal dari bakteri tergabung menjadi satu plasmid yang berbentuk kecil dan sirkuler (Jawetz *et al.*, 2001). Menurut Dwidjoseputro (1985), ukuran sel bakteri pada umumnya adalah 0,5-1,0 μm , dan mempunyai tiga bentuk dasar yaitu bulat atau kokus, batang atau *bacillus*, dan bentuk melingkar. Koes (2006) menyebutkan ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri antara lain adalah :

- a. Sumber energi.
- b. Sumber karbon.
- c. Sumber nitrogen.
- d. Sumber garam-garam anorganik.
- e. Bakteri-bakteri tertentu membutuhkan faktor-faktor tumbuh tambahan.

Menurut Fardiaz (1989), pertumbuhan bakteri memiliki beberapa fase, beberapa fase pertumbuhan bakteri yaitu :

- a. Fase adaptasi.
- b. Fase pertumbuhan.
- c. Fase logaritmik.
- d. Fase pertumbuhan lambat.

2.1.1. Identifikasi Bakteri

Penentuan jenis bakteri yang ditemukan perlu dilakukan dengan beberapa metode identifikasi, antara lain sebagai berikut :

a. Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengamati pergerakan dan pembelahan secara biner, mengamati bentuk dan ukuran sel yang dialami, pada saat mengalami fiksasi panas serta selama proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan (Tjampakasari dan Kusmaryeni, 2021).

b. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram merupakan salah satu teknik pewarnaan yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri (mikroorganisme). Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi mikroba. Bakteri yang diwarnai dengan metode Gram ini dibagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Zat warna yang digunakan pada pengecatan Gram meliputi kristal violet, logul, alkohol 70% dan safranin. Metode pewarnaan Gram termasuk pewarnaan differensial. Hal ini menyatakan bahwa pewarnaan digunakan untuk mengetahui bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Agustine dkk., 2018).

Metode pewarnaan Gram yaitu pemberian larutan kristal violet, safranin, iodin, alkohol, dan akuades. Pemberian larutan kristal violet untuk memberikan warna ungu pada mikroba sebagai pewarna sekunder. Pemberian larutan alkohol untuk membilas larutan zat pewarna primer. Pemberian akuades untuk membilas kristal violet, iodin dan safranin (Suarni dan Herman, 2013).

c. Media Selektif dan Differensial

Media selektif adalah media yang bersifat selektif hanya terhadap salah satu jenis bakteri. Media ini berfungsi untuk menumbuhkan organisme target atau yang diinginkan dan menekan pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan (*background flora*). Umumnya media selektif menyeleksi mikroorganisme target berdasarkan kelompok, genus, spesies (Pertiwi dkk., 2021). Sedangkan media differensial merupakan medium yang mengandung senyawa kimia tertentu yang

dapat membedakan sifat mikroorganisme lainnya karena adanya perbedaan respon terhadap senyawa kimia (Safitri, 2010). Adanya zat pewarna atau bahan kimia tertentu di dalam media akan menghasilkan perubahan karakteristik atau pola pertumbuhan organisme yang digunakan untuk identifikasi dan diferensiasi. Karakter tersebut dapat berupa warna dan bentuk dari koloni. Perbedaan karakter ini menjadi tahap yang sangat penting dalam proses diferensiasi dan dasar untuk proses identifikasi selanjutnya. Contoh media ini antara lain adalah, *Mannitol Salt Agar* (MSA), *Mac Conkey Agar*, *Eosin Methylene Blue Agar* (Emba), *Hektoen Enteric* (HE) agar, *Xylose-Lysine-Desoxycholate* (XLD) agar, dan *Blood Agar* (Atmanto dkk., 2022).

2.1.2. Klasifikasi Bakteri

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

a. Bakteri Gram Positif

Bakteri gram positif adalah bakteri yang mampu mempertahankan zat warna kristal violet atau nama senyawanya gentian violet pada dinding selnya sewaktu proses pewarnaan gram sehingga akan berwarna ungu di bawah mikroskop, seperti dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bakteri gram positif (Jawetz and Adelberg, 2008).

b. Bakteri Gram Negatif

Bakteri gram negatif merupakan bakteri yang mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis, terdapat pada ruang periplasmik, yaitu antara membran luar dengan membran plasma. Bagian dinding sel bakteri ini dapat menyerap zat warna merah atau nama senyawanya safranin pada pewarnaan gram karena tidak mampu mempertahankan warna kristal violet seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri gram negatif (Radji, 2011).

2.1.3. Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171

Pseudomonas berasal dari bahasa Yunani yaitu *pseudo* berarti palsu dan *monas* berarti satu unit. *Pseudomonas* sp. LPG171 merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon. Keberhasilan penggunaan bakteri *Pseudomonas* dalam upaya bioremediasi lingkungan akibat pencemaran hidrokarbon membutuhkan pemahaman tentang mekanisme interaksi antara bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dengan senyawa hidrokarbon. Klasifikasi *Pseudomonas* berdasar pada homologi rRNA atau DNA dan sifat pertumbuhannya. Spesies - spesies *pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. mendocina* (Boyd, 1995).

Identifikasi bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 telah dilakukan Pretti (2022) dari tanah tercemar yang terkontaminasi dengan minyak untuk memproduksi enzim lipase dilakukan di Laboratorium Uji Bakteriologi Balai Veteriner Lampung, Bandar Lampung. Tahapan yang telah dilakukan Pretti (2022) untuk identifikasi bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 adalah dengan penentuan kurva pertumbuhan bakteri, dengan diawali pembuatan medium starter (media inokulum). Mikroba

yang telah diinkubasi selama 72 jam dengan pH optimum dilakukan pengambilan sampel setiap 6 jam sekali dan diukur OD (*Optical Density*) serapannya menggunakan spektrofotometer Uv -Vis pada panjang gelombang 600 nm. Kemudian dilakukannya penentuan kondisi optimum pertumbuhan bakteri, dengan mencari optimasi pH dari pH 5, 6, dan 7, serta diuji aktivitas unitnya dengan menggunakan metode Kwon *and* Rhee. Selanjutnya dilakukan optimasi waktu inkubasi selama 0 sampai 72 jam pada pH optimum dengan pengambilan sampel setiap 6 jam, dan diuji aktivitas unitnya menggunakan metode Kwon *and* Rhee.

2.2. Enzim

Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan - perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim dikatakan sebagai biokatalisator yang berfungsi sebagai katalis dalam proses biologis. Enzim dihasilkan oleh organ - organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon. Secara umum, enzim menghasilkan kecepatan, spesifikasi, dan kendali pengaturan terhadap reaksi dalam tubuh. Enzim berfungsi sebagai katalisator, yaitu senyawa yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia (Supriyatna dkk., 2015). Enzim disusun oleh untaian asam amino yang panjang dan antar asam amino dihubungkan dengan ikatan peptida (Judoamidjojo dkk., 1992). Fungsi suatu enzim adalah sebagai katalis untuk mempercepat proses biokimia yang terjadi didalam sel maupun di luar sel (Poedjiadi, 1994).

Pemanfaatan enzim dapat dilakukan secara langsung menggunakan hasil isolasi maupun dengan cara pemanfaatan mikroorganisme yang dapat menghasilkan enzim yang diinginkan. Enzim dapat diperoleh dari makhluk hidup seperti hewan, tumbuhan dan mikroorganisme (Mahardhika dkk., 2021). Berdasarkan tempat bekerjanya, enzim dapat dibedakan dalam dua golongan, yaitu endoenzim dan eksoenzim. Endo enzim disebut juga enzim intraseluler, dihasilkan di dalam sel

yaitu pada bagian membran sitoplasma dan melakukan metabolisme di dalam sel. Eksoenzim (enzim ekstraseluler) merupakan enzim yang dihasilkan sel kemudian dikeluarkan melalui dinding sel sehingga terdapat bebas dalam media yang mengelilingi sel dan bereaksi memecah bahan organik tanpa tergantung pada sel yang melepaskannya (Soedigdo, 1988).

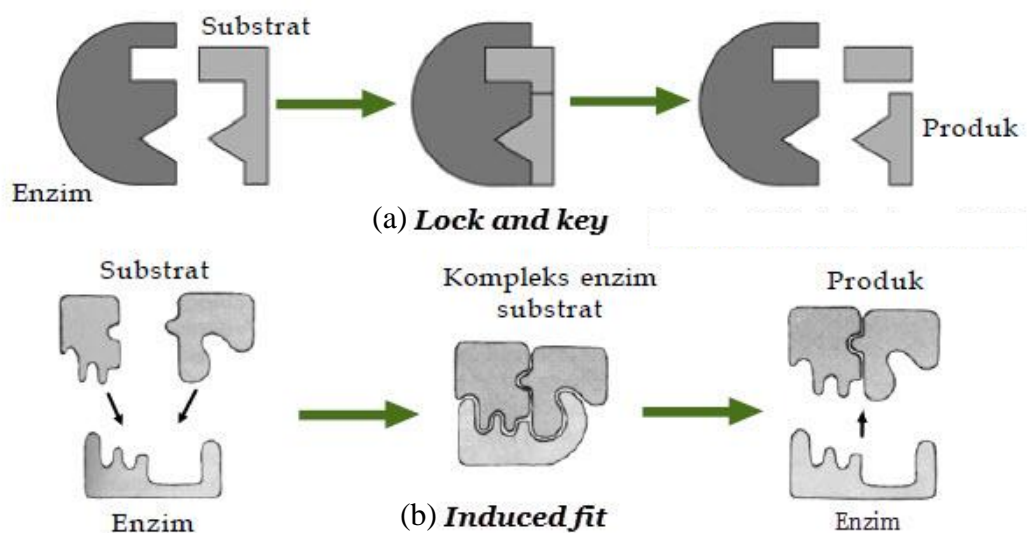
Berdasarkan biosintesisnya, enzim dibedakan menjadi enzim konstitutif dan enzim induktif. Enzim konstitutif adalah enzim yang selalu tersedia di dalam sel mikroba dalam jumlah yang relatif konstan, sedangkan enzim induktif adalah enzim yang ada dalam jumlah sel yang tidak tetap, tergantung pada adanya induser. Enzim induktif ini jumlahnya akan bertambah sampai beberapa ribu kali bahkan lebih apabila dalam medium mengandung substrat yang menginduksi, terutama bila substrat penginduksi merupakan satu-satunya sumber karbon (Kurnia, 2010).

2.2.1. Mekanisme Reaksi Enzim

Terikatnya substrat pada sisi aktif enzim menyebabkan berubahnya keadaan substrat sehingga berada dalam keadaan transisi dan akibatnya molekul substrat mengalami perubahan konformasi transisi yang diperlukan agar dapat diubah menjadi produk. Beberapa ion logam yang merupakan kofaktor juga membantu terjadinya ikatan substrat dengan enzim (Wheeler, 1994). Jika enzim telah melakukan pembentukan ikatan antara enzim dengan substrat dengan membentuk molekul kompleks enzim substrat, pembentukan molekul ini sangat dipengaruhi oleh bentuk sisi aktif enzim dan kespesifikan substrat.

Menurut Shahib (2005) ada dua teori yang mendukung dalam penjelasan pembentukan kompleks enzim substrat, teori pertama yang diajukan oleh Fisher yaitu teori Kunci dan Gembok / *Lock and Key* yang menjelaskan bahwa adanya kespesifikan enzim terhadap substrat tertentu yang bentuknya sesuai dengan sisi aktif enzim. Enzim dan substrat bergabung bersama membentuk kompleks, seperti kunci yang masuk dalam gembok. Dalam kompleks, substrat dapat bereaksi dengan energi aktivasi yang rendah. Setelah bereaksi, kompleks lepas dan

melepaskan produk serta membebaskan enzim. Teori kedua adalah teori yang diajukan oleh Koshland yaitu teori *Induced fit* yang menjelaskan bahwa substrat akan menginduksi suatu perubahan bentuk sisi aktif enzim sehingga dapat dengan mudah berikatan. Menurut teori kecocokan yang terinduksi, sisi aktif enzim merupakan bentuk yang fleksibel. Ketika substrat memasuki sisi aktif enzim, bentuk sisi aktif termodifikasi melingkupi substrat membentuk kompleks. Ketika produk sudah terlepas dari kompleks, enzim tidak aktif menjadi bentuk yang lepas. Sehingga, substrat yang lain kembali bereaksi dengan enzim tersebut. Adapun ilustrasi dari teori *Lock and Key* oleh Fischer dan *Induced fit* oleh Koshland dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Mekanisme reaksi enzim (a) *Lock and Key* (b) *Induced fit* (Wahyudiati, 2017)

2.2.2. Klasifikasi Enzim

Enzim diklasifikasikan ke dalam 6 kelas utama berdasarkan tipe reaksi yang dikatalisis dan beberapa sub kelas seperti tercantum pada Tabel 1 dan Tabel 2 (McMurry and Castellion, 1992).

Tabel 1. Klasifikasi enzim berdasarkan tipe reaksi (McMurry *and* Castellion, 1992).

| Kelas | Kelas Enzim | Tipe Reaksi |
|--------------|----------------------|---|
| 1 | <i>Oksireduktase</i> | Reaksi reduksi oksidasi (transfer elektron dari satu substrat ke substrat lainnya) Reaksi reduksi oksidasi (transfer elektron dari satu substrat ke substrat lainnya). |
| 2 | <i>Transferase</i> | Transfer atom atau gugus dari satu substrat ke substrat lain. |
| 3 | <i>Hidrolase</i> | Reaksi hidrolisis (pemecahan ikatan karena adanya air). |
| 4 | <i>Liase</i> | Penambahan gugus fungsi pada ikatan rangkap (adisi) atau pemutusan ikatan rangkap dengan pelepasan gugus fungsi. |

Berdasarkan klasifikasi subkelas enzim dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi subkelas enzim (McMurry *and* Castellion, 1992).

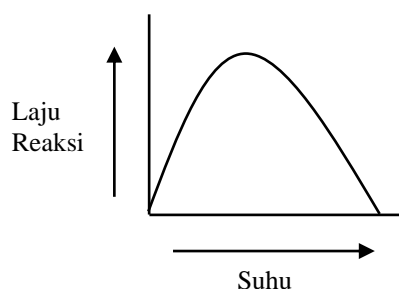
| Kelas | Subkelas | Tipe Reaksi yang dikatalisis |
|----------------------|-----------------|---|
| <i>Oksireduktase</i> | Oksidase | Oksidasi substrat |
| | Reduktase | Reduksi substrat |
| | Dehidrogenase | Pelepasan atom hydrogen (H ₂) sehingga terbentuknya ikatan rangkap. |
| <i>Transferase</i> | Transaminase | Transfer gugus amino antara substrat |
| | Kinase | Transfer gugus fosfat antara substrat. |
| <i>Hidrolase</i> | Lipase | Hidrolisis gugus ester dalam lipid |
| | Protoase | Hidrolisis gugus amida dalam protein |
| | Nuklease | Hidrolisis gugus fosfat dalam asam nukleat |
| <i>Liase</i> | Dehidrase | Kehilangan air |
| | Dekarboksilase | Kehilangan karbondioksida |

2.2.3. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Adapun beberapa faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas enzim antara lain, sebagai berikut :

a. Temperatur

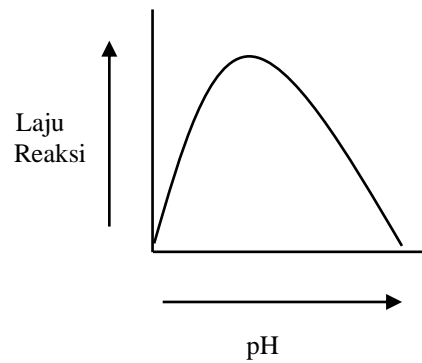
Suhu inkubasi sangat mempengaruhi kerja dari enzim, suhu inkubasi yang lebih tinggi dari suhu optimum kerja enzim dapat menyebabkan terjadinya perubahan konformasi sisi aktif enzim yang disebabkan adanya denaturasi protein enzim. Sebagian besar enzim terdenaturasi pada suhu diatas 50 °C. Dalam temperatur rendah, pada reaksi enzimatik berlangsung lambat, kenaikan temperatur akan mempercepat reaksi, hingga suhu optimum tercapai dan reaksi enzimatik mencapai maksimum. Kenaikan temperatur melewati temperatur optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi dan menurunkan kecepatan reaksi, sehingga efek dari suhu pada aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hubungan aktivitas enzim dengan suhu (Rusman, 2017).

b. Derajat keasaman (pH)

Efek pH berhubungan dengan kombinasi beberapa faktor seperti energi yang terlibat dalam ikatan substrat pada sisi aktif enzim, ionisasi residu asam amino yang terlibat dalam aktivitas katalitik enzim, ionisasi substrat, perbedaan struktur protein karena kekuatan ionik medium. Laju reaksi enzimatik karena perbedaan pH membuat kurva lonceng normal, dimana laju maksimum tercapai pada pH optimum larutan. Nilai pH optimum, berhubungan dengan pKs asam amino terionisasi yang terlibat dalam struktur protein. Sehingga efek derajat keasaman (pH) dapat dilihat pada Gambar 5.



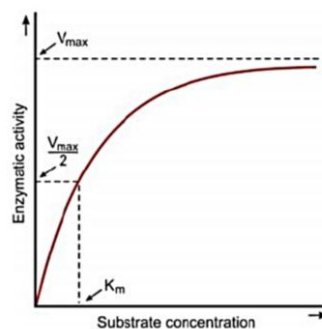
Gambar 5. Efek pH pada aktivitas enzim (Rusman, 2017).

c. Efek konsentrasi enzim

Dengan meningkatnya konsentrasi enzim berarti ada molekul tambahan yang akan membawa substrat sehingga laju reaksi meningkat. Jika konsentrasi meningkat dua kali maka laju reaksi atau aktivitas enzim akan meningkat 2 kali lebih besar.

d. Efek konsentrasi substrat

Enzim bekerja sesuai dengan kapasitasnya. Meningkatnya konsentrasi substrat maka laju reaksi akan meningkat karena lebih banyak enzim yang bekerja. Seperti pada Gambar 6, hubungan antara konsentrasi substrat dan aktivitas enzim mengikuti kurva hiperbolik.



Gambar 6. Efek konsentrasi substrat (Rusman, 2017).

Ketika konsentrasi substrat rendah, aktivitas enzim meningkat secara linear dengan konsentrasi substrat. Bagian ini mencerminkan reaksi orde pertama, menyatakan hubungan langsung antara laju reaksi enzim dan konsentrasi substrat. Konsentrasi substrat meningkat, terjadi peningkatan laju enzim hingga mencapai satu titik di mana aktivitas tidak meningkat, bahkan jika konsentrasi substrat terus

meningkat. Kurva cenderung menjadi horizontal pada titik yang sesuai dengan kecepatan maksimum (V_{maks}) enzim.

Kurva hiperbolik adalah karakteristik dari reaksi dimana satu substrat yang terlibat dalam reaksi. Ketika dua substrat terlibat, kurva hiperbolik juga dapat diperoleh untuk salah satunya jika terdapat kelebihan konsentrasi substrat lain yang digunakan. Hubungan substrat - aktivitas pertama kali digambarkan oleh Michaelis dan Menten. Dalam kasus yang paling sederhana, substrat berikatan dengan enzim secara reversibel. Kompleks yang terbentuk terdisosiasi lebih lambat dibandingkan reaksi pertama dan enzim akan melepaskan produk.

Pada konsentrasi substrat yang sangat rendah, sebagian besar molekul enzim (E) bebas. Ketika substrat (S) meningkat, molekul enzim terlibat dalam pembentukan kompleks enzim - substrat (ES) juga meningkat. Jika konsentrasi substrat terus meningkat, tercapai satu titik di mana hampir semua molekul enzim ditempati oleh substrat (dengan asumsi konsentrasi enzim konstan). Pada titik ini, enzim menjadi jenuh dengan substrat. Jika melebihi jumlah enzim, tercapai *steady state*, dimana laju reaksi tidak akan meningkat lagi.

e. Inhibisi enzim

Inhibitor merupakan zat yang dapat menghambat kerja enzim. Zat penghambat atau inhibitor dapat menghambat kerja enzim untuk sementara atau secara tetap. Berdasarkan kerjanya inhibitor dibagi menjadi dua, yakni inhibitor kompetitif dan non kompetitif.

f. 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.

g. Inhibitor nonkompetitif

Inhibitor nonkompetitif 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 nonkompetitif bersifat tetap dan tidak dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat (Bariroh, 2014).

2.3. Enzim Lipase

Enzim lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis triasilgliserol (trigliserida) untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol. Enzim ini juga digunakan untuk hidrolisis triasilgliserol menjadi diasilgliserol dan asam lemak bebas. Diasilgliserol adalah ester gliserol digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil produk makanan, kosmetika dan farmasetika. Lipase mikrobial telah digunakan sebagai katalis dalam menghasilkan produk - produk berbasis oleokimia antara lain lemak/minyak termodifikasi seperti trigliserida rendah kalori, minyak kaya EPA dan DHA.

Enzim lipase dapat pula digunakan sebagai biokatalis untuk meningkatkan kualitas *Crude Palm Oil* (CPO) yang lebih baik yaitu minyak sehat (*healthy oil*). *Healthy Econa Cooking Oil* telah diproduksi massal pada tahun 2001 oleh *Kao Industries of Japan* bekerja sama dengan *Novozymes, Co*. Bahan utama yang terkandung di dalam minyak ini adalah diasilgliserol yang dibuat secara enzimatik menggunakan minyak murni. Dalam jangka panjang minyak ini mampu mencegah peningkatan lemak tubuh, terutama lemak yang terdeposit dalam organ internal (Dali dkk., 2017). Enzim lipase sebagai biokatalisator mempunyai beberapa kelebihan dibandingkan katalisator alkali antara lain: bekerja secara spesifik, aktivitas katalitik enzim yang tinggi dan kemampuannya bekerja pada suhu yang relatif rendah sekitar 30°C, katalisator alkali bekerja pada suhu (220-250) °C. Suhu yang tinggi menghasilkan produk berwarna coklat (gelap) dan bau tidak diinginkan (Noureddini *et al.*, 2004).

2.3.1. Karakteristik Enzim Lipase yang Dihasilkan oleh Mikroba

Salah satu karakteristik utama dari lipase, yaitu enzim ini dapat bekerja pada lapisan antar muka karena adanya perbedaan kepolaran antara lipase dengan substrat yang dikatalisisnya. Lipase cenderung bersifat polar, sedangkan substratnya berupa senyawa non polar, sehingga lipase bekerja pada bagian antar muka antara fasa yang larut dalam air dan fasa minyak dari substratnya (Seniwati dkk., 2010). Aktivasi pada lapisan antar muka dari lipase ini akan meningkat ketika substrat yang tersedia berada dalam bentuk emulsinya. Sebagai akibat dari karakteristik ini, maka kinetika dari lipase tidak mengikuti aturan klasik model Michaelis-Menten (Jaeger *et al.*, 1994). Substrat dan produk yang dihasilkan dari katalitik lipase ini terkadang bersifat tidak dapat larut dengan baik dalam media air. Hal ini membuat enzim dapat dengan mudah dipisahkan dari substrat dan produknya. Pada umumnya enzim bersifat tidak stabil dalam pelarut organik dan dapat terdenaturasi atau hilang aktivitas katalitiknya.

Akan tetapi lipase dapat stabil dan tetap aktif dalam suatu pelarut organik tanpa adanya penambahan senyawa penstabil. Jenis substrat dari lipase juga terkadang tidak dapat larut atau bersifat sedikit larut dalam media air. Karena itu, dalam fenomena seperti ini digunakan suatu pelarut organik atau larutan organik-air sebagai media reaksi. Karena lipase tetap memiliki kemampuan katalitiknya dalam suatu pelarut organik, membuat lipase banyak diaplikasikan dalam bidang bioteknologi (Jaeger *et al.*, 1994). Lipase yang dihasilkan bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah lama waktu inkubasi. Lama waktu inkubasi mempengaruhi jumlah lipase yang dihasilkan. Kemampuan bakteri dalam menghasilkan lipase telah ditemukan dengan lama waktu inkubasi dari beberapa jam sampai beberapa hari. (Gilbert *et al.*, 1996) melaporkan bahwa *Pseudomonas sp.*, *P. fragi*, dan *P. fluorescens BW 96CC* mampu menghasilkan lipase hingga mencapai maksimum setelah inkubasi antara 72 dan 96 jam.

Lipase yang diperoleh dari mikroba menjadi salah satu solusi bagi industri untuk memproduksinya secara efisien dan dalam jumlah besar. Selain itu keuntungannya enzim mempunyai daya katalitik yang sangat spesifik sehingga dapat meminimalisir adanya reaksi samping yang terjadi. Namun ada beberapa hal yang

perlu diperhatikan saat memilih mikroba penghasil lipase. Beberapa di antaranya adalah mikrobanya merupakan penghasil enzim ekstraseluler agar mempermudah proses isolasi enzimnya, penghasil enzim dalam jumlah banyak dan cepat, tidak mudah mengalami mutasi, mampu tumbuh pada media kultivasi dan mudah dipanen, serta tidak menginduksi toksin (Hermawati, 2010).

Sama halnya dengan lipase yang hanya bekerja pada substrat lipid, enzim-enzim lain juga bekerja spesifik pada substrat yang sesuai karena enzim mempunyai perbedaan struktur kimia yang tetap. Kerja enzim secara umum saat mengkatalisis suatu reaksi dapat diketahui, yaitu dengan menempelkan sisi aktifnya pada permukaan molekul zat-zat yang bereaksi. Akibatnya energi aktivasi pada suatu reaksi akan menurun dan reaksi berlaju cepat. Perlu diketahui bahwa kerja enzim ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor. Faktor umum dan krusial antara lain adalah temperatur, tingkat keasaman (pH), konsentrasi substrat dan juga inhibitor.

2.3.2. 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 enzimatik 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 dkk., 2017). 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 dkk., 2020).

2.3.3. Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas lipase memiliki satuan unit, satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai kemampuan enzim lipase untuk menghasilkan 1 μ mol asam lemak bebas dari hidrolisis substrat oleh 1 mL enzim lipase tiap satuan menit (Adio *et al.*, 2015). Sedangkan aktivitas spesifik adalah jumlah unit enzim permiligram protein. Aktivitas spesifik biasanya mencerminkan kemurnian enzim. Selama pemurnian, aktivitas spesifik enzim meningkat dan tetap jika enzim sudah menjadi murni. Aktivitas enzim lipase yang dapat mengkatalisis pemutusan ikatan ester disebut aktivitas hidrolisis lipid (lipolisis). Aktivitas hidrolisis lipid dapat maksimal jika teradsorpsi pada bidang pertemuan (interface) air minyak (Lehninger, 1995). Menentukan aktivitas optimum pada kondisi optimum maka perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzimatis pada variasi suhu dan pH, sehingga diketahui aktivitas lipase disetiap rentang suhu dan pH yang ditentukan. Metode yang digunakan untuk memperkirakan aktivitas lipase secara kuantitatif ada metode interfacial, tensiometri, kromatografi, konduktometri, titrimetri, spektrofotometri (Kasipah *et al.*, 2013). 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. Aktivitas spesifik enzim memiliki satuan U/mg. Aktivitas spesifik enzim didefinisikan sebagai jumlah unit enzim tiap miligram protein.

2.3.4. Uji Aktivitas Lipase Metode Kwon and Rhee

Metode kolorimetri yang sederhana dan cepat dikembangkan untuk menentukan aktivitas lipase untuk pemecahan lemak. Bebas asam lemak yang dihasilkan oleh lipase dari triasilgliserol ditentukan dengan mengamati warna yang terbentuk menggunakan kupri asetat-piridin sebagai pewarna berkembang reagen. Metode yang dimodifikasi ini hanya membutuhkan beberapa menit untuk menentukan asam lemak bebas, sedangkan membutuhkan waktu lebih dari 20 menit dengan metode konvensional yang memerlukan langkah-langkah penguapan pelarut dan

sentrifugasi. Sensitivitas dan reproduktifitas metode ini baik untuk asam kaproat, kaprilat, kaprat, laurat, miristat, palmitat, stearat dan oleat Kwon *and* Rhee.

2.3.5. Uji Aktivitas Lipase Metode Fu

Metode Fu dilakukan bertujuan untuk mengukur kemampuan lipase dalam menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Penelitian ini menggunakan teknik spektrofotometri untuk mendeteksi perubahan absorbansi, yang mencerminkan jumlah asam lemak yang dihasilkan selama reaksi. Aktivitas lipase dihitung berdasarkan konsentrasi asam lemak yang dihasilkan, waktu inkubasi, dan konsentrasi enzim, yang biasanya dinyatakan dalam satuan unit per mililiter (U/mL). Metode ini penting untuk aplikasi di berbagai bidang, termasuk industri makanan, bioteknologi, dan kesehatan, serta memberikan pemahaman yang lebih baik tentang sifat enzim lipase dan efisiensinya dalam proses transesterifikasi. Selain itu, penelitian ini juga menekankan pentingnya melakukan kontrol positif dan negatif untuk memastikan keakuratan hasil yang diperoleh (Fu *et al.*, 2014).

2.4. Penentuan Kadar Protein Metode Lowry

Metode Lowry merupakan pengembangan dari metode Biuret. Dalam metode ini terlibat dua 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.

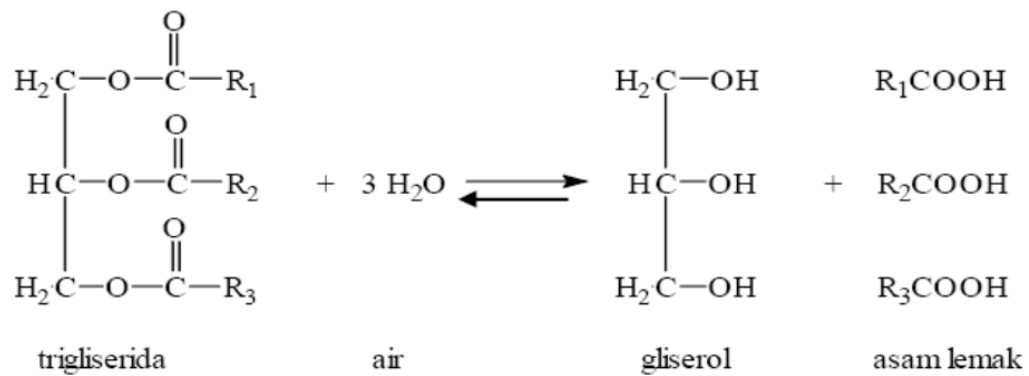
Keuntungan metode Lowry adalah lebih sensitif (100 kali) daripada metode biuret sehingga memerlukan sampel protein yang lebih sedikit. Batas deteksinya berkisar

pada konsentrasi 0,01 mg/mL. Namun metode Lowry lebih banyak interferensinya akibat kesensitifannya. Beberapa zat yang bisa mengganggu penetapan kadar protein dengan metode Lowry ini, antara lain; buffer, asam nuklet, gula atau karbohidrat, deterjen, gliserol, *Tricine*, EDTA, Tris, senyawa-senyawa kalium, sulfhidril, disulfida, fenolat, asam urat, guanin, *xanthine*, magnesium, dan kalsium. Interferensi agen - agen ini dapat diminimalkan dengan menghilangkan interferensi tersebut. Oleh karena itu dianjurkan untuk menggunakan blanko untuk mengkoreksi absorbansi. Interferensi yang disebabkan oleh deterjen, sukrosa dan EDTA dapat dieliminasi dengan penambahan SDS atau melakukan preparasi sampel dengan pengendapan protein.

Metode Lowry-*Folin* hanya dapat mengukur molekul peptida pendek dan tidak dapat mengukur molekul peptida panjang. Prinsip kerja metode Lowry adalah reduksi Cu^{2+} (reagen Lowry B) menjadi Cu^+ oleh tirosin, triptofan, dan sistein yang terdapat dalam protein. Ion Cu^+ bersama dengan fosfotungstat dan fosfomolibdat (reagen Lowry D) membentuk warna biru, sehingga dapat menyerap cahaya. Metode ini relatif sederhana dan dapat diandalkan serta biayanya relatif murah. Namun, metode ini mempunyai kelemahan yaitu sensitif terhadap perubahan pH dan konsentrasi protein yang rendah. Untuk mengatasinya adalah dengan cara menggunakan volume sampel yang sangat kecil sehingga tidak mempengaruhi reaksi (Lowry *et al.*, 1951).

2.5. Reaksi Hidrolisis

Dalam reaksi hidrolisis trigliserida, katalis yang sering digunakan ialah enzim lipase. Lipase merupakan jenis enzim yang dapat mengkatalisis pemecahan ikatan ester dalam molekul trigliserida, menghasilkan gliserol dan asam lemak. Proses ini terjadi di antar muka antara fasa air dan fasa minyak, Dimana molekul air ditambahkan untuk membantu pemecahan ikatan ester (Andaka, 2008). Reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 7.

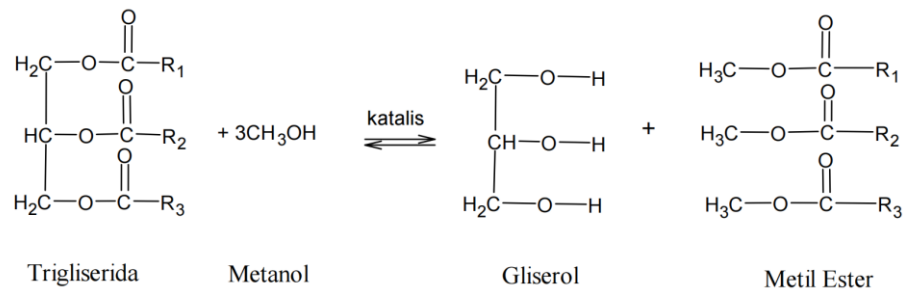


Gambar 7. Mekanisme reaksi hidrolisis (Andaka, 2008).

Dalam konteks biologis, lipase dapat ditemukan dalam system pencernaan manusia, terutama di pankreas, dan berperan dalam pemecahan lemak dari makanan menjadi bentuk yang dapat diserap oleh tubuh. Selain itu 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 merupakan katalis pilihan karena dapat bekerja secara spesifik pada ikatan ester dalam molekul trigliserida (Andaka, 2008).

2.6. Reaksi Transesterifikasi

Transesterifikasi merupakan suatu reaksi yang menghasilkan ester dimana salah satu pereaksinya juga merupakan senyawa ester. Terjadi pemecahan senyawa trigliserida dan migrasi gugus alkil antara senyawa ester. Ester yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi ini disebut biodiesel. R' adalah gugus alkil dan R1-R3 merupakan gugus asam lemak jenuh dan tak jenuh rantai panjang, yang dapat dilihat pada Gambar 8 (Aziz, 2007).



Gambar 8. Mekanisme reaksi transesterifikasi (Aziz, 2007).

Reaksi transesterifikasi secara umum dapat dilakukan dengan menggunakan katalis asam, basa dan enzim. Enzim sebagai katalis homogen dan penggunaan katalis homogen tersebut memiliki kekurangan terbesar yakni, dibutuhkan tahap pemurniaan 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 yang 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 antara lain adalah harga enzim yang sangat mahal, volume reaksi yang sangat besar dan udah terdenaturasi pada suhu tinggi (Buchori dkk., 2015).

2.7. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim merupakan suatu proses dimana pergerakan molekul enzim dalam ruang tempat reaksi ditahan sedemikian rupa sehingga terbentuk sistem enzim yang aktif dan tidak larut dalam air. Dalam imobilisasi enzim, pengikatan enzim pada suatu karier haruslah terjadi tanpa adanya perusakan pada struktur ruang tiga dimensi dari sisi aktif enzim tersebut, sehingga spesifitas substrat maupun gugus fungsi aktif tidak terganggu oleh proses ini. Imobilisasi enzim diketahui memiliki beberapa keunggulan, meliputi stabilitas enzim dan enzim dapat digunakan berulang-ulang. Aktivitas dan stabilitas enzim dipengaruhi oleh

metode imobilisasi, jenis enzim maupun jenis matrik yang digunakan enzim dapat diimobilisasi dengan menggunakan beberapa cara, antara lain adalah :

- a. Cara fisik, yang meliputi teknik penjebakan (*encapsulation gel lattice formation*) atau teknik pembungkusan dengan membran;
- b. Cara kimia, yang meliputi teknik pengikatan (adsorpsi) pada bahan pendukung melalui ikatan - ikatan ionik, kovalen atau polar, atau dengan teknik ikatan silang;
- c. Cara penggumpalan sel atau enzim;
- d. Kombinasi dari cara-cara sebelumnya seperti, cara adsorpsi kemudian *cross linking*.

Metode imobilisasi secara fisik memiliki aktivitas enzim immobil ditentukan oleh bahan pendukung yang digunakan. Pada proses imobilisasi, jumlah enzim yang teradsorpsi dipengaruhi oleh lama pengocokan dan konsentrasi adsorbat / enzim (Sediawan, 2000). Lama pengocokan dan konsentrasi enzim akan mempengaruhi massa enzim yang teradsorpsi, sehingga berpengaruh terhadap aktivitas enzim tersebut (Ariesta, 2009). Keuntungan penggunaan imobilisasi enzim antara lain, adalah :

- a. Sistem enzim yang telah diimobilisasi dapat digunakan berulang-ulang
- b. Memungkinkan proses pengoperasian secara berkesinambungan
- c. Dapat meminimalkan terjadinya pencampuran antara hasil reaksi dengan residu
- d. Memudahkan pengendalian kondisi reaksi
- e. Dapat meningkatkan stabilitas enzim.

Selain keuntungan imobilisasi enzim juga mempunyai kekurangan yaitu dapat menyebabkan penurunan aktivitas katalitik enzim untuk beberapa kasus serta terjadi pergeseran pH dan suhu optimum dari enzim (Payne *et al.*,1992).

2.8. Metode Adsorpsi

Teknik adsorpsi merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk imobilisasi enzim. Metode ini dapat dilakukan dengan pengondisian reaksi yang relatif mudah, dan matriks dapat digunakan kembali untuk imobilisasi ulang (Tan

et al., 2010). Adsorpsi memanfaatkan interaksi lemah antara enzim dengan matriks, seperti interaksi Van der Waals maupun ikatan hidrogen. Secara umum, matriks yang digunakan untuk adsorpsi dapat dibagi dalam 2 kategori: matriks anorganik dan matriks organik. Matriks anorganik yang umum digunakan antara lain silika, titania, dan hidroksiapatit. Adapun matriks organik dapat berasal dari sumber alami (contoh: kitin, kitosan, selulosa, alginat) maupun polimer hasil sintesis. Matriks tersebut dapat dimodifikasi secara kimia untuk disesuaikan dengan kondisi enzim dan aplikasinya (Radzimska *and* Jesionowski, 2014). Walaupun adsorpsi memiliki keuntungan ekonomis dan mempertahankan aktivitas tinggi milik enzim, terdapat resiko lepasnya enzim dari matriks karena interaksi yang lemah (Jegannathan *et al.*, 2008).

Dalam metode ini, molekul enzim menempel pada permukaan matriks pembawa dengan kombinasi interaksi hidrofobik dan pembentukan berbagai ikatan garam per molekul enzim. Imobilisasi adsorpsi adalah metode fisik yang dihasilkan dari Van der Waals dan interaksi nonkovalen lainnya, termasuk interaksi hidrofobik dan ikatan elektrostatis ikatan hidrogen antara pendukung dan enzim yang menempel.

2.9. Hidroksiapatit [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂]

Hidroksiapatit adalah bahan keramik kalsium fosfat [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] yang sangat penting sebagai biomaterial karena sifat osteofilik sehingga memiliki gambaran identik dengan hidroksiapatit pada tulang. Hidroksiapatit bersifat biokompatibel, osteokonduktif dan dapat menyatu dengan tulang sehingga dapat meningkatkan proses regenerasi tulang. Menurut Noviyanti dkk., (2017), hidroksiapatit merupakan salah satu biomaterial yang bersifat bioaktif untuk tulang. Biomaterial adalah suatu bahan sintesis yang dapat diimplan ke dalam sistem hidup sebagai pengganti fungsi dari jaringan hidup atau organ. Pada saat ini kebutuhan akan biomaterial sangat tinggi dan telah memberi dampak yang cukup besar terutama dalam bidang kedokteran ortopedi, misalnya saja untuk perbaikan tulang, baik pada perbaikan tulang retak maupun tulang patah. Material

yang digunakan dalam pengobatan tersebut harus bersifat bioaktif, biokompatibel, dan tidak beracun.

Hidroksiapatit (HA) memiliki banyak aplikasi dalam bidang medis dan bioteknologi karena kemiripannya dengan komponen matriks ekstraseluler dalam jaringan biologis. Imobilisasi enzim, terutama lipase, pada HA dapat menawarkan keuntungan seperti peningkatan stabilitas, kemampuan untuk digunakan kembali, dan kemudahan pemisahan. Lipase, enzim yang bertanggung jawab untuk hidrolisis lipid, memiliki aplikasi luas dalam industri makanan, detergen, dan farmasi. Sebagai material kimia, HA adalah senyawa kalsium fosfat dan anggota kelompok mineral apatit dengan rumus kimia secara umum $M_{10}(RO_4)X_2$, dengan R biasanya merupakan unsur fosfor, M adalah salah satu dari unsur logam yang biasanya adalah unsur kalsium, dan X biasanya merupakan hidroksida atau unsur halogen. Senyawa kalsium fosfat berbentuk kristal dan terdapat dalam empat fase, yaitu dikalsium fosfat, okta kalsium fosfat, trikalsium fosfat, dan hidroksiapatit (Noviyanti dkk., 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Juni 2024 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Lampung. Uji aktivitas hidrolisis dan kadar protein pada ekstrak kasar enzim, fraksinasi, dan dialisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis dilakukan di Laboratorium Botani, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung. Uji aktivitas hidrolisis, transesterifikasi, fraksi protein, dan kadar protein serta karakterisasi enzim pada hasil kromatografi filtrasi gel dan imobilisasi enzim lipase menggunakan spektrofotometri UV-Vis (Genesys TM 140/150 Vis/UV-Vis) dilakukan di Institut Teknologi Sumatera.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (gelas ukur, tabung reaksi, erlenmeyer, labu ukur), rak tabung reaksi, batang pengaduk, mikropipet, mikro tip, bunsen, neraca analitik, sumbat, pH meter, jarum ose, inkubator, autoklaf (*S-90-N Electric Stereoclave*), oven, pengaduk magnetik, spektrofotometer UV-Vis (Genesys TM 140/150 Vis/UV-Vis), *waterbath*, pemanas, tabung sentrifugasi, sentrifugasi, *Laminar Air Flow* (CRUMA model 9005-FL), botol semprot, pipet tetes, spatula, termometer, corong, jarum ose

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dari penelitian Pretti (2022), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), akuades, kolom *sephadex* G-75 (Merck Sigma-Aldrich), minyak zaitun (Merck *Bertolli*), *tween* 80, asam oleat, larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA), pereaksi Lowry A (Na_2CO_3 dan NaOH 2%), pereaksi Lowry B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dan NaK 1%), pereaksi Lowry C (Pereaksi Lowry B dan Lowry A), pereaksi Lowry D (Reagen *Folin-Ciocalteu* dan akuades), metanol, n-heksana, kapas, tisu, kain kassa, *aluminium foil*, buffer fosfat, hidroksiapatit komersil (Merck *Bhanex*) [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], aseton nitril, para-nitrofenil palmitat, isopropanol, ammonium sulfat [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$], BaOH_2 atau BaCl_2 dan plastik wrap.

3.3. Metode Penelitian

Prosedur pada penelitian ini meliputi tahap persiapan, pembuatan media, produksi enzim lipase, fraksinasi enzim lipase, dialisis enzim lipase, kromatografi enzim lipase, imobilisasi enzim lipase, dan karakterisasi enzim lipase sebelum imobilisasi dan sesudah imobilisasi enzim serta uji pemakaian berulang enzim.

3.3.1. Tahap Persiapan Alat

Mencuci bersih alat yang ingin digunakan dan mengeringkannya. Kemudian mensterilisasi alat dan dibungkus menggunakan kertas ke dalam autoklaf bertekanan 1 atm dengan suhu 121 °C selama 15 menit, setelah itu mengeringkan alat gelas yang telah disterilisasi ke dalam oven selama ± 2 jam dalam suhu 40 °C.

3.3.2. Pembuatan Media

Adapun tahapan pembuatan media dalam penelitian ini meliputi :

a. Pembuatan Media Selektif

Media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung *nutrient* dengan komposisi pepton,

NaCl dan *beef extract*. Menimbang 2,8 g NA yang dilarutkan dalam 100 mL akuades kemudian menambahkan minyak zaitun sebanyak 1 mL. Memanaskan media dengan pemanas dan mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Menuangkan media selektif pada tabung reaksi secara aseptis lalu mendinginkan media hingga mengeras dan siap pakai.

b. Peremajaan Bakteri

Pada penelitian ini, bakteri yang digunakan yaitu isolat bakteri yang telah diambil dari tanah tercemar hasil isolasi penelitian sebelumnya oleh Pretti, (2022).

Peremajaan bakteri dilakukan menggunakan media agar selektif yang telah dibuat sebelumnya. Kemudian memindahkan bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dari isolat awalnya Pretti, (2022) sebanyak 1 ose secara zig-zag, ke dalam tabung reaksi media selektif, menutup kembali mulut tabung menggunakan sumbat diposisikan tabung dengan kemiringan 5 °. Kemudian, menginkubasi pada inkubator dengan suhu optimal selama kurang lebih 48 jam.

c. Pembuatan Media Starter

Menimbang 1,3 gram media *Nutrient Broth* lalu melarutkannya dalam 100 mL buffer fosfat, setelah itu menambahkan 2 tetes tween 80 dan 2 mL minyak zaitun. Kemudian memanaskan media dengan pemanas untuk melarutkan semua komponen pada media. Mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Lalu mendinginkan media dengan cara menghidupkan blower di *Laminar Air Flow*.

d. Pembuatan Media Fermentasi

Menimbang 6,5 gram media *Nutrient Broth* lalu melarutkannya dalam 500 mL buffer fosfat, lalu menambahkan 10 tetes *Tween* 80 dan 10 mL minyak zaitun. Kemudian memanaskan media dengan menggunakan pemanas untuk melarutkan semua komponen pada media. Mensterilisasi media menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah itu, diamkan media di *Laminar Air Flow* selama 24 jam.

3.3.3. Produksi Enzim Lipase

Produksi enzim lipase dilakukan setelah diketahui kondisi optimum pertumbuhan bakteri. Bakteri terpilih yang disimpan di dalam medium agar miring diambil sebanyak dua ose dan dimasukkan dalam media starter, kemudian diinkubasi pada shaker inkubator dengan kecepatan 110 rpm selama 24 jam. Sebanyak 10% volume media starter dipindahkan ke medium kultur (media fermentasi), dan diinkubasi kembali sesuai dengan waktu pertumbuhan optimum bakteri yakni selama 18 jam. Media produksi disentrifugasi untuk memisahkan filtrat dengan endapan. Filtrat yang dihasilkan merupakan ekstrak kasar enzim lipase, selanjutnya diuji aktivitas hidrolisisnya dengan metode Kwon *and* Rhee dan analisa protein dengan metode Lowry *et al.*

3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase Metode Lowry

Pembuatan pereaksi pada penentuan kadar protein metode Lowry antara lain adalah, sebagai berikut :

- a. Pereaksi Lowry A, 2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 N menjadi larutan dengan konsentrasi 2%.
- b. Pereaksi Lowry B, 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% dicampurkan dengan 3 mL NaK 1%.
- c. Pereaksi Lowry C, 2 mL pereaksi Lowry B dicampurkan dengan 100 mL pereaksi Lowry A.
- d. Pereaksi Lowry D, reagen *Folin-Ciocalteu* dan akuades dicampurkan dengan perbandingan 1:1 (v/v).

Kadar protein dalam media kultur diukur berdasarkan metode Lowry *et al*, 0,1 mL sampel enzim ditambahkan 0,9 mL akuades. Kemudian campuran ditambahkan 5 mL pereaksi Lowry C, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian ditambahkan pereaksi 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,

menggantikan larutan enzim 0,1 mL dengan akuades. Selanjutnya kadar protein dapat ditentukan nilainya dengan menghitung menggunakan persamaan 1 berikut.

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = \frac{(\text{Abs sampel} - \text{Kontrol}) - b}{a} \times \text{FP} : 1000 \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan :

Abs : Absorbansi

a : *Slope*

b : *Intersept*

FP : Faktor Pengenceran

1000 : Konversi gram ke mg

3.3.5. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Adapun aktivitas lipase yang dihasilkan, dapat ditentukan dengan penentuan aktivitas hidrolisis metode Kwon *and* Rhee dan penentuan aktivitas transesterifikasi metode Fu.

1. Penentuan aktivitas hidrolisis

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon *and* Rhee. Penentuan kurva standar asam oleat dilakukan dengan larutan induk asam oleat yang diambil, kemudian dibuatkan konsentrasi 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, dan 1000 ppm. Kemudian untuk melakukan uji aktivitas hidrolisis dengan enzim lipase sebanyak 0,70 mL ditambahkan 0,35 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan substrat minyak zaitun sebanyak 0,70 mL. Campuran tersebut diinkubasi pada kecepatan 120 rpm pada suhu 35 °C selama 15 menit. Setelah diinkubasi, campuran ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana, homogenkan larutan menggunakan vorteks selama 1 menit dan didiamkan selama 15 menit dengan suhu ruangan. Setelah terbentuk dua fase, fase minyak diambil sebanyak 3,20 mL. Kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% pH 7, lalu homogenkan larutan menggunakan vorteks. Perlakuan ini menggunakan kontrol yaitu akuades 0,70 mL yang ditambahkan 0,35 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan substrat minyak zaitun sebanyak 0,70 mL. Selain itu, digunakan blanko pelarut n-

heksana sebanyak 3,75 mL. Kemudian dilakukan penentuan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-*Vis* dengan panjang gelombang 715 nm. Penentuan aktivitas unit pada penentuan hidrolisis metode Kwon *and* Rhee, dapat dilihat pada persamaan 2.

$$\text{Aktivitas Unit (U/mL)} = \frac{\text{Kadar Asam Oleat}}{\text{Mr Asam Oleat}} \times \frac{V}{p \times q} \times \text{FP} \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan :

- Kadar Asam Oleat : Konsentrasi sampel
 V : Volume sampel (mL)
 p : Jumlah enzim yang ditambahkan (mL)
 q : Waktu Inkubasi (menit)
 FP : Faktor Pengenceran

2. Penentuan aktivitas transesterifikasi

Aktivitas transesterifikasi lipase diukur menggunakan metode yang dilakukan (Fu *et al.*, 2014) dengan beberapa modifikasi. Penentuan kurva standar *p-Nitrophenol Palmitat* dilakukan dengan larutan induk para-nitrophenol palmitat yang diambil, kemudian dibuatkan konsentrasi 200, 400, 600, 800, 1000, dan 1200 ppm. Kemudian untuk melakukan uji aktivitas transesterifikasi dilakukan dengan mencampurkan 0,01 M/mL substrat para-nitrofenol palmitat dengan isopropanol di dalam 500 μ L asetonitril. Sebanyak 1 ml enzim lipase kemudian diinkubasi selama 10 menit dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 50° C. Setelah reaksi, 15 μ L campuran diambil dan dicampurkan dengan 1485 μ L etanol dan diukur serapannya pada panjang gelombang 315 nm. Kontrol direaksikan dengan prosedur yang sama, namun tanpa penambahan enzim. Absorbansi sampel kemudian dibandingkan dengan kurva standar *p-NPP* dalam etanol untuk menentukan aktivitas enzim. Penentuan aktivitas unit pada penentuan transesterifikasi metode (Fu *et al.*, 2014) dapat dilihat pada persamaan 3.

$$\text{Aktivitas Unit (U/mL)} = \frac{\mu \text{ mol } p - NPP}{t \text{ (menit)}} \times \text{FP} \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan :

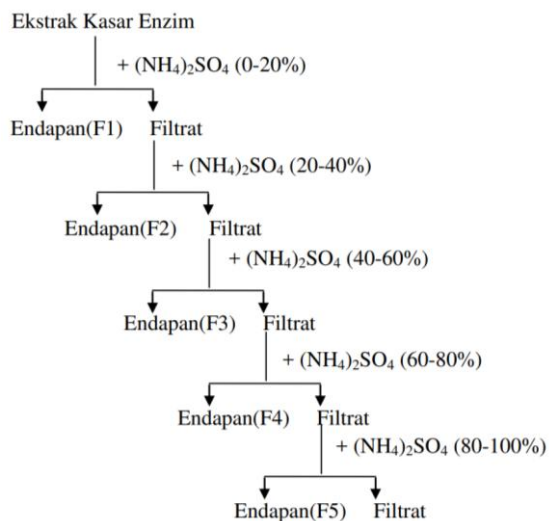
- $\mu \text{ mol } p - NPP$: Konsentrasi $p - NPP$
 t : Waktu Inkubasi (menit)
 FP : Faktor pengenceran

3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase

Adapun beberapa tahapan pemurnian enzim dilakukan dengan fraksinasi menggunakan ammonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, dialisis menggunakan kantong selofan, serta kromatografi filtrasi gel.

a. Fraksinasi dengan amonium sulfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$

Ekstrak kasar enzim ditambahkan garam ammonium sulfat secara perlahan sambil diaduk dengan magnetik 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 Kwon *and* Rhee, serta diukur kadar proteinnnya dengan metode Lowry *et al*, untuk mengetahui pada fraksi mana saja terdapat enzim lipase dengan aktivitas spesifik yang tinggi. 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) %. Diagram alir proses pemurnian fraksinasi dengan ammonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Skema proses pengendapan protein enzim dengan ammonium sulfat.

b. Dialisis

Endapan enzim yang telah dilarutkan dari tiap fraksi ammonium sulfat dengan aktivitas spesifik yang tinggi 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 bufer selama 4-6 jam agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara kontinu sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Untuk mengetahui bahwa sudah tidak ada lagi ion-ion garam dalam kantong, maka diuji dengan menambahkan larutan $\text{Ba}(\text{OH})_2$ atau BaCl_2 . Bila masih ada ion sulfat dalam kantong, maka akan terbentuk endapan putih BaSO_4 . Semakin banyak endapan yang terbentuk, maka semakin banyak ion sulfat yang ada dalam kantong.

c. Kromatografi filtrasi gel

Persiapan kolom (*sephadex G-75*) dilakukan dengan mengkalibrasi menggunakan buffer fosfat 0,05 M dan pH 7 dengan eluen sejumlah dua kali volume tabung kolom. Pembuatan matriks *sephadex G-75* dengan mengembangkan serbuk *sephadex G-75* menggunakan akuades, dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam (Rahmi dkk., 2020). Enzim hasil dialisis sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks *sephadex G-75* yang telah diaktivasi menggunakan buffer fosfat 0,05 M pH 7, kemudian dielusi dengan menggunakan

buffer fosfat 0,05 M pH 7. Sampel ditampung sebanyak 5 mL pada setiap tabung dengan menentukan laju alir (1 mL/ 4 menit) pada masing-masing sampel. Masing-masing fraksi ditentukan kadar proteinnya menggunakan metode Lowry dan aktivitas hidrolisis enzim menggunakan metode Kwon *and* Rhee serta aktivitas transesterifikasinya menggunakan metode Fu dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* (Rusman, 2017).

3.3.7. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim lipase dengan metode adsorpsi menggunakan matriks hidroksiapatit metode adsorpsi (Kharrat *et al.*, 2011) yang telah dimodifikasi yaitu; Adsorpsi enzim lipase 3 mL dengan menambahkan hidroksiapatit sebanyak 1 g, kemudian dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M sebanyak 3 mL (pH 7). Adsorpsi dilakukan selama 1 jam pada 4 °C dengan digoyangkan. Enzim lipase - adsorpsi ke hidroksiapatit dicuci dengan 20 mL aseton yang sebelumnya didinginkan pada suhu -20 °C, disaring menggunakan sentri, dipisahkan antara endapan dan filtratnya. Lipase imobil disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan. Hasil dari aktivitas lipase yang diimobilisasi didefinisikan sebagai rasio dari aktivitas yang teradsorpsi yang diperoleh kembali pada akhir periode imobilisasi dibagi dengan total aktivitas lipase yang dapat larut yang mula-mula ditambahkan ke dalam 1 g bahan pendukung.

3.3.8. Karakterisasi Enzim Lipase

Adapun karakterisasi enzim lipase pada penelitian ini dilakukan sebelum imobilisasi enzim lipase dan sesudah imobilisasi enzim lipase menggunakan penentuan aktivitas hidrolisis metode Kwon *and* Rhee. Penentuan yang dilakukan meliputi :

a. Optimasi pH

Penentuan optimasi pengaruh pH optimum, dilakukan uji aktivitas menggunakan substrat minyak zaitun dengan buffer fosfat 0,05 M dengan variasi pH yang

digunakan yaitu 5, 6, 7, dan 8. Larutan enzim yang telah dicampurkan dengan buffer fosfat dan substrat minyak zaitun lalu diinkubasi pada suhu optimum selama 15 menit. Kemudian larutan campuran enzim tersebut ditentukan absorbansinya untuk melihat aktivitas menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 715 nm.

b. Optimasi Suhu

Penentuan optimasi pengaruh suhu optimum terhadap aktivitas enzim dilakukan menggunakan substrat minyak zaitun dengan buffer fosfat 0,05 M pH optimum. Larutan enzim yang telah dicampurkan dengan buffer fosfat dan substrat minyak zaitun diinkubasi selama 15 menit dengan variasi suhu yang digunakan, yaitu 30, 35, 40, 45, 50, dan 55 °C. Kemudian larutan tersebut ditentukan absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 715 nm.

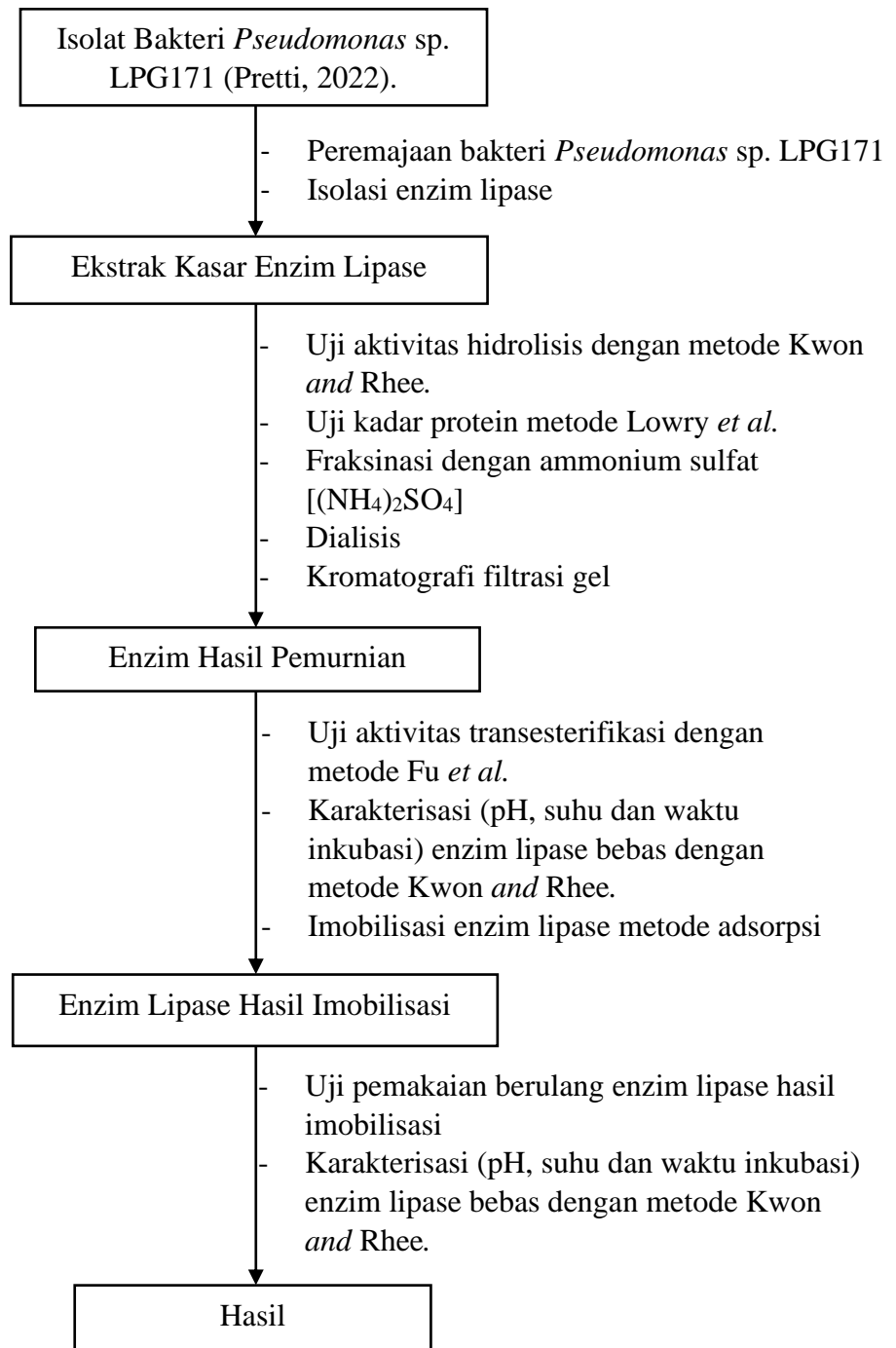
c. Optimasi Waktu Inkubasi

Penentuan optimasi pengaruh waktu inkubasi terhadap uji aktivitas enzim lipase juga dilakukan dengan menggunakan substrat minyak zaitun dan buffer fosfat 0,05 M pH optimum dan suhu optimum menggunakan variasi waktu inkubasi sekitar 10, 15, 20, 25, 30 dan 35 menit. Kemudian campuran larutan enzim yang sudah diinkubasi pada rentang waktu 10-30 menit ditentukan absorbansinya untuk melihat aktivitas unit enzim menggunakan spektrofotometer UV-*Vis* pada panjang gelombang 715 nm.

3.3.9. Uji Pemakaian Berulang Enzim Lipase Hasil Imobilisasi

Uji pemakaian berulang imobilisasi enzim lipase dilakukan dengan pengujian aktivitas enzim secara berulang setiap perlakuan, hingga didapatkan hasil akhir yang maksimal dengan metode (Firdaus dkk, 2017) yang telah dimodifikasi yaitu ; Sebanyak 1 gram enzim imobil ditambahkan 5 mL buffer fosfat pH 7 dan 5 mL substrat minyak zaitun, kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 15 menit pada suhu 35 °C dengan kecepatan 250 rpm, selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Produk yang dihasilkan diuji aktivitas enzimnya, sedangkan enzim imobil dicuci dengan buffer fosfat 20

mL pH 7, disaring, selanjutnya enzim imobil yang sudah dicuci digunakan kembali untuk penentuan aktivitas enzim lipase berikutnya. Secara keseluruhan, penelitian ini terangkum dalam diagram alir yang ditunjukkan dalam Gambar 10.



Gambar 10. Diagram alir penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

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

1. Enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 telah dimurnikan melalui kromatografi filtrasi gel memiliki aktivitas spesifik 80,15 U/mg dengan tingkat kemurnian 16,18 kali lipat dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim yang memiliki aktivitas spesifik 4,95 U/mg dari aktivitas hidrolisisnya.
2. Enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel pada aktivitas transesterifikasi memiliki aktivitas unit tertinggi pada fraksi 24 dengan aktivitas unitnya 31,08 U/mL.
3. Aktivitas hidrolisis enzim lipase bebas dan enzim lipase hasil imobilisasi yang dihasilkan tidak mengubah kondisinya, yaitu pada pH 7 dan waktu inkubasi 30 menit, tetapi suhu optimalnya meningkat dari 35 °C menjadi 50 °C.
4. Imobilisasi enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 menggunakan matriks hidroksiapatit didapatkan 14,4 gram enzim lipase hasil imobilisasi.
5. Hasil pemakaian berulang menunjukkan bahwa aktivitas unit dari enzim lipase hasil imobilisasi pada reaksi hidrolisis menurun dari 2,53 U/mL, menjadi 1,25 U/mL setelah 5 kali pemakaian, menunjukkan penurunan aktivitas hingga 50% dari aktivitas awalnya.

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, terdapat saran untuk penelitian selanjutnya, yaitu mengoptimalkan kembali proses pemurnian dialisis dan kromatografi filtrasi gel agar mendapatkan hasil yang lebih baik dari sebelumnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adio, O. Q., Kareem, S. O., Osho, M. B. and Omemu, A. M. 2015. Production of lipases in solid - state fermentation by *Aspergillus niger* F7-02 with agricultural residues. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **4**(06): 509–512.
- Agustine, L., Okfrianti, Y., and Jumiyati. 2018. Identifikasi total bakteri asam laktat (BAL) pada yoghurt dengan variasi sukrosa dan susu skim. *JDG.* **1**(2): 79-83.
- Andaka, G. 2008. Hidrolisis minyak biji kapuk dengan katalisator asam klorida. *J. Rek. Pros.* **2**(2): 45-48.
- Ariesta, R. 2009. Imobilisasi Enzim Lipase dari *Mucor Meichei* Menggunakan Matriks Polietilen. *Skripsi.* Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Atmanto, Y. K. A. A. A., Asri, L. A., Khadir, N. A. 2022. Media pertumbuhan kuman. *JMH.* **4**(1): 3069-3075.
- August, E. 2020. Kajian Lipase Amobil dari *Aspergillus niger* pada Pembuatan Monoasil Gliserol yang Bersifat Antibakteri dari Minyak Kelapa. *Skripsi.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Aziz, I. 2007. Kinetika Reaksi Transesterifikasi Minyak Goreng Bekas. *Skripsi.* Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Bariroh, A. 2014. Pengaruh Suhu terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Penicillium* sp dan *Trichoderma* sp. dalam Media Limbah Cair Tahu dan Dedak. *Skripsi.* Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Malang.

- Buchori, L. Istadi, I., dan Purwanto, P. 2015. Pengembangan proses produksi biodiesel sebagai bahan bakar alternatif. *Pros. Sem. Nas. Tekim.* 1-9.
- Boyd, R. F. 1995. *Basic Medical Microbiology*. Little, Brown. USA.
- Cahyaningrum, S. E. 2009, Peranan Jembatan Kation Logam Dalam Imobilisasi Papain Pada Kitosan. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Chen, H., Li, Z., and Liu, Z. 2019. Biodiesel production with immobilized lipase. *J. Biotechnol. Adv.* 628-634.
- Dali, S. Firdaus., Rusman, H. J. 2017. Produksi dag dari *Virgin Coconut Oil* (VCO) melalui reaksi transesterifikasi menggunakan enzim lipase dedak padi *Oryza sativa* L spesifik C19-20 terimobilisasi karbon aktif sebagai biokatalis. *J. Pen. Kim.* **5**(1): 769-777.
- Damaso, M. P. 2008. Utilization of Agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* **39**: 676-681.
- Dwidjoseputro, D. 1985. *Dasar - Dasar Mikrobiologi*. Djambatan. Jakarta.
- Elly, K. 2009. Pembuatan konsentrat protein dari biji kecipir dengan penambahan HCL. *J. Pen. Tek.* **9**(2): 115 – 122.
- Fadhullah, M., Sumantri, I., And Fitria, D. 2018. Reusability of immobilized lipase from *Bacillus subtilis* in biodiesel production: effect of operational conditions. *Indo. J. Chem.* **18**(2): 214-221.
- Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D., and Hernandez, J. LM. 2006. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *J. FoodTech. Biotechnol.* **44**(2): 235-240.
- Fardiaz. 1989. *Mikrobiologi Pangan*. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Firdaus., Dali, S., dan Rusman, H. J. 2017. Imobilisasi enzim lipase dedak padi (*Oryza sativa* L.) pada karbon aktif: karakterisasi, dan uji stabilitas kerja enzim imobilisasi. *Indo. J. Chem. Res.* **5**(1): 32-36.
- Fu, X., Zheng, J., Ying, X., Yan, H., and Wang, Z. 2014. Investigation of lipozyme TL IM-catalyzed transesterification using ultraviolet spectrophotometric assay. *Chinese. J. Catal.* **35**(4): 553-559.
- Gilbert, J. E. C., Jones., and Pabai. 1996. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, EF2. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2223-2229.

- Hermawati, B.D. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas aeruginosa* sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Kelapa Sawit dengan Sukrosa. *Skripsi*. Depok. Universitas Indonesia.
- Hidayat, N. 2006. *Mikrobiologi Industri Edisi Pertama*. Andi Offset. Yogyakarta.
- Indah, I., Mappiratu, M., dan Musafira, M. 2017. Produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* isolat kapang kopra dengan menggunakan medium kelapa parut. *J. Ris. Kim.* **3**(3): 269.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Heuvel, M. V., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS. Microbiol. Rev.* **15**(1): 29-63.
- Jawetz, E. Melnick, Adelberg. 2001. *Medical Microbiology*. Salemba Medika. Jakarta.
- Jawetz, E., and Adelberg. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Jegannathan, K, R., S. Abang, D. Poncelet, E. S. Chan, P. and Ravindra. 2008. Production of biodiesel using immobilized lipase-A. *J. Crit. Rev. Biotechnol.* **28**(4): 253-64
- Judoamidjoyo, M. A. A., Darwis, E. G., dan Sa'id. 1992. Teknologi fermentasi. diterbitkan atas kerja sama dengan PAU. *Pros. Biotek*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Kamelia, R., M. Sindumarta., dan D. Natalia. 2005. Isolasi dan karakterisasi protease intraseluler termostabil dari bakteri *Bacillus stearothermophilus* RP1. *Sem. Nas. MIPA*. Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor.
- Kasipah, C., Rismayani, S., and Nurachman, Z. 2013. Isolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim lipase ekstraseluler dari lumpur aktif instalasi pengolahan air limbah industri tekstil. *JAT.* **28**(1): 1-7.
- Kharrat, N., Ali, Y. Ben, Marzouk, S., Gargouri, Y. T., and Karra-Châabouni, M. 2011. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme. *J. Process. Biochem.* **46**(5): 1083-1089.
- Koes. 2006. *Mikrobiologi Menguak Dunia Mikroorganisme*. Rama Widaya. Bandung.
- Kordi, M. G. H. K. 2004. *Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan*. Rineka Cipta. Jakarta.

- Krajewska, B. 2004. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. *J. Enz. Microbiol. Technol.* **35**(1): 126-139.
- Kurnia, D. R. D. 2010. Studi Uji Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* Sebagai Biokatalisis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol. *Tesis*. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Kwon, D. Y., and Rhee, J. S. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **63**(1): 89-92.
- Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lehninger, A.L. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Liu, Y., Zhang, W., Yang, Y., and Xu, Y. 2020. Characterization and optimization of lipase immobilization on chitosan microspheres and its application in biodiesel production. *J. Mol. Catal., B. Enzym.* **167**: 75-84.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265-275.
- Mahardhika, W.A., Romario, D., dan Mochammad, F.Q.N. 2021. Isolasi dan karakterisasi kapang filoplan serta serasah daun di lingkungan laboratorium biologi Universitas Diponegoro dengan metode contact plate. *JBIB*. **23**(1): 6-10.
- McMurry, J., and Castellion, M. E. 1992. *Fundamental of General Organic and Biological Chemistry*. Prentice Hall Inc. New Jersey.
- Mulya, D., Zahrina, I., dan Helwani, Z. 2020. Esterifikasi asam lemak dengan katalis enzim pada sintesis emulsifier. *JOM*. **7**(2): 1-5.
- Nishio, T. T., Chikano, and M. Kamimura. 1987. *Tracylglycerol dalam Enzyme Handbook*. Springer-Verlag. New York.
- Nopiani, Yandri, AS., Hadi, S. 2016. Peningkatan kestabilan enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan imobilisasi menggunakan bentonit. *J. Anal. Kes.* **5**(1): 504-510.
- Noureddini, H., Gao, H, and Philkana R. S. 2004. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *JBLOT*. **1**(96): 769-777.
- Noviyanti, A. R., Haryono, H., Pandu, R., dan Eddy, D. R. 2017. Cangkang telur ayam sebagai sumber kalsium dalam pembuatan hidroksiapatit untuk aplikasi graft tulang. *J. Chimica et Natura Acta*. **5**(3): 107.

- Payne, G., V. Bringi, C. Prince, M. and Shuler. 1992. *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers. Munich-Vienna.
- Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D., and Castro, G. R. 2006. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *J. FoodTech. Biotechnol.* **44**(2): 47-52.
- Pertiwi, M. K., Wulandari, K. K., Rodja, H. A., Urjiyah, U. G., Fibriani, E., dan Putri, F. A. 2021. Teknik diagnostik konvensional dan lanjutan untuk infeksi bakteri dan resistensi antibakteri di Indonesia. *J. Art. Widya. Biol.* **12**(2): 98-116.
- Pratiwi, D. S., Firman, I. T., dan Jamilah. 2013. Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* dengan menggunakan Induser Minyak Zaitun Serta Kofaktor Na⁺ dan Co⁺. *Skripsi*. Departemen Kimia dan Biologi Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.
- 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.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar - Dasar Biokimia*. UI-Press. Jakarta.
- Rahmi, H., Hariyanti, R., Putri, A., dan Wulandari, D. 2020. Analysis of protease and lipase fractionation originated from the digestive tract of vannamei shrimp *litopenaeus vannamei*. *JBBI.* **7**(2): 194–202.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Kedokteran EGC. Jakarta.
- Radzimska, K.A., and Jesinowski, T. 2014. Zinc oxide - from synthesis to application. *JM.* **7**(4): 2833-2881
- Rusman, H. J. 2017. Potensi dan imobilisasi enzim lipase dari dedak padi *Oryza sativa linnaeus* serta aplikasinya dalam mengkatalis reaksi transesterifikasi dan amidasi menggunakan substrat minyak kelapa murni. *J. Afr. Potent. Ecol. Intensif. Agric.* **5**(1): 211–213.
- Safitri, R. 2010. *Medium Analisis Mikroorganisme Isolasi dan Kultur*. Trans Info Media. Jakarta.
- Sediawan, W. B. 2000. Berbagai teknologi proses pemisahan. *Pros. Pres. Ilm. Daur Ulang Bahan Bakar Nuklir V P2TBDU dan P2BGN*. Batan. Jakarta.
- Seniwati., Dali, Abd., Rauf, P. M., Noor, J. A. P., dan Pirman. 2010. Pengaruh Substrat dan Ion Logam terhadap Aktivitas Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopro Berjamur. *Tesis*. UNHAS, Makassar.

- Shah, A. A., Hameed A., and Hasan, F. 2009. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. *J. Biothechnol. Adv.* **27**(2): 782-796.
- Shahib, N. 2005. *Biologi Molekular Medik I*. Unpad Press. Bandung.
- Soedigdo. 1988. *Metode Penelitian Biokimia*. PAU Bioteknologi ITB. Bandung.
- Suarni dan Herman, S. 2013. Potensi pengembangan jagung dan sorgum sebagai sumber pangan fungsional. *JPPP*. **32**(2): 47-55.
- Supriyatna, A. D., Amalia, A. A., Jauhari, D., and Holydaziah. 2015. Aktivitas enzim amilase, lipase, dan protoase dari larva. *J. Inf. Tek. Ekonom. Kes.* **9**(2): 18-32.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., and Wang, F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *J. Biothechnol. Adv.* **28**(4): 628-634.
- Tjampakasari, R., dan Kusmaryeni, D. 2021. Stabilitas dan reusabilitas enzim lipase terimmobilisasi pada matriks kitosan untuk produksi biodiesel. *JTIP*. **32**(2): 190-201.
- Wahyudiati, D. 2017. *Biokimia*. Leepim Mataram. Mataram.
- Wang, K., Yang, H., Zhu, L., Liao, J., Lu, T., Xing, W., Xing, S., and Lv, Q. 2009. Direct electrochemistry and electrocatalysis of glucose oxidase immobilized on glassy carbon electrode modified by nafton and ordered mesoporous. *J. Mol. Catal., B. Enzym.* **58**: 194- 198.
- Wheeler, B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Zhang, H., Wang, Y., and Huang, L. 2018. Performance of immobilized lipases for biodiesel production: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **93**(9): 2519-2530.