

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM LIPASE DARI BAKTERI  
*Klebsiella* sp. LPG172 DENGAN IMOBILISASI METODE  
ADSORPSI PADA MATRIKS HIDROKSIAPATIT**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**DYASMIN DWI LARASATI  
2017011070**



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

## ABSTRAK

### **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172 DENGAN IMOBILISASI METODE ADSORPSI PADA MATRIKS HIDROKSIAPATIT**

Oleh

**Dyasmin Dwi Larasati**

Penelitian ini dilakukan untuk mempelajari enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 terimobil dengan hidroksiapatit mengenai kemampuannya sebagai katalis pada reaksi hidrolisis dan transesterifikasi. Pada penelitian ini dilakukan peremajaan dan produksi lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 yang memiliki kondisi optimum pertumbuhan pada pH 7 dan waktu inkubasi 66 jam pada media NA/NB mengandung minyak zaitun, serta serangkaian pemurnian enzim lipase seperti fraksinasi ammonium sulfat, dialisis dan kromatografi kolom filtrasi gel sephadex G-75 untuk memperoleh enzim lipase murni. Kemudian dilakukan imobilisasi pada matriks hidroksiapatit, ditentukan kondisi optimum enzim imobil dan dilakukan pemakaian berulang.

Ekstrak kasar enzim memiliki kadar protein sebesar 3,34 mg/mL dan aktivitas unit enzim sebesar 34,6 U/mL. Setelah pemurnian kromatografi kolom filtrasi gel sephadex G-75 enzim lipase memiliki kadar protein sebesar 0,70 mg/mL dan aktivitas unit sebesar 1.401,67 U/mL pada uji hidrolisis, sedangkan uji transesterifikasi sebesar 1.723,6 U/mL. Imobilisasi lipase pada matriks hidroksiapatit menunjukkan aktivitas unit sebesar 962,67 U/mL pada uji hidrolisis dan 1.334,8 U/mL pada uji transesterifikasi.

Imobilisasi lipase *Klebsiella* sp. LPG172 pada matriks hidroksiapatit mengubah kondisi optimum aktivitas enzim. Pada reaksi hidrolisis kondisi optimum lipase imobil memiliki pH 8, suhu 50°C dan inkubasi 15 menit dibandingkan enzim bebasnya yang menunjukkan aktivitas optimum pada pH 7, suhu 80°C, dan inkubasi 25 menit. Pada reaksi transesterifikasi memiliki kondisi optimum lipase imobil pH 8, suhu 60, dan inkubasi 10 menit dibandingkan enzim bebasnya yang optimum dengan pH 7, suhu 70°C, dan inkubasi 25 menit. Kondisi optimum enzim imobil tersebut digunakan untuk pemakaian berulang yang stabil pada reaksi hidrolisis sebanyak 2 kali pemakaian dengan aktivitas sisa sebesar 30% dari enzim bebasnya dan aktivitas enzim imobil sebesar 37% dari enzim bebasnya dipemakaian ke 4 pada reaksi transesterifikasi.

Kata kunci : *Klebsiella* sp. LPG172, imobilisasi, hidroksiapatit, hidrolisis, transesterifikasi.

## ABSTRACT

### INCREASING THE STABILITY OF LIPASE FROM THE BACTERIA *Klebsiella* sp. LPG172 BY IMMOBILIZING THE ADSORPTION METHOD ON THE HYDROXYAPATITE MATRIX

By

**Dyasmin Dwi Larasati**

This study was conducted to study lipase from *Klebsiella* sp. LPG172 bacteria immobilized with hydroxyapatite regarding its ability as a catalyst in hydrolysis and transesterification reactions. In this study, the rejuvenation and production of lipase from *Klebsiella* sp. LPG172 were carried out which had optimum growth conditions at pH 7 and an incubation time of 66 hours in NA/NB media containing olive oil, as well as a series of lipase purifications such as ammonium sulfate fractionation, dialysis and sephadex G-75 gel filtration column chromatography to obtain pure lipase. Then immobilization was carried out on the hydroxyapatite matrix, the optimum conditions of the immobilized enzyme were determined and repeated use was carried out.

The crude enzyme extract has a protein content of 3.34 mg/mL and an enzyme unit activity of 34.6 U/mL. After purification by sephadex G-75 gel filtration column chromatography, the lipase has a protein content of 0.70 mg/mL and a unit activity of 1,401.67 U/mL in the hydrolysis test, while the transesterification test is 1,723.6 U/mL. Immobilization of lipase on hydroxyapatite matrix shows a unit activity of 962.67 U/mL in the hydrolysis test and 1,334.8 U/mL in the transesterification test.

Immobilization of *Klebsiella* sp. LPG172 lipase on hydroxyapatite matrix changes the optimum conditions of enzyme activity. In the hydrolysis reaction, the optimum conditions of immobilized lipase have a pH 8, a temperature 50°C and an incubation 15 minutes compared to the free enzyme which shows optimum activity at pH 7, a temperature 80°C, and an incubation 25 minutes. In the transesterification reaction, the optimum conditions of immobilized lipase are pH 8, a temperature 60°C, and an incubation 10 minutes compared to the free enzyme which is optimum at pH 7, a temperature 70°C, and an incubation 25 minutes. The optimum conditions of the immobilized enzyme are used for stable repeated use in the hydrolysis reaction as many as 2 uses with a residual activity of 30% of the free enzyme and the activity of the immobilized enzyme is 37% of the free enzyme in the 4th use in the transesterification reaction.

Keywords : *Klebsiella* sp. LPG172, immobilization, hydroxyapatite, hydrolysis, transesterification.

**PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM LIPASE DARI BAKTERI  
*Klebsiella* sp. LPG172 DENGAN IMOBILISASI METODE  
ADSORPSI PADA MATRIKS HIDROKSIAPATIT**

Oleh

**DYASMIN DWI LARASATI**

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
Sarjana Kimia

Pada

**Jurusan Kimia**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



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

Judul Penelitian : **PENINGKATAN KESTABILAN ENZIM  
LIPASE DARI BAKTERI *Klebsiella* sp.  
LPG172 DENGAN IMOBILISASI METODE  
ADSORPSI PADA MATRIKS  
HIDROKSIAPATIT**

Nama Mahasiswa : **Dyasmin Dwi Larasati**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2017011070**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**

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

**Dr. Dra. Ilim, M.S.**  
NIP. 196505251990032002

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung**

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

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

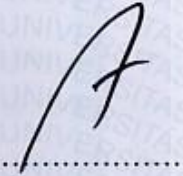
Ketua : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Dra. Ilim, M.S.**



Anggota : **Dra. Aspita Laila, M.S.**



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 : Dyasmin Dwi Larasati  
NPM : 2017011070  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "**Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Dengan Imobilisasi Metode Adsorpsi Pada Matriks Hidroksiapatit**" ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data 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, 23 Agustus 2024

Yang menyatakan,



Dyasmin Dwi Larasati  
NPM. 2017011070

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Dyasmin Dwi Larasati dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 10 Januari 2003. Anak kedua dari tiga bersaudara, putri dari pasangan Bapak Supratman dan Ibu Rusmawati. Penulis mengawali jenjang pendidikan dari Taman Kanak-Kanak AL-HIJRIAH yang diselesaikan pada tahun 2008. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 2 Way Huwi pada tahun 2014, kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP AL-HUDA Jati Agung diselesaikan pada tahun 2017, dan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Pangudi Luhur Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2020. Pada tahun 2020, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) yang diselesaikan pada tahun 2024.

Selama diperguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2020, dan kemudian menjadi anggota dari UKM Bulutangkis Universitas Lampung pada Tahun 2020-2021. Penulis Melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Bulan Januari-Februari 2023 di kelurahan Sekincau Kabupaten Lampung Barat. Pada tahun 2024, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Produksi dan Uji Aktivitas Enzim Lipase Dari Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172”. Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2023.



## MOTTO

“Dalam hidup ini tidak ada nanti apalagi lain kali,  
lakukan hari ini atau tidak sama sekali”

**(Hyouka – Honobu Yonezawa)**

“Tidak peduli seberat apapun atau tidak mungkin untuk dicapai,  
Kau tidak boleh menyerah dengan tujuanmu”

**(Luffy – Eiichiro Oda)**

“Sesungguhnya Allah tidak akan mengubah keadaan suatu kaum, sebelum  
mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri”

**(QS. Ar-ra'd : 11)**

“Aapun yang menjadi takdirmu, akan mencari jalannya menemukanmu”

**(Ali bin Abu Thalib)**

“Be kind to yourself and forgive your own mistakes”

(Berbaik hatilah pada diri sendiri dan maafkan kesalahanmu sendiri)

**(Tomorrow X Together)**

“Kita masih harus melakukan banyak hal di depan kita.

Tak apa-apa, semua itu bisa kita lewati, janganlah menangis”

**(Grow Up – Stray Kids)**

## SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim.

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase Dari Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Dengan Imobilisasi Metode Adsorpsi Pada Matriks Hidroksiapatit”**.

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

1. Papa dan Ibu (Almh) yang telah melimpahkan kasih sayang dan do'a serta saran, kesabaran, keikhlasan dan perjuangan untuk mendukung penulis. Semoga Papa diberikan kesehatan, dilancarkan rezekinya, dan kebaikan Papa dapat dibalas oleh Allah SWT, serta ibu ditempatkan disisiNya.
2. Kakakku Tian Ipan Sagara dan adikku Astri Mia Mirani yang tak henti mendukung, memberikan masukan, dan memberikan semangat di kala jenuh dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih telah menjadi pendengar yang baik dalam mendengar keluh kesah penulis.
3. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si, selaku pembimbing I yang selalu memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran, dan semangat, serta meluangkan waktu, tenaga dan kesabaran kepada penulis selama proses menyelesaikan skripsi. Semoga segala kebaikan ibu dibalas oleh Allah SWT.
4. Ibu Dr. Dra. Ilim, M.S. selaku pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan bantuan, ide, kritik serta saran dalam penyusunan skripsi ini.

5. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku pembahas yang telah memberikan komentar dan masukan yang bermanfaat untuk perbaikan dalam penyusunan skripsi ini.
6. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si, selaku pembimbing akademik dan Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah meluangkan waktu serta memberikan bimbingan, nasihat, dan saran kepada penulis.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang sangat bermanfaat kepada penulis.
8. Sahabat tercinta Seliya dan Pooja Sathiya yang tak henti menemani, memberikan semangat, menghibur dan menenangkan penulis dalam kondisi apapun. Terima kasih karena telah hadir dalam kehidupan penulis.
9. Sahabat seperjuangan Fitriana Artika Sari, M. Rafli Akbar dan Intan Aldara yang selalu menemani penulis disaat senang, sedih, kesulitan, memberikan nasihat dan dorongan kepada penulis. Serta selalu setia direpotkan dan mau menjadi tempat bertanya di masa perkuliahan dan penyusunan skripsi ini. Terima kasih telah menjadi bagian dari masa perkuliahan penulis.
10. Jordy Setiawan terima kasih atas segala semangat, dukungan, nasihat, ilmu, bantuan dan waktu yang telah dihabiskan dengan penulis. Terima kasih kebersamaannya selama ini.
11. Teman-teman yang baik hati Muhammad Irfan Hanafi, Ahmad Sulaiman, Siti Salwa Khotijah, Amelia Mareta, Muhammad Sabil, Ribka Angelia Gultom, Ratih Nurhidayati, Rahmadtullah, M. Rafli Yuwan, Rekia Enrik dan teman-teman kimia angkatan 2020 yang telah menemani masa perkuliahan penulis. Terima kasih atas bantuan dan kebersamaannya selama ini.
12. Muhamad Dwi Fansang dan Widya Cahya Purnama selaku *partner* asisten praktikum di Laboratorium Biokimia. Terima kasih atas segala semangat, hiburan, bantuan dan kesabarannya.
13. Fitriana Artika Sari, Bunga Mega Nurlinda, M. Fahrezi Cahaya Saputra selaku *partner* penelitian Dian Research'20 serta teman-teman dan kakak-kakak di Laboratorium Biokimia atas bantuan, ilmu, kerja sama, semangat, juga pengalaman yang kalian bagi dengan penulis. Seluruh karyawan FMIPA atas waktu serta pelayanan yang telah diberikan dalam proses perkuliahan.

14. Sepupu-sepupuku, Riani Windi Sabila, Zhakia Alya Muhbita, Dimas Rahmadi, Restu Wicaksono dan keluarga besar Sudarman terima kasih telah memberikan semangat, dukungan dan menghibur penulis disaat sedih.
15. Semua pihak yang belum dan tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Terima kasih telah membantu penulis dengan tulus.

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

Bandar Lampung, 23 Agustus 2024  
Penulis,

Dyasmin Dwi Larasati

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	4
1.3. Manfaat Penelitian .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1. Bakteri <i>Klebsiella</i> sp. ....	5
2.2. Enzim Lipase .....	5
2.2.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya.....	7
2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim.....	8
2.3. Karakteristik Enzim Lipase <i>Klebsiella</i> sp. LPG172 .....	10
2.3.1. pH Optimum .....	10
2.3.2. Suhu Optimum.....	11
2.3.3. Waktu Inkubasi Optimum.....	12
2.4. Hidroksiapatit.....	13
2.5. Imobilisasi Enzim .....	15
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	17
3.1. Waktu dan Tempat .....	17
3.2. Alat dan Bahan.....	17
3.3. Prosedur Penelitian .....	18
3.3.1. Tahap Persiapan .....	18
3.3.2. Persiapan untuk Penentuan Kadar Protein.....	19
3.3.3. Uji Aktivitas Enzim .....	20
3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase .....	21
3.3.5. Produksi Enzim.....	21
3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase .....	21
3.3.7. Imobilisasi Enzim Lipase.....	23
3.3.8. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Imobil .....	23
3.3.9. Uji Stabilitas Enzim .....	23
3.3.10. Skema Penelitian.....	24
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	25
4.1. Peremajaan Bakteri .....	25

4.2. Produksi Enzim.....	26
4.3. Enzim Hasil Pemurnian .....	27
4.3.1. Fraksinasi Ammonium Sulfat .....	27
4.3.2. Dialisis .....	29
4.3.3. Kromatografi Filtrasi Gel.....	29
4.4. Imobilisasi Enzim .....	32
4.5. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Terimobil.....	33
4.5.1. pH Optimum .....	33
4.5.2. Suhu Optimum.....	35
4.5.3. Waktu Inkubasi Optimum.....	36
4.6. Uji Stabilitas Enzim .....	37
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>40</b>
5.1. Kesimpulan .....	40
5.2. Saran .....	41
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>42</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>47</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Aktivitas enzim lipase pada setiap tahap pemurnian. ....	31
2. Hubungan antara penggunaan berulang dengan aktivitas unit dan hasil (%) enzim lipase.....	39
3. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat fraksi 0-20% dan 20-90% dengan aktivitas enzim lipase dari <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	48
4. Nilai $A_{280}$ enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel. ....	48
5. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel.....	49
6. Pengaruh pH pada aktivitas hidrolisis enzim lipase.....	49
7. Pengaruh pH pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase. ....	49
8. Pengaruh suhu pada aktivitas hidrolisis enzim lipase. ....	49
9. Pengaruh suhu pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase.....	50
10. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas hidrolisis enzim lipase. ....	50
11. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase.....	50
12. Uji stabilitas pada aktivitas hidrolisis enzim lipase. ....	50
13. Uji stabilitas pada aktivitas transesterifikasi enzim lipase. ....	51
14. Nilai absorbansi dari kurva standar BSA. ....	51
15. Nilai absorbansi dari kurva standar Asam Oleat.....	52
16. Nilai absorbansi dari kurva standar pNP.....	53

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Reaksi umum hidrolisis enzim lipase.....	6
2. Kurva hubungan suhu dan enzim .....	8
3. Kurva hubungan nilai pH .....	9
4. Kurva hubungan konsentrasi.....	9
5. Pengaruh pH pada aktivitas lipase reaksi hidrolisis dan transesterifikasi.....	11
6. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase dalam (a) reaksi hidrolisis dan (b) reaksi transesterifikasi.....	12
7. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase dalam reaksi hidrolisis dan transesterifikasi .....	13
8. Struktur kimia hidroksiapatit.....	14
9. Jenis-jenis metode imobilisasi.....	16
10. Peremajaan bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	26
11. Media produksi (a) sebelum dan (b) sesudah terdapat aktivitas enzim lipase	26
12. Mekanisme reaksi yang terjadi pada saat hidrolisis enzim lipase.....	27
13. Tingkat kejenuhan ammonium sulfat terhadap aktivitas spesifik (U/mg) enzim lipase pada fraksi (0-20%) dan (20-90%) .....	28
14. Profil hubungan $A_{280}$ dengan nilai aktivitas unit enzim (U/mL) hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.....	30
15. Mekanisme reaksi transesterifikasi saat uji aktivitas enzim lipase.....	32
16. Pengaruh pH pada aktivitas enzim lipase terimobil, (a) reaksi hidrolisis dan (b) reaksi transesterifikasi.....	34
17. Pengaruh suhu pada aktivitas unit enzim lipase (a) dalam reaksi hidrolisis dan (b) reaksi transesterifikasi.....	35
18. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas unit enzim lipase (a) dalam reaksi hidrolisis dan (b) reaksi transesterifikasi.....	36
19. Uji stabilitas enzim imobil terhadap penggunaan berulang (a) dalam reaksi hidrolisis dan (b) reaksi transesterifikasi.....	38
20. Kurva standar BSA .....	51



21. Kurva standar asam oleat .....	52
22. Kurva standar p-Nitrofenol .....	53

# I. PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Lipase (triasilgliserol asilhidrolase; EC 3.1.1.3) merupakan kelompok enzim yang didefinisikan sebagai karboksilesterase yang mengkatalisis hidrolisis asil gliserol rantai panjang pada antarmuka lipid air. Lipase juga dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi pada sintesis biodiesel dengan reagen yang sesuai dan kehadiran air yang terbatas (Castro-Ochoa *et al.*, 2005). Enzim lipase banyak ditemukan dalam berbagai hewan, tanaman, bakteri, ragi dan jamur. Enzim yang berasal dari mikroorganisme seperti bakteri lebih disukai karena berpotensi untuk aplikasi dalam berbagai industri (Telussa, 2013). Lipase banyak digunakan dalam pengolahan lemak dan minyak, detergen, pengolahan makanan, sintesis bahan kimia, farmasi, sintesis kertas, produksi kosmetik, industri biodiesel dan untuk aplikasi bioteknologi logis dalam industri susu, tekstil, dan produksi surfaktan (Sari, 2012). Beberapa contoh mikroorganisme penghasil enzim lipase adalah *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Miraxella*, *Mucor meihei*, dan *Candida rugosa* (Hernawati, 2010). *Klebsiella* sp juga termasuk salah satu bakteri yang dapat menghasilkan enzim lipase.

Enzim lipase adalah protein yang larut dalam air dan dapat mengkatalisis reaksi dalam dua jenis sistem yaitu media berair dan organik. Rantai panjang triasilgliserol disintesis oleh suatu pelarut atau senyawa yang dapat mengemulsi triasilgliserol seperti pelarut organik (Fatimah, 2021). Enzim lipase dilaboratorium biasa digunakan secara *bath*, yaitu enzim lipase dilarutkan ke dalam air dan direaksikan dengan substrat, sehingga enzim lipase dan substrat bercampur (Firdaus dkk., 2017).

Enzim lipase larut dalam air menyebabkan enzim lipase hanya dapat digunakan satu kali siklus reaksi, sedangkan enzim lipase masih memiliki aktivitas enzim. Selain itu, enzim lipase memiliki keterbatasan penggunaan karena biaya yang tinggi (Maroufi *et al.*, 2022).

Imobilisasi dilakukan untuk mengatasi keterbatasan enzim lipase yang larut dalam air dan meningkatkan penggunaan enzim lipase dengan memisahkan enzim lipase dan substrat diakhir reaksi, sehingga enzim lipase menjadi dapat digunakan berulang (Firdaus dkk., 2017), lebih efisien, berguna untuk mengatasi masalah enzim dan menurunkan biaya. Enzim imobilisasi terpakai lebih sedikit dibandingkan enzim bebas dalam suatu reaksi, sehingga dihasilkan produk yang lebih baik dan lebih murni (Susilo, 2012).

Imobilisasi enzim adalah teknik penjebakan enzim pada suatu matriks. Imobilisasi merupakan suatu cara untuk mempertahankan sisi aktif enzim agar tahan terhadap lingkungan, dengan cara mengikat suatu enzim pada molekul penyangga yang membuat persilangan yang kuat di antara asam amino penyusun enzim hingga membentuk struktur granula yang stabil. Struktur padat ini dapat digunakan berulang kali, karena enzim yang terimobilisasi menjadi tidak larut dalam air, sehingga mudah dipisahkan dari larutan pereaksi (Matsumoto and Ohashi, 2003).

Metode imobilisasi melibatkan penyertaan enzim dalam matriks atau mengikatnya pada berbagai permukaan. Beberapa contoh metode imobilisasi adalah; adsorpsi, enkapsulasi, pengikatan kovalen, *entrapment* dan lain-lain. Salah satu metode imobilisasi yang banyak digunakan adalah metode adsorpsi. Metode adsorpsi merupakan metode penjeratan enzim berdasarkan interaksi ikatan ionik, interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik antara enzim atau sel mikroba dengan bahan penyangga. Metode ini tidak menyebabkan perubahan konformasi enzim atau destruksi pada pusat aktif enzim (Bintang *et al.*, 2015). Keuntungan lain menggunakan metode ini yaitu mudah dan murah, tanpa perlu menggunakan reagen dan aktivitas katalitik yang bagus (Maroufi *et al.*, 2022).

Imobilisasi dilakukan dengan bantuan bahan pendukung sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim. Matriks pembawa yang ideal harus memiliki sifat

sebagai berikut; ekonomis, *inertness*, stabilitas, kekuatan fisik, kemampuan untuk meningkatkan aktivitas enzim, kemampuan regenerasi, kemampuan untuk mengurangi penghambatan produk dan kemampuan untuk mencegah adsorpsi nonspesifik dan bakteri kontaminasi. Ada beberapa jenis pendukung seperti zeolit,  $\text{CaCO}_3$ , silika gel, dan tulang sapi. Kemudian salah satu matriks pendukung yang lain yaitu hidroksiapatit (Maroufi *et al.*, 2022).

Hidroksiapatit (HA) dengan rumus kimia  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  merupakan salah satu senyawa kalsium fosfat dan termasuk dalam kelompok mineral apatit yang saat ini sedang banyak dikembangkan. Keunggulan dari material hidroksiapatit adalah memiliki komposisi dan struktur kristal yang mirip dengan tulang dan paling banyak digunakan dalam aplikasi biomedis (Noviyanti *et al.*, 2017). Pembuatan hidroksiapatit (HA) pada umumnya menggunakan padatan atau serbuk kalsium oksida (CaO). Dengan tingginya kebutuhan akan biomaterial ini, sintesis HA menjadi cukup bermanfaat untuk dilakukan. Keuntungan lain dari teknik imobilisasi dengan hidroksiapatit adalah; mendukung aktivasi terendah, atau tidak diperlukan praaktivasi sama sekali sehingga tidak diperlukan reagen, melindungi dari agregasi, proteolisis, dan interaksi utama, yang dapat mengganggu potensi enzim dan pembawa (Maroufi *et al.*, 2022). Karena keunggulan-keunggulan dari hidroksiapatit tersebut maka digunakan hidroksiapatit sebagai matriks pembawa.

Pada penelitian ini dilakukan imobilisasi enzim lipase dari *Klebsiella* sp. LPG172 koleksi Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung (Arif, 2022). Enzim lipase diproduksi dan dilakukan pemurnian untuk mendapatkan enzim lipase hasil pemurnian, kemudian dilakukan uji aktivitas enzim pada setiap tahap pemurnian. Setelah tahap pemurnian dilakukan imobilisasi enzim lipase dengan menggunakan metode adsorpsi pada matriks pendukung hidroksiapatit dan dilakukan penentuan kondisi optimum enzim lipase terimobil untuk mengetahui karakteristik dari enzim lipase terimobil pada matriks hidroksiapatit.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan enzim lipase murni dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dan pemurnian.
2. Melakukan imobilisasi enzim lipase menggunakan hidroksiapatit untuk mendapatkan enzim lipase terimobilisasi.
3. Mengetahui kondisi optimum enzim lipase terimobil dan pemakaian berulang.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dalam menghasilkan enzim lipase. Enzim dapat dipisahkan di akhir reaksi, tanpa terkontaminasi dengan hasil reaksi, sehingga enzim dapat digunakan kembali untuk reaksi selanjutnya atau dapat digunakan secara berulang.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Bakteri *Klebsiella* sp.

*Klebsiella* sp. adalah bakteri gram negatif dari kelompok *Enterobacteriaceae* yang bersifat nonmotile. Mereka cenderung lebih pendek dan lebih tebal jika dibandingkan dengan yang lain di keluarga *Enterobacteriaceae*. Sel-selnya berbentuk batang dan umumnya berukuran lebar 0,3 - 1,5  $\mu\text{m}$  dengan panjang 0,5 - 5,0  $\mu\text{m}$ . Mereka bisa ditemukan dalam bentuk sendiri-sendiri, berpasangan, dalam rantai, atau dihubungkan ujung ke ujung. *Klebsiella* bisa tumbuh di laboratorium biasa dan tidak memiliki persyaratan pertumbuhan khusus, seperti anggota *Enterobacteriaceae* lainnya. Spesies ini aerobik tetapi secara fakultatif anaerobik. Pertumbuhan ideal mereka suhu 35 - 37°C, sedangkan tingkat pH idealnya sekitar 7,2 (Arif, 2022).

Menurut Arif (2022) bakteri *Klebsiella* sp dapat menghasilkan isolat seperti enzim lipase dan mempunyai kemampuan yang dapat menghidrolisis minyak. Hal ini diketahui setelah melakukan studi awal dengan menumbuhkan isolat bakteri *Klebsiella* sp dalam media selektif dan menghasilkan indeks lipolitik sebesar 21,2. Indeks lipolitik sebesar 21,2 diperoleh dari hasil pembagian antara diameter koloni yang tumbuh dan diameter zona bening pada uji lipolitik.

### 2.2. Enzim Lipase

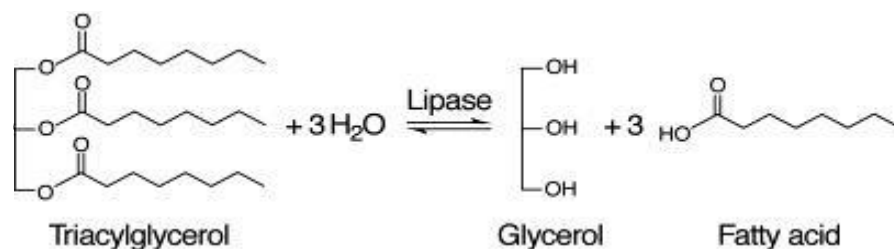
Lipase (triasilgliserol asilhidrolase; EC 3.1.1.3) merupakan kelompok enzim yang didefinisikan sebagai karboksilesterase yang mengkatalisis hidrolisis asil gliserol rantai panjang pada antarmuka lipid air (Castro-Ochoa *et al.*, 2005). Lipase telah banyak digunakan untuk aplikasi bioteknologi logis dalam deterjen, industri susu, tekstil, produksi surfaktan, dan pengolahan minyak.

Contoh lain aplikasi lipase yang banyak diperhatikan yaitu sehubungan dengan pembuatan obat - obatan murni enansiomer, karena lipase memiliki sejumlah karakteristik unik yaitu; spesifisitas substrat, spesifisitas regio, dan selektivitas kiral. Banyak reaksi dilakukan efisien pada suhu tinggi dan dalam pelarut organik (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Sejumlah mikroorganisme termofilik yang memproduksi lipase dan esterase termoaktif telah dimurnikan dan dikarakterisasi. Lipase termofilik menunjukkan termostabilitas yang lebih tinggi, aktivitas yang lebih tinggi pada suhu tinggi, dan sering menunjukkan lebih banyak ketahanan terhadap denaturasi kimia, menjadikannya ideal dalam proses industri dan kimia di mana suhu reaksi atau pelarut organik yang relatif tinggi digunakan. Karena setiap aplikasi industri mungkin memerlukan sifat khusus dari biokatalis, untuk menemukan lipase baru yang dapat membuat aplikasi baru (Castro-Ochoa *et al.*, 2005).

Keunggulan lipase sebagai katalis sekaligus pembeda dari esterase lainnya adalah terdapat bagian sisinya yang bersifat hidrofobik (Hidayat *et al.*, 2014).

Berdasarkan karakteristik dan keunggulan yang dimiliki lipase, diketahui bahwa lipase sangat dimanfaatkan pada suatu industri. Sehingga lipase perlu diproduksi dalam jumlah banyak, karena lipase banyak dimanfaatkan dalam suatu industri. Pengetahuan mengenai berbagai sumber yang dapat menghasilkan lipase dapat mempermudah dalam produksi lipase. Secara umum sumber lipase terbagi menjadi tiga bagian yaitu bersumber dari mamalia, tumbuhan dan mikroba.



Gambar 1. Reaksi umum hidrolisis enzim lipase (Sholeha and Agustini, 2021).

### 2.2.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya

Adapun klasifikasi enzim lipase berdasarkan sumbernya menurut Kurnia. (2010) yaitu :

1. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari mamalia:

- a) Lipase pada sistem pencernaan, seperti lingual, lambung, dan pankreas.
- b) Lipase pada jaringan, seperti hati, paru-paru, jantung, dan ginjal.
- c) Lipase dalam air susu.

2. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari tumbuhan di bagi menjadi empat jenis :

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

3. Sedangkan lipase yang bersumber dari mikroba dibagi menjadi tiga jenis :

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

Lipase yang bersumber dari mikroba merupakan lipase yang dapat dihasilkan secara cepat dan banyak didalam industri. Enzim lipase mempunyai daya katalitik dan sifat sangat spesifik sehingga menguntungkan karena dapat meminimalisir adanya reaksi samping yang mungkin terjadi. Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat memilih mikroba penghasil lipase 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 (Hernawati, 2010).

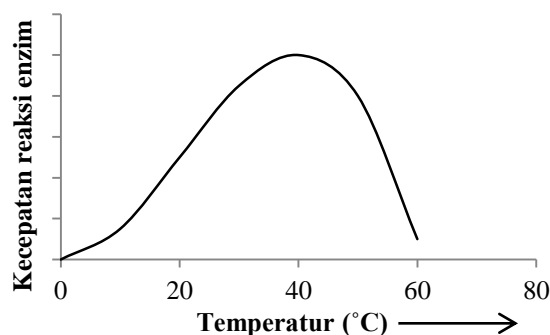


Selain sifat spesifik lipase yang hanya bekerja pada substrat lipid, enzim-enzim lain juga bekerja spesifik pada substrat yang sesuai karena enzim mempunyai perbedaan struktur kimia yang tetap. Kerja enzim secara umum pada saat mengkatalisis suatu reaksi, yaitu terjadi dengan menempelkan sisi aktifnya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

### 2.2.2. Faktor yang Mempengaruhi Kerja Enzim

#### 1. Temperatur

Enzim merupakan protein yang mempunyai sifat mengalami denaturasi jika terkena panas. Karena sifatnya sebagai protein tersebut setiap enzim memiliki suhu optimumnya masing-masing. Suhu dapat mempengaruhi kerja enzim. Jika suhunya dibawah atau diatas suhu optimum yang dimiliki enzim maka kerja enzim dapat berkurang atau tidak bekerja sama sekali. Karena suhu yang terlalu rendah tidak mendorong kerja enzim secara efektif sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat merusak sisi aktif enzim (Irawati, 2016). Hubungan antara suhu dan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 2.

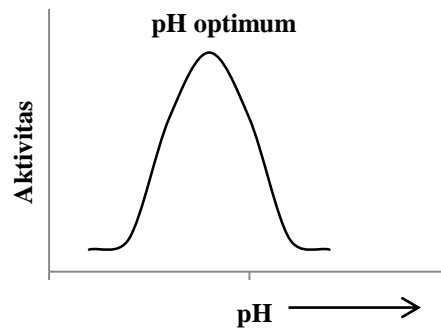


Gambar 2. Kurva hubungan suhu dan enzim (Arif, 2022).

#### 2. Tingkat Keasaman (pH)

Tingkat keasaman (pH) pada enzim memiliki titik optimumnya sendiri. Lingkungan yang terlalu asam atau terlalu basa dapat mendenaturasi enzim. Kebanyakan enzim yang ditemukan memiliki pH optimum pada keadaan netral

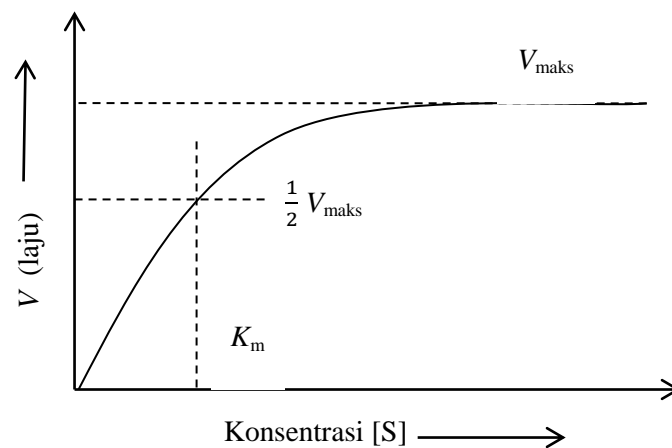
atau nilai pHnya sebesar 7 (Ayu, 2017). Kurva yang menyatakan hubungan pH dengan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan nilai pH (Arif, 2022).

### 3. Konsentrasi substrat

Konsentrasi substrat yang digunakan juga mempengaruhi aktivitas kerja enzim. Konsentrasi substrat berbanding lurus dengan aktivitas kerja enzim. Semakin tinggi konsentrasi substrat yang digunakan, maka semakin tinggi aktivitas enzim atau semakin tinggi kecepatan reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut. Pada suatu titik tertentu, yaitu kecepatan maksimum ( $V_{maks}$ ), penambahan konsentrasi substrat dalam jumlah tertentu tidak akan dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim, melainkan dapat menurunkan aktivitas enzim atau kecepatan reaksi (Elawati dkk., 2018). Hal ini terjadi karena pada konsentrasi yang sangat tinggi semua sisi aktif enzim telah berikatan dengan substrat sehingga tercapailah laju reaksi maksimum (Ayu, 2017). Adapun kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva hubungan konsentrasi (Arif, 2022).

#### 4. Inhibitor

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.

##### a) Inhibitor kompetitif

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

##### b) Inhibitor 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).

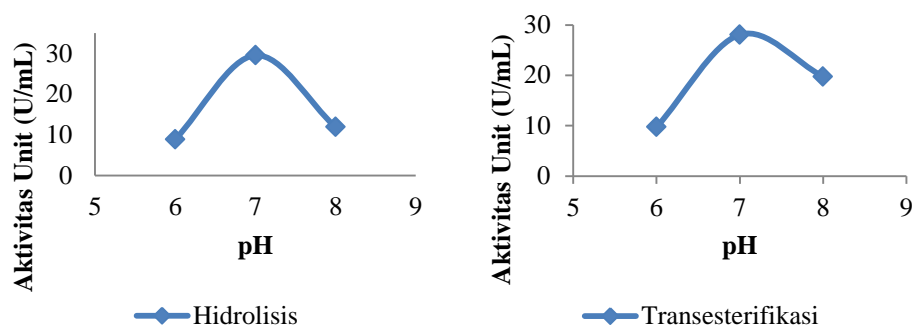
### **2.3. Karakteristik Enzim Lipase *Klebsiella* sp. LPG172**

Penentuan kondisi optimum enzim lipase sebelum terimobilisasi digunakan dari hasil penelitian sebelumnya yaitu pada penelitian Arif (2022) dan Partini (2023). Karakteristik enzim lipase hasil pemurnian perlu ditentukan untuk mendapatkan kondisi optimum pada beberapa parameter yang dapat mempengaruhi kerja enzim pada reaksi hidrolisis. Parameter yang digunakan pada penelitian ini berupa pH, suhu, dan waktu inkubasi.

#### 2.3.1. pH Optimum

Kerja enzim dipengaruhi beberapa faktor seperti nilai pH, temperatur dan juga waktu inkubasinya. Optimasi dari setiap faktor dilakukan untuk mendapatkan kerja enzim yang optimal pula. Prinsip optimasi kerja enzim ini adalah penentuan aktivitas enzim dalam reaksi hidrolisis lipid dengan variasi pH tertentu. Penentuan

pH optimum dilakukan dengan cara memvariasikan besar pH pada larutan buffer fosfat yang digunakan untuk menentukan uji nilai aktivitas unit enzim. Variasi nilai pH larutan buffer fosfat yang digunakan sebesar 6, 7 dan 8 dengan konsentrasi sebesar 0,05 M. Selanjutnya enzim yang telah ditambahkan buffer dan substrat diinkubasi selama 15 menit pada suhu 40°C. Hasil yang didapatkan pada perlakuan ini ditunjukkan pada kurva hubungan nilai aktivitas unit dengan nilai pH buffernya, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.



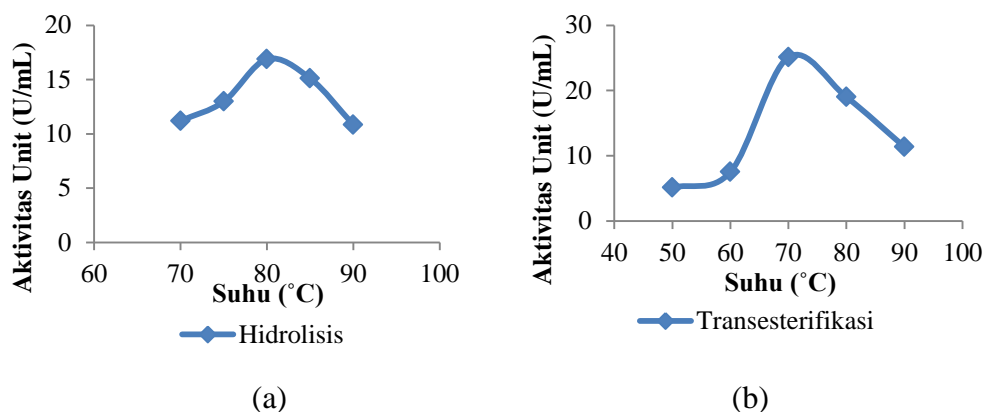
Gambar 5. Pengaruh pH pada aktivitas lipase dalam reaksi hidrolisis (Arif, 2022) dan transesterifikasi (Partini, 2023).

Gambar 5 menunjukkan pada reaksi hidrolisis memiliki puncak pada pH 7 dengan nilai aktivitas unitnya sebesar 29,51 U/mL (Arif, 2022) dan reaksi transesterifikasi pada puncak pH 7 memiliki nilai aktivitas unit sebesar 28,064 U/mL (Partini, 2023) merupakan pH optimum enzim lipase dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172. Pada pH selain pH optimum, enzim dapat mengalami denaturasi yang dapat mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim. Hal ini dikarenakan enzim merupakan protein sehingga perubahan pH dapat menyebabkan ionisasi pada molekul protein berubah. Perubahan yang terjadi dapat menyebabkan struktur tiga dimensi enzim berubah sehingga sisi aktif enzim yang berguna untuk menjalankan aktivitas katalitik menjadi terganggu dan tidak efektif.

### 2.3.2. Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan agar didapatkan kerja optimum enzim pada suhu tertentu dalam reaksi hidrolisis. Penentuan suhu optimum dilakukan dengan cara memvariasikan temperatur selama masa inkubasi untuk mendapatkan nilai aktivitas unit enzim. Variasi temperatur yang digunakan sebesar 70, 75, 80, 85

dan 90°C. Persiapannya dilakukan dengan menambahkan enzim, substrat dan buffer fosfat 0,05 M dengan pH optimum yakni 7. Kemudian di inkubasi selama 15 menit pada masing masing temperatur. Hasil yang didapatkan pada perlakuan ini ditunjukkan pada kurva hubungan nilai aktivitas unit dengan temperaturnya, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.



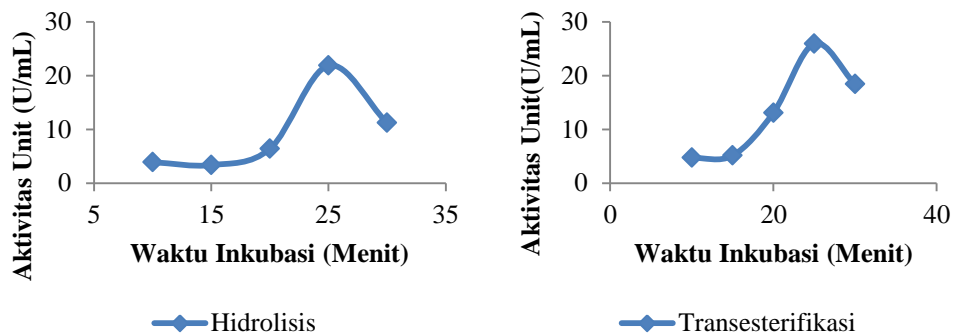
Gambar 6. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase dalam (a) reaksi hidrolisis (Arif, 2022) dan (b) reaksi transesterifikasi (Partini, 2023).

Pada Gambar 6 (a) menunjukkan puncak aktivitas unit tertinggi pada temperatur 80°C dengan nilai AU sebesar 16,89 U/mL (Arif, 2022). Sedangkan pada Gambar 6 (b) menunjukkan aktivitas unit enzim lipase tertinggi berada pada puncak suhu 70°C sebesar 25,125 U/mL (Partini, 2023). Hal ini menunjukkan bahwa enzim dapat bekerja secara optimal pada suhu tersebut. Sejalan dengan meningkatnya suhu, makin meningkat juga nilai aktivitasnya. Namun, peningkatan suhu di atas suhu optimumnya dapat menyebabkan lemahnya ikatan dalam enzim secara struktural. Pada saat itu enzim akan terdenaturasi karena struktur protein terbuka dan gugus polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka ke luar. Kelarutan protein dalam air akan berkurang sehingga aktivitas enzimnya juga akan menurun. Inilah yang menyebabkan pada temperatur 85°C dan 90°C nilai aktivitas unitnya mengalami penurunan.

### 2.3.3. Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan agar didapatkan kerja optimum enzim pada waktu tertentu dalam reaksi hidrolisis. Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan cara memvariasikan rentang waktu inkubasi yang

digunakan untuk menentukan nilai aktivitas unit enzim. Variasi rentang waktu yang digunakan sebesar 10, 15, 20, 25 dan 30 menit. Persiapannya dilakukan dengan menambahkan enzim, substrat dan buffer fosfat 0,05 M dengan pH optimum yakni 7. Kemudian di inkubasi dengan setiap varian waktu pada temperatur optimumnya yakni 80°C. Hasil yang didapatkan pada perlakuan ini ditunjukkan pada kurva hubungan nilai aktivitas unit dengan waktu inkubasinya, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas enzim lipase dalam reaksi hidrolisis (Arif, 2022) dan transesterifikasi (Partini, 2023).

Pada Gambar 7 waktu inkubasi optimum pada menit ke 25 merupakan puncak tertinggi dengan aktivitas unit sebesar 21, 86 U/mL pada reaksi hidrolisis (Arif, 2022) dan sebesar 25,92 U/mL pada reaksi transesterifikasi (Partini, 2023). Hal ini dapat diartikan dengan semakin bertambahnya waktu aktivitas enzim akan semakin meningkat, kemudian menjadi sangat efektif dan optimum pada waktu tertentu, dan setelahnya mengalami penurunan kembali. Menurunnya aktivitas enzim bisa diakibatkan karena enzim yang berupa protein mengalami denaturasi sehingga mengalami perubahan bentuk sisi aktifnya.

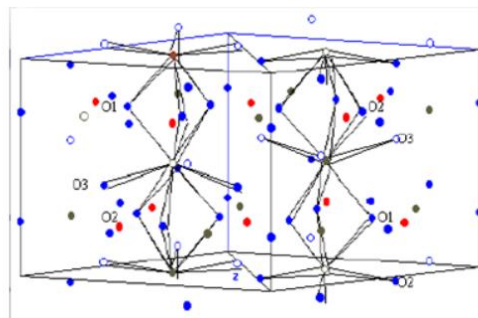
#### 2.4. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) dengan rumus kimia  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  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, seperti untuk perbaikan tulang, baik pada perbaikan tulang retak maupun tulang patah. Material yang digunakan dalam pengobatan tersebut harus bersifat bioaktif, biokompatibel, dan tidak beracun (Noviyanti *et al.*, 2017).

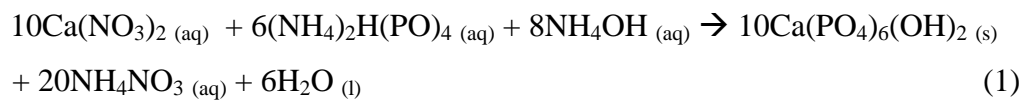
Sebagai material kimia, HA adalah senyawa kalsium fosfat dan anggota kelompok mineral apatit dengan rumus kimia secara umum  $M_{10}(RO_4)X_2$ , dengan R biasanya merupakan unsur fosfor, M adalah salah satu dari unsur logam yang biasanya adalah unsur kalsium, dan X biasanya merupakan hidroksida atau unsur halogen. Senyawa kalsium fosfat berbentuk kristal dan terdapat dalam empat fase, yaitu dikalsium fosfat, okta kalsium fosfat, trikalsium fosfat, dan hidroksiapatit (Noviyanti *et al.*, 2017).

Kalsium fosfat memiliki sifat alami yang kompleks, bisa berada pada berbagai fase, dapat pula dalam bentuk larutan padat. Selain itu kalsium fosfat dapat dalam bentuk nonstoikiometri dengan adanya pengotor yang mengganti ion kalsium dalam kristal. Pada umumnya, kalsium fosfat berada dalam bentuk amorf maupun berbagai kristal. Komposisi kimia HA  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  berupa kesatuan sel dari HA dalam 3 dimensi yang memiliki panjang 0,944 nm, lebar 0,944 nm dan tinggi 0,688 nm dengan bentuk keseluruhan berupa jajaran genjang. Kesatuan sel HA terdiri atas dua dataran berbentuk jajaran genjang di permukaan atas dan bawah. Tiga ion terletak ditengah pada masing-masing dataran, sedangkan 8 ion lain berada pada tepi dan bergabung dengan sel lain yang berdekatan. Dua ion terletak di tengah dan merupakan inti dari unit sel, 8 ion terletak di tepi dan bergabung dengan 4 unit sel lainnya yang berdekatan. Delapan ion pada keempat dataran vertikal sel (Rossi *et al.*, 2007). Struktur kristal dari HA adalah hexagonal dengan dimensi sel  $a = 9,423 \text{ \AA}$  dan  $c = 6,875 \text{ \AA}$  (Majhool *et al.*, 2019).



Gambar 8. Struktur kimia hidroksiapatit (Noviyanti *et al.*, 2017).

Menurut Noviyanti *et al.* (2017) persamaan reaksi pembentukan hidroksiapatit dapat dilihat pada Persamaan 1 yaitu :



Pada penelitian ini hidroksiapatit yang digunakan merupakan hidroksiapatit komersial yang memiliki sifat kimia dan fisik yaitu :

Kelas farmasi *Bovine Hydroxyapatite*

Klasifikasi	: Keramik, Hidroksiapatit
Sinonim	: Hidroksiapatit, Kalsium Fosfat Hidroksida, Kalsium Hidrofosfat, Dekalsium Heksafosfat Dihidroksida, Kalsium Fosfat Tribasic
Rumus kimia	: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Berat molekul	: 502,31 g/mol
Ukuran partikel	: 400-650 nm
Kemurnian	: > 95%
Suhu dekomposisi	: 1000°C (1832°F)
Rasio molar Ca/P	: 1,60 hingga 1,90
Titik leleh	: 1.100°C (2012°F)
Pembuatan	: Reaksi Hidrotermal (Kalsinasi)
Morfologi	: Kristal Heksagonal
Warna	: Putih hingga putih mati
Kegunaan	: Implan biokompatibilitas atau tulang

## 2.5. Imobilisasi Enzim

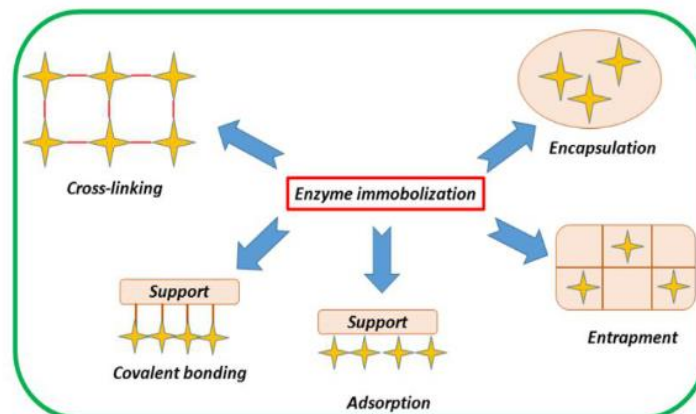
Sebagian besar lipase yang digunakan dalam proses industri berada dalam keadaan imobil. Imobilisasi enzim menggunakan bahan pendukung padat sangat menarik karena beberapa keuntungan penting seperti; peningkatan aktivitas dan stabilitas enzim, kemungkinan pemulihan enzim yang diimobilisasi pada akhir reaksi, potensi penggunaan kembali dan pencapaian reaksi. Banyak yang telah melaporkan teknik imobilisasi lipase yang berbeda seperti adsorpsi fisik enzim pada bahan pembawa, penjebakan atau mikroenkapsulasi dalam pendukung padat



dan pengikatan kovalen ke matriks padat (Kharrat *et al.*, 2011). Adapun keuntungan perlakuan imobilisasi menurut Susilo. (2012) antara lain sebagai berikut :

- Enzim dapat digunakan kembali.
- Proses dapat dioperasikan terus menerus dan dapat dengan mudah dikontrol.
- Produk dapat dipisahkan dengan mudah.
- Limbah dan penanganan masalah bahan dapat diminimalkan.
- Dalam beberapa kasus, sifat enzim (aktivitas dan stabilitas) dapat diubah menjadi lebih baik oleh media imobilisasi.
- Meningkatkan kestabilan pH dan termal.

Ada berbagai metode penjeratan enzim seperti penjebakan serat, penjebakan gel, mikroenkapsulasi, dll. Berbagai metode imobilisasi dapat dilihat pada Gambar 9 (Maroufi *et al.*, 2022) :



Gambar 9. Jenis-jenis metode imobilisasi.

Salah satu metode imobilisasi yang biasa dilakukan adalah adsorpsi. Pada metode adsorpsi, 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 elektrostatik ikatan hidrogen antara pendukung dan enzim yang menempel (Maroufi *et al.*, 2022).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2023 - Juni 2024 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Bandar Lampung.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat - alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah; cawan petri, tabung reaksi, tabung sentrifuga, *centrifuge cole parmer*, labu ukur, gelas ukur, Erlenmeyer, gelas piala, rak tabung reaksi, pipet tetes, batang pengaduk, *Laminar Air Flow* CRUMA model 9005-FL, autoklaf model S-90N, corong pisah, spektrofotometer *UV-Vis Cary Win UV 100*, mikropipet *dragon lab*, mikrotip, neraca analitik DJ-V 220A *Lucky*, pH meter *metrohm*, jarum ose, inkubator *precistern P selecta*, *magnetic stirrer* CB161 *Stuart*, *hot plate* CB162 *Stuart*, *spin bar*, termometer, *orbital shaker* Daihan *Labtech Co., LTD*, *waterbath* Memmert W 350, oven, bunsen dan buret sebagai kolom kromatografi dengan volume 50 mL.

Bahan - bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah; kertas saring, kapas, kain kasa, *Aluminium foil*, plastik *wrap*, *Nutrient Agar*, *Nutrient Broth*, tween 80, minyak zaitun Bertolli, akuades,  $\text{Na}_2\text{HSO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ , HCl 6N, n-heksana, metanol, asetonitril, isopropanol, tembaga(II)asetat, BSA(*Bovine Serum Albumin*), Asam oleat, pNP(p-Nitrofenol), pNPP(p-Nitrofenolpalmitat), pereaksi Lowry (A,B,C dan D), ammonium sulfat, sephadex G-75, bakteri *Klebsiella* sp. LPG172, dan matriks hidroksiapatit yang diperoleh secara komersial.

### 3.3. Prosedur Penelitian

#### 3.3.1. Tahap Persiapan

##### a) Persiapan alat

Peralatan gelas sebelum digunakan terlebih dahulu dicuci, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas. Setelah dibungkus, semua peralatan disterilisasi dalam autoklaf bertekanan 1 atm dan bersuhu 121°C selama 15 menit. Alat yang telah disterilisasi kemudian dikeringkan dalam oven selama kurang lebih 2 jam (Arif, 2022).

##### b) Pembuatan media selektif

Media selektif dalam Erlenmeyer 250 dibuat dengan mencampurkan NA 2,8 % dan minyak zaitun sebanyak 1 % yang dilarutkan dalam akuades. Media dipanaskan dengan *hot plate* hingga homogen dan disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam autoklaf. Media dituang pada cawan petri/tabung reaksi secara aseptik. Media didiamkan hingga mengeras dan siap pakai (Arif, 2022).

##### c) Pembuatan media inokulum

Media inokulum dibuat dengan komposisi minyak zaitun 1 %, tween 80 0,1 %, dan *nutrient broth* 1,3 % yang dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dalam Erlenmeyer 250 mL. Media inokulum disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam autoklaf (Arif, 2022).

##### d) Pembuatan media fermentasi

Media fermentasi dibuat dengan komposisi minyak zaitun 2 %, tween 80 0,1 %, dan *nutrient broth* 1,3 % yang dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 dalam Erlenmeyer 1000 mL. Media fermentasi disterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm, selama 15 menit dalam autoklaf (Arif, 2022).

##### e) Inokulasi bakteri

Media agar selektif dituang pada tabung reaksi secara aseptis. Mulut tabung reaksi ditutup menggunakan sumbat. Media disterilisasi pada autoklaf dengan tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Tabung reaksi diletakkan dengan kemiringan

lima derajat. Tabung reaksi didiamkan 3 hari hingga siap dipakai. Isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dipindahkan ke dalam media agar miring yang telah dibuat secara aseptis. Media agar miring diinkubasi pada inkubator dengan suhu 30°C selama 66 jam (Arif, 2022).

f) Peremajaan isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172

Peremajaan isolat dilakukan dengan cara isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 diambil 1 ose dan digoreskan ke media NA miring dalam tabung reaksi secara aseptik, lalu biakan diinkubasi selama 66 jam pada suhu 30°C dan disimpan dalam kulkas sebagai isolat stok. Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 yang digunakan adalah stok di laboratorium biokimia yang diperoleh dengan metode isolasi dari tanah tercemar minyak di daerah kampung baru, Bandar Lampung yang dilakukan oleh Arif (2022).

### 3.3.2. Persiapan untuk Penentuan Kadar Protein

Penentuan kadar protein menurut Lowry *et al.* (1951) :

1. Pereaksi Lowry A

Pereaksi Lowry A dibuat dengan melarutkan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam larutan NaOH 0.1 N dengan konsentrasi 2%.

2. Pereaksi Lowry B

Pereaksi Lowry B dibuat dengan mencampurkan larutan CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1% dan larutan NaK 1% dengan perbandingan 5 : 3 (v/v).

3. Pereaksi Lowry C

Pereaksi Lowry C dibuat dengan mencampurkan larutan pereaksi Lowry B dan larutan pereaksi Lowry A dengan perbandingan 2 : 100 (v/v).

4. Pereaksi Lowry D

Pereaksi Lowry D dibuat dengan mencampurkan larutan Folin ciocalteu dan akuades dengan perbandingan 1:1 (v/v).

### 3.3.3. Uji Aktivitas Enzim

Aktivitas lipase ditentukan dengan dua reaksi yaitu aktivitas hidrolisis dan aktivitas transesterifikasi.

#### 3.3.3.1. Uji aktivitas hidrolisis

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon and Rhee. (1986). Campuran enzim lipase 0,70 mL, buffer fosfat 0,05 M pH 7 0,35 mL dan substrat minyak zaitun 0,70 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada *shaker* kecepatan 120 rpm selama 15 menit. Campuran ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana, divorteks selama 1 menit dan didiamkan selama 15 menit menghasilkan terbentuknya dua fase. Fase minyak diambil sebanyak 2,50 mL. Akuades sebanyak 0,70 mL digunakan sebagai kontrol dan pelarut n-heksana sebanyak 3,75 mL sebagai blanko. Sampel, kontrol dan blanko ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% lalu divorteks. Penentuan nilai absorbansi sampel dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* dengan panjang gelombang 746 nm. Aktivitas Hidrolisis diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan asam oleat sebagai standar.

#### 3.3.3.2. Uji aktivitas transesterifikasi

Uji aktivitas transesterifikasi dilakukan dengan metode yang dilakukan oleh Fu *et al.* (2014). Substrat p-nitrofenol palmitat sebanyak 0,25 mL dicampurkan dengan 0,25 mL asetonitril dalam tabung reaksi. Campuran substrat ditambahkan 1 mL enzim lipase dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 10 menit. Campuran diambil sebanyak 0,045 mL, ditambahkan dengan 4,455 mL metanol dan diuji absorbansi pada panjang gelombang 315 nm spektrofotometer *UV-Vis*. Kontrol dilakukan kondisi dan prosedur yang sama tetapi tanpa penambahan enzim. Aktivitas transesterifikasi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan p-NP (p-nitrofenol) sebagai standar.

### 3.3.4. Penentuan Kadar Protein Enzim Lipase

Kadar protein enzim lipase diukur berdasarkan metode Lowry *et al.* (1951) yaitu; 0,1 mL sampel enzim lipase ditambahkan 0,9 mL akuades dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Campuran ditambahkan 5 mL pereaksi Lowry C, dikocok dan didiamkan selama 10 menit. Campuran ditambahkan pereaksi Lowry D (folin ciocalteu) sebanyak 0,5 mL, dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi sampel ditentukan dengan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang 750 nm. Kadar protein diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum dengan menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Larutan kontrol digunakan 0,1 mL akuades. Kadar protein dapat ditentukan nilainya dengan menghitung menggunakan Persamaan 2 :

$$\text{Kadar Protein (mg/mL)} = \frac{(\text{Abs Sampel} - a)}{b} : 1000 \quad (2)$$

### 3.3.5. Produksi Enzim

Kultur bakteri diambil menggunakan ose dan dimasukkan ke dalam 50 mL media inokulum pada Erlenmeyer 250 mL, dilakukan hingga tiga kali pengulangan. Media diinkubasi pada suhu 30°C dan diagitasi menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama satu hari. Hasil inkubasi digunakan sebagai inokulum. 10% inokulum difermentasi pada 500 mL media fermentasi, dilakukan kultivasi selama dua hari dan diagitasi dengan kecepatan 120 rpm. Larutan disentrifus dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit untuk memisahkan supernatan (ekstrak kasar enzim) dari pelletnya (sisa-sisa sel) (Sugiharni, 2010). Ekstrak kasar enzim lipase dilakukan uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein yang dapat dilihat pada metode uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein.

### 3.3.6. Pemurnian Enzim Lipase

#### a. Fraksinasi ekstrak kasar

Ekstrak kasar enzim lipase dilakukan pemurnian menggunakan ammonium sulfat pada 2 tingkat fraksi, yaitu fraksi (0 - 20 dan 20 - 90) %. Ammonium sulfat ditambahkan secara perlahan ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk. Suhu

lingkungan dibuat menjadi 4°C, didiamkan selama 30-60 menit, dan disentrifugasi selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipisahkan dari endapan yang terbentuk dan ditampung untuk fraksinasi pada tingkat berikutnya. Endapan protein pada masing-masing fraksi dilarutkan dalam 30 mL buffer fosfat pH optimum produksi untuk selanjutnya didialisis (Parwata, I dan Martiningsih, 2014).

#### b. Dialisis

Endapan protein terlarut buffer dari tiap fraksi ammonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,01 M pH 7 selama  $\pm$  24 jam pada suhu dingin. Larutan buffer diluar kantong dialisis diganti setiap 4-6 jam sekali selama proses dialisis, agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi (Popoola and Olateru, 2021). Dialisis dilakukan secara kontinu sampai ion-ion didalam kantong dialisis dapat diabaikan. BaCl<sub>2</sub>/BaOH<sub>2</sub> ditambahkan pada buffer untuk melihat sisa endapan garam ammonium sulfat setiap pergantian buffer. Hasil dialisis ditentukan melalui nilai aktivitas lipase dan kadar proteinnya yang dapat dilihat pada metode uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein.

#### c. Kromatografi filtrasi gel

Sephadex G-75 berupa serbuk dikembangkan menggunakan buffer fosfat, ditentukan pHnya menggunakan buffer fosfat pH optimum produksi enzim dan didiamkan pada suhu dingin selama 24 jam. Buret digunakan sebagai kolom kromatografi filtrasi gel dan sephadex G-75 sebagai matriks kolom (Rahmi *et al.*, 2020). Enzim hasil fraksinasi sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks sephadex G-75 yang telah diaktivasi menggunakan buffer fosfat 0,05 M pH optimum produksi. Enzim lipase dielusi dengan menggunakan buffer fosfat 0,05 M pH optimum produksi. Sampel ditampung sebanyak 5 mL pada setiap tabung vial. Masing-masing fraksi ditentukan kadar protein dan aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* ( $\lambda = 280$  nm) (Rusman, 2017). Metode uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein dapat dilihat pada metode uji aktivitas dan penentuan kadar protein enzim.

### 3.3.7. Imobilisasi Enzim Lipase

Pada penelitian ini digunakan hidroksiapatit (HA) yang diperoleh secara komersial. Imobilisasi enzim lipase dengan metode adsorpsi pada hidroksiapatit dilakukan dengan mengambil enzim lipase sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL buffer fosfat pH 7 dan 0,67 gram hidroksiapatit. Enzim dan matriks dishaker selama 30 menit dengan kecepatan 120-150 rpm pada suhu kamar, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm (Firdaus dkk., 2017).

### 3.3.8. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Imobil

#### a) Penentuan pH Optimum

Penentuan pH optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim dan substrat selama 15 menit pada suhu 40°C dengan prosedur uji aktivitas menggunakan beberapa kondisi pH (6, 7, 8, 9, 10) dengan buffer fosfat (Su'li dkk., 2013).

#### b) Penentuan Suhu Optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim dan substrat selama 15 menit pada prosedur uji aktivitas menggunakan variasi suhu (30, 40, 50, 60, 70°C) dan pH optimum yang telah ditentukan (Su'li dkk., 2013).

#### c) Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim dan substrat dengan suhu dan pH optimum pada prosedur uji aktivitas menggunakan variasi lama waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, 25, 30) menit (Susanti, 2011).

### 3.3.9. Uji Stabilitas Enzim

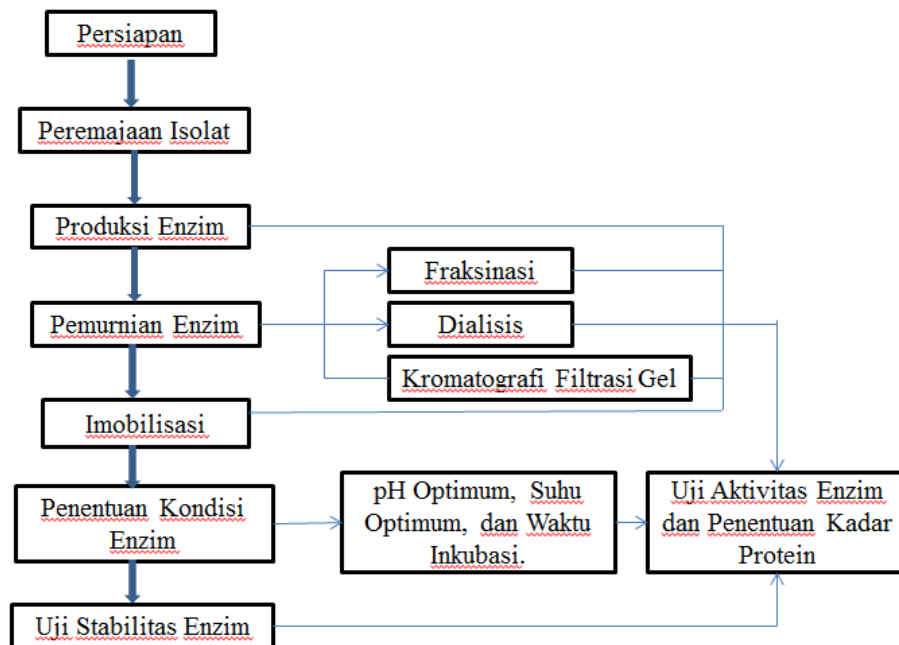
Stabilitas enzim lipase dilakukan dengan uji aktivitas enzim lipase secara berulang hingga didapatkan hasil yang maksimal yaitu jika hasil yang diperoleh sudah setengah dari hasil enzim terimobil. Menurut Firdaus dkk., (2017) penggunaan



berulang enzim lipase dilakukan dengan menggunakan uji hidrolisis; Sebanyak 1 g enzim imobil dimasukkan kedalam tabung sentrifus, ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH optimum imobil dan 0,70 mL substrat minyak zaitun. Campuran diinkubasi pada waktu inkubasi optimum imobil (menit), pada suhu optimum imobil ( $^{\circ}\text{C}$ ). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Produk hasil imobilisasi diuji aktivitas enzimnya dengan menggunakan metode Kwon and Rhee (1986) pada panjang gelombang 746 nm. Larutan sisa pemakaian enzim imobil pertama dibuang dan matriks yang masih terikat enzim dicuci dengan ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH optimum imobil dan disentrifugasi selama 10 menit. Filtrat dibuang dan enzim yang masih terikat pada matriks digunakan untuk penentuan aktivitas enzim lipase berikutnya. Prosedur yang sama dilakukan untuk uji transesterifikasi dengan metode Fu *et al.*, (2014) menggunakan pNPP sebagai substrat dan diuji pada panjang gelombang 315 nm.

### 3.3.10. Skema Penelitian

Adapun skema penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :



## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

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

1. Enzim lipase yang didapatkan melalui pemurnian bertahap seperti fraksinasi ammonium sulfat, dialisis dan kromatografi filtrasi gel memiliki aktivitas spesifik pada reaksi hidrolisis sebesar 2.002,39 U/mg dengan kemurnian sebesar 193 kali lebih besar dari ekstrak kasar enzim lipase. Sedangkan, pada reaksi transesterifikasi memiliki aktivitas spesifik sebesar 2.462,29 U/mg dengan kemurnian sebesar 237,33 kali lebih besar dari ekstrak kasar enzim.
2. Enzim lipase terimobil dengan matriks hidroksiapatit memiliki aktivitas spesifik sebesar 1.375,24 U/mg pada uji hidrolisis. Sedangkan, pada uji transesterifikasi memiliki aktivitas spesifik sebesar 1.906,86 U/mg.
3. Enzim lipase terimobilisasi memiliki kondisi optimum pada reaksi hidrolisis yaitu; pH 8, suhu 50°C dan waktu inkubasi 15 menit, dan pada reaksi transesterifikasi yaitu; pada pH 8, suhu 60°C dan waktu inkubasi 10 menit.
4. Enzim lipase imobil dengan matriks hidroksiapatit dapat dilakukan 2 kali pemakaian dengan sisa aktivitas sebesar 30% dari enzim bebasnya pada reaksi hidrolisis dan sebanyak 4 kali pemakaian dengan aktivitas sisa sebesar 37% dari enzim bebasnya untuk reaksi transesterifikasi.

## 5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, terdapat beberapa saran yang dapat dilakukan dan membantu dalam penelitian selanjutnya yaitu :

1. Pada tahap pemurnian kromatografi filtrasi gel dengan sephadex G-75, dibutuhkan perhatian lebih untuk mempertahankan laju alir fase gerak yang berupa buffer fosfat guna menjaga sephadex G-75 tetap dalam keadaan terendam sehingga tidak menyebabkan keretakan pada gel sephadex G-75.
2. Disarankan untuk penelitian selanjutnya digunakan matriks yang berbeda pada imobilisasi, untuk mengetahui karakteristik dari enzim lipase terimobil pada matriks selain hidroksiapatit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arif, F. H. 2022. Studi Produksi Biodiesel Dengan Katalis Lipase Yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. Dari Tanah Tercemar Minyak. In *Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung*. Bandar Lampung.
- Arjita, I. P. D. 2009. Analisis Protein Jaringan Otak Sapi Dengan Metode Isolasi, Purifikasi Dan Visualisasi. *GaneÇ Swara*. 3(2) : 55–58.
- Ayu, M. L. 2017. Penentuan Jenis Enzim Protease Dari *Bacillus licheniformis* Dengan Metode Zimography Pada Suhu 50°C Dan 70°C. *Program Studi Diploma IV Analis Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang*.
- Bariroh, A. 2014. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease Dari *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp. Dan Campuran Kapang *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. Yang Ditumbuhkan Pada Media Limbah Cair Tahu Dan Dedak. *Skripsi, Jurusan Biologi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*.
- Bintang, M., Panji, T., and Saadah, S. 2015. Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase on Zeolit, CaCO<sub>3</sub>, Silica Gel, and Cow Bone. *Current Biochemistry*. 2(2) : 63–72. <https://doi.org/10.29244/cb.2.2.63-72>.
- Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., and Oliart Ros, R. 2005. Screening, Purification and Characterization of The Thermoalkalophilic Lipase Produced by *Bacillus Thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology*. 37(6) : 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.003>.
- Elawati, N. E., Pujiyanto, S., dan Kusdiyantini, E. 2018. Karakteristik Dan Sifat Kinetika Enzim Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauveria bassiana*. *Jurnal Bioteknologi Dan Biosains Indonesia*. 5(6) : 1–7.

- 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.  
<https://doi.org/10.26740/ujc.v10n3.p246-256>.
- 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 Imobil. *Indo. J. Chem. Res.* 5(1) : 32–36.  
<https://doi.org/10.30598/ijcr.2017.5-fir>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/s1872-2067\(14\)60053-x](https://doi.org/10.1016/s1872-2067(14)60053-x).
- Hernawati, B. D. 2010. *Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari Pseudomonas aeuruginosa Sebagai Biokatalisator Dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Sawit Dengan Sukrosa*. Depok: Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Indonesia.
- Hidayat, M., Soeng, S., dan Prahastuti, S. 2014. Pengujian Aktivitas Inhibitor Lipase Ekstrak Etanol Dan Hasil Fraksionasi Dari Kedelai Detam 1 Dan Daun Jati Belanda. *Chimica et Natura Acta*. 2(1) : 76–82.
- Irawati, R. 2016. Karakterisasi pH, Suhu Dan Konsentrasi Substrat Pada Enzim Selulase Kasar Yang Diproduksi Oleh *Bacillus circulans*. *Skripsi, Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*.
- 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. *Process Biochemistry*. 46(5) : 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.029>.
- Kojima, Y., and Shimizu, S. 2003. Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96(3) : 219–226. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80185-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80185-8).
- Kurnia, D. R. D. 2010. Studi Aktivitas Enzim Lipase Dari *Aspergillus niger* Sebagai Biokatalis Pada Proses Gliserolisis Untuk Menghasilkan Monoasilgliserol. *Program Magister Teknik Kimia Universitas Diponegoro*.

- Kwon, D. Y., and Rhee, J. S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method For Determination of Free Fatty Acids For Lipase Assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 63(1) : 89–92.  
<https://doi.org/10.1007/BF02676129>.
- Li, Y., Liu, T. jie, Zhao, M. jie, Zhang, H., and Feng, F. qin. 2019. Screening, Purification, And Characterization Of An Extracellular Lipase From *Aureobasidium pullulans* Isolated From Stuffed Buns Steamers. *Journal of Zhejiang University: Science B (Biomedicine and Biotechnology)*. 20(4) : 332–342. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1800213>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
- Majhool, A. A., Zainol, I., Jaafar, C. N. A., Alsailawi H. A., Hassan, M. Z., Mudhafar, M., Majhool, A. A., and Asaad, A. 2019. A Brief Review on Biomedical Applications of Hydroxyapatite Use as Fillers in Polymer. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 13(3) : 1–8.  
<https://doi.org/10.17265/1934-7375/2019.03.004>.
- Manalu, R. T. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon Asal Indonesia. *Sainstech Farma*. 10(2) : 23–28.
- Maroufi, L. Y., Rashidi, M., Tabibiazar, M., Mohammadi, M., Pezeshki, A., and Ghorbani, M. 2022. Recent Advances of Macromolecular Hydrogels For Enzyme Immobilization In The Food Products. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 12(2) : 309–318. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.043>.
- Matsumoto, M., and Ohashi, K. 2003. Effect of Immobilization On Thermostability of Lipase From *Candida rugosa*. *Biochemical Engineering Journal*. 14(1) : 75–77. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00138-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00138-9).
- 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. *Chimica et Natura Acta*. 5(3) : 107.  
<https://doi.org/10.24198/cna.v5.n3.16057>.
- 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*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Parwata, I dan Martiningsih, N. W. 2014. Lipase Alkali dan Stabil Alkohol dari Bakteri Isolat Tanah Terkontaminasi Minyak di Pasar Anyar Singaraja, Bali. *Seminar Nasional Riset Inovatif II*. 900–906.
- Pelczar, M. 2008. *Dasar - Dasar Mikrobiologi I*. Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Popoola, B. M., and Olateru, C. T. 2021. Purification and Kinetics of Lipase of *Pseudomonas fluorescens* from Vegetable Oil Polluted Soil. *Journal of Biological Sciences*. 21(1) : 29–37. <https://doi.org/10.3923/jbs.2021.29.37>.
- Pretti, G. S. 2022. *Pemanfaatan Enzim Lipase Yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri Pseudomonas sp. Dari Tanah Tercemar Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi Dalam Produksi Biodiesel*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
- Rahman, S. M. M. M., Sen, P. K., Hasan, M. F., Miah, M. A. S., and Rahman, M. H. R. 2004. Purification and Characterization of Invertase Enzyme from Sugarcane. In *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7(3) : 340–345. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.340.345>.
- Rahmi, H., Hariyanti, Putri, R. A., and Wulandari, D. 2020. Analysis of Protease and Lipase Fractionation Originated from the Digestive Tract of Vannamei Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 7(2) : 194–202. <http://ejurnal.bppt.go.id/index.php/JBBI>.
- Rossi, A. M., Prado da Silva, M. H., Ramirez, A. J., Biggemann, D., Caraballo, M. M., Mascarenhas, Y. P., Eon, J. G., and Moure, G. T. 2007. Structural Properties of Hydroxyapatite With Particle Size Less Than 10 Nanometers. *Key Engineering Materials*. 330(332) : 255–258. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.330-332.255>.
- 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. In *Tesis. Program Paskasarjana. Universitas Hasanuddin*. [http://digilib.unhas.ac.id/uploaded\\_files/temporary/DigitalCollection/NzhjYzAxODdhZDgzZTQyM2E1MDhmZGE5NGVjY2FhNDhjNGMyNTQzNA==.pdf](http://digilib.unhas.ac.id/uploaded_files/temporary/DigitalCollection/NzhjYzAxODdhZDgzZTQyM2E1MDhmZGE5NGVjY2FhNDhjNGMyNTQzNA==.pdf).

- Sambodo, D. K., Marsel, F., Sambodo, H. P., dan Arlesia, N. 2022. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Daun Jati (*Tectona grandis L. f*) Terhadap Aktivitas Antibakteri Pada *Escherichia coli*. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*. 4(2) : 156–173.
- Sari, D. K. 2012. Karakterisasi Lipase Pada Sintesis Biodiesel. *Molluca Journal of Chemistry Education*. 2(2) : 78–84.
- Selvia, R. I., Wuryanti, dan Sriatun. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase dari Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik berasal dari Kupu-kupu (*Lepidoptera*). *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*. 16(3) : 97–101.  
<https://doi.org/10.14710/jksa.16.3.97-101>.
- Sholeha, R., and Agustini, R. 2021. Seed Lipase And Its Characterization. *UNESA Journal of Chemistry*. 10(2) : 168–183.
- Sugiharni, N. 2010. *Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari Pseudomonas fluorescens Sebagai Biokatalisator Dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa*. Depok : Skripsi. Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Indonesia.
- Su'I, M., Harijono, Yuniarta, dan Aulani'am. 2013. Kondisi Optimum Enzim Lipase Kasar Dari Kentos Kelapa. *Jurnal Reka Pangan*. 7(1) : 91–97.
- Susanti, E. 2011. Optimasi Produksi dan Karakterisasi Sistem Selulase dari *Bacillus circulans* strain Lokal dengan Induser Avicel. *Jurnal Ilmu Dasar*. 12(1) : 40–49.
- Susilo, B. 2012. Studi Optimasi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Glukosa Menggunakan Lipase *Candida Rugosa* EC 3.1.1.3 Terimmobilisasi Pada Matriks Zeolit. *Jurnal Enzim*. 1(1) : 1–92.
- Telussa, I. 2013. Isolasi Bakteri Penghasil Enzim Lipase dari Coco Butter Subtitute dan Karakterisasi Lipasannya. *Prosiding FMIPA Universitas Pattimura 2013*. 134–143.
- Wardoyo, F. A., dan Kartika, A. I. 2018. Peningkatan Stabilitas Termal Dan Stabilitas Penggunaan Berulang Enzim Lipase Melalui Imobilisasi Pada Zeolit Alam. *Jurnal Labora Medika*. 2(1) : 1–5.