

**IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp.
LPG172 SECARA ADSORPSI MENGGUNAKAN MATRIKS ZEOLIT
ALAM LAMPUNG**

(Skripsi)

Oleh

**FITRIANA ARTIKA SARI
NPM 2017011031**



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

ABSTRAK

IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172 SECARA ADSORPSI MENGGUNAKAN MATRIKS ZEOLIT ALAM LAMPUNG

Oleh

Fitriana Artika Sari

Dalam penelitian ini, dilakukan imobilisasi enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 menggunakan matriks zeolit alam Lampung. Tahap penelitian dilakukan dengan memproduksi ekstrak kasar lipase yang kemudian dimurnikan dengan fraksinasi ammonium sulfat, dialisis dan kromatografi kolom filtrasi gel sephadex G-75. Lipase hasil pemurnian diimobilisasi menggunakan zeolit alam Lampung teraktivasi dan ditentukan kondisi optimumnya. Ekstrak kasar enzim lipase mempunyai aktivitas sebesar 34,60 U/mL dengan kadar protein sebesar 3,34 mg/mL. Fraksi enzim hasil pemurnian dengan kromatografi kolom filtrasi gel sephadex G-75 memiliki kadar protein sebesar 0,69 mg/mL dengan nilai aktivitas hidrolisis serta transesterifikasi masing-masing sebesar 1.615,33 U/mL dan 1.178,80 U/mL. Setelah diimobilisasi menggunakan matriks zeolit alam Lampung teraktivasi aktivitas hidrolisis dan transesterifikasi enzim lipase masing-masing menjadi 1.205,67 U/mL dan 1.108,80 U/mL.

Proses imobilisasi lipase *Klebsiella* sp. LPG172 menggunakan zeolit alam Lampung teraktivasi mengubah kondisi optimum pada kedua aktivitas enzim. Pada reaksi hidrolisis, lipase bebas memiliki kondisi optimum pH 7, suhu 80°C dengan waktu inkubasi selama 25 menit. Namun, setelah diimobilisasi lipase bekerja secara optimal pada pH 8, suhu 50°C serta waktu inkubasi selama 15 menit. Sedangkan dalam reaksi transesterifikasi, lipase bebas memiliki kondisi optimum pada pH 7, suhu 70°C dengan waktu inkubasi 25 menit. Setelah diimobilisasi lipase bekerja secara optimal pada pH 8, suhu 60°C dengan waktu inkubasi selama 10 menit.

Kondisi optimum yang diperoleh digunakan dalam uji stabilitas lipase imobil terhadap pemakaian berulang. Pada reaksi hidrolisis, lipase imobil dapat dilakukan pemakaian 2 kali dalam siklus reaksi dengan aktivitas sisa sebesar 43,09% dari aktivitas awal. Sedangkan pada reaksi transesterifikasi pemakaian enzim lipase imobil dapat dilakukan sebanyak 3 kali siklus reaksi dengan persen aktivitas akhir sebesar 55,98%.

Kata kunci: hidrolisis, imobilisasi, *Klebsiella* sp. LPG172, lipase, transesterifikasi, zeolit alam Lampung.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM ISOLATE *Klebsiella* sp. LPG172 BY ADSORPTION USING LAMPUNG NATURAL ZEOLIT MATRIX

By

Fitriana Artika Sari

In this research, the immobilization of lipase from *Klebsiella* sp. LPG172 was carried out using natural zeolite from Lampung. The research involved producing a crude lipase extract, which was subsequently purified through ammonium sulfate fractionation, dialysis, and sephadex G-75 gel filtration chromatography. The purified lipase was then immobilized using activated natural zeolite from Lampung, and its optimal conditions were determined. The crude lipase extract exhibited an activity of 34.60 U/mL with a protein concentration of 3.34 mg/mL. The enzyme fraction obtained from sephadex G-75 gel filtration chromatography had a protein concentration of 0.69 mg/mL, with hydrolysis and transesterification activities of 1615.33 U/mL and 1178.80 U/mL, respectively. After immobilization with activated natural zeolite from Lampung, the lipase hydrolysis and transesterification activities were 1205.67 U/mL and 1108.80 U/mL, respectively.

The immobilization of *Klebsiella* sp. LPG172 lipase using natural zeolite from Lampung altered the optimal conditions for both enzyme activities. For the hydrolysis reaction, free lipase had optimum conditions at pH 7, a temperature of 80°C, and an incubation time of 25 minutes. However, after immobilization, the lipase worked optimally at pH 8, a temperature of 50°C, and an incubation time of 15 minutes. In the transesterification reaction, free lipase had optimum conditions at pH 7, a temperature of 70°C, and an incubation time of 25 minutes. After immobilization, the lipase functioned optimally at pH 8, a temperature of 60°C, and an incubation time of 10 minutes.

The optimal conditions obtained were used to test the stability of the immobilized lipase against repeated use. In the hydrolysis reaction, the immobilized lipase could be used for 2 cycles with the final activity reducing to 43.09% of its initial activity. In the transesterification reaction, the immobilized lipase could be used for 3 cycles with a final activity percentage of 55.98%.

Keywords: hydrolysis, immobilization, *Klebsiella* sp. LPG172, lipase, transesterification, Lampung nature zeolite.

**IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp.
LPG172 SECARA ADSORPSI MENGGUNAKAN MATRIKS ZEOLIT
ALAM LAMPUNG**

Oleh

FITRIANA ARTIKA SARI

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 Penelitian : IMOBILISASI ENZIM LIPASE DARI ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172 SECARA
ADSORPSI MENGGUNAKAN MATRIKS
ZEOLIT ALAM LAMPUNG

Nama Mahasiswa : Fitriana Artika Sari

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011031

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

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

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



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



Anggota : Diky Hidayat, S.Si., M.Sc.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

NIP. 197110012005011002

Tanggal lulus ujian skripsi: 21 Agustus 2024

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitriana Artika Sari
NPM : 2017011031
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul **“Imobilisasi Enzim Lipase dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Secara Adsorpsi Menggunakan Matriks Zeolit Alam Lampung”** ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 22 Agustus 2024

Yang menyatakan,




Fitriana Artika Sari

NPM. 2017011031

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Fitriana Artika Sari dilahirkan di Lampung Tengah pada tanggal 11 Januari 2001. Penulis merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara, putri dari pasangan Bapak Kasno dan Ibu Partilah. Saat ini penulis bertempat tinggal di Desa Payung Rejo, Kecamatan Pubian, Kabupaten Lampung Tengah, Lampung.

Penulis mengawali jenjang pendidikan di Taman Kanak-Kanak (TK) PGRI Payung Rejo pada tahun 2006-2008. Selanjutnya, penulis menempuh pendidikan Sekolah Dasar (SD) di SD Negeri Payung Rejo pada tahun 2008-2014. Pada tahun 2014-2017 penulis melanjutkan pendidikannya di SMP Negeri 2 Pubian. Kemudian, tahun 2017-2020 penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 2 Pringsewu.

Pada tahun 2020, penulis diterima di perguruan tinggi melalui Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Lampung. Selama di perguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai kader muda Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) periode 2021, dan kemudian menjadi anggota inti di Bidang Sosial dan Masyarakat pada periode 2022.

Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Periode 1 tahun 2023 di Pekon Kampung Baru, Kecamatan Kota Agung Timur, Kabupaten Tanggamus, Lampung selama 40 hari dari bulan Januari-Februari 2023. Pada bulan Maret 2024, penulis

menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA, Universitas Lampung dengan judul “Studi Produksi dan Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Enzim Lipase dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Sebagai Biokatalisator Dalam Proses Pembuatan Biodiesel”. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Pada bulan Desember 2023-Juli 2024, penulis menyelesaikan penelitian yang dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Kimia Anorganik-Fisik FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Imobilisasi Enzim Lipase dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Secara Adsorpsi Menggunakan Matriks Zeolit Alam Lampung”.

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Dia mendapat (pahala) dari (kebajikan) yang dikerjakannya dan dia mendapat (siksa) dari (kejahatan) yang diperbuatnya.”

(Q.S Al-Baqarah: 286)

“Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan, maka apabila kamu telah selesai (dari satu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan lain).”

(Q.S. Al-Insyirah: 6-7)

“Bermimpilah setinggi langit. Jika engkau jatuh, engkau akan jatuh diantara bintang-bintang.”

(Ir. Soekarno)

“Jangan takut jatuh, karena yang tidak pernah memanjatlah yang tidak pernah jatuh. Jangan takut gagal, karena yang tidak pernah gagal hanyalah orang-orang yang tidak pernah melangkah. Jangan takut salah, karena dengan kesalahan yang pertama kita dapat menambah pengetahuan untuk mencari jalan yang benar pada langkah yang kedua.”

(Buya Hamka)

“Aku membahayakan nyawa ibuku untuk lahir ke dunia, jadi tidak mungkin aku tidak ada artinya.”

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah rabbil'alamiin, dengan segala puji syukur kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan segala nikmat, hidayah dan inayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Imobilisasi Enzim Lipase dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Secara Adsorpsi Menggunakan Matriks Zeolit Alam Lampung”** sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Dalam penulisan skripsi ini tentu tidak lepas dari segala kesulitan dan rintangan, namun semua itu dapat penulis lalui berkat restu dan ridho Allah SWT. serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada:

1. Cinta pertamaku Bapak Kasno dan pintu surgaku Ibu Partilah. Terima kasih atas segala pengorbanan dan tulus kasih yang diberikan. Terima kasih telah turut berjuang, memberikan segala bentuk dukungan, kasih sayang, kesabaran, dan keikhlasan dalam kebersamai penulis hingga sampai di titik ini. Semoga bapak dan ibu selalu diberikan kesehatan, panjang umur dan kebahagiaan selalu.
2. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si selaku pembimbing I yang senantiasa memberikan bimbingan, perhatian, ilmu, saran, nasihat dan memotivasi penulis untuk tetap semangat serta meluangkan banyak waktu, pikiran, tenaga dan kesabarannya selama proses penelitian dan penyelesaian skripsi ini. Semoga Ibu sehat, bahagia dan selalu dalam lindungan Allah SWT., semoga Allah SWT. membalas semua kebaikan Ibu.

3. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. selaku pembimbing II sekaligus ketua jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung yang juga selalu meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, saran dan dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Ibu sehat dan selalu dalam lindungan Allah SWT, semoga segala kebaikan Ibu dibalas oleh Allah SWT.
4. Bapak Diki Hidayat, S.Si., M.Si. selaku pembahas telah memberikan ilmu, kritikan, saran dan bantuan sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini. Semoga kesehatan dan kebahagiaan selalu menyertai Bapak.
5. Ibu Dr. Rinawati, Ph.D. selaku pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu serta memberikan perhatian, bimbingan, nasihat, saran, dan motivasi kepada penulis.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik serta memberikan ilmu pengetahuan yang sangat bermanfaat kepada penulis selama kuliah.
8. Seluruh karyawan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atas waktu serta pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.
9. Kakak-kakakku, Heri Suwandi, Ana Rusmiati dan Yuliana. Terima kasih telah senantiasa memotivasi dan menyemangati penulis untuk dapat menyelesaikan pendidikan hingga mendapat gelar sarjana. Semoga kesehatan dan kebahagiaan selalu menyertai kalian.
10. Keponakan-keponakanku, Raya, Davin, Nisa, Gilang, dan Jaya yang menjadi tempat menghibur diri ketika penulis merasa penat.
11. Sepupu-sepupu beserta keluarga besarku yang selalu mendoakan, mendukung dan menyemangati penulis.
12. Temanku Intan Aldara yang selalu setia mendengarkan segala bentuk keluh kesah dan celotehanku. Terima kasih karena tidak pernah bosan untuk tetap ada dan menemani segala proses yang dilewati penulis selama penyusunan skripsi ini.
13. Sahabatku sedari SMA, Deva Septia Sri Lutfi yang selalu ada ketika penulis merasa terpuruk atas segala cobaan yang penulis lewati selama ini. Terima

kasih atas segala perhatian, dukungan dan semangat sehingga penulis tidak pernah merasa sendirian.

14. Saudara sekaligus teman sedari kecilku, Pandu Winata yang banyak memberikan semangat dan motivasi serta menemani penulis hingga sampai di titik ini.
15. Irfan Hanafi, M. Rafli Akbar dan Siti Salwa Khotijah, terima kasih atas segala waktu yang diluangkan untuk sekedar memberikan hiburan, semangat dan kepeduliannya kepada penulis.
16. *Partner* penelitianku (BDN'20); Dyasmin Dwi Larasati, M. Fahrezi Cahaya Saputra, dan Bunga Mega Nurlinda. Terima kasih atas segala bentuk kerjasamanya dalam menyelesaikan permasalahan penelitian di laboratorium dan penyelesaian skripsi ini.
17. Sahabat-sahabatku sedari SMP; Sukma Meta Zulfia, Puput Putriya Ningsih, Alya Normawanti. Terima kasih telah tumbuh dan berkembang bersama dengan penulis dalam menggapai cita-cita.
18. '*Someone*' yang memotivasi dan memberikan dukungan serta dorongan semangat kepada penulis untuk terus bertahan dan bisa menyelesaikan skripsi ini.
19. Amelia Mareta, terima kasih sudah memberikan perhatian dan motivasi serta menjadi *partner* dalam mengerjakan tugas kuliah dan laporan praktikum selama perkuliahan.
20. Ratih Nurhidayati dan Ribka Angelina Gultom yang memberikan perhatian, motivasi dan semangat saat menjalani penelitian.
21. Teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biokimia, terima kasih bantuan, ilmu, kerjasama, dorongan semangat dan pengalaman yang dibagikan kepada Penulis selama penelitian berlangsung.
22. Teman-temanku di 'Chemistry C'. Terima kasih atas kenangan, kebersamaan dan kekompakannya selama perkuliahan.
23. Teman-teman Kimia'20 atas kebersamaan, bantuan, ilmu, pengalaman serta kenangannya selama perjalanan kuliah penulis.
24. Terima kasih kepada segala pihak yang membantu jalannya penyelesaian skripsi ini yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.

25. Terakhir kepada diriku sendiri Fitriana Artika Sari, terima kasih telah bertahan dan kuat sampai ditahap ini. Walau sering kali merasa lelah dan putus asa atas apa yang diusahakan dan belum berhasil namun terima kasih karena memilih untuk tetap berusaha dan tetap mencoba. Terima kasih karena memutuskan tidak menyerah sesulit apapun cobaan yang dilewati selama proses penyusunan skripsi ini dan menyelesaikannya sebaik dan semaksimal mungkin.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kata sempurna. Penulis memohon maaf atas segala kekurangan tersebut dan berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan bagi siapapun yang membaca, khususnya rekan-rekan mahasiswa kimia.

Bandar Lampung, 22 Agustus 2024

Penulis,

Fitriana Artika Sari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xix
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. Klasifikasi Bakteri.....	5
2.1.2. Identifikasi Bakteri.....	6
2.1.3. Bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	7
2.2. Enzim.....	8
2.2.1. Mekanisme Kerja Enzim.....	8
2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	9
2.3. Enzim Lipase.....	12
2.3.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya.....	13
2.3.2. Karakteristik Enzim Lipase dari <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	13
2.4. Aktivitas Enzim Lipase.....	14
2.4.1. Reaksi Hidrolisis.....	15
2.4.2. Uji Aktivitas Hidrolisis Lipase.....	16
2.4.3. Reaksi Transesterifikasi.....	16
2.4.4. Uji Aktivitas Transesterifikasi Lipase.....	18
2.4.5. Penentuan Kadar Protein Lipase.....	18
2.5. Imobilisasi Enzim.....	19
2.6. Zeolit.....	20
2.6.1. Zeolit Alam.....	22
III. METODE PENELITIAN	24
3.1. Waktu dan Tempat.....	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Prosedur Penelitian.....	25

3.3.1. Tahap Persiapan.....	25
3.3.2. Pembuatan Larutan untuk Penentuan Kadar Protein.....	26
3.3.3. Uji Aktivitas Enzim Lipase.....	27
3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase.....	28
3.3.5. Produksi Enzim Lipase.....	28
3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase.....	29
3.3.7. Aktivasi Zeolit Alam Lampung.....	30
3.3.8. Imobilisasi Enzim Lipase.....	30
3.3.9. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Imobil.....	30
3.3.10. Uji Stabilitas Enzim Imobil Terhadap Pemakaian Berulang...	31
3.4. Skema Penelitian.....	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1. Peremajaan Bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	33
4.2. Produksi Enzim.....	34
4.3. Enzim Hasil Pemurnian.....	35
4.3.1. Pemurnian Enzim dengan Ammonium Sulfat.....	35
4.3.2. Pemurnian Enzim Melalui Dialisis.....	36
4.3.3. Pemurnian Enzim Melalui Kromatografi Filtrasi Gel.....	37
4.4. Imobilisasi Enzim.....	39
4.5. Kondisi Optimum Enzim Lipase Imobil.....	41
4.5.1. pH Optimum.....	41
4.5.2. Suhu Optimum.....	42
4.5.3. Waktu Inkubasi Optimum.....	43
4.6. Stabilitas Enzim Imobil Terhadap Pemakaian Berulang.....	45
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
5.1. Kesimpulan.....	48
5.2. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA.....	50
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas enzim lipase pada setiap tahap pemurnian.....	39
2. Hubungan antara pemakaian berulang dengan persen aktivitas (%) enzim lipase imobil.....	47
3. Hasil pengukuran absorbansi BSA	56
4. Hasil pengukuran absorbansi asam oleat	57
5. Hasil pengukuran absorbansi p-Nitrophenol.....	58
6. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat fraksi 0-20% dan 20- 90% terhadap aktivitas enzim lipase dari isolat bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	59
7. Nilai kadar protein (A_{280}) enzim lipase hasil pemurnian dengan metode kromatografi filtrasi gel	60
8. Hubungan antara profil fraksi dengan nilai aktivitas enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel	61
9. Pengaruh pH terhadap aktivitas hidrolisis enzim lipase imobil.....	61
10. Pengaruh pH terhadap aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil.....	62
11. Pengaruh suhu terhadap aktivitas hidrolisis enzim lipase imobil	62
12. Pengaruh suhu terhadap aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil.....	62
13. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas hidrolisis enzim lipase imobil..	63
14. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil	63

15. Hasil uji stabilitas enzim lipase imobil terhadap pemakaian berulang pada reaksi hidrolisis 63
16. Hasil uji stabilitas enzim lipase imobil terhadap pemakaian berulang pada reaksi transesterifikasi..... 63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva hubungan suhu dengan kerja enzim	9
2. Kurva hubungan antara nilai pH dengan kerja enzim.....	10
3. Kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kerja enzim	11
4. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan katalis enzim lipase.....	15
5. Mekanisme reaksi yang terjadi pada saat uji aktivitas hidrolisis enzim lipase	16
6. Reaksi transesterifikasi.....	17
7. Mekanisme reaksi yang terjadi pada saat uji aktivitas transesterifikasi enzim lipase	18
8. Tipe-tipe imobilisasi.....	19
9. Struktur zeolit.....	20
10. Struktur kimia zeolit.....	22
11. Skema penelitian.	32
12. Isolat bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG 172 hasil peremajaan	33
13. Hasil fermentasi bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	34
14. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat (%) terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase.....	36
15. Hubungan antara A ₂₈₀ dengan nilai aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase hasil pemurnian dengan metode kromatografi filtrasi gel.	38
16. Perbedaan fisik serbuk zeolit alam Lampung (a) sebelum dan (b) sesudah dikalsinasi	40

17. Pengaruh pH terhadap (a) aktivitas hidrolisis dan (b) aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil.....	42
18. Pengaruh variasi suhu terhadap (a) aktivitas hidrolisis dan (b) aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil.....	43
19. Pengaruh waktu inkubasi terhadap (a) aktivitas hidrolisis dan (b) aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil.....	44
20. Hasil uji stabilitas (a) aktivitas hidrolisis dan (b) aktivitas transesterifikasi enzim lipase imobil terhadap pemakaian berulang.....	46
21. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	57
22. Kurva standar asam oleat	58
23. Kurva standar p-Nitrophenol.....	59

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim adalah protein yang berfungsi sebagai biokatalisator yang mempunyai spesifisitas terhadap suatu reaksi yang dikatalisis dan molekul yang menjadi substratnya. Berdasarkan kemampuannya dalam mempercepat reaksi, enzim dapat dikelompokkan menjadi beberapa jenis. Salah satu jenis enzim tersebut adalah enzim hidrolase yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis. Beberapa contoh enzim hidrolase meliputi enzim esterase, enzim nuklease, enzim fosfatase, enzim protease dan enzim lipase (Poedjiadi, 2006).

Enzim lipase bersifat larut dalam air dan mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan ester dari triasilgliserol yang tidak larut, melepaskan asam lemak bebas, mono- atau diasilgliserolin ke *interface* minyak dan air (Oliveira *et al.*, 2014). Enzim lipase dapat diproduksi oleh semua organisme hidup, baik tumbuhan, hewan maupun mikroorganisme. Adapun tumbuhan yang dapat menjadi sumber lipase diantaranya biji *Caesalpinia bonducella* L., biji *Brassica napus* L., daging kelapa (*Cocos nucifera* L.) dan dedak padi (*Oryza sativa* L.). Pada hewan, enzim lipase dapat ditemukan di dalam pankreas, hati dan lambung (Fatimah, 2021).

Pada mikroorganisme, enzim lipase dapat dihasilkan dari berbagai jenis jamur dan bakteri. Jamur yang dapat menghasilkan enzim lipase seperti, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* dan *Fusarium*. Sedangkan bakteri penghasil lipase seperti, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, dan *Klebsiella* sp. (Sholeha dan Agustini, 2021). Salah satu jenis bakteri *Klebsiella* sp. yakni *Klebsiella* sp. LPG172 koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung. Bakteri tersebut dapat tumbuh dengan optimum pada media NA yang mengandung

minyak zaitun pada kondisi pH 7. Setelah bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 diinkubasi selama waktu inkubasi optimum 66 jam dilakukan pemanenan ekstrak kasar enzim lipase yang selanjutnya dimurnikan untuk memperoleh enzim lipase murni (Arif, 2022).

Enzim lipase banyak diaplikasikan dalam industri karena sifatnya sebagai biokatalis yang bekerja dengan selektif dan spesifik, efisien, ekonomis, tidak beracun, mempercepat reaksi tanpa produk samping dan ramah lingkungan. Hal ini membuat lipase banyak dimanfaatkan secara komersial dalam berbagai bidang, termasuk bidang industri pertanian, pangan, dan kesehatan. Dalam skala industri, lipase yang berasal dari mikroorganisme lebih menguntungkan karena mikroorganisme lebih mudah untuk dikembangkan, tidak memerlukan ruang dan tempat yang besar serta waktu yang lama (Wang *et al.*, 1979). Namun, lipase memiliki beberapa kekurangan, seperti harganya yang mahal, ketersediaan yang terbatas, dan sifatnya yang hanya dapat digunakan sekali karena sulitnya untuk memisahkan lipase dari substratnya, sehingga penggunaan lipase dalam industri menjadi terbatas. Selain itu, enzim lipase bebas memiliki sifat tidak stabil terhadap lingkungan. Salah satu cara untuk meningkatkan kestabilan dan mengatasi kelemahan dalam penggunaan enzim lipase tersebut adalah melalui imobilisasi enzim.

Imobilisasi enzim merupakan suatu proses pemerangkapan atau penahanan pergerakan molekul enzim pada suatu padatan atau matriks tertentu. Ketika digunakan, enzim imobil dapat berfungsi sebagai katalis tanpa larut dalam substrat sehingga setelah reaksi biokimia selesai, enzim imobil dapat dipisahkan dari produk dan digunakan kembali dalam beberapa siklus reaksi selanjutnya (Darwis dan Sukara, 1990). Selain bisa digunakan berulang kali, enzim imobil dalam industri memiliki beberapa keuntungan lain, seperti penggunaan produknya tidak terkontaminasi oleh enzim, mempermudah proses pengendalian reaksi, bisa digunakan dalam analisis, dan pada proses imobilisasi tertentu dapat meningkatkan kestabilan enzim. Agar diperoleh imobilisasi enzim yang kuat dengan aktivitas katalitik yang baik, metode imobilisasi dan padatan pendukung

yang dipilih harus tepat dan sesuai karena kedua hal tersebut sangat mempengaruhi aktivitas enzim imobil (Wang *et al.*, 1979).

Salah satu metode imobilisasi yang dapat dilakukan yaitu metode adsorpsi. Kelebihan dari teknik adsorpsi yaitu sederhana dan efektif karena tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim serta media dapat diregenerasi. Metode imobilisasi enzim dengan teknik adsorpsi memerlukan suatu padatan yang digunakan sebagai matriks pengadsorpsi. Matriks pengadsorpsi atau adsorben yang digunakan dalam imobilisasi enzim memiliki beberapa syarat, seperti area permukaannya luas, dapat ditembus, tidak dapat larut, memiliki stabilitas dan stabilitas termal yang baik, kekakuannya tinggi, mempunyai bentuk dan ukuran pori yang cocok, tahan terhadap serangan mikrobial dan dapat diregenerasi (Sari *et al.*, 2014).

Padatan yang umum digunakan sebagai matriks pengadsorpsi adalah zeolit, alumina dan silika. Zeolit alam Lampung mengandung silika (SiO_2) dan alumina (Al_2O_3). Zeolit adalah senyawa kimia yang memiliki banyak kegunaan serta ketersediannya di alam sangat melimpah. Dalam bidang industri, zeolit sering digunakan sebagai penjernih dan pengering. Zeolit cocok digunakan untuk mengeringkan bahan pangan, zat aditif dan tanaman obat yang umumnya sensitif terhadap panas, sehingga menghasilkan produk yang berkualitas atau bermutu tinggi. Zeolit merupakan zat penyerap yang tidak beracun, ramah lingkungan, mudah dalam penanganan, serta memiliki daya serap terhadap air yang sangat tinggi pada berbagai tingkat kelembaban udara. Adsorpsi dengan menggunakan zeolit dapat diterapkan secara fleksibel dimana penyerapan dapat dicampur dengan produk bahan makanan seperti biji-bijian, maupun ditempatkan secara terpisah dalam unit lain (Djaeni *et al.*, 2012). Mineral zeolit sering ditemukan di alam sebagai batuan sedimen vulkano dan memiliki struktur kerangka yang terdiri dari unit-unit tetrahedral (AlO_4)⁻⁵ dan (SiO_4)⁻⁴ yang saling terhubung melalui atom oksigen membentuk pori-pori zeolit, sehingga zeolit dapat digunakan sebagai matriks pengimobil dan menampung enzim hingga 79,78% (Sari *et al.*, 2014).

Berdasarkan sifat fisika dan kimianya, zeolit dimanfaatkan sebagai penukar ion, penyaring molekul, adsorben dan katalis. Zeolit alam Lampung yang teraktivasi memiliki kemampuan adsorpsi yang lebih baik dan efisien dalam imobilisasi enzim. Berdasarkan hal diatas maka pada penelitian ini digunakan zeolit alam Lampung teraktivasi sebagai matriks pengadsorpsi dalam proses imobilisasi enzim lipase yang dihasilkan dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu sebagai berikut:

1. Mendapatkan enzim lipase dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
2. Melakukan imobilisasi enzim lipase hasil pemurnian dengan menggunakan matriks zeolit alam Lampung.
3. Mengetahui kondisi optimum enzim lipase imobil.
4. Mendapatkan enzim lipase imobil yang dapat digunakan secara berulang.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dalam menghasilkan enzim lipase serta dapat memberikan informasi mengenai kemampuan zeolit alam Lampung sebagai zat pengimobil enzim lipase sehingga enzim lipase dapat digunakan secara berulang.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri merupakan organisme mikroskopis yang memiliki struktur sederhana yaitu bersel tunggal, tidak memiliki nukleus atau membran inti sel, dan memiliki ukuran yang sangat kecil. Terdapat beberapa kriteria dalam pengelompokan bakteri, yaitu berdasarkan bentuk, jumlah dan posisi flagel, kebutuhan terhadap oksigen, karakteristik dinding sel, dan cara mendapatkan nutrisi. Keanekaragaman jenis bakteri yang ada di alam mendorong untuk dilakukannya identifikasi bakteri dalam keperluan pengujian (Artati dan Oman, 2019).

2.1.1. Klasifikasi Bakteri

Berdasarkan perbedaan kandungan dari dinding selnya, bakteri dapat digolongkan menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan sehingga dinding selnya kaku. Pada bagian luar peptidoglikan terdapat suatu senyawa yang disebut teichoat. Sedangkan bakteri gram negatif pada dinding selnya mengandung peptidoglikan dalam jumlah yang jauh lebih sedikit, akan tetapi dibagian luar peptidoglikan terdapat membran luar yang tersusun atas lipoprotein dan fosfolipid serta mengandung lipopolisakarida. Karena perbedaan komposisi dinding sel tersebut, bakteri gram positif dan negatif memiliki ketahanan yang berbeda. Bakteri gram positif lebih rentan terhadap antibiotik penisilin karena antibiotik tersebut dapat merusak peptidoglikan. Sebaliknya, karena jumlah peptidoglikan yang lebih banyak, bakteri gram positif biasanya lebih tahan terhadap kerusakan mekanisme (Rini dan Rochmah, 2020).

2.1.2. Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui dan menentukan jenis bakteri yang diuji. Terdapat beberapa metode mikroskopis yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri. Adapun metode tersebut yaitu sebagai berikut:

a) Pemeriksaan Langsung

Pemeriksaan langsung digunakan untuk mengobservasi pergerakan dan pembelahan bakteri secara biner, mengamati bentuk dan ukuran yang alami, yang pada saat mengalami fiksasi panas serta proses pewarnaan mengakibatkan beberapa perubahan. Suatu metode mikroskop yang baik adalah dengan membuat sediaan tetesan gantung, karena bakteri yang diamati dalam keadaan utuh (Kusnadi, 2012).

b) Teknik Pewarnaan

Menurut Kusnadi (2012), teknik pewarnaan dikelompokkan menjadi beberapa jenis, berdasarkan respon sel bakteri terhadap bahan pewarna dan sistem pewarnaan yang digunakan yaitu:

1. Untuk memisahkan kelompok bakteri maka digunakan pewarnaan Gram, dan pewarnaan “*acid-fast*” (tahan asam) untuk genus *Mycobacterium*.
2. Untuk melihat struktur digunakan pewarnaan *flagella*, pewarnaan kapsul, pewarnaan spora, dan pewarnaan inti. Pewarnaan Neisser atau Albert digunakan untuk melihat granula metakromatik (*volutin bodies*) pada *Corynebacterium diphtheria*.

c) Media Selektif dan Differensial

Media selektif adalah jenis media kultur yang diformulasikan khusus untuk pertumbuhan organisme tertentu dan menghambat pertumbuhan organisme lain. Dalam hal ini, media selektif digunakan untuk mengisolasi kelompok bakteri khusus. Media ini dilengkapi dengan zat kimia untuk menghambat pertumbuhan satu jenis bakteri dan menyebabkan pertumbuhan yang lain sehingga

memudahkan isolasi bakteri yang diinginkan. Sedangkan media differensial digunakan untuk membedakan kelompok bakteri berdasarkan sifat morfologi dan biokimianya. Media ini dilengkapi dengan campuran zat kimia, yang setelah diinokulasi dan diinkubasi akan menghasilkan perubahan karakteristik pada pertumbuhan bakteri dan/atau di sekitar koloni yang menyebabkan perbedaan. Beberapa contoh dari kedua media tersebut seperti agar garam mannitol, agar darah, agar McConkey, agar *eosin-methylene blue* (EMB agar), agar darah telurit, agar tioglikolat/tarrozi (perbenihan anaerob), agar TCBS dan agar monsur, agar coklat atau Thayer-Martin dan medium agar Lowenstein-Jensen (Kusnadi, 2012).

2.1.3. Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu bakteri *Klebsiella* sp. LPG172. *Klebsiella* sp. LPG172 merupakan jenis bakteri gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* yang bersifat nonmotile (tidak bergerak). Mereka cenderung lebih pendek dan lebih tebal dibandingkan dengan yang lain dalam famili *Enterobacteriaceae*. Sel-selnya memiliki bentuk batang dan umumnya memiliki lebar 0,3-1,5 μm dengan panjang 0,5-5,0 μm . Mereka dapat ditemukan sebagai individu, berpasangan, dalam rantai, atau terhubung ujung ke ujung. *Klebsiella* sp. LPG172 dapat tumbuh di laboratorium biasa dan tidak memiliki persyaratan pertumbuhan khusus seperti anggota *Enterobacteriaceae* lainnya. Spesies ini bersifat aerobik tetapi juga dapat menjadi anaerobik secara fakultatif. Suhu pertumbuhan yang ideal adalah 35-37°C sedangkan tingkat pH idealnya adalah sekitar 7,2 (Shi *et al.*, 2020).

Menurut Fitriyani *et al.* (2020), ditemukan isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dalam tanah yang biasa dipergunakan sebagai tempat pembuangan sampah atau limbah. Hasil skrining menunjukkan bahwa tanah tersebut merupakan habitat bagi mikroorganisme penghasil enzim hidrolitik. Kondisi tanah sebagai tempat penimbunan sampah atau limbah menyebabkan tanah mengandung bahan organik yang tinggi dan dapat dijadikan sebagai substrat bagi mikroorganisme asli dalam

tanah. Hal ini mengakibatkan mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim ekstraseluler hidrolitik.

2.2. Enzim

Enzim merupakan protein fungsional yang memiliki bagian aktif yang dapat melipat (*folding*) karena berinteraksi dengan bagian aktif dari substrat, sehingga dapat mengkatalisis perubahan senyawa tertentu menjadi senyawa lain. Peran enzim sebagai biokatalisator adalah untuk mempercepat reaksi kimia dengan cara menurunkan energi bebas pengaktifan (ΔG) sehingga dihasilkan keadaan transisi lebih rendah (Wirahadikusumah, 1977). Suatu enzim dapat mempercepat suatu reaksi 10^8 hingga 10^{11} kali lebih cepat dibandingkan dengan reaksi tanpa katalis. Enzim mempunyai massa molekul mulai dari 12.000 hingga lebih dari 1 juta. Enzim bersifat spesifik dalam kerja katalitiknya. Karakteristik tersebut disebabkan oleh bentuk yang unik dan adanya kelompok gugus polar dan non-polar dalam struktur enzim (Fessenden dan Fessenden, 1992).

Menurut Chaplin and Bucke (1990), kestabilan enzim sebagai katalis dibandingkan dengan katalis sintetik antara lain yaitu sebagai berikut:

1. Enzim memiliki spesifitas yang lebih tinggi.
2. Enzim bekerja secara spesifik (hanya mengkatalisis substrat tertentu).
3. Dalam proses reaksinya tidak menghasilkan produk samping yang tidak diinginkan.
4. Mempunyai produktivitas yang lebih tinggi.
5. Produk akhir umumnya tidak terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi atau pemurnian dan mengurangi dampak negatif terhadap lingkungan.

2.2.1. Mekanisme Kerja Enzim

Enzim berfungsi sebagai katalis dalam proses reaksi biokimia yang terjadi di dalam sel maupun reaksi biokimia yang terjadi di luar sel. Enzim bekerja dengan

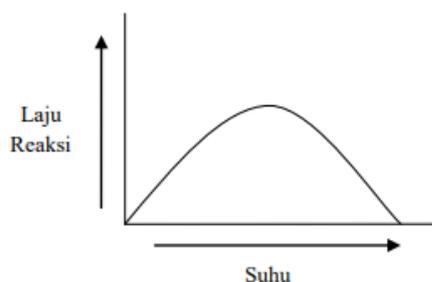
cara berinteraksi dengan molekul substrat untuk menghasilkan senyawa intermediet melalui suatu reaksi kimia organik yang memerlukan energi aktivasi yang lebih rendah, sehingga mempercepat reaksi kimia karena reaksi kimia dengan energi aktivasi yang lebih tinggi membutuhkan waktu yang lebih lama. Meskipun senyawa katalis dapat mengalami perubahan pada awal reaksi, pada akhir reaksi molekul katalis akan kembali ke bentuk semula. Enzim mempercepat reaksi dengan meningkatkan laju reaksi. Enzim meningkatkan laju reaksi dengan menurunkan energi aktivasi (energi yang diperlukan untuk reaksi) dari EA1 menjadi EA2. Penurunan energi aktivasi dilakukan dengan membentuk kompleks dengan substrat (Wahyudiati, 2017).

2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor. Adapun faktor-faktor tersebut yaitu sebagai berikut:

1. Temperatur

Aktivitas suatu enzim sangat bergantung pada suhu lingkungannya. Setiap peningkatan suhu sebesar 10°C , kecepatan enzim akan mengalami peningkatan 2 kali lipat, hingga mencapai suhu maksimum. Suhu yang terlalu tinggi umumnya dapat menonaktifkan atau mendenaturasi enzim karena enzim merupakan suatu protein. Enzim yang tahan terhadap panas bekerja secara optimal pada suhu 37°C , sementara enzim hewan berdarah dingin bekerja optimum pada suhu 25°C . Dan bakteri yang hidup di air panas memiliki enzim yang bekerja paling optimal pada suhu 70°C (Suhara, 2009).

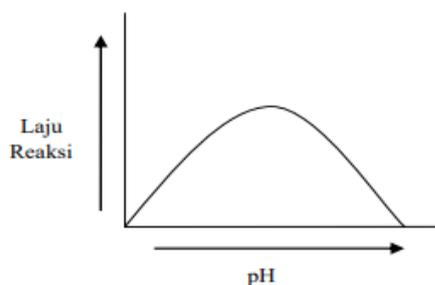


Gambar 1. Kurva hubungan suhu dengan kerja enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

Pada Gambar 1 dijelaskan bahwa pada awalnya, seiring dengan peningkatan suhu maka laju reaksi enzim semakin meningkat. Hal tersebut disebabkan karena adanya peningkatan energi kinetik molekul yang meningkatkan jumlah tumbukan yang efektif antara enzim dan substrat. Pada keadaan tertentu maka enzim akan mencapai titik optimumnya, yang mana pada titik tersebut laju reaksi yang paling cepat dapat terjadi. Setelah melewati suhu optimumnya, seiring dengan terus meningkatnya suhu maka enzim akan mengalami penurunan laju reaksi akibat adanya denaturasi (Sholeha dan Agustini, 2021).

2. Derajat Keasaman (pH)

Sama halnya dengan protein, aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungannya. Enzim bekerja dengan optimal pada pH tertentu yang disebut pH optimum. Tingkat keasaman yang optimal untuk aktivitas enzim umumnya mendekati pH netral, berkisar antara 6-8. Di luar rentang tersebut, aktivitas enzim dapat terganggu bahkan dapat mengalami denaturasi (Wahyudiati, 2017).



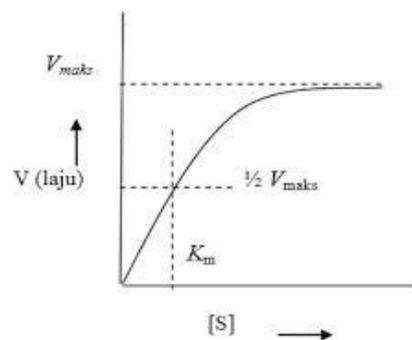
Gambar 2. Kurva hubungan antara nilai pH dengan kerja enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

Dapat dilihat pada Gambar 2 bahwa apabila enzim diberikan kondisi pH yang terlalu rendah maka aktivitas enzim akan menurun, begitupun jika pH terlalu tinggi.

3. Konsentrasi Substrat

Penambahan konsentrasi substrat pada reaksi yang dikatalisis oleh enzim pada awalnya akan meningkatkan kecepatan reaksi. Namun, setelah konsentrasi substrat dinaikkan lebih lanjut, kecepatan reaksi akan mencapai titik jenuh dan

tidak bertambah lagi. Setelah mencapai titik jenuh, penambahan kembali konsentrasi substrat tidak akan berpengaruh terhadap kecepatan reaksi. Pada keadaan kecepatan reaksi jenuh oleh konsentrasi substrat, penambahan enzim dapat meningkatkan kecepatan reaksi. Peningkatan kecepatan reaksi oleh peningkatan konsentrasi enzim akan meningkatkan kecepatan reaksi hingga terbentuk titik jenuh yang baru. Pada konsentrasi enzim yang tetap, peningkatan konsentrasi substrat akan menaikkan kecepatan reaksi enzimatik sampai mencapai kecepatan maksimum yang tetap (Wahyudiati, 2017). Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kerja enzim (Sholeha dan Agustini, 2021).

4. Zat Penghambat (Inhibitor)

Proses kerja enzim dapat terhambat oleh zat penghambat atau inhibitor.

Menurut (Wahyudiati, 2017), terdapat dua jenis inhibitor, antara lain yaitu:

a. Inhibitor kompetitif

Inhibitor kompetitif menghambat kerja enzim dengan cara berikatan dengan enzim pada sisi aktifnya. Hal ini terjadi karena inhibitor memiliki struktur yang mirip dengan substrat dan berikatan dengan enzim pada pusat aktifnya. Akibatnya, enzim yang terikat dengan inhibitor tidak dapat memainkan perannya sebagai fasilitator.

b. Inhibitor non-kompetitif

Berbeda dengan inhibitor kompetitif, inhibitor non-kompetitif tidak bersaing dengan substrat untuk mengikat enzim. Inhibitor ini akan mengikat enzim pada

sisi yang berlainan (bukan sisi aktif). Jika terjadi ikatan enzim-inhibitor, sisi aktif enzim akan berubah sehingga substrat tidak dapat mengikat enzim. Banyak ion logam berat yang bekerja sebagai inhibitor non-kompetitif, misalnya Ag^+ dan Pb^{2+} .

2.3. Enzim Lipase

Salah satu hasil ledakan bioteknologi modern saat ini adalah industri enzim. Sebagian besar industri enzim diwakili oleh enzim lipase. Lipase adalah kelas enzim yang paling banyak digunakan dalam berbagai bidang bioteknologi. Lipase terdapat di alam dan ditemukan dalam banyak organisme uniseluler dan multiseluler. Lipase merupakan kelas enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis triasilgliserol menjadi senyawa turunannya yaitu asam lemak dan gliserol. Lipase banyak terdapat pada hewan, tumbuhan dan mikroorganisme, terutama lipase yang berasal dari bakteri akan lebih stabil dibandingkan lipase yang berasal dari makhluk hidup yang lain. Lipase bakteri secara komersil lebih baik karena lebih mudah dikembangkan karena tidak memerlukan waktu yang lama dan ruang yang besar serta optimalisasi untuk mendapatkan hasilnya lebih tinggi. Sebagian besar lipase bersifat ekstraseluler dan dapat diperoleh dengan baik menggunakan fermentasi terendam (SmF) atau dengan fermentasi keadaan padat (SSF). Mikroba lipolitik banyak ditemukan diberbagai habitat yang terkontaminasi minyak, limbah minyak nabati limbah susu dan makanan yang rusak. Minyak alami seperti zaitun, minyak kelapa, minyak sayur dapat meningkatkan aktivitas produksi lipase (Bharathi *et al.*, 2019).

Lipase (*triacylglycerol hydrolases*) (E.C.3.1.1.3) adalah enzim yang mempercepat pembentukan lipid atau sering disebut juga enzim lipolitik yang dapat menguraikan substrat lipid (Svendsen, 2000). Pada keadaan umum, lipase tidak memerlukan ko-faktor, bekerja di berbagai pH, tahan terhadap suhu tinggi, dan memiliki spesifisitas serta menunjukkan selektivitas terhadap regio (pembentukan isomer struktural sebagai produk utama yang dapat membentuk dua atau lebih isomer struktural), kemoselektivitas (reaksi salah satu gugus fungsional dari dua

gugus fungsional pada satu molekul) dan enantioselektivitas (kemampuan enzim untuk membedakan enantiomer substrat yang terikat). Sedangkan pada situasi atau keadaan tertentu, lipase dapat bertindak sebagai katalis dalam reaksi sintesis seperti esterifikasi, transesterifikasi, aminolisis dan laktonisasi (Celligoi *et al.*, 2017).

2.3.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya

Menurut Sholeha dan Agustini (2021), berdasarkan sumbernya enzim lipase dapat diklasifikasikan menjadi 3 kelompok, yaitu:

1. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari mamalia dibagi menjadi:
 - a) Lipase pada sistem pencernaan.
 - b) Lipase pada jaringan, seperti hati, paru-paru, ginjal dan jantung.
 - c) Lipase dalam air susu.

2. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari mikroorganisme dibagi menjadi:
 - a) Bakteri, seperti *Pseudomonas*, *Klebsiella* sp. LPG172 dan *Burkholderia*.
 - b) Kapang, seperti *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* dan *Fusarium*.
 - c) Khamir, seperti *Candida antartika* dan *C. rugosa*.

3. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari tumbuhan dibagi menjadi:
 - a) Triasilgliserol terdapat pada tanaman minyak sawit, kentang dan beras.
 - b) Asil hidrolase terdapat pada tanaman kentang.
 - c) Fosfolipase terdapat pada kol dan seledri.
 - d) *Lysophospholipase* terdapat pada tanaman gandum.

2.3.2. Karakteristik Enzim Lipase dari *Klebsiella* sp. LPG172

Setiap enzim memiliki spesifisitas dan karakteristik tertentu. Pada penelitian Arif (2022) dan Partini (2023), telah ditentukan kondisi optimum lipase dari *Klebsiella* sp. LPG172. Kondisi optimum ini meliputi pH, suhu dan waktu inkubasi. Kondisi

suhu optimum lipase bebas pada reaksi hidrolisis diperoleh sebesar 80°C dengan aktivitas unit sebesar 16,89 U/mL (Arif, 2022). Sedangkan pada reaksi transesterifikasi, lipase bebas dari *Klebsiella* sp. LPG172 memiliki suhu optimum sebesar 70°C dengan aktivitas unit 25,125 U/mL (Partini, 2023). Kemudian, pada reaksi hidrolisis dan transesterifikasi diperoleh kondisi pH optimum lipase bebas pada pH 7 dengan aktivitas unit sebesar 29,51 U/mL (Arif, 2022) dan 28,064 U/mL (Partini, 2023). Selanjutnya didapatkan waktu inkubasi optimum pada reaksi hidrolisis dan transesterifikasi selama 25 menit dengan masing-masing aktivitas unit sebesar 21,86 U/mL (Arif, 2022) dan 25,92 U/mL (Partini, 2023).

2.4. Aktivitas Enzim Lipase

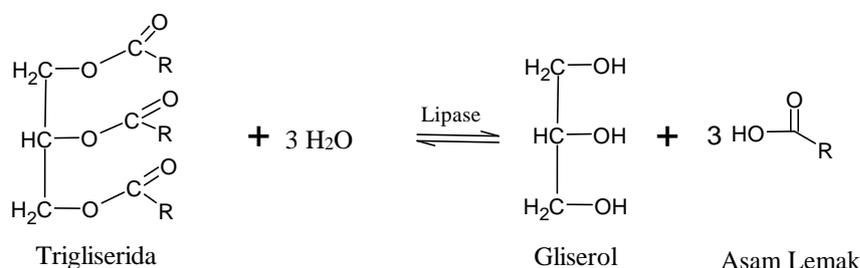
Aktivitas enzim menunjukkan seberapa besar kemampuan enzim dalam mempercepat suatu reaksi pemecahan sumber karbon. Aktivitas tersebut dinyatakan dalam satuan unit/mL.menit, yang mana satu unit aktivitas enzim menandakan perubahan pada 1µmol karbon menjadi 1µmol produk setiap menit dalam kondisi spesifik. Oleh karena itu, aktivitas enzim lipase merupakan suatu aktivitas yang menunjukkan jumlah yang diperlukan untuk memecah 1µmol per menit dalam kondisi tertentu (Sholeha dan Agustini, 2021). Satu unit aktivitas lipase setara dengan produksi 1µmol asam lemak bebas melalui reaksi hidrolisis substrat yang dipercepat oleh enzim lipase setiap menit. Untuk mengetahui aktivitas optimum lipase pada kondisi terbaik, maka perlu dilakukan pengukuran aktivitas enzim pada rentang suhu dan pH tertentu sehingga dapat ditetapkan kondisi optimum untuk aktivitas optimum lipase (Kurnia, 2010).

Pada penelitian ini digunakan enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 koleksi dari Laboratorium Biokimia Universitas Lampung. Menurut Arif (2022), bakteri tersebut berhasil diisolasi pada tahun 2017 dari tanah tercemar minyak Bandar Lampung. Bakteri tersebut tumbuh secara optimum pada pH 7 dengan waktu inkubasi optimumnya yaitu 66 jam. Enzim lipase yang dihasilkan dari isolat tersebut memiliki aktivitas optimumnya pada kondisi suhu 80°C dan pH 7.

2.4.1. Reaksi Hidrolisis

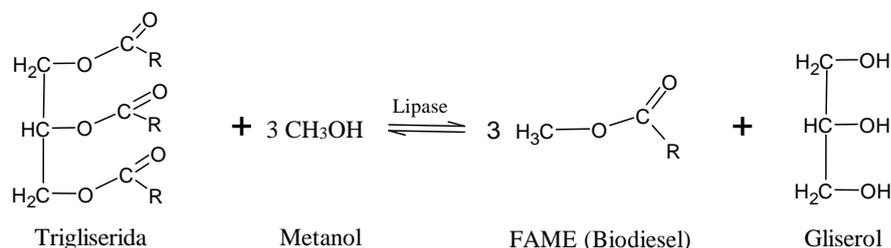
Hidrolisis merupakan proses kimia dimana air berinteraksi dengan zat lain menghasilkan satu atau lebih senyawa baru dan menyebabkan dekomposisi larutan atau senyawa melalui penggunaan air. Biasanya, reaksi hidrolisis adalah reaksi endotermik karena membutuhkan kalor dalam proses reaksinya (Praputri *et al.*, 2018). Reaksi hidrolisis termasuk ke dalam jenis reaksi orde satu, karena pada proses reaksi digunakan air berlebih sehingga perubahan reaktan dapat diabaikan. Terdapat beberapa jenis hidrolisis, seperti hidrolisis murni, hidrolisis dengan larutan asam atau larutan basa, dan hidrolisis dengan menggunakan enzim (Artati *et al.*, 2013).

Hidrolisis minyak dan lemak merupakan suatu reaksi kimia yang bertujuan untuk memecah trigliserida menjadi senyawa-senyawa turunannya (asam lemak) dan gliserol. Reaksi tersebut merupakan reaksi dua arah (reversibel) heterogen yang disebabkan oleh tidak bercampurnya fase minyak dan fase air. Reaksi hidrolisis berlangsung di dalam fase minyak. Sebelum mencapai fase tersebut, maka molekul air harus berdifusi terlebih dahulu ke dalamnya (Setyoprato, 2012). Katalis yang baik digunakan dalam proses hidrolisis yaitu enzim. Enzim yang sering digunakan dalam reaksi hidrolisis yaitu enzim lipase. Lipase sering disebut *lipolytic enzyme* karena kemampuannya dalam memisahkan lemak (*glycerl esters*) menjadi di- atau monogliserida dan asam lemak (Crueger and Crueger, 1984). Reaksi hidrolisis trigliserida dengan bantuan enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi hidrolisis trigliserida dengan katalis enzim lipase (Kurnia, 2010).

biodiesel (Aziz, 2007). Reaksi yang terjadi pada proses transesterifikasi dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi transesterifikasi (Aisyah, 2013).

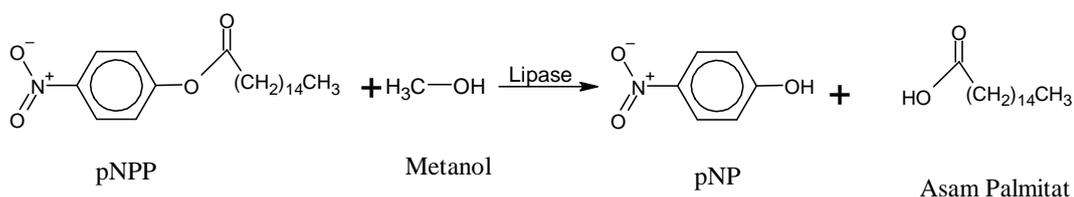
Reaksi transesterifikasi merupakan proses dimana ester mengalami pertukaran gugus alkilnya dengan gugus alkil dari alkohol, seperti metanol. Reaksi ini terjadi secara reversibel yang relatif lambat karena prosesnya berlangsung pada suhu rendah (50–80°C) (Sriatun *et al.*, 2015). Oleh sebab itu, agar laju reaksinya berjalan lebih cepat dan hasil yang didapatkan meningkat maka dalam proses reaksinya dilakukan pengadukan yang baik, ditambahkan suatu katalis dan diberikan reaktan berlebih sehingga reaksi akan bergeser ke arah kanan. Namun, penggunaan enzim sebagai katalis akan lebih efektif karena enzim dapat bekerja secara spesifik dan efisien, minimnya produk samping yang dihasilkan sehingga lebih ramah lingkungan (Aziz, 2007). Selain penggunaan katalis, terdapat faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil rendemen metil ester dari reaksi transesterifikasi seperti temperatur atau suhu reaksi, waktu reaksi, rasio molar antara trigliserida dan alkohol, kandungan air dan kandungan asam lemak bebas pada bahan baku yang bisa menghambat reaksi (Suleman *et al.*, 2019).

Manfaat dan keuntungan penggunaan katalis enzim pada reaksi transesterifikasi yaitu tidak terbentuknya sabun pada saat proses transesterifikasi berlangsung, reaksi berjalan pada pH netral, suhu yang dibutuhkan lebih rendah sehingga tidak membutuhkan biaya yang tinggi. Beberapa metode enzimatik bertujuan untuk mengurangi ikatan kovalen, ikatan silang, dan melakukan enkapsulasi pada skala mikro. Jenis enzim yang umumnya digunakan dalam proses transesterifikasi yaitu enzim lipase. Hal tersebut dikarenakan enzim lipase memiliki harga yang lebih

rendah dibandingkan dengan enzim lain. Selain itu, enzim lipase juga dapat mengkatalisis baik reaksi hidrolisis maupun transesterifikasi suatu trigliserida dalam kondisi biasa untuk menghasilkan metil ester (biodiesel) (Manullang, 2014).

2.4.4. Uji Aktivitas Transesterifikasi Lipase

Uji aktivitas transesterifikasi lipase dilakukan sesuai dengan penelitian Fu *et al.* (2014) yang telah dimodifikasi. Dalam proses pengujiannya, substrat yang terdiri dari 0,25 mL pNPP (*p*-nitrofenilpalmitat) dicampurkan dengan 0,25 mL asetonitril. Dalam proses transesterifikasi, campuran tersebut direaksikan dengan 1 mL enzim lipase dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C lalu disentrifugasi. Kemudian supernatan yang diperoleh diambil 0,45 mL dan ditambahkan dengan 4,455 mL metanol dan diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 315 nm. Adapun mekanisme reaksi yang terjadi ketika dilakukan uji aktivitas transesterifikasi dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Mekanisme reaksi yang terjadi pada saat uji aktivitas transesterifikasi enzim lipase (Fu *et al.*, 2014).

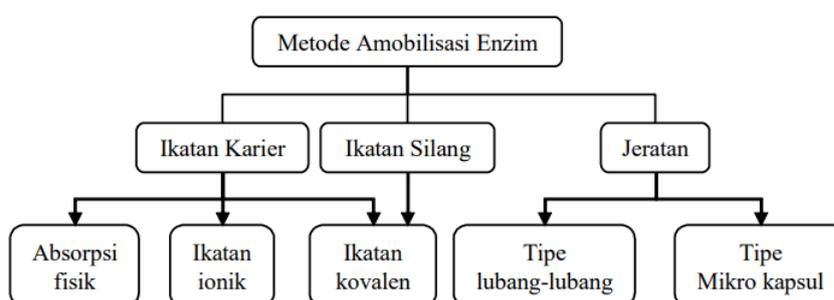
2.4.5. Penentuan Kadar Protein Lipase

Daya katalitik suatu enzim dipengaruhi oleh kandungan protein di dalamnya. Secara umum, meningkatnya kadar protein enzim akan meningkatkan daya katalitik enzim tersebut. Metode Lowry merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengukur kadar protein suatu enzim. Pengukuran tersebut bertujuan untuk memastikan bahwa enzim protein tetap ada dalam setiap tahap pemurnian dan memiliki aktivitas yang optimal. Metode Lowry dilakukan dalam kondisi basa dan ion tembaga (II) akan membentuk kompleks dengan protein. Selanjutnya, ketika ditambahkan reagen *folin-ciocelteau*, maka reagen ini akan

berikatan dengan protein dan mengubah warna larutan dari kuning ke biru karena terjadi reaksi reduksi. Prinsip dasar dari metode Lowry yaitu terjadinya reaksi antara Cu^{2+} dan ikatan peptida yang tereduksi menjadi Cu^+ dalam kondisi lingkungan alkali. Kemudian, Cu^+ berinteraksi dengan sisa tirosin, triptofan, dan sistein dalam protein, yang bereaksi dengan reagen *folin-ciocelteau*. Reaksi tersebut akan menghasilkan perubahan warna dan intensitasnya bergantung pada kandungan tirosin dan triptofan dalam protein. Oleh sebab itu, protein yang berbeda akan menghasilkan tingkatan warna yang berbeda (Alexander and Griffith, 1993).

2.5. Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim berarti enzim dibatasi atau terlokalisir sehingga enzim dapat digunakan secara terus-menerus. Tantangan atau masalah yang melatarbelakangi imobilisasi enzim adalah ketika jumlah substrat sangat besar dan enzim yang digunakan mahal. Keuntungan dari imobilisasi enzim adalah enzim dapat dipisahkan dengan cepat dari campuran reaksi, produk hasil reaksi dapat diperoleh tanpa terkontaminasi oleh enzim, dan enzim yang telah dipisahkan dapat digunakan kembali (Wuryanti, 2006). Imobilisasi enzim dikategorikan menjadi 3 jenis ikatan, yaitu ikatan karier, ikatan silang dan penjeratan. Klasifikasi tersebut dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Tipe-tipe imobilisasi (Wening dan Herdyastuti, 2021).

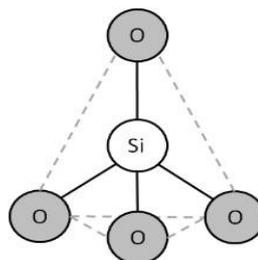
Menurut Lee (1996), Imobilisasi enzim adalah proses ketika enzim yang awalnya berada dalam keadaan larut dan bebas bergerak diubah menjadi bentuk yang tidak larut dan terjebak pada suatu substrat atau matriks. Proses ini memiliki

keunggulan dalam aplikasi teknologi biokimia karena terjadinya pencegah difusi enzim ke dalam campuran reaksi dapat menghindari kontaminasi produk dengan enzim. Selain itu, salah satu manfaat besar dari imobilisasi enzim adalah kemudahan pemisahan enzim dari campuran reaksi setelah proses berlangsung. Dengan adanya imobilisasi, enzim dapat dengan mudah dipisahkan dari aliran produk menggunakan teknik pemisahan padat atau cair yang sederhana, efisien, dan dapat diulang-ulang, sehingga meningkatkan efisiensi produksi dan mengurangi biaya operasional dalam berbagai industri yang menggunakan enzim sebagai katalis. Terdapat 5 teknik (metode) imobilisasi, yaitu:

1. Adsorpsi enzim pada bahan pendukung.
2. Pengikatan enzim secara kovalen pada bahan pendukung.
3. Pengikatan silang enzim pada bahan pendukung.
4. Penjeratan enzim dalam suatu bahan pendukung
5. Mikroenkapsulasi.

2.6. Zeolit

Zeolit adalah mineral kristal alumina silikat berpori terhidrat yang memiliki struktur rangka tiga dimensi, terbentuk dari tetrahedral $[\text{SiO}_4]^{4-}$ dan $[\text{AlO}_4]^{5-}$. Kedua tetrahedral tersebut terhubung oleh atom-atom oksigen, menghasilkan struktur tiga dimensi terbuka dan berongga yang didalamnya diisi oleh atom-atom logam, biasanya logam-logam alkali atau alkali tanah dan molekul air yang dapat bergerak bebas (Breck, 1974). Struktur tiga dimensi dari zeolit biasanya merupakan polimer anorganik yang terbentuk dari unit tetrahedral TO_4 , dimana T merupakan kation seperti Si^{4+} atau Al^{3+} yang dikoordinasikan dan dihubungkan oleh atom oksigen yang terletak diantara dua atom T seperti pada Gambar 9.



Gambar 9. Struktur zeolit (Rahma, 2019).

Karakteristik mineral zeolit dapat berbeda-beda tergantung pada jenis dan konsentrasi mineralnya. Struktur zeolit memiliki rongga yang umumnya berisi udara dan kation yang dapat ditukar, serta mempunyai ukuran pori spesifik. Karena hal tersebut, zeolit dapat digunakan sebagai filter molekuler, penukar ion, serta sebagai penyaring dan katalis (Barrer, 1987). Karena karakteristiknya yang unik, zeolit juga dapat digunakan sebagai adsorben. Pada keadaan umumnya, ruang hampa dalam kristal zeolit terisi oleh molekul air bebas yang berada di sekitar kation. Apabila kristal zeolit dipanaskan pada kisaran suhu 300-400°C, molekul air di dalam ruang hampa tersebut akan menguap sehingga memungkinkan zeolit berperan sebagai adsorben bagi gas maupun cairan. Zeolit memiliki area permukaan yang sangat luas untuk proses adsorpsi, yakni hingga ratusan meter persegi per gram. Oleh karena itu, beberapa jenis material zeolit dapat menyerap suatu molekul hingga mencapai 30% dari total berat keringnya (Farida, 2009).

Menurut Haag (1984), beberapa karakteristik dari struktur zeolit meliputi:

1. Memiliki banyak pori, disebabkan oleh kerangka kristalnya yang terbentuk dari jaring tetrahedral $[\text{SiO}_4]^{4-}$ dan $[\text{AlO}_4]^{5-}$.
2. Ukuran porinya sesuai dengan ukuran molekul, yang berasal dari susunan cincin yang terdiri dari 6, 8, 10, atau 12 tetrahedral.
3. Mampu untuk bertukar kation disebabkan oleh adanya perbedaan muatan antara Al^{3+} dan Si^{4+} . Hal ini membuat atom Al di dalam kerangka memiliki muatan negatif dan memerlukan kation untuk menetralkannya. Kation tersebut yang bukan merupakan bagian dari kerangka, bisa dengan mudah digantikan oleh kation lain.
4. Strukturnya dapat dengan mudah dimodifikasi karena setiap tetrahedral dapat berinteraksi dengan bahan modifikasi.

Pada struktur zeolit, ion aluminium dapat menempati pusat tetrahedral dari empat atom oksigen. Ketika Si^{4+} digantikan oleh Al^{3+} , hal ini menyebabkan terbentuknya muatan negatif pada struktur kisi. Muatan negatif tersebut diimbangi dengan hadirnya kation-kation dari unsur pengotor seperti Na^+ , K^+ , atau Ca^{2+} (Estianty,

Dalam proses aktivasi, zeolit sebelumnya dimurnikan untuk menghilangkan pengotor yang terikat pada struktur zeolit. Pemurnian tersebut dilakukan menggunakan larutan HF dan HCl. Penggunaan HF bertujuan untuk menghilangkan pengotor SiO₂ dalam bentuk amorf di sekitar zeolit. Sedangkan HCl digunakan untuk menghilangkan pengotor logam seperti Fe, Mg, Ca, Na, dan Al yang tidak terlepas pada pencucian HF (Estianty, 2015). Kemudian zeolit alam Lampung yang telah melalui proses aktivasi akan menunjukkan kristalinitas dan kapasitas adsorpsi yang lebih unggul dibandingkan tanpa aktivasi. Peningkatan konsentrasi HCl pada aktivasi zeolit alam Lampung menurunkan kristalinitas zeolit. Selain itu, proses aktivasi juga dapat meningkatkan daya adsorpsi zeolit. Hal tersebut dikarenakan menurunnya ukuran partikel zeolit akan meningkatkan luas permukaan porinya (Setiawan *et al.*, 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari Desember 2023 sampai Juli 2024 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Kimia Anorganik-Fisik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Aktivasi zeolit alam Lampung menggunakan tanur dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, tabung sentrifuga, sentrifugasi, labu ukur, gelas ukur, Erlenmeyer, gelas beker, rak tabung reaksi, batang pengaduk, *Laminar Air Flow*, autoklaf, oven, spektrofotometer UV-Visibel Cary Win UV100, mikropipet, termometer, bunsen, neraca analitik, sumbat, pH meter, mikro tip, jarum ose, inkubator, kolom kromatografi, buret, *magnetic stirrer*, *hot plate*, corong pisah, mortar dan alu, tanur, serta cawan porselen.

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dari koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung hasil dari isolasi bakteri pada tanah tercemar minyak yang dilakukan pada penelitian sebelumnya yaitu penelitian Firyal Humaira Arif pada tahun 2022, *Nutrient agar* (NA), *Nutrient broth* (NB), minyak zaitun, tween 80, akuades (H_2O), Dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4), Natrium dihidrogen fosfat (NaH_2PO_4), asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$), Tembaga(II)asetat ($Cu(CH_3COO)_2$), asetonitril (C_2H_3N), metanol (CH_3OH), isopropanol (C_3H_8O), p-Nitofenolpalmitat (p-NPP),

p-Nitrofenol (p-NP), n-heksana (C₆H₁₄), asam klorida (HCl) 6 N, pereaksi Lowry, ammonium sulfat (NH₄)₂SO₄, sephadex G-75, kertas saring, *Bovine Serum Albumin* (BSA), natrium hidroksida (NaOH), dan zeolit alam Lampung dari CV. Minatama, Bandar Lampung.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a) Persiapan Alat

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

b) Pembuatan Media Selektif

Media selektif dibuat sebanyak 100 ml dengan komposisi NA sebanyak 2,8% dan minyak zaitun sebanyak 1% yang dilarutkan menggunakan akuades dalam Erlenmeyer. Selanjutnya, media tersebut dipanaskan dengan *hot plate* lalu dituang ke dalam tabung reaksi secara aseptik. Kemudian media dalam tabung reaksi di sterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, media didiamkan pada posisi miring hingga mengeras dan media siap dipakai (Arif, 2022).

c) Peremajaan Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172

Isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 diambil 1 ose dan digoreskan ke media NA miring dalam tabung reaksi secara aseptik di dalam LAF, lalu biakkan diinkubasi pada waktu inkubasi optimumnya yaitu selama 66 jam pada suhu 30°C dan disimpan sebagai isolat stok (Arif, 2022).

d) Pembuatan Media Inokulum

Dalam 100 mL media inokulum, dimasukkan 3,5 gram NB ke dalam Erlenmeyer 250 mL, 1 mL minyak zaitun, tween 80 sebanyak 0,1 mL dan buffer fosfat pH 7 hingga volume mencapai 100 mL. Kemudian media disterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit (Arif, 2022).

e) Pembuatan Media Fermentasi

Dalam 500 mL media fermentasi, dimasukkan 6,5 gram NB ke dalam Erlenmeyer 1000 mL, ditambahkan 5 mL minyak zaitun, 0,5 mL tween 80 dan buffer fosfat pH 7 hingga volume mencapai 500 mL. Kemudian, media disterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit (Arif, 2022).

3.3.2. Pembuatan Larutan untuk Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan beberapa pereaksi. Menurut Lowry *et al.* (1951), larutan dan pereaksi yang digunakan pada penentuan kadar protein enzim yaitu sebagai berikut:

1. Larutan $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5%

Larutan dibuat dengan $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ padatan dilakukan dalam akuades dengan konsentrasi 5% (w/v).

2. Larutan BSA 2000 ppm

0,05 gram padatan BSA dilarutkan dalam 10 mL, campuran dimasukan kedalam labu ukur 25 mL, ditambahkan akuades hingga tanda tera, kemudian dihomogenkan.

3. Pereaksi Lowry A

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

4. Pereaksi Lowry B

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

5. Pereaksi Lowry C

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

6. Pereaksi Lowry D

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

3.3.3. Uji Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas enzim lipase dapat ditentukan dengan dua reaksi, yaitu reaksi hidrolisis dan reaksi transesterifikasi, sehingga pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas lipase sebagai berikut:

3.3.3.1. Uji Aktivitas Hidrolisis

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon and Rhee (1986). Pertama-tama diambil 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 selama 15 menit. Setelah diinkubasi, campuran ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana, divorteks selama 1 menit dan didiamkan selama 15 menit. Setelah terbentuk dua fase, fase minyak diambil sebanyak 2,50 mL. Digunakan akuades sebagai kontrol dengan perlakuan yang sama. Sampel dan kontrol kemudian ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% lalu divorteks. Selanjutnya dilakukan penentuan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 746 nm.

3.3.3.2. Uji Aktivitas Transesterifikasi

Dibuat campuran yang terdiri dari 0,25 mL substrat p-NPP (*p*-nitrofenilpalmitat) dan 0,25 mL asetonitril. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan 1 mL enzim

lipase dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 30°C. Kemudian, campuran diambil sebanyak 0,045 mL lalu ditambahkan dengan 4,455 mL metanol dan dihomogenkan. Digunakan kontrol dengan perlakuan dan prosedur yang sama tanpa penambahan enzim. Sampel dan kontrol diuji dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 315 nm (Fu *et al.*, 2014).

3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase

Kadar protein dalam media kultur diukur berdasarkan metode Lowry *et al.* (1951). Sebanyak 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 BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Untuk larutan kontrol, larutan enzim 0,1 mL diganti dengan akuades. Selanjutnya kadar protein dapat ditentukan nilainya dengan menggunakan Persamaan 3.

$$\text{Kadar protein (mg/mL)} = \frac{(\text{Abs.sampel}-a)}{b} \quad (3)$$

3.3.5. Produksi Enzim Lipase

Isolat yang telah diinkubasi selama 66 jam pada agar miring digunakan sebagai kultur bakteri. Kultur bakteri diambil menggunakan ose dan dimasukkan kedalam 50 mL media inokulum pada Erlenmeyer 250 mL, lakukan hingga dua kali pengulangan. Kemudian diinkubasi pada shaker dan diagitasi dengan kecepatan 114-120 rpm selama satu hari. Hasil inkubasi digunakan sebagai inokulum, 10% inokulum difermentasi pada 1000 mL media fermentasi. Kemudian dilakukan kultivasi selama 66 jam dan diagitasi dengan kecepatan 115-120 rpm. Setelahnya larutan disentrifugasi selama 20 menit untuk memisahkan supernatan (ekstrak kasar enzim) dari pellet nya (sisa-sisa sel) (Hernawati, 2010).

3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase

a) Fraksinasi dengan Ammonium Sulfat

Fraksinasi lipase dari ekstrak kasar dilakukan menggunakan ammonium sulfat pada tingkah fraksi, yaitu fraksi 0-20% dan 20-90%. Ammonium sulfat yang telah dihaluskan ditambahkan secara perlahan-lahan ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk. Suhu lingkungannya dibuat menjadi 4°C setelah didiamkan selama 30-60 menit, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan $10000 \times g$ selama 15 menit pada temperatur 4°C. Supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk dan ditampung untuk fraksinasi pada tingkat berikutnya. Endapan protein pada masing-masing fraksi kemudian dilarutkan dalam 50 mm buffer fosfat pH optimum produksi untuk selanjutnya didialisis. Masing-masing fraksi enzim yang diperoleh kemudian ditentukan aktivitas lipase dan kadar proteinya (Rusman, 2017).

b) Dialisis

Endapan protein yang telah dilarutkan dari setiap fraksi ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH optimum produksi selama ± 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis dilakukan pergantian larutan buffer setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Popoola and Olateru, 2020). Proses ini dilakukan secara terus-menerus sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Hasil dialisis ditentukan melalui nilai aktivitas lipase dan kadar proteinya.

c) Kromatografi Filtrasi Gel

Pembuatan matriks sephadex G-75 dilakukan dengan mengembangkan serbuk sephadex G-75 menggunakan buffer fosfat pH optimum produksi enzim dan didiamkan pada suhu dingin selama 24 jam (Rahmi *et al.*, 2020). Selanjutnya disiapkan kolom kromatografi lalu dimasukkan sephadex G-75 kedalam kolom hingga $2/3$ volume kolom dan dialiri dengan buffer 0,05 M fosfat pH 7 hingga laju

alirnya konstan. Kemudian, enzim hasil fraksinasi sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks sephadex G-75 yang telah diaktivasi. Sampel ditampung sebanyak 3 mL pada setiap tabung dengan menentukan laju alir (3 mL/menit) pada masing-masing sampel. Masing-masing fraksi ditentukan kadar protein dan aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Rusman, 2017).

3.3.7. Aktivasi Zeolit Alam Lampung

Zeolit alam Lampung yang digunakan sebagai matriks pengadsorpsi berasal dari Campang Tiga Lampung Selatan yang dikelola oleh CV. Minatama, Bandar Lampung. Sebelum diaktivasi, dilakukan preparasi zeolit alam Lampung terlebih dahulu dengan cara menghaluskan zeolit tersebut hingga halus dan diayak dengan ukuran 100 mesh. Selanjutnya dilakukan aktivasi zeolit alam Lampung dengan menggunakan metode fisik. Metode tersebut dilakukan dengan cara mengkalsinasi serbuk zeolit menggunakan tanur pada suhu 600°C selama 4 jam. Setelah dingin, sampel diangkat dan disimpan dalam desikator. Selanjutnya, diperoleh zeolit alam Lampung teraktivasi yang siap digunakan dalam proses imobilisasi enzim lipase (Putri, 2018).

3.3.8. Imobilisasi Enzim Lipase

Imobilisasi enzim lipase dilakukan dengan mengambil enzim lipase sebanyak 1 mL lalu ditambahkan dengan 1 mL buffer fosfat pH 7 dan 0,67 gram zeolit alam Lampung teraktivasi kemudian dishaker selama 30 menit dengan kecepatan 120-150 rpm pada suhu kamar. Selanjutnya, disentrifugasi selama 10 menit dengan (Firdaus *et al.*, 2017).

3.3.9. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Imobil

Penentuan kondisi optimum enzim lipase imobil dilakukan menggunakan variasi suhu, pH dan waktu inkubasi yang telah dilakukan oleh Arif (2022), sehingga

dapat dibandingkan hasil suhu, pH, dan waktu inkubasi optimum enzim lipase sebelum diimobil dan sesudah diimobil. Penentuan kondisi optimum enzim tersebut yaitu sebagai berikut:

a) Penentuan pH Optimum

Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas enzim lipase dilakukan dengan menggunakan buffer fosfat 0,05 M pada variabel pH sebesar 6, 7, 8, 9 dan 10. Selanjutnya, diuji aktivitas hidrolisis dan transesterifikasi enzim lipase imobil.

b) Penentuan Suhu Optimum

Suhu optimum dapat ditentukan dengan mengkondisikan enzim dengan pH optimumnya pada suhu 30, 40, 50, 60, dan 70°C. Kemudian, diukur aktivitas hidrolisis dan transesterifikasi enzim lipase imobil.

c) Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

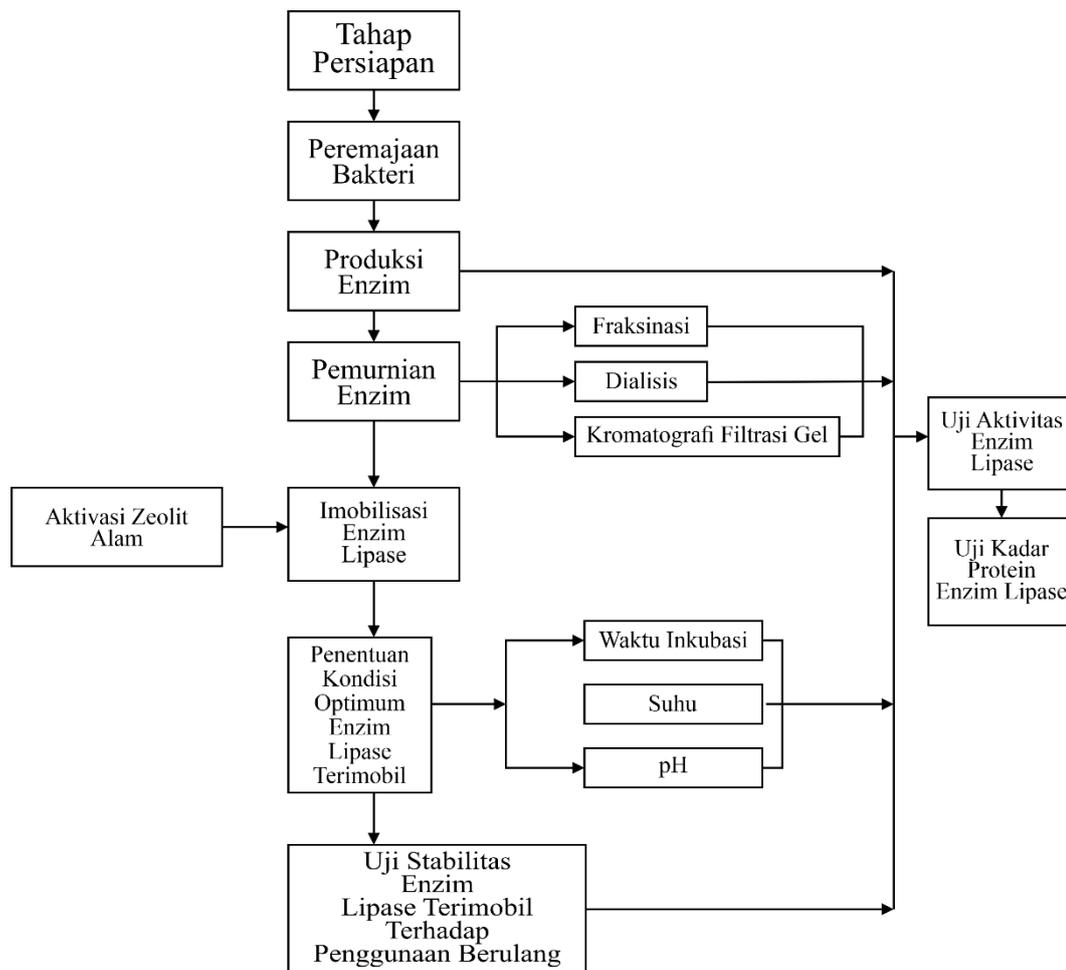
Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menginkubasi enzim pada pH dan suhu optimumnya dengan variasi waktu yaitu: 10, 15, 20, 25, dan 30 menit. Lalu diukur aktivitas hidrolisis dan transesterifikasi enzim lipase imobil.

3.3.10. Uji Stabilitas Enzim Imobil Terhadap Pemakaian Berulang

Stabilitas enzim lipase imobil diuji terhadap penggunaannya secara berulang. Uji ini dilakukan berdasarkan metode Firdaus *et al.* (2017) yang telah dimodifikasi. Metode tersebut dilakukan dengan cara mengikatkan enzim lipase pada matriks zeolit alam Lampung terlebih dahulu. Setelah proses pengikatan selesai, untuk uji pemakaian berulang dalam reaksi hidrolisis enzim lipase imobil tersebut ditambahkan dengan 0,35 mL buffer fosfat pH optimum enzim lipase imobil dan minyak zaitun sebanyak 0,70 mL. Selanjutnya, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 50°C selama 15 menit. Sedangkan pemakaian berulang untuk reaksi transesterifikasi digunakan substrat p-NPP sebanyak 0,25 mL dan 0,25 mL asetonitril lalu campuran tersebut diinkubasi pada pH optimum enzim lipase imobil selama 10 menit pada suhu 60°C. Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 10 menit. Kemudian, produk yang dihasilkan diuji aktivitas enzimnya,

sedangkan enzim imobil yang telah digunakan dicuci dengan 2 mL buffer fosfat pH 8 lalu disentrifugasi untuk memisahkan enzim pada matriks dengan buffernya. Setelah dipisahkan, maka enzim tersebut digunakan kembali untuk menentukan aktivita enzim lipase berikutnya.

3.4. Skema Penelitian



Gambar 11. Skema penelitian.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Diperoleh kadar protein enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 hasil pemurnian hingga tahap kromatografi filtrasi gel dengan sephadex G-75 sebesar 0,69 mg/mL dengan aktivitas hidrolisis dan transesterifikasi masing-masing sebesar 1.615,33 U/mL dan 1.178,80 U/mL sehingga kemurniannya meningkat 228,23 kali dari ekstrak kasarnya.
2. Pada proses imobilisasi, enzim lipase hasil pemurnian berhasil diimobil dan dihasilkan nilai aktivitas unit hidrolisis dan transesterifikasi enzim imobil masing-masing sebesar 1.205,68 U/mL dan 1.108,80 U/mL.
3. Enzim lipase yang telah diimobilisasi menunjukkan kondisi optimum yang berbeda dari enzim lipase sebelum diimobil. Dalam reaksi hidrolisis, kondisi optimum lipase imobil tercapai pada pH 8, suhu 50°C dengan waktu inkubasi selama 15 menit. Sedangkan, untuk reaksi transesterifikasi, kondisi optimum lipase imobil yaitu pada pH 8, suhu 60°C, dan waktu inkubasi selama 10 menit.
4. Enzim lipase imobil menunjukkan kestabilan pemakaian hingga 2 kali reaksi dalam proses hidrolisis, dengan aktivitas sisa sebesar 43,09% dari aktivitas awal. Sementara itu, pada proses transesterifikasi enzim lipase imobil dapat digunakan hingga 3 kali reaksi dengan persen aktivitas sebesar 55,98 % dari aktivitas awal.

5.2. Saran

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

1. Pada tahap pemurnian kromatografi filtrasi gel dengan sephadex G-75 sebaiknya lebih hati-hati dalam memperhatikan laju aliran fase gerak sehingga sephadex dalam kolom tidak kering karena apabila sephadex dalam kolom kering akan mengakibatkan keretakan pada gel sephadex.
2. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai imobilisasi enzim lipase dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dengan zeolit alam Lampung menggunakan metode aktivasi secara kimia.
3. Melakukan imobilisasi enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 menggunakan jenis matriks yang berbeda dengan ciri memiliki area permukaan yang luas, tidak dapat larut, dan tahan terhadap serangan mikroba.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah. 2013. *Senyawa Organik Monofungsi*. Alauddin University Press.
- Akimkhan, M. 2012. *Structural and Ion Exchange Properties of Natural Zeolites, Chapter 10* (E. by A. Kilislioglu. (ed.); Chapter 10). Intech Open.
- Alexander, R. R., and Griffith, J. M. 1993. *Basic Biochemical Methods, 2nd*. Wiley-Liss, Inc.
- Arif, F. H. 2022. Studi Produksi Biodiesel dengan Katalis Enzim Lipase yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. dari Tanah Tercemar Minyak. In *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.
- Artati, D., dan Oman, M. 2019. Identifikasi Bakteri Melalui Penggunaan Kit Analytical Profile Index (API) 20E. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*. 17(2): 149–153.
- Artati, E. K., Wulandari, F., dan Sukma, R. N. 2013. Pengaruh Konsentrasi Katalis Asam dan Kecepatan Pengadukan pada Hidrolisis Selulosa dari Ampas Batang Sorgum Manis. *Ekulibium*. 12(1): 17–22.
- Aziz, I. 2007. Kinetika reaksi Transesterifikasi Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(1): 19–23.
- Barrer, R. M. 1987. *Hydrothermal Chemistry of Zeolites*. Academic Press.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., and Komathi, S. 2019. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University - Science*. 31(4): 898–901.
- Bintang, M., Panji, T., dan Saadah, S. 2015. Imobilisasi Lipase *Rhizopus oryzae* pada Zeolit, CaCO₃, Silika Gel, dan Tulang Sapi. *Current Biochemistry*. 2 (2): 54–63.
- Breck, D. W. 1974. *Zeolite Molecular Sieves: Structure, Chemistry, and Use*. John Wiley & Sons.
- Celligoi, M. A. P. C., Baldo, C., De Melo, M. R., Gasparin, F. G. M., Marques, T. A., and De Barros, M. 2017. Lipase properties, functions and food applications. *Microbial Enzyme Technology in Food Applications, November*. 214–240.
- Chaplin, M. F., and Bucke. 1990. *Enzim Technology*. Cambridge University Press.

- Crueger, W., and Crueger, A. 1984. *Biotechnology a textbook of Industrial Microbiology Brock*. Science Tech, Inc.
- Darwis, A. A., dan Sukara, E. 1990. *Isolasi, Purifikasi dan Karakterisasi Enzim*. PAU Bioteknologi IPB.
- Djaeni, M., Widjanarko, A., Ridwan, dan Ratnawati. 2012. Penggunaan Zeolit Sintesis Dalam Pengeringan Gabah dengan Proses Fluidisasi Indirect Contact. *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*. 1(1): 157–164.
- Estianty, L. M. 2015. Sintesis dan Karakterisasi Zeolit-TiO₂ dari Zeolit Alam Termodifikasi. *Teknologi Mineral Dan Batubara Volume*. 11(3): 181–190.
- Fatimah, E. 2021. Review Artikel: Karakteristik Dan Peranan Enzim Lipase Pada Produksi Diacylglycerol (Dag) Dari Virgin Coconut Oil (Vco). *Unesa Journal of Chemistry*. 10(3): 246–256.
- Fessenden, R. J., dan Fessenden, J. . 1992. *Kimia Organik Jilid II*. Erlangga.
- Firdaus, Dali, S., and Rusman, H. J. 2017. Immobilization of Lipase Enzyme From The Bran Rice (*Oryza Sativa L.*) on Activated Carbon: Characterization and Stability Test of Immobile Enzyme Work. *J. Chem. Res*. 5(1): 32–36.
- Fitriasari, P. D., Amalia, N., dan Farkhiyah, S. 2020. Isolasi dan Uji Kompatibilitas Bakteri Hidrolitik Dari Tanah Pemrosesan Akhir Talangagung, Kabupaten Malang. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*. 19(2): 165–176.
- Fu, X., Zheng, J., Ying, X., Yan, H., and Wang, Z. 2014. Investigation of Lipozyme TL IM-Catalyzed Transesterification Using Ultraviolet Spectrophotometric Assay. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*. 35(4): 553–559.
- Haag, W. O. 1984. Catalysis by Zeolite Science and Technology in Zeolite: Related Microporous Materials. *Elsevier*. 789 pp.
- Hernawati, B. D. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas Aeruginosa* Sebagai Biokatalisator Dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa. *Jurnal Universitas Indonesia*. 5–6.
- Krisentiana, M. S. 2022. *Sintesis, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Katalitik ZSM-5 Pori Hierarki Berbasis Silika Ampas Tebu Termodifikasi Logam Ni Pada Reaksi Hidrolisis Selulosa*. Lampung.
- Kurnia, D. R. D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol*. Universitas Diponegoro.
- Kusnadi. 2012. *Buku Common Text Mikrobiologi*. UPI-Press.
- Kwon, D. Y., and Rhee, J. S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. In *JAOCs: Vol. 63* (1).

- Las, T. 2004. Potensi Zeolit untuk Mengolah Limbah Industri dan Radioaktif. In *Riview* (p. 179 hlm). JSPS-BBPT.
- Lee, B. 1996. *Fundamental of Food Biotechnology*. VCH Publisher Inc.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1): 265–275.
- Manullang, W. F. 2014. 1,2-Dimetil-1,1,2,2-Tetrafenildisilana Sulfonat Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi CPO (Crude Palm Oil) Berkadar Asam Lemak Bebas Tinggi Untuk Menghasilkan Biodiesel. In *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Sumatera Utara.
- Nabilasani, G. C. 2018. *Produksi dan Karakterisais Lipase Untuk Reaksi Transesterifikasi Dari Kapang Mutan*. Institut Pertanian Bogor.
- Oliveira, T. F. D., Hidalgo, M. R., and Junior, M. S. S. 2014. Production of Lipase Extrated from Aqueous Waste: Enzymatic Activity Kinetics. *Ciênc. Agrotec., Lavras.* 38(6): 562–572.
- Partini. 2023. Pengaruh Rasio Molar Minyak dengan Metanol Terhadap Aktivitas Transesterifikasi Menggunakan Katalis Enzim Lipase yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri Klebsiella sp. LPG172 Pada Produksi Biodiesel. In *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung.
- Poedjiadi, A. 2006. *Dasar-Dasar Biokimia*. UI-PRESS.
- Popoola, B. M., and Olateru, C. T. 2020. Purification and Kinetics of Lipase of Pseudomonas fluorescens from Vegetable Oil Polluted Soil. *Journal of Biological Sciences*. 21(1): 29–37.
- Praputri, E., Sundari, E., Firdaus, F., dan Sofyan, S. 2018. Penggunaan Katalis Homogen dan Heterogen pada Proses Hidrolisis Pati Umbi Singkong Karet Menjadi Glukosa. *Jurnal Litbang Industri*. 8(2): 105–110.
- Putri, C. C. 2018. *Pemanfaatan Zeolit Alam Lampung Sebagai Katalis Pendukung Pada Reaksi Transesterifikasi Minyak Kelapa Sawit Menjadi Biodiesel*. Universitas Lampung.
- Rahma, A. 2019. Sintesis dan Karakterisasi Katalis NiMo/y-Al₂O₃ dengan Penambahan Zeolit HY, Zeolit Hirarki HY dan Silika. In *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.
- Rahmi, H., Hariyanti, R., Putri, A., and Wulandari, D. 2020. Analysis of Protease and Lipase Fractionation Originated from the Digestive Tract of Vannamei Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Bioteknologi & Biosains Indonesia*. 7(December): 194–202.
- Renni, C. P., Mahatmanti, F. W., dan Widiarti, N. 2018. Pemanfaatan Zeolit Alam Teraktivasi sebagai Adsorben Ion Logam Fe (III) dan Cr (VI). *Indonesian Journal of Chemical Science*. 7(1): 65–70.

- Rini, C. S., dan Rochmah, J. 2020. Bakteriologi Dasar. In *Umsida Press Sidoarjo Universitas* (Vol. 1, Issue 1). Umsida Press.
- Rusman, H. J. 2017. Potensi dan Imobilisasi Enzim Lipase dari Dedak Padi (*Oryza Sativa L.*) Serta Aplikasinya Dalam Mengkatalis Reaksi Trans-Esterifikasi dan Amidasi Menggunakan Substrat Minyak Kelapa Murni. *Journal of Africa's Potential for the Ecological Intensification of Agriculture*. 211–213.
- Sari, I. P., Prasetyawan, S., Kimia, J., Matematika, F., Alam, P., Brawijaya, U., dan Humicola, R. 2014. *Optimasi Amobilisasi Xilanase dari Trichoderma Viride dengan Matriks Zeolit*. 2(1): 421–427.
- Setiawan, Y., Mahatmanti, F. W., Harjono, dan Jumaeri. 2017. Preparasi dan Karakterisasi Nanozeolit dari Zeolit Alam Gunungkidul dengan Metode Top-Down. *Indonesian Journal of Chemical Science*. 6(2): 1–8.
- Setyoprato, P. 2012. Produksi Asam Lemak dari Minyak Kelapa Sawit dengan Proses Hidrolisis. *Jurnal Teknik Kimia*. 7(1): 26–31.
- Shi, Y. W., Yang, H., Chu, M., Huo, X. D., Gao, Y., Zeng, J., Zhang, T., Li, Y. G., Outi, K. E., Lou, K., Li, X. Y., Dang, W. F., and Li, C. 2020. *Klebsiella Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 233–257.
- Sholeha, R., dan Agustini, R. 2021. Lipase Biji-Bijian dan Karakteristiknya. *Unesa Journal of Chemistry*. 10(2): 168–183.
- Sriatun, Taslimah, dan Linda, S. 2015. Pemanfaatan Katalis Silika Alumina dari Bagasse pada Pembuatan Biodiesel dari Minyak Goreng Sisa Pakai. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 25(1): 14–20.
- Suhara. 2009. Dasar-Dasar Biokimia. In *Dasar-Dasar Biokimia*. Prisma-Press.
- Suleman, N., Abas, dan Papatung, M. 2019. Esterifikasi dan Transesterifikasi Stearin Sawit untuk Pembuatan Biodiesel. *Jurnal Teknik*. 17(1): 66–77.
- Svendsen, A. 2000. *Biochim. Biophys Acta*.
- Wahyudiati, D. 2017. Buku Biokimia. In E. M. Jayadi (Ed.), *LEPPIM Mataram*.
- Wang, D. I. C., Conney, A. L., Demain, P., Dunhill, A. E., Humfrey, and M.D, L. 1979. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Willey and Sons.
- Wardoyo, F. A., dan Kartika, A. I. 2017. Imobilisasi enzim lipase pada padatan pendukung zeolit alam. *Jurnal Muhammadiyah, September*. 141–145.
- Wening, K. W., dan Herdyastuti, N. 2021. Imobilisasi Enzim Papain dengan Silika Mesopori dan Karagenan Sebagai Bahan Pendukung. *Journal of Chemistry*. 3(1): 268–279.
- Wirahadikusumah, M. 1977. *Biokimia: Protein, Enzim, dan Asam Nukleat*. Institut Teknologi Bandung.
- Wuryanti. 2006. Amobilization Of Enzyme Bromelin From Pineapple Stem With Seaweed (*Euchema Cottonii*) Carrageenan As A Support Matrix.

Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi. 9(3): 56–59.

Yuanita, D. 2009. Hidrogenasi Katalitik Metil Oleat menjadi Stearil Alkohol Menggunakan Katalis Ni/Zeolit Alam. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Universitas Negeri Yogyakarta*. 1–8.