

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE
HASIL ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172**

(Skripsi)

Oleh

**RETNO DWI ANGGRAENI
NPM 2117011003**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRAK

PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE HASIL ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172

Oleh

RETNO DWI ANGGRAENI

Produksi gliserol di Indonesia masih terbatas, sedangkan senyawa tersebut memiliki banyak manfaat dalam dunia industri. Penelitian ini bertujuan memisahkan gliserol dari minyak sawit komersial secara hidrolisis enzimatik menggunakan enzim lipase dari *Klebsiella* sp. LPG172. Penelitian diharapkan mendukung ketersediaan gliserol dan mengurangi limbah industri biodiesel secara berkelanjutan.

Penelitian dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu peremajaan bakteri, produksi dan pemurnian enzim lipase, lalu hidrolisis minyak sawit komersial menggunakan enzim lipase. Gliserol hasil hidrolisis kemudian dipisahkan dan dimurnikan dengan asam fosfat 5% (v/v). Uji Dunstan serta pengukuran pH dan bilangan asam dilakukan untuk memastikan keberadaan dan kemurnian gliserol hasil proses hidrolisis enzimatik tersebut.

Enzim lipase hasil pemurnian menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi sebesar 1.176,5 U/mg pada minyak zaitun dan 1.025 U/mg pada minyak sawit komersial, dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Gliserol berhasil dipisahkan dan dimurnikan dengan tingkat kemurnian 83,46%. Uji Dunstan menunjukkan keberadaan gliserol dengan perubahan warna dari merah muda menjadi tidak berwarna. pH gliserol murni menunjukkan kondisi asam, dan bilangan asam sebesar 0,786 mg KOH/g yang menyarankan keberhasilan proses pemisahan secara enzimatik yang memenuhi SNI 06-1564-1995 tentang gliserol teknis.

Kata kunci: gliserol, minyak sawit, hidrolisis enzimatik, lipase, *Klebsiella* sp. LPG172

ABSTRACT

SEPARATION OF GLYCEROL FROM PALM OIL BY ENZYMATIC HYDROLYSIS USING LIPASE FROM ISOLATED BACTERIA *Klebsiella* sp. LPG172

By

RETNO DWI ANGGRAENI

Glycerol production in Indonesia is still limited, while the compound has many benefits in the industrial world. This research aims to separate glycerol from commercial palm oil by enzymatic hydrolysis using lipase enzyme from *Klebsiella* sp. LPG 172. Research is expected to support the availability of glycerol and reduce biodiesel industrial waste sustainably.

The research was carried out through several stages, namely bacterial rejuvenation, production and purification of lipase enzyme, then hydrolysis of commercial palm oil using lipase enzyme. Glycerol from hydrolysis is then separated and purified with 5% phosphoric acid (v/v). The Dunstan test as well as the measurement of pH and acid number was carried out to ensure the presence and purity of glycerol as a result of the enzymatic hydrolysis process.

The refined lipase enzyme showed the highest specific activity of 1,176.5 U/mg in olive oil and 1.025 U/mg in commercial palm oil, compared to the crude extract of the enzyme. Glycerol is successfully separated and purified with a purity level of 83,46%. The Dunstan test showed the presence of glycerol with a color change from pink to colorless. The pH of pure glycerol showed an acidic condition, and an acid number of 0.786 mg KOH/g which suggests the success of the enzymatic separation process that meets SNI 06-1564-1995 on technical glycerol.

Keywords: glycerol, palm oil, enzymatic hydrolysis, lipase, *Klebsiella* sp.
LPG172

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE
HASIL ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172**

Oleh

RETNO DWI ANGGRAENI

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
2025**

Judul Penelitian

: PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK
KELAPA SAWIT SECARA HIDROLISIS
ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE
HASIL ISOLAT BAKTERI *Klebsiella* sp.
LPG172

Nama Mahasiswa

: Retno Dwi Anggraeni

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2117011003

Program Studi

: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

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

Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc. Ph.D.
NIP. 195907061988111001

2. Ketua Jurusan Kimia

Prof. Dr. Mita Rihyanti, S. Si., M.Si.
NIP. 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Dr. Dian Herasari, S.Si.



Sekretaris : Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D.



Anggota : Prof. Dr. Ilim, M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 6 Agustus 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retno Dwi Anggraeni
NPM : 2117011003
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul **"Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatik Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172"** adalah benar karya sendiri dan tidak mengandung karya orang lain kecuali yang telah dicantumkan dalam daftar pustaka. Oleh karena itu, seluruh isi dalam skripsi ini dapat saya pertanggungjawabkan. Saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan sebelum dilakukan publikasi, selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut berdasarkan kesepakatan bersama.

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

Bandar Lampung, 9 Agustus 2025
Yang Menyatakan,



Retno Dwi Anggraeni
NPM. 2117011003

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Retno Dwi Anggraeni, yang lahir di Desa Tegal Yoso, Kecamatan Purbolinggo, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung pada tanggal 22 Maret 2003. Penulis merupakan anak kedua dari dua bersaudara, yaitu putri dari Bapak Kusnadi dan Ibu Siti Rohani. Penulis saat ini bertempat tinggal di Desa Tegal Yoso, Kecamatan

Purbolinggo, Kabupaten Lampung Timur, Provinsi Lampung.

Penulis mengawali jenjang pendidikan formal di TK PGRI Tegal Yoso pada tahun 2007-2009. Selanjutnya, penulis melanjutkan pendidikan di SDN 3 Tegal Yoso pada tahun 2009-2015, kemudian dilanjutkan di SMPN 1 Purbolinggo pada tahun 2015-2018. Pendidikan menengah atas ditempuh di SMAN 1 Purbolinggo dan diselesaikan pada tahun 2021. Pada tahun 2021, penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi S1 Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menjalani studi di perguruan tinggi, penulis aktif dalam kegiatan organisasi kemahasiswaan, antara lain sebagai kader muda Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada tahun 2021 dan sebagai anggota inti Biro Penerbitan pada tahun 2022. Selain itu, penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke-31 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Universitas Lampung tahun 2021. Pada tahun 2023, penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) Bina Desa di Desa Rejomulyo, Kecamatan Jati Agung, Kabupaten Lampung Selatan selama empat bulan, terhitung sejak bulan Agustus hingga Desember 2023. Penulis juga memiliki pengalaman sebagai asisten praktikum Biokimia bagi

mahasiswa program studi Biologi Terapan, FMIPA, Universitas Lampung dan mahasiswa Universitas Terbuka pada tahun 2025. Penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada bulan Juni 2025 di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung dengan judul “Produksi Enzim Lipase dari Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172”. Selain itu, penulis telah menyelesaikan penelitian yang dilaksanakan pada bulan Oktober 2024-Juni 2025 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Anorganik-Fisik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Kemudian penulis telah menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatik Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172”.

PERSEMBAHAN



Dengan mengucapkan Alhamdulillahirobbil'alamin segala puji bagi Allah subhanahu wa ta'ala atas limpahan rahmat dan karunia-Nya yang senantiasa menyertai setiap Langkah saya, sehingga karya tulis ini dapat saya selesaikan dengan baik. Karya tulis kecil ini saya persembahkan kepada:

Kedua orang tuaku tercinta, bapak Kusradi dan Ibu Siti Rohani yang selalu menjadi sumber kekuatan dan semangat dalam setiap langkahku. Terima kasih atas cinta dan kasih sayang yang tak terbatas, atas pengorbanan yang begitu besar, serta doa yang selalu menyertai setiap Langkah penulis. Keberadaan dan pencapaian saya tidak akan berarti tanpa dukungan kalian.

Kakakku tersayang, Nafsirudin dan Putri Ramdani yang selalu memberikan dukungan, semangat, serta kasih sayang yang tak pernah putus. Terima kasih telah menjadi panutan dalam hidupku.

Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D., dan Ibu Prof. Dr. Ilim, M.S., serta seluruh dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membimbing, mengarahkan, dan memberikan ilmu, serta nasihatnya sehingga penulis mencapai gelar sarjana.

Serta

Almamater tercinta Universitas Lampung

MOTTO

“Maka, sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan.”

(QS. Al-Insyirah: 5-6)

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

(QS. Ar-Ra’d: 11)

“Tugas kita bukanlah untuk BERHASIL, tugas kita adalah untuk MENCOBA karena didalam mencoba itulah kita menemukan kesempatan untuk berhasil.”

(Buya Hamka)

“Bila esok nanti kau sudah lebih baik, jangan lupakan masa-masa sulitmu. Ceritakan kembali pada dunia, caramu merubah peluh jadi senyuman.”

(Admesh Kamaleng)

“Pada akhirnya ini semua hanyalah permulaan.”

(Nadin Amizah)

SANWACANA

Puji syukur penulis haturkan kehadiran Allah *subhanahu wa ta'ala* yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul:

**“Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatik
Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172”**

Sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari keterbatasan kemampuan dan pengetahuan yang penulis miliki sehingga isi maupun penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan serta petunjuk dari banyak pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Kusrandi dan Mama Siti Rohani, terima kasih atas cinta yang tulus, kasih sayang yang tak pernah habis, pengorbanan yang begitu besar, serta doa yang selalu mengiringi setiap langkah penulis. Semoga mama dan bapak dapat terus kebersamaan di setiap perjalanan penulis.
2. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing satu, yang telah memberikan bimbingan, ilmu, dan dukungan, serta pelajaran berharga dalam menghadapi berbagai proses dan tantangan selama penyusunan skripsi ini.
3. Bapak Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D., selaku dosen pembimbing kedua, atas waktu yang telah diluangkan untuk memberikan bimbingan, pelajaran tentang pentingnya berpikir kritis, serta saran-saran berharga selama proses penyusunan skripsi ini.

4. Ibu Prof. Dr. Ilim, M.S., selaku dosen pembahas sekaligus dosen pembimbing akademik, atas arahan, bimbingan, dan perhatian yang diberikan sejak awal masa perkuliahan hingga proses penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, atas bimbingan, ilmu, dan motivasi yang diberikan selama masa perkuliahan.
8. Seluruh karyawan, laboran, dan admin Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas segala bantuan dan pelayanannya selama masa perkuliahan.
9. Kakakku tersayang, Nafsirudin dan Putri Ramdani, terima kasih atas dukungan, semangat, dan kasih sayang yang tak pernah putus mengalir kepada penulis. Kehadiran dan doa kalian menjadi kekuatan yang tak ternilai dalam setiap langkah penulis.
10. Keluarga besar *Mapul's Family*, terutama Bibi Septi, Bibi Iin, Mbah Timah, Mbah Mapul, Om Sinin, dan Om Dian, terima kasih atas segala perhatian, kasih sayang, doa, dan dukungan yang tak ternilai kepada penulis. Kehangatan, cinta, dan kebersamaan yang keluarga berikan menjadi sumber kekuatan dan kebahagiaan dalam setiap langkah penulis.
11. Adik-adik sepupuku tersayang, Azka, Dilla, dan Aezar atas semangat yang selalu kalian berikan melalui tawa riang, candaan, dan kasih sayang yang tulus. Kehadiran kalian menjadi sumber kebahagiaan tersendiri di tengah proses yang penuh perjuangan ini.
12. Keluarga besar Mbah Lio atas doa, dukungan, kasih sayang yang menjadi sumber kekuatan bagi penulis dalam menempuh perkuliahan hingga menyelesaikan skripsi ini.
13. Teman seperjuangan penelitian *Dian's Research 21*, Desvica Romanda, S.Si., dan Dina FebriYanti, S.Si., terima kasih atas kebersamaan, semangat, dukungan, bantuan, serta menjadi tempat berdiskusi dan berbagi keluh kesah selama penulis melaksanakan penelitian.

14. Sahabat semasa kuliah, Gibah Santuy: Najmi Annistya, Inggit Pratiwi, dan Amalia Triananda terima kasih atas dukungan dan semangat yang selalu kalian berikan, atas ketersediaan menjadi tempat penulis berbagi keluh kesah, serta atas kebersamaan dalam menemani setiap langkah dan proses yang penulis jalani.
15. Sahabat-sahabatku sejak masa putih abu-abu, Abang Alvian, Dimas, Arum, dan Indy, yang selalu hadir memberikan dukungan, tawa, dan semangat di berbagai fase kehidupan penulis.
16. Naila dan Dea yang sempat ada dan meluangkan waktu untuk mendengarkan dan berbagi cerita suka maupun duka, baik dalam perkuliahan maupun di luar perkuliahan, serta memberikan semangat yang tak pernah surut.
17. Kak Nindy Novita Sari, S.Pd., M.Si., Kak Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si., M.Si., dan Kak Armidla Nadya Kurniati, S.Si., M.Si., atas semangat, masukan, bimbingan, dan kesabaran dalam mendampingi penulis hingga penelitian dan tugas akhir skripsi ini terselesaikan.
18. Teman-teman di Laboratorium Biokimia atas segala bantuan, ilmu, kerja sama, semangat, dan pengalaman yang diberikan selama penelitian.
19. Teman-teman asisten praktikum, Desvica, Dina, dan Talfa, atas kebersamaan, kerja sama, bantuan, serta dukungan yang telah diberikan, yang menjadi bagian berharga dalam perjalanan penulis selama perkuliahan.
20. Teman-teman MBKM Bina Desa: Nacmi, Inggit, Trie, Azoo, Lilis, Nadira, dan Marsa, atas kerja sama yang menyenangkan, kekompakan, dan semangat selama menjalani kegiatan hingga sampai saat ini. Perjalanan ini menjadi kenangan berharga dalam perjalanan akademik penulis.
21. Teman-teman angkatan 2021 terutama kelas C atas semangat, bantuan, dan kenangan selama masa perkuliahan.
22. Kepada seseorang yang tidak perlu disebutkan namanya, terima kasih atas pelajaran berharga yang lahir dari rasa sakit yang pernah diberikan. Hal tersebut telah menjadi pemacu semangat bagi penulis untuk membuktikan kemampuan diri dan menyelesaikan tugas akhir skripsi ini dengan lebih baik.
23. Semua pihak yang telah tulus membantu dan mendoakan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

24. Terakhir, untuk diriku sendiri, Retno Dwi Anggraeni, terima kasih atas keteguhan bertahan di tengah air mata dan putus asa, atas perjuangan, usaha, dan senyuman, dan terus melangkah hingga akhirnya tiba di titik ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan. Penulis memohon maaf atas segala kekurangan yang ada, dan berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan bagi siapapun yang membaca, khususnya rekan-rekan mahasiswa kimia.

Bandar Lampung, 9 Agustus 2025
Penulis,

Retno Dwi Anggraeni
NPM. 2117011003

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR TABEL	xx
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	5
1.3. Manfaat Penelitian.....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Bakteri	6
2.1.1. Fase Pertumbuhan Bakteri	6
2.2. <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	8
2.3. Enzim Lipase EC 3.1.1.3.....	9
2.3.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya	10
2.3.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	11
2.4. Aktivitas Enzim.....	15
2.4.1. Hidrolisis	15
2.4.2. Esterifikasi.....	16
2.4.3. Transesterifikasi	17
2.5. Gliserol	17
2.5.1. Pemisahan Gliserol.....	18
2.5.2. Pemurnian Gliserol.....	20
2.5.3. Penentuan Kadar Gliserol	21
2.6. Minyak Sawit	21

III. METODE PENELITIAN	23
3.1. Waktu dan Tempat.....	23
3.2. Alat dan Bahan.....	23
3.3. Prosedur Penelitian	24
3.3.1. Tahap Persiapan.....	24
3.3.2. Produksi Enzim Lipase.....	25
3.3.3. Pemurnian Enzim Lipase.....	26
3.3.4. Penentuan Kadar Protein	28
3.3.5. Uji Aktivitas Hidrolisis.....	29
3.3.6. Pemisahan Gliserol.....	29
3.3.7. Pemurnian Gliserol.....	30
3.3.8. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Gliserol.....	30
3.3.9. 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. Pemurnian Enzim Lipase dari Bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	36
4.3.1. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat dan Dialisis	37
4.3.2. Kromatografi Filtrasi Gel.....	40
4.4. Pemisahan Gliserol.....	45
4.5. Pemurnian Gliserol.....	46
4.6. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Gliserol.....	49
V. SIMPULAN DAN SARAN	55
5.1. Simpulan.....	55
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Bacteria Genus Klebsiella</i> sp.....	9
2. Kurva hubungan suhu dengan kecepatan reaksi enzim	12
3. Kurva hubungan nilai pH dengan aktivitas enzim	12
4. Kurva hubungan konsentrasi substrat dan kerja enzim.....	13
5. Reaksi esterifikasi	16
6. Reaksi transesterifikasi	17
7. Hasil hidrolisis gliserol dan asam lemak bebas	19
8. Reaksi hidrolisis.....	20
9. Skema fraksinasi enzim menggunakan amonium sulfat	26
10. Skema penelitian.....	32
11. Media agar miring sebelum dan sesudah ditumbuhi bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172, yaitu a). Media agar miring yang belum ditumbuhi bakteri dan b). Media agar miring yang sudah ditumbuhi bakteri	34
12. Perubahan warna media inokulum selama inkubasi bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172, yaitu a). Media inokulum sebelum inkubasi (0 jam) dan b). Media inokulum setelah 24 jam inkubasi.....	35
13. Proses dialisis.....	38
14. Profil hubungan λ_{280} dengan nilai aktivitas unit enzim (U/mL) hasil hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.....	42
15. Proses pemisahan gliserol secara hidrolisis enzimatik yang menghasilkan dua lapisan, yaitu a). Gliserol kasar dan b). Asam lemak bebas.....	45

16. Hasil pemurnian gliserol menggunakan asam fosfat 5% (v/v) yang terbentuk tiga lapisan, yaitu a). Asam lemak bebas, b). Gliserol, dan c). Residu fosfat	47
17. Hasil pemurnian gliserol menggunakan asam fosfat 5% (v/v) yang terbentuk dua lapisan, yaitu a). Sisa minyak dan b). Gliserol murni	48
18. Gliserol hasil pemurnian	49
19. Hasil uji Dunstan pada masing-masing sampel, yaitu a). Gliserol, b). Gliserol kasar, c). Minyak sawit komersial, d). Sisa minyak, e). Enzim lipase, dan f). Asam lemak bebas	51
20. Kurva standar BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	65
21. Kurva standar asam oleat	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik ekstrak kasar enzim lipase.....	36
2. Karakteristik enzim lipase hasil pemurnian melalui fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis	39
3. Karakteristik enzim lipase hasil pemurnian melalui kromatografi filtrasi gel.....	42
4. Pemurnian enzim lipase dari bakteri <i>Klebsiella</i> sp. LPG172	44
5. Hasil pengukuran pH dari enam jenis sampel.....	52
6. Perolehan angka asam dari masing-masing sampel.....	53
7. Hasil pengukuran absorbansi BSA pada $\lambda 750$ nm.....	65
8. Hasil pengukuran absorbansi ekstrak kasar enzim lipase pada $\lambda 750$ nm	66
9. Hasil pengukuran absorbansi asam oleat pada $\lambda 746$ nm	67
10. Hasil pengukuran absorbansi ekstrak kasar enzim lipase pada $\lambda 746$ nm dengan substrat minyak sawit komersial	67
11. Hasil pengukuran absorbansi ekstrak kasar enzim lipase pada $\lambda 746$ nm dengan substrat minyak zaitun.....	68
12. Hasil pengukuran absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 750$ nm	71
13. Hasil pengukuran absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 746$ nm dengan substrat minyak sawit komersial	72
14. Hasil pengukuran absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 746$ nm dengan substrat minyak zaitun.....	72

15. Nilai A ₂₈₀ enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel	75
16. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas hidrolisis enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel	76
17. Hasil fraksi gabungan kromatografi filtrasi gel pada $\lambda 750$ nm.....	76
18. Hasil fraksi gabungan kromatografi filtrasi gel pada nilai aktivitas hidrolisis enzim lipase	76
19. Tipe-tipe <i>sephadex</i>	77

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim lipase merupakan biokatalis esensial yang berfungsi memecah trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol, dengan kemampuan katalitik pada antarmuka air dan minyak. Enzim lipase merupakan salah satu jenis enzim yang berperan penting dalam proses katalisis reaksi hidrolisis trigliserida, yang menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Lipase dapat ditemukan dalam berbagai organisme, mulai dari hewan, tumbuhan, hingga mikroorganisme. Enzim lipase bekerja pada antarmuka antara air dan minyak, memungkinkan pemecahan molekul lipid yang tidak larut air, sehingga sangat penting dalam metabolisme lemak. Dalam tubuh manusia, lipase berfungsi terutama dalam sistem pencernaan, yaitu membantu memecah lemak dari makanan (Ali *et al.*, 2023).

Lipase telah mendapat perhatian luas karena memiliki kemampuan untuk bekerja dalam kondisi berair (*aqueous*) dan non-air (*non-aqueous*), yang memberikan keunggulan dalam berbagai aplikasi. Dalam lingkungan berair lipase dapat mendegradasi lipid, sedangkan dalam lingkungan non-air dapat meningkatkan stabilitas enzim, transesterifikasi, dan esterifikasi. Keunggulan lain dari lipase adalah stabilitasnya terhadap perubahan suhu dan pH, serta kemampuannya bekerja di dalam pelarut organik, menjadikannya pilihan yang tepat untuk proses industri. Mikroorganisme seperti *Aspergillus niger*, *Klebsiella* sp., dan *Pseudomonas* sp. sering digunakan untuk memproduksi enzim lipase karena bakteri ini mudah diisolasi dan dapat dimodifikasi untuk meningkatkan efisiensi yang membuka peluang luas untuk aplikasi industri skala besar (Ali *et al.*, 2023).

Selain berperan dalam hidrolisis lemak, lipase juga mampu mengkatalisis reaksi transesterifikasi, esterifikasi, dan alkoholisis yang menjadikannya sangat penting dalam berbagai aplikasi industri (Indriyani dkk., 2021). Enzim lipase memiliki fungsi yaitu sebagai hidrolisis, esterifikasi, dan transesterifikasi, serta pelarut organik. Pada proses hidrolisis, lipase akan memecah lemak menjadi asam lemak dan gliserol, fungsi ini sangat penting dalam pencernaan lemak dan digunakan dalam berbagai aplikasi industri seperti dalam produksi biodiesel (Sumarsih dkk., 2018). Lipase juga dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi dan esterifikasi, yang bermanfaat dalam pembuatan senyawa organik seperti ester yang digunakan dalam industri pangan dan kosmetik (Indriyani dkk., 2021). Selain itu, dalam media non-air lipase dapat digunakan untuk biokonversi yang penting dalam industri kimia dan farmasi, seperti pada sintesis obat yang membutuhkan reaksi stereospesifik (Sumarsih dkk., 2018). Aplikasi lain dari enzim lipase dalam industri diantaranya adalah pada industri farmasi, kosmetik, dan bahan kesehatan. Enzim lipase digunakan dalam produksi obat-obatan, terutama untuk reaksi yang membutuhkan katalisis spesifik seperti pada pembuatan obat anti-inflamasi dan antibiotik merupakan aplikasi dari industri farmasi. Kemudian untuk industri kosmetik dan bahan kesehatan yaitu ester yang dihasilkan oleh lipase sering digunakan dalam produksi kosmetik dan produk kesehatan, seperti *lotion* dan sabun alami (Sumarsih dkk., 2018).

Sumber lipase terutama berasal dari mikroorganisme seperti jamur dan bakteri, yang dikenal sebagai produsen yang efisien karena stabilitasnya yang tinggi dan memiliki peran penting untuk skala industri. Mikroorganisme seperti *Aspergillus awamori*, *Candida antarctica*, dan *Pseudomonas aeruginosa* telah banyak digunakan dalam industri biodiesel, pengolahan makanan, dan farmasi. Penelitian terbaru telah berfokus pada pengoptimalan imobilisasi lipase untuk meningkatkan stabilitas dan kemampuan penggunaannya kembali, sehingga semakin meningkatkan efisiensinya dalam skala industri (Chandra *et al.*, 2020). Selain mikroorganisme yang telah disebutkan, terdapat isolat bakteri *Klebsiella* sp. yang teridentifikasi dapat menghasilkan enzim lipase dan mempunyai kemampuan dalam menghidrolisis lipid menjadi asam lemak dan minyak. Beberapa spesies

dari genus *Klebsiella* seperti *Klebsiella pneumoniae* juga memiliki kemampuan untuk memproduksi enzim lipase (Sayuti dan Suratni, 2015).

Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 merupakan salah satu jenis bakteri gram negatif dengan sel bakteri berwarna merah yang banyak dijumpai di berbagai lingkungan, terutama pada tanah dan air. Komposisi dinding sel bakteri gram negatif sebagian besar tersusun dari lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna kristal violet saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak saat dicuci dengan alkohol), sel bakteri terwarnai oleh safranin sehingga sel bakterinya berwarna merah. Bakteri ini dikenal karena kemampuannya dalam melakukan proses biotransformasi serta menguraikan senyawa kompleks seperti lignin dan polutan organik. Beberapa strain *Klebsiella*, termasuk LPG172, sering kali dikaitkan dengan penelitian bioteknologi karena kemampuannya dalam memfermentasi berbagai substrat, termasuk karbohidrat kompleks. Bakteri ini juga dikenal mampu menghasilkan polisakarida ekstraseluler, yang membuatnya berpotensi digunakan dalam bidang pangan, farmasi, dan bioenergi. *Klebsiella* sp. LPG172 khususnya telah diteliti karena kemampuannya untuk memproduksi enzim inulinase yang berperan dalam proses konversi inulin menjadi fruktosa. *Klebsiella* sp. juga digunakan untuk memproduksi enzim lipase, dimana aktivitas hidrolisisnya akan menguraikan trigliserida menjadi asam lemak bebas dan gliserol (Saryono dkk., 2016).

Gliserol adalah senyawa organik dengan tiga gugus hidroksil, sehingga menjadikannya sangat larut dalam air dan berperan penting dalam berbagai aplikasi industri. Gliserol secara utama diproduksi sebagai produk sampingan dalam industri biodiesel, dengan perkiraan 10% gliserol dihasilkan dari setiap *batch* biodiesel (Moklis *et al.*, 2023). Dalam beberapa tahun terakhir, perhatian meningkat pada pemanfaatan gliserol sebagai bahan baku murah untuk memproduksi bahan kimia bernilai tinggi, seperti asam laktat, propilen glikol, dan dihidroksiaseton (Lu and Xu, 2023). Penggunaan gliserol mentah memerlukan proses pemurnian karena adanya kontaminan, yang membuat proses pengolahan lebih mahal. Di sisi lain, teknologi konversi baru telah dikembangkan untuk mengatasi hal ini, termasuk pendekatan elektrokimia yang lebih ramah lingkungan

dan hemat biaya (Moklis *et al.*, 2023). Sekarang ini penelitian memfokuskan pada pengembangan katalis yang efisien untuk konversi gliserol melalui reaksi oksidasi, dehidrasi, dan reformasi. Katalis heterogen, seperti logam transisi dan zeolit, telah terbukti meningkatkan hasil produk bernilai tinggi (Lu *and* Xu, 2023).

Indonesia sampai sekarang masih mengalami kesulitan dalam memperoleh sumber gliserol. Ketersediaan gliserol di Indonesia sebagian besar berasal dari produksi biodiesel sebagai produk sampingan. Gliserol kasar yang dihasilkan dari produk samping biodiesel ini masih perlu dimurnikan untuk mencapai kualitas yang lebih tinggi (Aziz dkk., 2008). Kebutuhan gliserol ini terus meningkat seiring dengan pertumbuhan produksi biodiesel dan berbagai industri kimia lainnya. Gliserol memiliki berbagai manfaat dan aplikasi, terutama sebagai bahan dalam industri farmasi, kosmetik, dan makanan. Gliserol kasar yang merupakan produk samping dari biodiesel dapat dimurnikan untuk digunakan dalam pembuatan bahan kimia seperti propilen glikol dan etanol (Azelee *et al.*, 2019).

Minyak sawit merupakan salah satu sumber trigliserida yang melimpah dan banyak digunakan dalam industri, terutama di negara-negara penghasil minyak sawit seperti Indonesia dan Malaysia. Minyak sawit terdiri dari campuran asam lemak jenuh dan tak jenuh, yang menjadikannya substrat yang ideal untuk reaksi hidrolisis. Dalam proses ini, trigliserida pada minyak sawit dipecah oleh enzim lipase menjadi asam lemak bebas dan gliserol, yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan dapat digunakan dalam berbagai aplikasi industri (Kareem *et al.*, 2017). Minyak sawit tidak hanya ekonomis karena ketersediaannya yang melimpah, tetapi juga memiliki komposisi asam lemak yang stabil, seperti asam palmitat dan asam oleat, yang memudahkan proses hidrolisis untuk menghasilkan gliserol dan asam lemak bebas dalam jumlah besar. Gliserol yang dihasilkan dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri, seperti kosmetik, farmasi, dan produksi biodiesel. Dengan demikian, minyak sawit sebagai substrat hidrolisis untuk pemisahan gliserol menggunakan enzim lipase dapat memberikan solusi yang ramah lingkungan, ekonomis, dan efisien terutama dalam mendukung industri yang berkelanjutan (Kareem *et al.*, 2017).

Pada penelitian ini dilakukan pemisahan gliserol menggunakan enzim lipase hasil dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Enzim diproduksi dan dilakukan pemurnian untuk mendapatkan enzim lipase murni, kemudian dilakukan uji aktivitas enzim dan uji kadar protein pada setiap tahap pemurnian. Setelah tahap pemurnian, dilakukan pemisahan gliserol dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatik. Gliserol murni yang telah dihasilkan akan dianalisis secara kualitatif menggunakan uji Dunstan dan uji fisikokimia berupa pengukuran pH. Penggunaan enzim lipase pada proses pemisahan gliserol ini memiliki potensi untuk efisiensi produksi biodiesel dan produk sampingnya. Penggunaan enzim lipase dalam pemisahan gliserol merupakan metode yang ramah lingkungan dibandingkan dengan proses kimia yang membutuhkan bahan berbahaya atau energi yang lebih besar. Penelitian ini dapat mendukung arah industri yang lebih berkelanjutan, dengan mengurangi limbah dan dampak lingkungan.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mendapatkan enzim lipase murni dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
2. Memisahkan gliserol dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatik menggunakan enzim lipase hasil isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
3. Mengidentifikasi keberadaan gliserol hasil pemurnian melalui uji kualitatif.

1.3. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dalam menghasilkan enzim lipase, mendukung ketersediaan enzim lipase, dan meningkatkan ketersediaan gliserol.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri berasal dari bahasa Latin *bacteria* yaitu sekelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel yang termasuk ke dalam kelompok besar prokariota yang memiliki ukuran sangat kecil (mikroskopik). Dinding sel bakteri, yang tersusun atas senyawa pembentuk dinding sel bakteri bernama peptidoglikan, memberikan struktur yang fleksibel namun kokoh pada sel tersebut. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang relatif tebal, terdiri dari berbagai macam lapisan polimer peptidoglikan (murein). Tebalnya dinding sel dalam bakteri, dapat menahan keluarnya kompleks kristal violet-iodin ketika dicuci dengan alkohol atau aseton (Maryati *et al.*, 2007). Bakteri termasuk dalam golongan prokariotik, karena organisme yang tidak memiliki nukleus dan membran. Patogen juga merupakan jenis bakteri, yang memiliki ukuran kecil yaitu sekitar 0,5-0,5 μm . Bakteri memiliki beragam ukuran, dan ukuran bakteri ini memang berukuran sangat kecil bahkan untuk dapat melihatnya diperlukan alat yaitu mikroskop (Partini, 2023).

2.1.1. Fase Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri merupakan fase pembelahan sel bakteri melalui beberapa fase atau serangkaian tahapan yang dilalui oleh populasi bakteri saat berkembang biak dalam kondisi tertentu, seperti di media kultur atau lingkungan spesifik. Fase pertumbuhan bakteri terjadi karena keterbatasan sumber daya di lingkungan, seperti nutrisi, oksigen, dan ruang. Fase-fase ini menggambarkan

perubahan jumlah sel bakteri seiring waktu. Bakteri dapat ditumbuhkan kembali ke dalam medium yang baru, namun bakteri tidak akan segera membelah diri akan tetapi mengalami fase pertumbuhan terlebih dahulu. Terdapat enam fase dalam pertumbuhan bakteri. Fase-fase yang terjadi selama proses pertumbuhan bakteri yaitu sebagai berikut:

a. Fase permulaan

Fase ini dikenal sebagai fase *initial* atau *lag phase*. Pada fase ini bakteri belum berkembangbiak atau melakukan perbanyakan sel. Pada fase ini biasanya terjadi pembentukan enzim induktif atau germinasi spora.

b. Fase pertumbuhan

Pada fase ini terjadi pertumbuhan yang dipercepat dan sel bakteri belum memperbanyak diri secara optimal.

c. Fase logaritma

Fase ini dikenal sebagai *exponential phase* karena pada fase ini kecepatan pertumbuhan populasi sel berjalan maksimal dan konstan. Sel bakteri sangat aktif dalam membelah diri.

d. Fase pertumbuhan diperlambat/terhambat

Pada fase ini pertumbuhan sel bakteri mulai terhambat, kecepatan pertumbuhan semakin lama akan semakin menurun. Penurunan kecepatan pertumbuhan sel disebabkan oleh kehabisan nutrisi akumulasi substansi toksik hasil metabolisme sel dan perubahan pH yang tajam.

e. Fase stasioner

Pada fase ini kecepatan pertumbuhan sel adalah nol. Jumlah pembentukan sel baru sebagai hasil reproduksi seimbang dengan jumlah sel yang mati.

f. Fase kematian

Fase ini dikenal sebagai *phase of decline* karena jumlah sel yang hidup semakin lama akan semakin menurun, sedangkan jumlah kematian sel semakin banyak. Hal ini disebabkan oleh kondisi lingkungan yang tidak sesuai terutama adanya akumulasi toksin hasil metabolisme sel (Risna *et al.*, 2022).

2.2. *Klebsiella* sp. LPG172

Klebsiella sp. merupakan suatu bakteri gram negatif dari kelompok *Enterobacteriaceae* yang bersifat non-motil (bakteri yang tidak memiliki kemampuan untuk bergerak secara mandiri). Kelompok bakteri ini cenderung lebih pendek dan lebih tebal jika dibandingkan dengan bakteri lain yang ada di famili *Enterobacteriaceae*. Sel-sel bakteri ini berbentuk batang dan umumnya berukuran lebar 0,3-1,5 μm dengan panjang 0,5-5,0 μm . Bakteri ini bisa ditemukan dalam bentuk mandiri, 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 umumnya bersifat aerobik tetapi secara fakultatif dapat bersifat anaerobik. Pertumbuhan ideal mereka yaitu pada suhu 35-37°C, sedangkan tingkat pH idealnya sekitar 7,2 (Arif, 2022).

Klebsiella terdiri dari sejumlah spesies yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* dan *Klebsiella terrigena*. *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu bakteri yang paling penting dari genus *Klebsiella*. Bakteri dari genus *Klebsiella* sp. tersebar luas di alam, yaitu di dalam tanah dan air. Bakteri ini juga dapat menginfeksi mulut dan kulit (Jawetz *et al.*, 2005 dan Ramadhan, 2018). Sistematika dari bakteri ini adalah sebagai berikut: Bakteri *Klebsiella* sp. ditunjukkan pada Gambar 1.

- Kerajaan: *Bacteria*
- Divisi: *Proteobacteria*

- Class: *Gamma Proteobacteria*
- Ordo: *Enterobacteriales*
- Famili: *Enterobacteriaceae*
- Genus: *Klebsiella*



Gambar 1. *Bacteria Genus Klebsiella* sp. (Anonim, 2024)

2.3. Enzim Lipase EC 3.1.1.3

Enzim lipase EC 3.1.1.3 (termasuk dalam kelas hidrolase yaitu triasilgliserol asil hidrolase) merupakan enzim yang berperan dalam mengkatalisis hidrolisis lipid, seperti trigliserida, menjadi asam lemak bebas, monogliserida, digliserida, dan gliserol. Lipase bekerja di antarmuka air dan minyak karena bersifat *interfacial* (perbatasan antara dua fase yang tidak saling bercampur), dan enzim ini umumnya aktif dalam bentuk "terbuka", di mana hidrofobik pada permukaan enzim berinteraksi dengan tetesan minyak atau lemak. Aktivasi *interfacial* inilah yang memungkinkan aktivitas lipase, menjadikannya sangat efektif dalam proses hidrolisis lemak (Carballares *et al.*, 2022).

Dalam industri, lipase banyak digunakan sebagai biokatalis untuk berbagai aplikasi, termasuk produksi biodiesel melalui transesterifikasi minyak nabati dan lemak hewani. Penggunaan lipase yang diimobilisasi pada pendukung hidrofobik, seperti manik-manik agarosa oktil, telah terbukti meningkatkan stabilitas dan aktivitas enzim secara signifikan dibandingkan enzim komersial. Strategi imobilisasi ini juga mencegah pelepasan enzim dari pendukung, yang sering menjadi masalah dalam penggunaan lipase (Carballares *et al.*, 2022). Selain itu, beberapa studi menunjukkan bahwa stabilisasi lipase melalui teknik imobilisasi atau penggunaan dukungan dengan senyawa fungsional seperti vinil sulfon dapat

lebih meningkatkan aktivitas dan daya tahan enzim. Teknik ini memungkinkan keterikatan enzim pada dukungan secara kovalen, yang menghasilkan enzim yang lebih stabil dan cocok untuk aplikasi industri jangka panjang (Carballares *et al.*, 2022).

2.3.1. Klasifikasi Enzim Lipase Berdasarkan Sumbernya

Klasifikasi enzim lipase berdasarkan sumbernya menurut Kurnia, (2010) diantaranya yaitu:

1. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari tumbuhan dibagi menjadi empat jenis:
 - a. Triasilgliserol lipase, terdapat pada tanaman jagung, minyak sawit, kacang, beras, dan kentang.
 - b. Silhidrolase, dapat diperoleh dari tanaman kentang.
 - c. *Phospholipase*, terdapat pada tanaman seledri, kol, dan kacang.
 - d. *Lyphospholipase*, terdapat dalam tanaman gandum.
2. 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.
3. Pengelompokkan lipase yang bersumber dari mikroba dibagi menjadi tiga jenis:
 - a. Bakteri, seperti lipase *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dan *Moraxella*.
 - b. Kapang, seperti lipase *Penicillium camemberti*, *Geotrichum candidum*, dan *Mucor meihei*.
 - c. Khamir, seperti lipase *Candida antarctica*, *C. rugosa*, dan *C.cylindraceae*.

Pengelompokkan lipase yang bersumber dari mikroba merupakan lipase yang mudah dihasilkan terutama karena terdapat banyak di industri. Enzim lipase

mempunyai 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, hal ini 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).

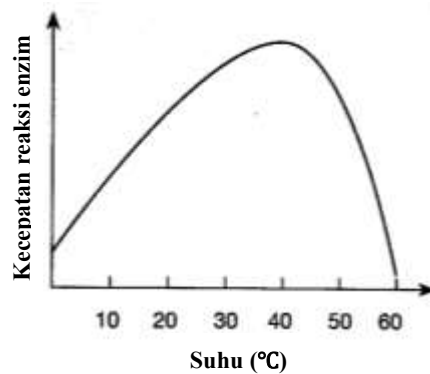
2.3.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Aktivitas katalitik enzim bergantung kepada integritas strukturnya sebagai protein. Hal tersebut juga berlaku pada lipase yang juga merupakan salah satu jenis enzim. Faktor-faktor utama yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah pH, suhu, konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, senyawa aktivator dan inhibitor. Perubahan pH dapat mempengaruhi muatan ionik dari gugus aktif enzim, sedangkan suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein, mengakibatkan hilangnya aktivitas enzim. Selain itu, peningkatan konsentrasi enzim dan substrat dapat mempercepat laju reaksi hingga mencapai kondisi kejenuhan. Aktivator berfungsi untuk meningkatkan efisiensi enzim, sedangkan inhibitor bekerja dengan menghambat atau mengurangi aktivitas katalitik enzim, baik secara kompetitif maupun non-kompetitif.

a. Suhu

Enzim memerlukan jumlah kalor tertentu untuk dapat aktif dalam melakukan proses katalisis. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan kenaikan suhu. Aktivitas enzim akan mengalami kenaikan sebanyak dua kali pada setiap peningkatan 10°C di atas suhu minimum. Peningkatan aktivitas enzim akan terhenti ketika mencapai suhu optimum. Hal ini dikarenakan pada suhu optimum struktur ikatan dalam enzim akan melemah. Suhu maksimum akan membuat struktur protein terbuka dan gugus non-polar yang berada di dalam molekul menjadi terbuka yang mengakibatkan kelarutan protein di dalam air yang polar menjadi turun sehingga aktivitas enzim juga akan menurun (Sholeha *and*

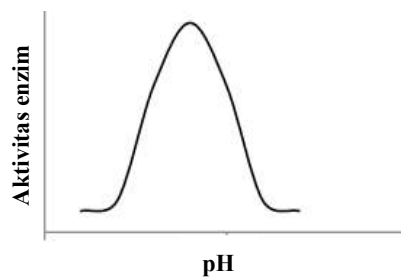
Agustini, 2021). Hubungan antara suhu dengan kecepatan reaksi enzim tersebut dapat dilihat dalam Gambar 2.



Gambar 2. Kurva hubungan suhu dengan kecepatan reaksi enzim

b. Tingkat keasaman (pH)

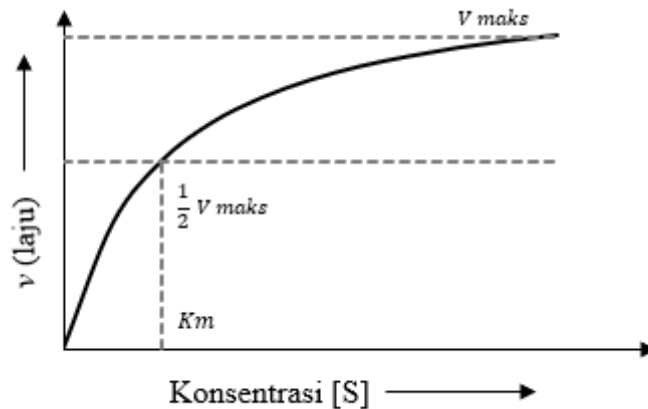
Tingkat keasaman (pH) pada enzim harus sesuai dengan rentang pH-nya masing-masing. Perubahan pH tersebut akan mempengaruhi ionisasi pada molekul protein, sebagian besar pH optimum yaitu pH 7 (netral) (Risna *et al.*, 2022). Potensial Hidrogen (pH) merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim. Hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH di mana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Enzim merupakan molekul protein, di mana molekul protein kestabilannya dapat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan, pada kondisi keasaman yang ekstrem molekul-molekul protein dari enzim akan rusak. Kurva yang menyatakan hubungan pH dengan aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan nilai pH dengan aktivitas enzim

c. Konsentrasi substrat dan enzim

Konsentrasi substrat juga dapat mempengaruhi kerja enzim secara optimal, di mana naiknya suatu konsentrasi substrat, semakin tinggi kecepatan reaksi yang dikatalis oleh enzim pada batas konsentrasi substrat tertentu tidak akan terjadi kenaikan reaksi walaupun konsentrasi substrat diperbesar. Jika konsentrasi substrat diperbesar maka makin banyak substrat yang akan bergabung pada sisi aktif enzim. Oleh sebab itu, konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar. Sedangkan pada penambahan konsentrasi substrat yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi (Murni *et al.*, 2011). Adapun kurva hubungan antara konsentrasi substrat dengan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva hubungan konsentrasi substrat dan kerja enzim

Enzim tidak akan mencapai konversi maksimum karena terbatasnya substrat yang direaksikan. Kecepatan reaksi akan meningkat seiring dengan adanya peningkatan konsentrasi substrat karena banyaknya substrat yang terikat pada enzim. Namun, penambahan konsentrasi pada titik-titik jenuh tidak dapat lagi meningkatkan kecepatan laju reaksi. Hal ini sesuai dengan hukum Michaelis-Menten yaitu kecepatan reaksi akan terus meningkat seiring dengan penambahan substrat hingga mencapai titik batas di mana enzim jenuh dengan substrat. Penambahan konsentrasi enzim akan meningkatkan laju reaksi karena akan semakin banyak sisi aktif yang akan ditemplei oleh substrat membentuk produk. Hal tersebut akan mengakibatkan produk akan lebih cepat terbentuk (Sholeha *and* Agustini, 2021).

d. Aktivator dan inhibitor

Enzim dapat juga membutuhkan komponen lain agar dapat berfungsi secara maksimal sebagai katalis. Komponen pendukung ini disebut dengan kofaktor. Jenis-jenis kofaktor dapat dibagi menjadi tiga kelompok yaitu koenzim, gugus prostetik, dan aktivator (Sholeha *and* Agustini, 2021). Inhibitor adalah suatu molekul atau ion yang dapat menghambat reaksi tersebut. Molekul inhibitor dapat berupa modifikasi gugus fungsi pada molekul enzim, molekul yang mirip dengan substrat. Inhibitor dapat mengurangi peluang bagi terbentuknya kompleks enzim substrat dan hal ini akan menyebabkan berkurangnya kecepatan reaksi.

Berdasarkan dari cara kerjanya, inhibitor dibagi menjadi dua yaitu inhibitor kompetitif dan non-kompetitif.

- Inhibitor kompetitif

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

- Inhibitor non-kompetitif

Inhibitor non-kompetitif merupakan suatu molekul penghambat enzim yang bekerja dengan cara melekatkan diri pada luar sisi aktif enzim. Sehingga, bentuk enzim berubah dan sisi aktif enzim tidak dapat berfungsi. Hal ini menyebabkan substrat tidak dapat masuk ke sisi aktif enzim. Penghambatan inhibitor non-kompetitif bersifat tetap dan tidak dapat dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Selain itu, inhibitor ini sering kali menyebabkan perubahan alosterik pada enzim, yang membuat perubahan struktur tiga dimensi enzim secara permanen. Akibatnya, meskipun substrat tersedia dalam konsentrasi tinggi, laju reaksi tetap tidak dapat meningkat karena perubahan ireversibel tersebut (Bariroh, 2014).

2.4. Aktivitas Enzim

Aktivitas enzim merupakan besarnya kemampuan enzim dalam mengkatalisis reaksi penguraian sumber karbon. Aktivitas enzim dinyatakan dengan unit/mL menit. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah yang menyebabkan 1 μmol karbon diubah menjadi 1 μmol produk per menit pada kondisi tertentu, sehingga pengertian aktivitas enzim lipase adalah jumlah yang dibutuhkan untuk menghidrolisis 1 μmol ikatan per menit pada kondisi pengujian tertentu. Aktivitas spesifik enzim merupakan suatu ukuran kemurnian yang ukuran nilainya akan meningkat selama proses pemurnian. Penentuan aktivitas spesifik enzim dapat diperoleh dengan cara membagi hasil aktivitas enzim dengan kadar proteinnya. Satuan dari aktivitas spesifik enzim yaitu jumlah unit enzim per mg (U/mg) pada kondisi optimum (Wijaya, 2002 dan Partini, 2023).

2.4.1. Hidrolisis

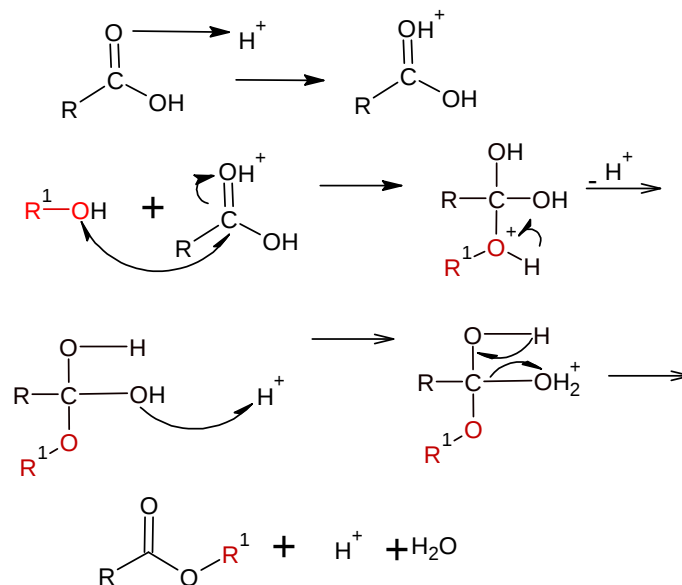
Hidrolisis lipase adalah proses di mana enzim lipase memecah trigliserida yang terkandung dalam lemak dan minyak menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Proses ini sangat penting dalam industri makanan, farmasi, dan bioteknologi untuk menghasilkan senyawa yang bermanfaat, seperti asam lemak yang dapat digunakan sebagai antioksidan dan antimikroba. Prinsip dasar hidrolisis lipase melibatkan aksi enzim lipase yang bekerja pada permukaan emulsi minyak-air, di mana enzim ini mengkatalisis pemutusan ikatan ester dalam trigliserida. Enzim lipase terutama memecah trigliserida pada posisi 1 dan 3 dari molekul gliserol, yang menghasilkan asam lemak bebas dan 2-monoasilgliserol. Proses ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk jenis minyak, sumber lipase, dan kondisi lingkungan seperti suhu dan pH (Katogen *et al.*, 2023).

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Katogan *et al.*, (2023), berbagai minyak nabati seperti minyak zaitun, rapeseed, linseed, almond, dan kacang tanah dihidrolisis menggunakan lipase dari jamur seperti *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, dan *Rhizomucor miehei*. Proses hidrolisis ini melibatkan pengujian

aktivitas lipase pada pelat kromogenik dan dalam larutan cair. Setelah perawatan enzimatis, konsentrasi asam lemak bebas meningkat, dan uji aktivitas antioksidan serta antimikroba dilakukan. Hasil menunjukkan bahwa minyak yang telah dihidrolisis memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak yang tidak dihidrolisis.

2.4.2. Esterifikasi

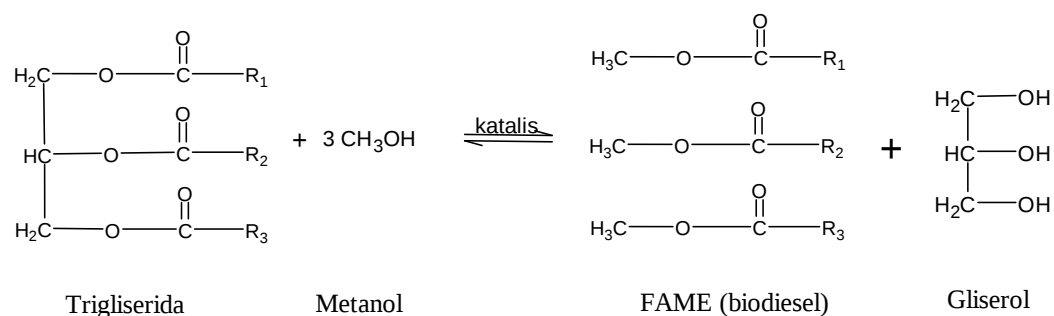
Esterifikasi adalah reaksi kimia antara asam dan alkohol yang menghasilkan ester dan air. Pada esterifikasi enzimatis, enzim lipase digunakan sebagai katalis untuk mempercepat reaksi ini. Enzim lipase mampu mengkatalis berbagai reaksi, termasuk hidrolisis dan esterifikasi. Pada reaksi esterifikasi, lipase mengkatalis reaksi antara asam lemak (hasil hidrolisis) dengan alkohol, seperti sitronelol. Reaksi esterifikasi enzimatis merupakan proses kimia di mana suatu enzim, dalam hal ini lipase, berfungsi sebagai biokatalis untuk membentuk ester dari asam lemak dan alkohol. Esterifikasi dilakukan menggunakan asam lemak dari hidrolisis minyak kelapa dengan sitronelol untuk menghasilkan perisa alami (Hadiangoro dkk., 2018). Mekanisme reaksi esterifikasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Reaksi esterifikasi

2.4.3. Transesterifikasi

Reaksi antara minyak (trigliserida) dan alkohol merupakan reaksi transesterifikasi (Darnoko dan Cheryan, 2000). Transesterifikasi adalah reaksi antara minyak nabati atau lemak hewani dan alkohol rantai pendek (yaitu metanol atau etanol) dengan adanya katalis, sehingga menghasilkan pembentukan ester monoalkil (bahan bakar biodiesel). Berbagai penelitian kinetik menunjukkan bahwa reaksi transesterifikasi mempunyai tiga fase: pertama fase kontrol perpindahan massa, kemudian fase kontrol kinetik, dan terakhir fase kesetimbangan lambat. Sebagian besar penelitian berfokus pada fase kedua dan ketiga, yang dipelajari secara *offline* menggunakan berbagai teknik analisis spektroskopi. Transesterifikasi merupakan reaksi pembentukan ester yang salah satu reaktannya juga merupakan senyawa ester. Hal ini menyebabkan pemecahan senyawa trigliserida dan perpindahan gugus alkil menjadi senyawa ester. Ester yang dihasilkan dari reaksi transesterifikasi ini disebut biodiesel. R' merupakan gugus alkil dan R1-R3 merupakan gugus asam lemak jenuh dan tak jenuh rantai panjang, seperti terlihat pada Gambar 6 (Aziz, 2007).



Gambar 6. Reaksi transesterifikasi

2.5. Gliserol

Gliserol, juga dikenal sebagai gliserin, adalah senyawa yang terbentuk dari proses hidrolisis trigliserida, yaitu lemak dan minyak. Dalam konteks produksi biodiesel, gliserol merupakan produk sampingan yang signifikan dari reaksi transesterifikasi, yang menghasilkan sekitar 10% berat gliserol untuk setiap

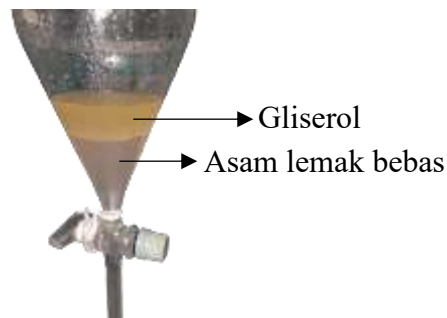
produksi biodiesel. Jika tidak dimanfaatkan dengan benar, kelebihan produksi gliserol ini dapat menyebabkan masalah lingkungan karena menumpuk sebagai limbah. Dalam penelitian Zulaika *et al.*, (2024) gliserol dihasilkan sebagai hasil samping dari produksi biodiesel berbasis minyak nabati atau lemak hewani melalui reaksi transesterifikasi. Gliserol mentah yang dihasilkan umumnya mengandung berbagai pengotor seperti air, garam, metanol, dan senyawa organik lainnya, yang harus dimurnikan sebelum dapat digunakan dalam aplikasi lain.

Selain sebagai limbah dari biodiesel, gliserol juga memiliki potensi besar sebagai bahan baku untuk berbagai produk kimia melalui fermentasi atau reaksi kimia lainnya. Salah satu penelitian yang menarik adalah konversi gliserol menjadi bioetanol melalui fermentasi mikroorganisme. Beberapa mikroorganisme yang berhasil diisolasi dan diidentifikasi dalam penelitian ini, seperti *Pseudomonas sp.* dan *Escherichia coli*, memiliki aktivitas lipolitik yang tinggi dan potensial digunakan dalam produksi bioetanol dari gliserol. Reaksi fermentasi akan menghasilkan bioetanol sebagai salah satu alternatif bahan bakar terbarukan. Selain itu, proses ini dapat meningkatkan nilai ekonomis gliserol yang awalnya hanya dianggap sebagai limbah (Zulaika *et al.*, 2024).

2.5.1. Pemisahan Gliserol

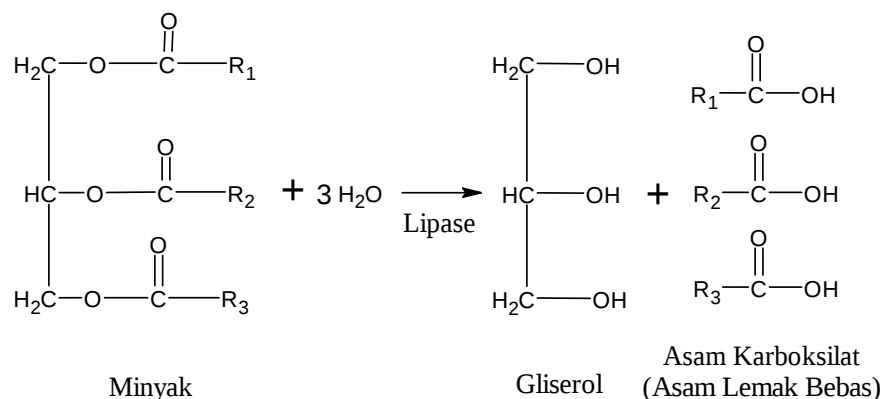
Gliserol yang umumnya dihasilkan sebagai produk sampingan, diolah lebih lanjut untuk digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk farmasi, kosmetik, dan makanan. Pemisahan gliserol dapat dilakukan dengan menggunakan metode hidrolisis (Nenobahan dkk., 2020). Hidrolisis merupakan proses pemecahan suatu ikatan kimia dengan menggunakan air, dimana air akan memecah ikatan ester yang menghubungkan gliserol dengan rantai asam lemak pada trigliserida (Lopez *et al.*, 2023). Pada pemisahan gliserol, trigliserida (lemak atau minyak) dihidrolisis menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Setelah proses hidrolisis selesai, produk yang dihasilkan akan terbentuk dua fasa (lapisan). Lapisan atas merupakan gliserol dan lapisan bawah menunjukkan asam lemak bebas

(Nenobahan dkk., 2020). Hasil hidrolisis gliserol dan asam lemak bebas yaitu pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil hidrolisis gliserol dan asam lemak bebas

Hidrolisis merupakan suatu metode yang efisien untuk memisahkan gliserol dalam skala industri. Hidrolisis minyak merupakan proses kimia di mana molekul minyak (trigliserida) dipecah menjadi gliserol dan asam lemak melalui reaksi dengan air. Proses ini dapat dipercepat dengan penggunaan katalis seperti enzim lipase atau bahan kimia seperti asam atau basa. Proses ini sangat bergantung pada kemampuan spesifik enzim lipase untuk memilih jenis asam lemak tertentu berdasarkan struktur molekulnya (Lopez *et al.*, 2023). Pada dasarnya, molekul minyak terdiri dari satu molekul gliserol yang terikat pada tiga molekul asam lemak (trigliserida). Hidrolisis minyak dilakukan dengan mencampurkan enzim dan minyak dengan rasio perbandingan 1:1 dalam Erlenmeyer dan dishaker selama 30 menit. Penggunaan enzim lipase sebagai katalisator dalam proses ini selain untuk mempercepat juga bertujuan untuk mengubah trigliserida yang terkandung didalam minyak. Selanjutnya akan dimasukkan kedalam corong pisah dimana hasil dari campuran tersebut membentuk dua lapisan. Gliserol pada lapisan atas dan asam lemak bebas pada lapisan bawah. Proses pemisahan ini memberikan langkah awal yang sangat penting dalam industri, terutama untuk memurnikan gliserol. Gliserol selanjutnya dapat diolah untuk menghasilkan berbagai produk turunan seperti bioetanol atau bahan kimia lainnya. Selain itu, pemanfaatan asam lemak bebas juga dapat mendukung produksi biodiesel atau produk kimia lainnya (Nenobahan dkk., 2020). Reaksi hidrolisis minyak dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Reaksi hidrolisis

2.5.2. Pemurnian Gliserol

Pemurnian gliserol hasil samping produksi biodiesel telah banyak diteliti sebelumnya dengan berbagai metode. Salah satu metode yang umum digunakan pada tahap awal pemurnian gliserol adalah metode netralisasi untuk menghilangkan katalis basa dan sabun dari gliserol dengan melibatkan reaksi kimia menggunakan asam (Ardi *et al.*, 2015). Selain itu, pemurnian gliserol juga dapat dilakukan dengan tiga tahapan yaitu destilasi, asidifikasi, dan adsorpsi. Destilasi dilakukan untuk mengurangi kadar methanol dalam *crude glycerol* (gliserol kasar). Asidifikasi dilakukan untuk mengurangi sisa katalis basa yang bereaksi, direaksikan dengan asam menggunakan pereaksi asam. Adsorpsi dengan menggunakan *fly ash* dilakukan untuk menurunkan kadar asam lemak bebas sehingga kadar gliserol semakin tinggi (Nadir dan Marlinda, 2013). Pada penelitian lain juga dilakukan pemurnian gliserol melalui tiga tahap, yaitu tahap persiapan aktivasi bahan adsorben karbon aktif, tahap pemisahan zat warna dengan menggunakan membran mikrofiltrasi, dan pemisahan pelarut air dengan menggunakan *rotary evaporator*. Karakterisasi gliserol ini dapat dilakukan dengan dua tahapan, yaitu dengan mengamati warna gliserol sebelum dan sesudah diadsorpsi, serta dapat juga dengan menggunakan spektrum gugus fungsi menggunakan FTIR yang merupakan uji kualitatif. Untuk analisa kuantitatif meliputi uji kadar gliserol, viskositas menggunakan viskometer *Brookfield*, dan uji densitas menggunakan piknometer (Suseno dkk., 2019).

2.5.3. Penentuan Kadar Gliserol

Penentuan kadar gliserol dapat dilakukan melalui berbagai metode analisis kimia, salah satunya adalah metode titrasi alkalimetri menggunakan natrium periodat dalam suasana asam sesuai dengan SNI 06-1564-1995, yang digunakan untuk mengukur kandungan gliserol dalam fase air. Metode lain yang umum digunakan untuk mengukur kadar atau konsentrasi gliserol yaitu kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC), kromatografi gas (GC), dan metode enzimatik. Teknik spektroskopi *Fourier Transformed Infrared* (FTIR) juga telah dimanfaatkan karena kemampuannya mengidentifikasi gugus fungsi, menganalisis senyawa campuran, dan melakukan analisis secara non-destruktif terhadap sampel (Kasman dkk., 2023).

Metode *gas chromatography* (GC) dengan *flame ionization detector* (FID) merupakan salah satu teknik yang umum digunakan dalam penentuan kadar gliserol pada sampel biologis maupun biodiesel, dengan perhitungan kadar berdasarkan luas puncak kromatogram yang dibandingkan terhadap standar gliserol (Shen and Xu, 2013). Berdasarkan penelitian Hazra dan Septiawan (2014), penentuan kadar gliserol dilakukan melalui analisis fisikokimia yang mencakup parameter kadar gliserol, bilangan asam, kadar air, kadar abu, densitas, viskositas, dan pH untuk membandingkan karakteristik gliserol sebelum dan sesudah pemurnian. Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan asam fosfat dengan konsentrasi 5% (v/v) memberikan kadar gliserol yang cukup tinggi yaitu 83,46% yang telah memenuhi standar SNI 06-1564-1995. Peningkatan kadar gliserol ini menunjukkan efektivitas metode pemurnian dalam menghilangkan zat pengotor, seperti sabun dan sisa katalis.

2.6. Minyak Sawit

Minyak sawit merupakan salah satu bahan baku utama dalam industri biodiesel dan dalam berbagai proses biokimia lainnya, termasuk hidrolisis enzimatis untuk menghasilkan gliserol dan asam lemak bebas. Minyak sawit adalah trigliserida

yang mengandung campuran asam lemak jenuh dan tak jenuh, dengan kandungan utama asam palmitat dan asam oleat. Keberadaan asam lemak ini membuat minyak sawit menjadi substrat yang ideal untuk reaksi hidrolisis menggunakan enzim lipase. Selain menghasilkan asam lemak bebas yang dapat dimanfaatkan untuk biodiesel, gliserol yang dihasilkan sebagai produk sampingan juga memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Trigliserida dalam minyak sawit dihidrolisis oleh lipase menjadi asam lemak bebas dan gliserol (Kareem *et al.*, 2017). Pemurnian gliserol melalui proses lanjutan seperti destilasi, asidifikasi, dan adsorpsi dapat memastikan kualitas produk gliserol yang sesuai dengan standar industri. Pada minyak sawit, hidrolisis trigliserida oleh lipase berlangsung melalui tiga tahap yaitu pemecahan trigliserida menjadi diasilgliserol, kemudian menjadi monoasilgliserol, dan akhirnya menjadi gliserol bebas. Proses ini umumnya menggunakan air atau pelarut organik untuk meningkatkan kelarutan substrat dan memfasilitasi pemisahan produk reaksi. Gliserol yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis minyak sawit dapat digunakan dalam berbagai industri dan dalam produksi biodiesel (Kareem *et al.*, 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 - Juni 2025 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Anorganik-Fisik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung.

Peremajaan bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dilakukan menggunakan koleksi isolat stok dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah; spektrofotometer UV- Vis *Carry Win UV 32*, *Laminar Air Flow* (LAF) CURMA model 9005-FL , *shaker Labtech* LSI 1 EDAM 97, inkubator *shaker*, *hot plate Stuart*, *waterbath Memmert W 350*, *sentrifuse 1725010-Centifuge Cole-Parmer*, tabung sentrifugasi, inkubator, oven, autoklaf, *magnetic stirrer*, neraca analitik, pH meter *Metrohm*, bunsen, mikropipet *Dragon Lab*, termometer, jarum ose, spatula, *vortex*, corong pemisah, kolom fraksionasi, pendingin air, gunting, rak tabung reaksi, dan alat gelas lainnya.

Bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini adalah; isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 koleksi dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *sephadex G-75 Sigma-Al Drich*, minyak zaitun,

minyak sawit komersial, *tween 80*, asam oleat, HCl, tembaga (II) asetat, BSA (*Bovine Serum Albumin*), amonium sulfat, buffer fosfat, etanol, pereaksi C *Lowry*, pereaksi D *Lowry*, n-heksana, NaOH, KOH, asam fosfat (H_3PO_4), etanol 95%, akuades, boraks, indikator *fenolftalein* (PP), *indicator universal*, pendingin (air es), kapas, tisu, kain kasa, alumunium foil, dan plastik *wrap*.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a) Persiapan alat

Sebelum digunakan, peralatan gelas dicuci, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas. Selanjutnya, peralatan tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, peralatan dikeringkan dalam oven selama ± 2 jam (Larasati, 2024).

b) Pembuatan media peremajaan

Media peremajaan yang digunakan adalah media *Nutrient Agar* (NA), yang mengandung pepton, NaCl, dan ekstrak daging sapi. Sebanyak 3 g NA dilarutkan dalam 100 mL akuades, kemudian ditambahkan 1 mL minyak zaitun dan 1 tetes *tween 80*. Larutan media dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen, kemudian media disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media dituangkan ke dalam tabung reaksi secara aseptis, kemudian mulut tabung ditutup dengan sumbat. Tabung diposisikan dengan kemiringan 5° dan diamkan media dalam tabung selama 24 jam hingga media siap digunakan (Pretti, 2022). Media ini selanjutnya akan digunakan untuk meremajakan bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.

c) Pembuatan media produksi (fermentasi)

Media ini digunakan untuk memulai proses dan produksi enzim lipase. 13 g media *Nutrient Broth* (NB) dilarutkan dalam 1000 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7. Kemudian ditambahkan 10 mL minyak zaitun dan 20 tetes *tween 80*. Media dipanaskan dengan *hot plate* dan media disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, media yang telah didapat akan digunakan untuk media produksi enzim lipase (Nurlinda, 2024).

d) Pembuatan media inokulum

Media inokulum dibuat dengan melarutkan 12,6 g media *Nutrient Broth* (NB) dalam 200 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7. Kemudian ditambahkan 2 mL minyak zaitun dan 4 tetes *tween 80*. Media inokulum disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121°C selama 15 menit (Arif, 2022).

e) 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 48 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 Larasati (2024).

3.3.2. Produksi Enzim Lipase

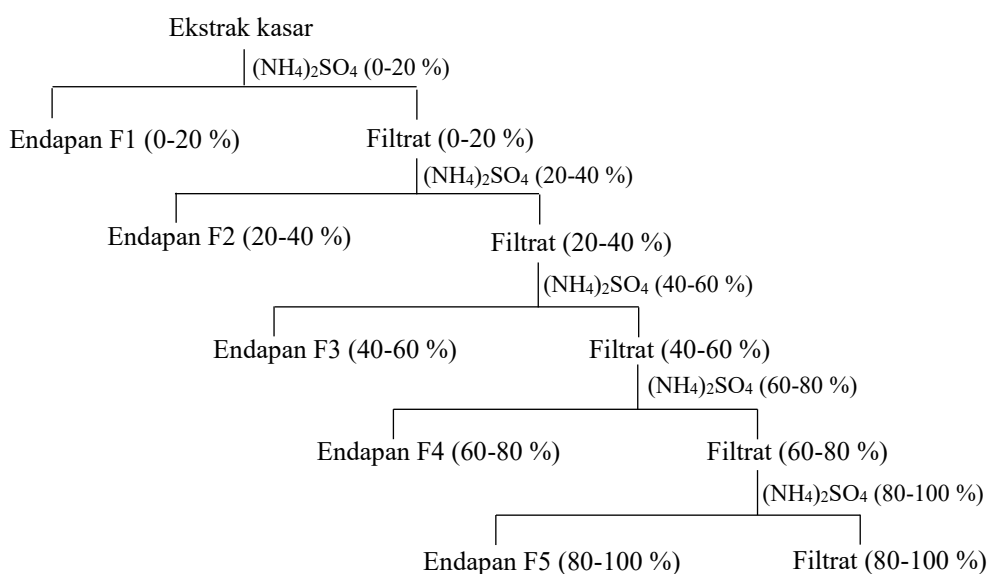
Kultur bakteri diambil sebanyak 2 ose menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam 200 mL media inokulum pada Erlenmeyer 250 mL, dilakukan hingga tiga kali pengulangan. Media diinkubasi pada suhu 30°C dan diagitasi menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Selanjutnya bakteri dipindahkan ke media produksi (fermentasi). Sebanyak 10% dari media

inokulum difermentasi pada 1000 mL media fermentasi, dilakukan kultivasi selama dua hari dan diagitasi dengan kecepatan 120 rpm. Larutan disentrifus 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.

3.3.3. Pemurnian Enzim Lipase

a) Fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis

Ekstrak kasar enzim lipase yang telah diperoleh kemudian dimurnikan melalui proses fraksinasi menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 20-90%. Proses fraksinasi diawali dengan penambahan garam amonium sulfat secara perlahan ke dalam ekstrak kasar enzim sambil diaduk pada suhu 4°C, kemudian campuran didiamkan selama 30-60 menit, dan disentrifugasi selama 20 menit pada suhu yang sama. Endapan hasil sentrifugasi dipisahkan dari supernatan yang kemudian digunakan untuk pemurnian selanjutnya. Skema fraksinasi lipase menggunakan amonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Skema fraksinasi enzim menggunakan amonium sulfat

Berdasarkan skema fraksinasi yang ditunjukkan pada Gambar 9., filtrat dari fraksi kejenuhan 0-20% digunakan kembali sebagai bahan dasar untuk fraksinasi berikutnya pada tingkat kejenuhan 20-40%. Prosedur serupa dilakukan secara berurutan hingga mencapai tingkat kejenuhan 80-100%. Pada penelitian ini, fraksinasi hanya dilakukan pada tingkat kejenuhan 20-90%, yang merujuk pada hasil penelitian sebelumnya oleh Pretti (2022) dan Nurlinda (2024) yang telah melakukan proses pencarian pola fraksinasi enzim lipase dengan tingkat kejenuhan bertahap, yaitu (0-20%), (20-40%), (40-60%), (60-80%), dan (80-100%).

Endapan hasil fraksinasi dilarutkan dalam 30 mL buffer fosfat dengan pH optimum produksi, kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan untuk dilakukan proses dialisis (Prawata dan Martiningsih, 2014). Hasil fraksi didialisis menggunakan 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 berlangsung. Pergantian buffer ini bertujuan untuk mengurangi konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis secara bertahap. Proses dialisis dilakukan secara *continue* hingga konsentrasi ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan. Hasil dialisis ditentukan melalui nilai aktivitas lipase dan kadar proteinnya yang dapat dilihat pada metode uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein.

b) 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 dilusi 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*. Kadar protein ditentukan

dengan $\lambda 280$ nm dan aktivitas enzim ditentukan dengan $\lambda 746$ nm (Rusman, 2017). Metode uji aktivitas enzim dan penentuan kadar protein dapat dilihat pada metode uji aktivitas dan penentuan kadar protein enzim.

3.3.4. Penentuan Kadar Protein

Berdasarkan penelitian Nurlinda (2024), metode *Lowry* (Lowry *et al.*, 1951) digunakan untuk menentukan kadar protein. Metode ini menggunakan beberapa pereaksi berikut:

- Pereaksi A : 2 g Na_2CO_3 dilarutkan dalam 100 mL NaOH 0,1 M.
- Pereaksi B : 5 mL $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% ditambahkan ke dalam 3 mL larutan NaK-tartrat 1%.
- Pereaksi C : 2 mL pereaksi B ditambahkan 100 mL pereaksi A.
- Pereaksi D : Reagen folin ciocelciu diencerkan dengan akuades (1:1).
- Larutan Standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) berbagai Konsentrasi.

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 C, dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian campuran ditambahkan pereaksi D sebanyak 0,5 mL dengan cepat, lalu dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Sebagai larutan kontrol, 0,1 mL sampel enzim lipase diganti dengan 0,1 mL akuades, dengan perlakuan yang sama seperti pada perlakuan menggunakan sampel enzim. Absorbansi sampel ditentukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm, dan untuk menentukan konsentrasinya digunakan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai standar. Kadar protein dapat ditentukan nilainya dengan menghitung menggunakan Persamaan 1:

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

3.3.5. Uji Aktivitas Hidrolisis

Aktivitas enzim lipase ditentukan dengan menggunakan metode Kwon *and* Rhee (1986) yang dimodifikasi. Campuran enzim lipase 0,70 mL, buffer fosfat 0,05 M pH 7 sebanyak 0,35 mL dan substrat minyak sawit komersial 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 3 mL. Akuades sebanyak 0,70 mL digunakan sebagai kontrol dan pelarut n-heksana sebanyak 3,25 mL sebagai blanko. Sampel, kontrol dan blanko ditambahkan 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat 5% lalu divorteks. Perlakuan yang sama dilakukan dengan menggunakan substrat yang berbeda untuk mendapatkan perbandingan antara substrat minyak zaitun dengan substrat minyak sawit komersial. 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.

3.3.6. Pemisahan Gliserol

Pada proses hidrolisis, digunakan perbandingan minyak sawit komersial dan enzim lipase sebesar 1:1, yaitu masing-masing sebanyak 35 mL. Kedua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, lalu di *shaker* selama 30 menit pada suhu ruang. Campuran tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian dihomogenkan, dan dibiarkan hingga terjadi pemisahan sempurna. Lapisan atas menunjukkan gliserol, sedangkan lapisan bawah menunjukkan asam lemak bebas (Nenobahan dkk., 2020).

3.3.7. Pemurnian Gliserol

Pemurnian gliserol dapat dilakukan dengan memasukkan gliserol kasar sebanyak 33 mL ke dalam gelas beaker 250 mL dan dipanaskan diatas *hot plate* hingga mencapai suhu 20-30°C sambil diaduk. Setelah itu, ditambahkan larutan asam fosfat (H_3PO_4) dengan konsentrasi 5% (v/v) selama 15 menit. Campuran didinginkan dan didiamkan sampai terbentuk tiga lapisan. Setelah terbentuk tiga lapisan, lapisan berbentuk garam dipisahkan dengan disaring menggunakan kertas saring. Kemudian hasil penyaringan tersebut didiamkan sampai membentuk dua lapisan, di mana lapisan bawah merupakan gliserol yang akan diambil dan disimpan, sedangkan lapisan atas merupakan sisa asam lemak (Hazra dan Septiawan, 2014).

3.3.8. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Gliserol

Uji kualitatif gliserol dilakukan menggunakan uji Dunstan, serta dilengkapi dengan uji kuantitatif menggunakan uji fisikokimia berupa pengukuran pH dan penentuan bilangan asam.

a) Uji Dunstan

Identifikasi keberadaan gliserol dilakukan dengan menggunakan uji Dunstan, yang melibatkan reaksi antara larutan boraks dan indikator *fenolftalein* (PP) dengan berbagai jenis sampel, yaitu gliserol murni, gliserol kasar, minyak sawit komersial, sisa minyak, enzim lipase, dan asam lemak bebas dari pemurnian gliserol. Sebanyak 1 mL larutan boraks dan 2 tetes larutan indikator PP dicampurkan ke dalam 6 tabung reaksi yang berbeda hingga menghasilkan larutan yang berwarna merah muda. Setelah itu, 2 tetes dari masing-masing sampel ditambahkan ke tabung yang telah berisi campuran boraks dan PP. Perubahan warna merah muda menjadi bening menunjukkan adanya gliserol (Saputri, 2021).

b) Pengukuran pH

Pengukuran pH menggunakan *indicator universal* juga dilakukan untuk mengetahui sifat asam atau basa dari masing-masing sampel. *Indicator universal* ditetesi dengan masing-masing sampel. Warna yang terbentuk dicocokkan dengan skala warna standar untuk menentukan nilai pH (Hazra dan Septiawan, 2014). Menurut Rahmi (2006), kondisi pH yang paling optimal untuk proses pemurnian gliserol adalah pada pH 3, yang diketahui mampu memberikan hasil pemurnian yang terbaik.

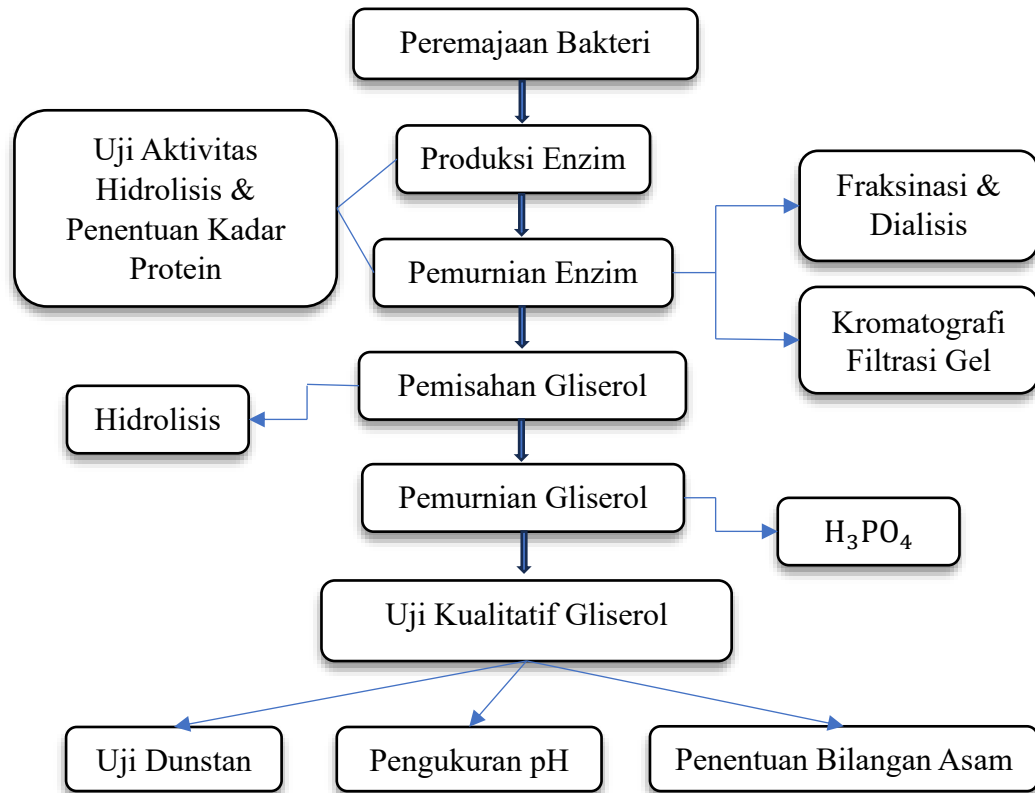
c) Penentuan Bilangan Asam

Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis angka asam pada enam jenis sampel yaitu gliserol murni, gliserol kasar, minyak sawit komersial, sisa minyak, enzim lipase, dan asam lemak bebas. Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL. Selanjutnya, ditambahkan 25 mL etanol 95% untuk melarutkan sampel. Campuran dipanaskan dalam waterbath pada suhu 50°C selama 15 menit hingga larut sempurna. Setelah itu, ditambahkan 2–3 tetes indikator fenolftalein, dan campuran kemudian dititrasi dengan larutan KOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda sebagai tanda titik akhir titrasi. Volume KOH yang digunakan dicatat untuk perhitungan angka asam. Setiap sampel dianalisis dalam tiga kali ulangan untuk memperoleh nilai rata-rata angka asam (Fitri dan Fitriana, 2019). Nilai angka asam dihitung berdasarkan jumlah KOH (mg) yang dibutuhkan untuk menetralkan asam lemak bebas dalam 1 g sampel yang dapat dilihat pada persamaan (ii).

$$\text{Angka Asam (mg KOH/gram)} = \frac{V \times N \times 56,1}{b} \dots\dots\dots (ii)$$

3.3.9. Skema Penelitian

Skema dari tahapan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Skema penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 memiliki waktu pertumbuhan optimal selama 48 jam pada suhu 30°C dan pH 7, yang ditandai dengan berubahnya warna menjadi lebih keruh sebagai indikator keberhasilan peremajaan.
2. Enzim lipase dari *Klebsiella* sp. LPG172 menunjukkan hasil optimal setelah inkubasi selama 72 jam pada suhu ruang dan pH 7. Aktivitas tertinggi diperoleh saat menggunakan minyak zaitun sebagai substrat, yaitu sebesar 15,15 U/mL dengan aktivitas spesifik 21,04 U/mg, sedangkan pada minyak sawit komersial menghasilkan aktivitas unit sebesar 6,71 U/mL dan aktivitas spesifik 9,31 U/mg. Pada kondisi tersebut, kadar protein dari ekstrak kasar adalah sebesar 0,72 mg/mL.
3. Pemurnian enzim lipase dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu fraksinasi amonium sulfat yang dilanjutkan dengan dialisis, serta kromatografi filtrasi gel. Pada tahap fraksinasi dan dialisis, diperoleh aktivitas enzim sebesar 46,3 U/mL pada minyak sawit komersial dan 62,89 U/mL pada minyak zaitun, dengan kadar protein sebesar 0,45 mg/mL. Tahap akhir melalui kromatografi filtrasi gel menghasilkan aktivitas enzim tertinggi, yaitu 225,5 U/mL pada minyak sawit komersial dan 258,83 U/mL pada minyak zaitun, dengan kadar protein sebesar 0,22 mg/mL.

4. Gliserol kasar hasil hidrolisis diperoleh sebanyak 33 mL, kemudian dimurnikan menggunakan asam fosfat 5% (v/v), sehingga menghasilkan gliserol murni dengan tingkat kemurnian sekitar 83,46%.
5. Hasil uji kualitatif menunjukkan bahwa gliserol murni dan kasar mengalami perubahan warna dari merah muda menjadi bening pada uji Dunstan, menandakan keberadaan gliserol. Pengukuran pH keduanya sebesar 1, menunjukkan sifat sangat asam dan belum memenuhi pH optimal pemurnian yaitu pH 3. Sementara itu, bilangan asam gliserol murni sebesar 0,786 mg KOH/g dan gliserol kasar 0,897 mg KOH/g, masih memenuhi batas SNI < 1,0 mg KOH/g, namun gliserol kasar memiliki kandungan asam lebih tinggi, menandakan pemurnian belum sempurna.

5.2. Saran

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

1. Penelitian selanjutnya disarankan agar produksi enzim lipase ditingkatkan volumenya, sehingga jika dilakukan proses pemisahan gliserol hingga tahap pemurnian, volume gliserol murni yang dihasilkan dapat lebih banyak. Hal ini penting agar gliserol yang diperoleh mencukupi untuk pengujian lebih lanjut.
2. Disarankan dilakukan uji kuantitatif kadar gliserol menggunakan teknik instrumentasi seperti *Gas Chromatography* (GC) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Meskipun dalam penelitian ini keberadaannya telah dibuktikan melalui uji Dunstan, uji kuantitatif diperlukan untuk mengetahui konsentrasi gliserol secara tepat dan akurat.
3. Disarankan agar dilakukan analisis kadar *Free Fatty Acid* (FFA) pada minyak sawit komersial, sebelum proses hidrolisis dilakukan. Data kadar FFA akan memberikan gambaran awal mengenai kualitas substrat dan membantu memprediksi potensi konversi trigliserida menjadi gliserol.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, S., Khan, S. A., Hamayun, M., and Lee, I. J. 2023. The Recent Advances in The Utility of Microbial Lipases: A Review. *Microorganisms*. 11(2): 1-26.
- Ardi, M., Aroua, M., and Hashim, N. 2015. Progress, Prospect and Challenges in Glycerol Purification Process: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 42: 1164-1173.
- Arif, F. 2022. Studi Produksi Biodiesel dengan Katalis Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri *Klebsiella sp.* Dari Tanah Tercemar Minyak . In *Skripsi*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Azelee, N. I., Ramli, A. N., Manas, N. H., Salamun, N., Man, R. C., and Enshasy, H. E. 2019. Glycerol In Food, Cosmetics And Pharmaceutical Industries: Basics And New Applications. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 8(12): 553-558.
- Aziz, I. 2007. Kinetika Reaksi Transesterifikasi Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(1): 19-23.
- Aziz, I., Nurbayti, S., dan Luthfiana, F. 2008. Pemurnian Gliserol dari Hasil Samping Pembuatan Biodiesel Menggunakan Bahan Baku Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Valensi*. 1(3): 157-162.
- Bariroh, A. 2014. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Enzim Protease dari *Trichoderma sp.* dan Campuran Kapang *Penicillium sp.* dan *Penicillium*: 52 *Trichoderma sp.* yang Ditumbuhkan Pada Media Limbah Cair Tahu dan Dedak. *Skripsi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim*.
- Carballares, D., Martin, J., and Lafuente, R. 2022. Coimmobilization of Lipases Exhibiting Three Very Different Stability Ranges. Reuse of The Active Enzymes and Selective Discarding of The Inactivated Ones. *International Journal of Biological Macromolecules*. 206: 580-590.

- Chandra, P., Enespa, Singh, R., and Arora, P. K. 2020. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: A Comprehensive Review. *Microbial Cell Factories*. 19: 1-42.
- Darnoko, D., and Cheryan, M. 2000. Continuous Production of Palm Methyl Esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 77(12): 1269-1272.
- Dunstan, W. 1904. The Identification of Glycerol. *Journal of The Chemical Society*. 85: 176-180.
- Fitri, A. S. dan Fitriana, Y. A. N. 2019. Analisis Angka Asam pada Minyak Goreng dan Minyak Zaitun. *SAINTEKS*. 16(2): 115-119.
- Gunstone, F. 2004. The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties, and Uses. In *Blackwell Publishing*.
- Hadiangoro, S., Moentamaria, D., dan Syarwani, M. 2018. Efektifitas Penggunaan *Co Immobilized* -Lipase Pada Reaksi Esterifikasi Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Kelapa. *Jurnal Teknik Kimia dan Lingkungan*. 2(1): 23-30.
- Hazra, F., dan Septiawan, I. 2014. Pemurnian Gliserol dari Hasil Samping Produksi Biodiesel Minyak Kelapa Sawit. *Jurnal Sains Terapan Edisi IV*. 1(1): 53-58.
- Hernawati, B. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas aeruginosa* Sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Sawit dengan Sukrosa. *Skripsi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Indonesia*.
- Indriyani, D. M., Nurhasanah, and Herasari, D. 2021. Optimization of Lipase Production from Local Bacteria Isolate with Palm Oil Inducer. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 4(2): 58-61.
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E., Bonang, and Gerard. 2005. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan: *Review of Medical Microbiology*. Jakarta: CV. EBC, 1982;1984;1986.
- Kareem, S., Falokun, E., Balogun, S., Akinloye, O., and Omeike, S. 2017. Enzymatic Biodiesel Production from Palm Oil and Palm Kernel Oil Using Free Lipase. *Egyptian Journal of Petroleum*. 26: 635-642.
- Kasman, M., Hadrah, Suraya, dan Andika, B. 2023. Analisis Pemanfaatan Minyak Jelantah Menjadi Gliserol dengan Metode Hidrolisis. *Jurnal Daur Lingkungan*. 6(1): 8-11.

- Katogen, A., Furka, Z., Kovacs, T., Volford, B., Papp, D., Varga, M., and Tako, M. 2022. Hydrolysis of Edible Oils by Fungal Lipases: An Effective Tool to Produce Bioactive Extracts with Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Journal Article Foods*. 11(12): 1-19.
- Koolman, J., and Roehm, K. 2005. Color Atlas of Biochemistry Second Edition, Revised and Enlarged. *Thieme Stuttgart*.
- Kurnia, 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.
- Larasati, D. 2024. Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase dari Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 dengan Imobilisasi Metode Adsorpsi pada Matriks Hidroksipatit. *In Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Lide, D. 2009. CRC Handbook of Chemistry and Physics. *In Chemistry Press*.
- Lopez, E., Callejon, M., Sanchez, M., Moreno, P., and Medina, A. 2023. Obtaining Eicosapentaenoic Acid-Enriched Polar Lipids from Microalga *Nannochloropsis* sp. By Lipase-Catalysed Hydrolysis. *Algal Research*. 71: 1-15.
- 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.
- Lu, T., and Xu, C. 2023. New Trends in Catalytic Conversion of Glycerol. *Catalysts*. 13(4): 1-3.
- Mardini, M., Ariff, A., Rios-Solis, L., Halim, M., Abdullah, R., and Ghazali, H. 2015. Hydrolysis of Oils by Lipase from *Aspergillus niger*: Effects of Process Parameters and Substrate Specificity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 120: 30-39.
- Maryati, R., Fauzia, dan Rahayu, T. 2007. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. 8(1): 30-38.

- Moklis, M. H., Cheng, S., and Cross, J. S. 2023. Current and Future Trends for Crude Glycerol Upgrading to High Value-Added Products. *Sustainability*. 15(2979): 1-30.
- Murni, S., Kholisoh, S., dan Petrissia, E. 2011. Produksi Karakterisasi dan Isolasi Lipase dari *Aspergillus niger*. *Yogyakarta Jl., SWK*, pp: 62-274.
- Nadir, M., dan Marlinda. 2013. Peningkatan Kadar Gliserol Hasil Samping Pembuatan Biodiesel dengan Metode Adsorpsi Asam Lemak Bebas (ALB) Menggunakan *Fly Ash*. *Jurnal Konversi*. 2(2): 51-58.
- Nenobahan, M., Ledo, M., dan Nitsae, M. 2020. Pembuatan Biodiesel Minyak Jelantah Menggunakan Biokatalis Ekstrak Kasar Lipase dari Biji Kesambi (*Schleicheraoleosal*). *Jurnal Saintek Lahan Kering*. 3(1): 20-25.
- Nurlinda, B. 2024. Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dengan Matriks Zeolit Alam Teraktivasi. *In Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- 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. Bandar Lampung.
- Prawata, 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.
- Pretti, G. S, 2022. Pemanfaatan Enzim Lipase Yang Dihasilkan Oleh Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. dari Tanah Tercemar Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi dalam Produksi Biodiesel. *Skripsi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung*. Bandar Lampung.
- Rahmi, H., Hariyanti, Putri, R., 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.
- Rahmi, U. 2006. Pengaruh Jenis Asam dan pH pada Pemurnian Residu Gliserol dari Hasil Samping Produksi Biodiesel. *Skripsi*. *Universitas Sumatera Utara*.

- Ramadhan, M. 2018. Uji Sensitivitas *Klebsiella sp.* dari Sputum Pasien *Pneumonia* di RSUD Dr. Moewardi Terhadap Antibiotik Ampisilin Gentamisin, Seftriakson, dan Siprofloksasin. *Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi*.
- Risna, Y., Harimurti, S., Wihandoyo, W., dan Widodo, W. 2022. Kurva Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat dari Saluran Pencernaan Itik Lokal Asal Aceh. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 24(1): 1-7.
- Rusman, H. J. 2017. Potensi dan Imobilisasi Enzim Lipase dari Dedak Padi (*Oryza Sativa L.*) Serta Aplikasinya dalam Mengkatalis Reaksi Transesterifikasi dan Amidasi Menggunakan Substrat Minyak Kelapa Murni. *In Tesis Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin*.
- Safitri, L. 2022. Peningkatan Kestabilan Enzim α -Amilase dari *Aspergillus Fumigatus* dengan Penambahan Glutaraldehyd. *Skripsi*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Sambodo, D., Marsel, F., Sambodo, H., 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.
- Saputri, N. 2021. Laporan Praktikum Lipid II: Uji Dunstan untuk Deteksi Gliserol. *Sekolah Tinggi Kesehatan Nasional Surakarta*.
- Saryono, Fitriani, dan Soedjanaatmadja, R. 2016. Beberapa Mikroorganisme yang Menghasilkan Enzim Inulinase, Isolasi dan Karakterisasi Enzim dari *Aspergillus flavus* Gm11.2 Galur Lokal. *Chimica et Natura Acta*. 4(3): 165-174.
- Sayuti, I., dan Suratni. 2015. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Hidrokarbonoklastik dari Limbah Cair Minyak Bumi GS Cevron Pasifik Indonesia di Desa Benar Kecamatan Rimba Melintang Rokan Hilir. *Prosiding Semirata Bidang MIPA BKS-PTN Barat*, pp. 320-324.
- Selvia, R., Wuryanti, W., dan Sriatun, S. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase dari Isolat Jamur Akuatik Kitinolitik Berasal dari Kupu-kupu (*Lepidoptera*). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 16(3): 97-101.

- Shen, Y., and Xu, Z. (2013). An Improved GC-MS Method in Determining Glycerol in Different Types of Biological Samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 930: 36-40.
- Sholeha, R., dan Agustini, R. 2021. Lipase Biji-Bijian dan Karakteristiknya . *UNESA Journal of Chemistry.* 10(2): 168-183.
- Smith, M., and Feinberg, J. 2011. Organic Chemistry: An Acid-Base Approach. *In Chemistry Press.*
- Standar Nasional Indonesia. 1995. SNI 06-1564-1995: *Gliserol Kasar*. Dewan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Standar Nasional Indonesia. 1995. SNI-3741-2013. *Standar Mutu Minyak Goreng*. Dewan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Sugiharni, N. 2010. Isolasi Lipase Ekstrak Kasar dari *Pseudomonas fluorescens* Sebagai Biokatalisator dalam Studi Pendahuluan Reaksi Esterifikasi Antara Asam Lemak Minyak Kelapa dengan Sukrosa. *Skripsi.* Jurusan Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Sumarsih, S., Fatimah, dan Hadi, S. 2018. Konstruksi Bakteri Lipolitik Unggul dalam Produksi Enzim Lipase untuk Aplikasi Industri. *Universitas Airlangga Repository.*
- Suseno, N., Adiarto, T., Alviany, R., dan Novitasari, K. 2019. Pemurnian Gliserol Hasil Produk Samping Biodiesel dengan Kombinasi Proses Adsorpsi-Mikrofiltrasi-Evaporasi. *Jurnal Teknik Kimia.* 13(2): 32-38.
- Suseno, N., Adiarto, T., Alviany, R., dan Novitasari, K. 2020. Pemurnian Gliserol Hasil Produk Samping Biodiesel dengan Kombinasi Proses Adsorpsi-Mikrofiltrasi-Evaporasi. *Jurnal Teknik Kimia.* 13(2): 123-130.
- Wijaya, S. 2002. Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar.* 3(1): 30-35.
- Wita, M., Hambali, E., dan Permadi, P. 2015. Perbaikan Proses Pemurnian Gliserol Hasil Samping Industri Biodiesel Menggunakan Distilasi Vakum. *IPB Scientific Repository, Departemen Teknologi Industri Pertanian.* Institut Pertanian Bogor.

Zulaika, A., Rahman, H., Ningrum , S., and Maulida, A. 2024. Exploring Microbial Lipases: Screening and Identification for Biocatalyst Potential Bioethanol Synthesis From Glycerol-Based Biodiesel Waste . *Results in Engineering*. 23: 1-13.