

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE HASIL
ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. LPG171**

(Skripsi)

Oleh

**DESVICA ROMANDA
NPM 2117011095**



**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 *Pseudomonas* sp. LPG171

Oleh

DESVICA ROMANDA

Di Indonesia, gliserol digunakan luas dalam industri kimia, makanan, dan kosmetik. Namun, ketersediaannya masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan gliserol dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatik, yaitu pemecahan lemak menjadi gliserol dan asam lemak bebas dengan bantuan lipase sebagai katalis. Penelitian ini diharapkan mampu meningkatkan produksi gliserol dengan menggunakan lipase hasil isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171. Selain itu, hasilnya dapat mendukung perkembangan industri berbasis enzim di Indonesia.

Penelitian ini melalui beberapa tahapan, yaitu peremajaan bakteri, produksi dan pemurnian enzim lipase, hidrolisis minyak sawit komersial dengan enzim lipase. Selanjutnya, pemisahan dan pemurnian gliserol, serta uji kualitatif dan kuantitatif untuk memastikan keberadaan dan kemurnian gliserol yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis enzimatik tersebut.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa enzim hasil pemurnian memiliki aktivitas unit dan aktivitas spesifik 115,50 kali lebih tinggi yaitu 208,03 U/mL dan 1.044,15 U/mg dengan substrat minyak sawit komersial, sedangkan 41,86 kali lebih tinggi 242,16 U/mL dan 1.210,8 U/mg dengan substrat minyak zaitun, dibandingkan dengan ekstrak kasar enzim. Gliserol berhasil dipisahkan dan dimurnikan menggunakan asam fosfat 5 % (v/v), menghasilkan kemurnian sekitar 83,46 % dengan volume 3 mL. Uji Dunstan dilakukan untuk memastikan keberadaan gliserol dengan menunjukkan perubahan warna dari merah muda menjadi tidak berwarna, bilangan asam (<1 mg KOH/g) memenuhi SNI, dan diperoleh pH gliserol pada kondisi asam.

Kata kunci: *Pseudomonas* sp. LPG171, lipase, gliserol, dan hidrolisis enzimatik.

ABSTRACT

SEPARATION OF GLYCEROL FROM PALM OIL BY ENZYMATIC HYDROLYSIS LIPASE FROM ISOLATED BACTERIA *Pseudomonas* sp. LPG171

By

DESVICA ROMANDA

In Indonesia, glycerol is widely used in the chemical, food, and cosmetic industries. However, its availability remains limited. This study aims to produce glycerol from palm oil through enzymatic hydrolysis, which involves the breakdown of fats into glycerol and free fatty acids with the aid of lipase as a catalyst. The study is expected to increase glycerol production using lipase derived from a bacterial isolate, *Pseudomonas* sp. LPG171. Additionally, the results may support the development of enzyme-based industries in Indonesia.

The research involved several stages, including bacterial rejuvenation, production and purification of lipase enzyme, hydrolysis of commercial palm oil using the purified lipase, followed by separation and purification of glycerol. Qualitative and quantitative tests were carried out to confirm the presence and purity of glycerol produced from the enzymatic hydrolysis reaction.

The results showed that the purified enzyme had 115.50 times higher activity and specific activity 208.03 U/mL and 1,044.15 U/mg respectively when using commercial palm oil as substrate, and 41.86 times higher 242.16 U/mL and 1,210.8 U/mg when using olive oil, compared to crude enzyme extract. Glycerol was successfully separated and purified using 5% (v/v) phosphoric acid, resulting in approximately 83,46% purity and a final volume of 3 mL. The Dunstan test confirmed the presence of glycerol by showing a color change from pink to colorless. The acid value (<1 mg KOH/g) met the Indonesian National Standard (SNI), and the glycerol had an acidic pH.

Keywords: *Pseudomonas* sp. LPG171, lipase, glycerol, enzymatic hydrolysis.

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE HASIL
ISOLAT BAKTERI *Pseudomonas* sp. LPG171**

Oleh

DESVICA ROMANDA

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 *Pseudomonas* sp. LPG171

Nama : Desvica Romanda

NPM : 2117011095

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

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

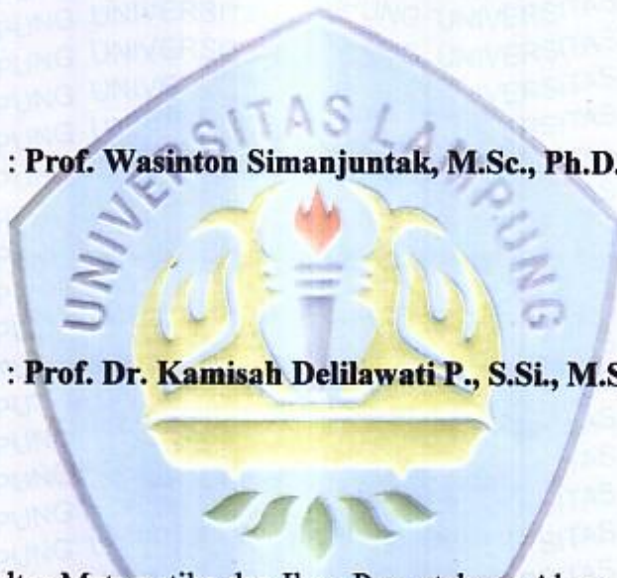
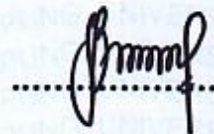
Ketua : **Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si.**



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



Anggota : **Prof. Dr. Kamisah Delilawati P., S.Si., M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **30 Juli 2025**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Desvica Romanda
NPM : 2117011095
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa skripsi saya yang berjudul **“Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171”** adalah benar karya saya sendiri yang tidak terdapat karya orang lain selain yang disebutkan dalam daftar pustaka. Sehingga yang sudah tercantum dalam skripsi saya ini dapat dipertanggungjawabkan dan saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi ini digunakan oleh program studi untuk kepentingan publikasi selama nama saya tercantum dalam publikasi tersebut atas kesepakatan bersama.

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

Bandar Lampung, 4 Agustus 2025
Yang Menyatakan,



Desvica Romanda
NPM. 2117011095

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Desvica Romanda yang lahir di Kota Bandar Lampung, Lampung pada 5 Desember 2002. Penulis merupakan anak kedua dari tiga bersaudara, yaitu putri dari Bapak Sarwo Edy dan Ibu Watiningsih. Penulis mengawali jenjang pendidikan formal di TK Kuntum Bandar Lampung pada tahun 2008, SDN 2 Beringin Raya diselesaikan pada tahun 2015, SMPN 14 Bandar Lampung diselesaikan pada tahun 2018, dan SMK di Sekolah Menengah Teknologi Industri (SMTI) jurusan Analis Pengujian Laboratorium diselesaikan pada tahun 2021. Kemudian pada tahun 2021, penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah ke-31 yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Universitas Lampung tahun 2021, penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi kemahasiswaan sebagai anggota aktif Biro Usaha Mandiri Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) 2022. Penulis juga telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Rejomulyo, Lampung Selatan pada tahun 2024. Pada tahun 2025, penulis pernah menjadi asisten praktikum Biokimia Jurusan Biologi Terapan FMIPA Universitas Lampung, menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung dengan judul “Produksi Enzim Lipase dari Isolat Bakteri LPG171”. Kemudian penulis telah menyelesaikan penelitian di Laboratorium Biokimia dan Anorganik-Fisik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung. Serta, penulis telah menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171”.

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”

(QS. Al-Baqarah: 286)

“Maka, sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan.”

(QS. Al-Insyirah: 5-6)

“Doa yang kamu langitkan tidak akan pulang dengan tangan kosong, jika langkah semut saja Allah dengar, lalu bagaimana dengan doa yang selalu kamu ulang?”

“Allah tidak akan menyalahi janji Nya.”

(QS. Ar-Rum:6)

“Keberhasilan bukanlah milik orang pintar, keberhasilan adalah milik mereka yang senantiasa berusaha.”

(B.J Habibie)

“Perang telah usai, aku bisa pulang, kubaringkan panah dan berteriak MENANG.”

(Nadin Amizah)

PERSEMBAHAN



Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wa Ta'ala atas rahmat dan karunia-Nya, serta shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad Shallallahu Alaihi Wasallam. Dengan mengucap *Alhamdulillah rabbil 'alamin* kupersembahkan karya kecil ini sebagai wujud bakti, rasa syukur, dan ucapan terima kasih kepada:

Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Sarwo Edy dan Ibu Watiningsih yang senantiasa mendoakan, memberikan cinta dan kasih sayang, motivasi, nasihat, setra dukungan secara moril dan materil kepada penulis selama ini.

Kedua saudaraku, Dea Aqilla Ningrum dan Drisa Zaskia Senja yang selalu mendukung dan mendoakan penulis.

Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D., dan Ibu Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandiangan, S.Si., M.Si., serta seluruh dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membimbing dan memberikan ilmu, serta nasehatnya hingga penulis mencapai gelar sarjana.

Keluarga besar, sahabat, teman-teman seperjuangan, dan diriku sendiri.

Almamater Tercinta Universitas Lampung.

SANWACANA

Puji syukur atas rahmat, pertolongan, kasih sayang, dan segala kemudahan yang senantiasa Allah Subhanahu Wa Ta'ala berikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul:

“Pemisahan Gliserol dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171”

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

Penulis menyadari bahwa selama penulisan skripsi ini banyak mendapatkan bantuan, saran, doa, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tuaku, Bapak Sarwo Edy dan Ibu Watiningsih, yang telah mendidik, memberi semangat, perhatian, cinta, kasih sayang, pengorbanan, serta selalu mendoakan penulis untuk bisa menyelesaikan perkuliahan dan tugas akhir skripsi ini.
2. Kakakku Dea Aqilla Ningrum dan suaminya Ade Safta, serta adikku Drisa Zaskia Senja, yang telah memberikan motivasi, dukungan, dan doa kepada penulis selama proses perkuliahan.
3. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing satu yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing penulis dengan sabar sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
4. Bapak Prof. Wasinton Simanjuntak, M.Sc., Ph.D selaku dosen pembimbing dua yang telah meluangkan waktu, membantu memberikan pemikiran, arahan, dan koreksi dalam penyusunan skripsi ini.

5. Ibu Prof. Dr. Kamisah Delilawati Pandiangan, S.Si., M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat berharga dalam penyempurnaan skripsi ini.
6. Bapak Prof. Dr. Drs. Hardoko Insan Qudus, SU selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan mendampingi penulis selama masa perkuliahan.
7. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah memberikan nasihat dan ilmu yang sangat bermanfaat selama masa studi.
10. Seluruh karyawan, laboran, dan admin Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas segala bantuan dan pelayanannya selama masa perkuliahan.
11. Keluarga besar Alm. Mbah Parjono dan Mbah Ginun yang selalu memberikan semangat dan mendoakan penulis hingga dapat menyelesaikan perkuliahan.
12. Keponakanku Muhammad Alfarezel Safta, terima kasih atas perhatian dan kelucuan-kelucuan yang membuat penulis senang dan melepas lelah sejenak dari pengerjaan skripsi ini.
13. Teman seperjuangan penelitian Dian *Reasearch*'21, Retno Dwi Anggraeni, S.Si dan Dina FebriYanti, S.Si yang senantiasa memberikan semangat, membantu, membersamai, dan menjadi tempat berdiskusi selama penulis melaksanakan penelitian.
14. Ber 6 Ber S.Si. yaitu Tiara Zalfa N., S.Si., Sajiddah Talfah, S.Si., Anisah Isti R., S.Si., Amelia Rizky A., S.Si., dan Desrita Pratiwi, S.Si., yang senantiasa hadir memberikan semangat, perhatian, kebersamaan, dan kehangatan di tengah proses yang penuh tantangan sejak awal perkuliahan hingga penulis mendapatkan gelar S.Si.
15. Kak Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si., M.Si., Kak Nindy Novita Sari, S.Pd., M.Si., dan Kak Armydla Nadya Kurniati, S.Si., M.Si., yang telah

memberikan semangat, saran, dan menjadi mentor, serta selalu sabar mendampingi penulis dalam menyelesaikan penelitian dan tugas akhir skripsi ini.

16. Teman-teman di Laboratorium Biokimia atas bantuan, ilmu, kerja sama, semangat, serta pengalaman yang kalian bagi dengan penulis selama penelitian berlangsung.
17. Teman-teman angkatan 2021 terutama kelas A atas semangat, bantuan, dan kenangan selama masa perkuliahan
18. Teman-teman KKN Rejomulyo 3 yang telah berbagi suka dan duka selama 40 hari, kenangan bersama kalian tidak akan terlupakan.
19. Kepada seseorang yang tidak dapat disebutkan namanya, terima kasih telah menjadi rumah untuk melepas keluh kesah, memberikan semangat, doa, dan bantuannya selama penulis menjalankan perkuliahan hingga menyelesaikan tugas akhir skripsi ini.
20. Semua pihak yang telah membantu dan mendoakan penulis dengan tulus dalam proses penyelesaian skripsi yang tidak dapat disebutkan satu persatu.
21. Terakhir, kepada diriku sendiri yang telah bertahan sejauh ini. Terima kasih karena tidak menyerah, meskipun sering lelah, ragu, cemas, banyak air mata yang telah dikeluarkan, dan setiap doa yang terucap dalam diam. Perjalanan ini mungkin tidak mudah, namun diri ini tetap berjalan dan berusaha hingga saat ini. Semoga kedepan, diri ini selalu diberikan kekuatan untuk terus berjalan dalam menghadapi setiap proses kehidupan kedepannya.

Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini masih terdapat kekurangan, penulis harap skripsi ini dapat memberikan informasi, wawasan, dan ilmu yang bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan.

Bandar Lampung, 4 Agustus 2025
Penulis,

Desvica Romanda
NPM. 2117011095

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR GAMBAR.....	xvi
---------------------------	------------

DAFTAR TABEL	xviii
---------------------------	--------------

I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	4
1.3. Manfaat Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Bakteri.....	6
2.1.1. Klasifikasi Bakteri	6
2.2. Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp.	7
2.3. Enzim Lipase	9
2.3.1. Sumber Enzim Lipase	10
2.3.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim.....	10
2.3.3. Aktivitas Enzim Lipase.....	12
2.4. Gliserol.....	13
2.5. Reaksi Hidrolisis	14
2.6. Minyak Kelapa Sawit.....	15
III. METODE PENELITIAN.....	16
3.1. Waktu dan Tempat	16
3.2. Alat dan Bahan.....	16
3.3. Prosedur Penelitian	17

3.3.1. Tahap Persiapan	17
3.3.2. Peremajaan Bakteri	18
3.3.3. Produksi Enzim Lipase	18
3.3.4. Pemurnian Enzim Lipase	19
3.3.5. Penentuan Kadar Protein.....	21
3.3.6. Penentuan Aktivitas Hidrolisis	21
3.3.7. Pemisahan Gliserol	22
3.3.8. Pemurnian Gliserol	22
3.3.9. Uji Kualitatif Gliserol	23
3.4. Diagram Alir Penelitian	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1. Produksi Enzim Lipase	27
4.2. Pemurnian Enzim Lipase	31
4.2.1 Fraksinasi dengan Amonium Sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄) dan Dialisis.....	31
4.2.2. Kromatografi Filtrasi Gel	34
4.3. Pemisahan Gliserol	38
4.4. Pemurnian Gliserol	39
4.5. Uji Kualitatif dan Kuantitatif Gliserol	42
V. SIMPULAN DAN SARAN	48
5.1. Simpulan	48
5.2. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva hubungan suhu dengan kerja enzim	11
2. Kurva hubungan pH dengan kerja enzim.....	11
3. Kurva hubungan konsentrasi substrat dan kerja enzim.....	12
4. Reaksi hidrolisis.....	15
5. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat.....	19
6. Diagram alir penelitian.....	25
7. Isolat bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171	28
8. Perubahan warna media inokulum Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 setelah inkubasi selama 24 jam: a). 0 jam dan b). 24 jam.....	29
9. Proses dialisis.....	33
10. Profil hubungan λ_{280} dengan nilai aktivitas unit enzim (U/mL) hasil kromatografi filtrasi gel	35
11. Proses pemisahan gliserol secara hidrolisis enzimatik yang membentuk dua lapisan: a). Gliserol kasar, b). Asam lemak bebas	38
12. Hasil pemurnian gliserol menggunakan asam fosfat (5 %) terbentuk tiga lapisan: a). Asam lemak bebas, b). Gliserol, dan c). Residu fosfat.....	40
13. Hasil pemisahan menggunakan kertas saring diperoleh dua lapisan: a). Asam lemak bebas dan b). Gliserol murni	41
14. Gliserol hasil pemurnian	42

15. Uji Dunstan pada enam sampel berbeda, yaitu: a). Gliserol kasar, b). Gliserol murni, c). Minyak sawit komersial, d). Asam lemak bebas, e) Sisa minyak, dan f). Enzim lipase	44
16. Kurva standar <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA).....	57
17. Kurva standar asam oleat	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik ekstrak kasar enzim lipase.....	30
2. Karakteristik enzim lipase hasil pemurnian secara fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis	32
3. Karakteristik enzim lipase hasil pemurnian secara kromatografi filtrasi gel. 36	
4. Pemurnian enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171	27
5. Hasil penentuan pH.....	44
6. Perolehan angka asam.....	47
7. Hubungan konsentrasi absorbansi <i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	57
8. Hubungan konsentrasi absorbansi asam oleat.....	58
9. Hubungan antara aktivitas enzim lipase dengan ekstrak kasar enzim lipase dari <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171	59
10. Absorbansi ekstrak kasar enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 pada $\lambda 750\text{nm}$	59
11. Absorbansi ekstrak kasar enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 pada $\lambda 746\text{nm}$ minyak sawit komersial.....	60
12. Absorbansi ekstrak kasar enzim lipase dari bakteri <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171 pada $\lambda 746\text{nm}$ minyak zaitun	60
13. Hubungan antara tingkat fraksi hasil dialisis dengan aktivitas enzim lipase dari <i>Pseudomonas</i> sp. LPG171	64
14. Hasil pengukuran absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 750\text{ nm}$	64

15. Absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 746$ nm minyak sawit komersial..... 65
16. Absorbansi enzim lipase pada tahap dialisis pada $\lambda 746$ nm minyak zaitun .. 65
17. Nilai $\lambda 280$ enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel..... 69
18. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas hidrolisis enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel 70
19. Hasil fraksi gabungan kromatografi filtrasi gel pada $\lambda 750$ nm..... 70
20. Hasil fraksi gabungan kromatografi filtrasi gel pada nilai aktivitas hidrolisis enzim lipase 70

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Industri di Indonesia, baik industri pangan maupun industri non pangan sering kali menggunakan enzim sebagai biokatalisator untuk mempercepat reaksi kimia.

Semua organisme hidup memiliki enzim. Salah satu daya tarik aktivitas biologis enzim adalah bagaimana cepatnya mereka bekerja dan menggunakan energi yang sangat sedikit untuk mengkatalisis reaksi tertentu. Semua tahap metabolisme dan reaksi biokimia membutuhkan enzim. Beberapa enzim unik karena mereka dapat berfungsi sebagai katalis untuk berbagai proses biokimia (Ali *et al.*, 2023). Enzim juga dapat membantu mengurangi biaya produksi dan konsumsi sumber daya alam seperti air, listrik, dan bahan bakar. Selain itu, enzim dapat digunakan untuk membuat proses alternatif yang lebih ramah lingkungan daripada metode kimia.

Enzim lipase adalah salah satu enzim industri yang sangat penting karena dapat mengkatalisis berbagai reaksi seperti hidrolisis lemak dan transesterifikasi. Namun, karena alasan ekonomi, penggunaan lipase dalam skala komersial masih terbatas. Banyak industri pangan dan non-pangan telah memanfaatkan kerja enzim lipase sebagai biokatalisator karena penggunaan enzim lipase di bidang bioteknologi semakin meningkat (Agung, 2020). Enzim lipase adalah pemecah lemak yang dikenal sebagai gliserol ester hidrolase atau triasilgliserol asil hidrolase, dan termasuk dalam kelas enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis. Lipase memiliki kemampuan untuk menghidrolisis berbagai jenis lemak dan minyak dalam waktu yang relatif cepat. Selain kemampuan lipase dalam menghidrolisis lemak, lipase juga dapat mengkatalisis sintesis dan metabolisme

ester pada substrat dengan konsentrasi air rendah. Enzim lipase ialah protein yang larut dalam air yang memiliki kemampuan untuk mengkatalisis reaksi dalam media berair dan organik (Fatimah, 2021).

Lipase dapat dihasilkan dari tanaman, hewan serta mikroba. Sumber utama lipase yang saat ini digunakan adalah mikroorganisme. Kemampuan mikroorganisme untuk menghasilkan lipase berbeda-beda tergantung pada jenis lipase yang dimiliki, kondisi lingkungan, dan media yang digunakan selama proses produksi enzim (Nabilasani dkk., 2019). Lipase merupakan subkelas esterase yang bertanggung jawab atas pencernaan, transportasi, dan pemrosesan lipid sebagian besar organisme hidup. Lipase bersifat serbaguna dan memungkinkan berbagai reaksi biokonversi pada organisme uniseluler dan multiseluler, termasuk hidrolisis, alkoholisis, asidolisis, aminolisis, esterifikasi, dan interesterifikasi. Biokonversi triasilgliserol (TAG) antara organisme dan di dalam organisme sangat bergantung pada lipase (Ali *et al.*, 2023).

Mikroba seperti *Pseudomonas*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Moraxella*, *Arcaligenes*, *Candida*, dan lainnya dapat menghasilkan enzim lipase (Pratiwi dkk., 2013). Bakteri lipolitik dapat menghasilkan enzim lipase; bakteri lipolitik memiliki kemampuan untuk memecahkan atau menghidrolisis lemak, fosfolipid, dan turunannya. *Pseudomonas* sp. LPG171 adalah bakteri lipolitik yang banyak ditemukan di tanah, air, tanaman, dan hewan. Bakteri ini sering ditemukan pada flora usus dan kulit manusia. Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 telah berhasil diproduksi dan dimurnikan dari enzim lipase, yang dapat diisolasi dari tanah tercemar. Aktivitasnya optimal pada pH 7, suhu 40 °C, dan waktu inkubasi selama 18 jam (Pretti, 2022). Penelitian sebelumnya juga telah melakukan penentuan konsentrasi optimum methanol sebesar 75 % (Astuti, 2022). Untuk menghasilkan enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171.

Bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 adalah kokus atau basil Gram-negatif. Koloni mikroskopis biasanya membentuk rantai pendek. Bakteri *Pseudomonas* sp. bersifat invasif, ganas, dan menyebabkan infeksi pada pasien dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Bakteri dari genus ini menghasilkan beberapa enzim

seperti protease, amilase, dan lipase. Genus *Pseudomonas* sp. juga dapat memecah protein, karbohidrat, dan senyawa organik lainnya menjadi CO₂, gas amonia, dan senyawa sederhana lainnya. *Pseudomonas* sp. lebih menyukai lingkungan dengan suhu 15-30 °C. Kelompok bakteri *Pseudomonas* sp. bersifat *aerobic*, dan mempunyai flagela tunggal atau hanya 2-3 flagela, beberapa di antaranya menghasilkan pigmen yang larut dalam air (Suyono dan Salahudin, 2011). Enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 digunakan dalam aktivitas hidrolisis yang dapat menghasilkan asam lemak dan gliserol.

Gliserol merupakan suatu trihidroksi alkohol yang terdiri atas tiga atom karbon. Jadi tiap karbon mempunyai gugus –OH. Gliserol memiliki formula kimia C₃H₈O₃, dan itu tidak berwarna, kental, tidak berbau, dan memiliki rasa manis. Sebagian besar, senyawa ini ditemukan dalam hampir semua minyak nabati dan lemak hewani sebagai ester gliserin dari asam palmitat dan oleat. Gliserol dapat digunakan untuk gliserolisis lemak atau metil ester untuk membentuk gliserolat monogliserida, digliserida dan trigliserida. Gliserol sangat bernilai ekonomis dan penggunaannya sangat luas (Nadir dan Marlinda, 2013). Gliserol adalah bahan penting dalam industri kimia untuk berbagai tujuan, seperti menambah cita rasa makanan, pelarut obat, multivitamin, sabun kecantikan, bedak cair, pembersih mata, poliester, alkil resin, pelumas, anti beku, bahan untuk proses pengolahan karet, dan bahan untuk larutan pembersih. Gliserol digunakan baik dalam bentuk gliserin maupun gliserida. Gliserol, yang diproduksi secara komersial, memiliki kemurnian antara 85 % dan 96 % (Suseno dkk., 2019).

Indonesia masih mempunyai kendala dalam memperoleh sumber daya gliserol. Ketersediaan gliserol di Indonesia terutama berasal dari produksi biodiesel sebagai produk samping sangat sedikit. Mengingat kebutuhan gliserol semakin meningkat di Indonesia. Gliserol mentah yang dihasilkan dari produk hayati ini harus dimurnikan lebih lanjut untuk mencapai kualitas yang lebih tinggi. Gliserol dengan kemurnian lebih rendah umumnya disebut gliserol mentah (Aziz dkk., 2008). Gliserol memiliki banyak aplikasi di berbagai bidang industri, seperti makanan, kosmetik, obat-obatan dan industri polimer. Dalam industri makanan, gliserol ditambahkan ke dalam makanan untuk meningkatkan retensi air dan

bertindak sebagai pelarut dalam berbagai bahan tambahan makanan. Gliserol digunakan sebagai antiinflamasi dan antiseptik dalam industri kosmetik. Dalam formulasi farmasi, gliserol dengan kemurnian tinggi ditambahkan sebagai pelumas dan pelembab. Gliserol juga berguna dalam pembuatan sirup, krim dan sirup. Kesederhanaan gliserol terutama disebabkan oleh sifat fisik dan sifat kimianya. Karena struktur polihidroksil gliserol, berbagai senyawa penting dapat diproduksi dengan beberapa metode katalitik seperti asam laktat, asam akrilat, dihidroksiaseton, gliserol karbonat dan 1,3-propanadiol (Azelee *et al.*, 2020).

Mengingat banyaknya pemanfaatan gliserol di berbagai industri, maka pada penelitian ini dilakukan pemisahan gliserol dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatis menggunakan lipase hasil isolate bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dan pemurnian gliserol menggunakan uji kualitatif menggunakan uji Dunstan dan uji fisikokimia berupa pengukuran pH, digunakan minyak kelapa sawit sebagai substrat karena minyak kelapa sawit adalah substrat yang ideal untuk reaksi hidrolisis, terdiri dari campuran asam lemak jenuh dan tak jenuh. Enzim lipase memecahkan trigliserida dari minyak sawit menjadi asam lemak bebas dan gliserol. Minyak kelapa sawit memiliki biaya yang sangat hemat dan dapat digunakan dalam berbagai industri (Kareem *et al.*, 2017). Minyak kelapa sawit juga dipilih karena lebih mudah ditemukan dibandingkan substrat lain. Penggunaan enzim lipase dalam pemisahan gliserol merupakan metode yang ramah lingkungan dibandingkan dengan proses kimia yang membutuhkan bahan berbahaya, energi yang lebih besar, dan biaya yang relatif tinggi.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mendapatkan enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 pada kondisi optimum.
2. Melakukan pemurnian enzim lipase secara fraksinasi menggunakan amonium sulfat dan dialisis, serta kromatografi filtrasi gel.

3. Memisahkan gliserol dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatis menggunakan lipase hasil isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171.
4. Melakukan uji kualitatif dan kuantitatif gliserol hasil reaksi hidrolisis enzimatis.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dalam menghasilkan enzim lipase, mendukung ketersediaan lipase yang dapat dihasilkan dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171, dan meningkatkan ketersediaan gliserol yang dihasilkan dari minyak kelapa sawit secara hidrolisis enzimatis.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri

Bakteri berasal dari bahasa Latin (*bacteria*) adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Organisme ini sangat kecil dan hanya dapat dilihat melalui mikroskop karena termasuk dalam domain prokariota. (Hadi dan Alamudi, 2019). Bakteri merupakan mikroorganisme bersel tunggal yang biasanya berukuran 1-2 μm dan dapat ditemukan secara individual atau dalam kelompok sel yang membentuk koloni. Karena ukurannya yang kecil, bakteri tidak dapat dilihat tanpa mikroskop (Jahira dan Sopialena, 2021). Bakteri tersebar luas di seluruh dunia dan mampu bertahan hidup di lingkungan ekstrem seperti air yang sangat asam, sumber air panas, dan di bawah lapisan es. Beberapa bakteri bersifat parasit dan dapat menyebabkan penyakit pada manusia serta hewan, sementara yang lain berperan dalam metabolisme dan proses pencernaan. Bakteri memiliki berbagai bentuk, seperti bulat, batang, spiral, dan berserabut. Sel bakteri dilindungi oleh dinding sel yang kuat dan berisi organel yang mendukung metabolisme serta sintesis sel. Beberapa bakteri juga dilengkapi dengan flagela, struktur mirip ekor yang membantu pergerakan mereka (Effendi, 2020).

2.1.1. Klasifikasi Bakteri

Secara umum, bakteri dikelompokkan berdasarkan ukuran, bentuk, dan susunannya. Untuk mengukur bakteri, digunakan satuan mikron (mikrometer) yang disimbolkan dengan " μ ". Satu mikro (μm) setara dengan 1000 mm. Ukuran

rata-rata bakteri berkisar antara 0,2 hingga 1,5 μm dalam diameter dan panjangnya 3-5 μm . Karena ukurannya yang sangat kecil, bakteri tidak bisa dilihat dengan mata telanjang, karena batas penglihatan mata manusia hanya sekitar 200 μm . Oleh sebab itu, diperlukan mikroskop untuk mengamati bakteri (Koentjoro dkk., 2020). Metode pewarnaan bakteri dibagi menjadi dua kategori, yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif, berdasarkan respons bakteri terhadap zat pewarna. Respons ini ditentukan oleh komposisi dinding sel bakteri. Oleh karena itu, pewarnaan Gram tidak bisa diterapkan pada mikroorganisme yang tidak memiliki dinding sel, seperti *Mycoplasma* sp.

a. Bakteri Gram Positif

Bakteri gram positif adalah bakteri yang dinding selnya merupakan lapisan peptidoglikan yang terlihat tebal. Bakteri ini berwarna ungu jika diwarnai dengan pewarnaan Gram. Contoh yang termasuk bakteri gram positif adalah *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Vibrio cholerae*, dan *Bacillus subtilis*.

b. Bakteri Gram Negatif

Bakteri gram negatif adalah bakteri dengan lapisan peptidoglikan yang tipis. Bakteri ini berwarna merah muda bila diwarnai dengan pewarna gram. Contohnya termasuk *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Fikri, 2022).

2.2. Bakteri *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas sp. merupakan kelompok bakteri gram negatif yang bersifat destruktif hidrokarbon karena mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon. Morfologi spesies *Pseudomonas* sp. biasanya berbentuk lonjong, seperti batang, berukuran 0,5 hingga 1,0 μm , berwarna neon, dan bersifat aerobik, artinya hanya dapat hidup pada kondisi lingkungan yang kaya akan oksigen. *Pseudomonas* sp. merupakan bakteri yang tidak dapat membentuk spora, mempunyai uji oksidase positif, dan mempunyai satu atau lebih flagela yang berfungsi sebagai alat gerak

atau penggerak (Listyawati, 2016). *Pseudomonas* sp. mempunyai ciri-ciri seperti koloni berwarna putih, merupakan bakteri Gram negatif, basil atau kokus, aerob obligat, flagela motil, dan polar. Bakteri ini bersifat oksidase positif, katalase positif, non-fermentatif, dan tumbuh dengan baik pada suhu 4 °C atau di bawah 43 °C. Bakteri *Pseudomonas* sp. mempunyai batas-batas pH tertentu untuk pertumbuhannya (Fajarfika dkk., 2022).

Bakteri dari genus ini menghasilkan beberapa enzim seperti protease, amilase, dan lipase. Selain itu *Pseudomonas* sp. juga dapat memecah protein, karbohidrat, dan senyawa organik lainnya menjadi CO₂, gas amonia, dan senyawa sederhana lainnya. Bakteri *Pseudomonas* sp. lebih suka hidup di lingkungan dengan suhu antara 15 dan 30 °C. Bakteri *Pseudomonas* sp. memiliki batasan pH tertentu untuk pertumbuhannya. Bakteri *Pseudomonas* sp. pH 5,3–9,7 umumnya tumbuh dengan baik pada pH 5,5–9,0. pH yang rendah merupakan kondisi optimal bagi berkembangnya beberapa jenis bakteri patogen, antara lain: Bakteri *Pseudomonas* sp. dan perubahan pH yang besar dapat menyebabkan stres pada ikan (Rahmadian dkk., 2018). Bakteri *Pseudomonas* bersifat invasif dan beracun, menyebabkan infeksi pada pasien dengan sistem kekebalan yang lemah (Suyono dan Salahudin, 2011).

Lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* sp. memegang peranan yang sangat penting dalam bidang bioteknologi. Enzim yang dihasilkan dari genus ini merupakan katalis yang sangat baik untuk reaksi sintesis konversi organik. Produksi enzim lipase akan meningkat jika ada induser yang sesuai dalam mediumnya (Pratiwi dkk., 2013). Adapun klasifikasi dari bakteri *Pseudomonas* sp. adalah sebagai berikut

Kingdom: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Kelas: *Gamma Proteobacteria*

Ordo: *Pseudomonadales*

Famili: *Pseudomonadaceae*

Genus: *Pseudomonas*

Spesies: *Pseudomonas aeruginosa*

2.3. Enzim Lipase

Lipase merupakan enzim yang termasuk dalam kelas hidrolase (EC 3.1.1.3; triasilgliserol asil hidrolase) dan berfungsi untuk menghidrolisis ikatan ester secara alami pada triasilgliserida, menghasilkan diasilgliserol (DG), monoasilgliserol (MG), dan asam lemak bebas (FFA) (Sampaio *et al.*, 2022). Lipase adalah enzim golongan hidrolase (enzim yang sering digunakan sebagai katalis biokimia menggunakan udara sebagai pemecah molekul kimia) biasanya bekerja untuk menghidrolisis lemak, mono-, di-, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Lipase mempunyai situs aktif, lipase disebut juga serin hidrolase, bekerja pada urutan G-X1-S-X2-G, dimana G-glisin, S-serin, X1-histidin dan X2-glutamat atau asam aspartat (Masithah, 2023). Lipase memiliki situs aktif yang dibentuk oleh triad katalitik yang biasanya terdiri dari histidin, serin, asam aspartat atau glutamat, terlebih lagi, mereka kebanyakan dari mereka juga memiliki rantai polipeptida yang menutupi situs aktifnya yang disebut penutup. Mereka juga mampu mengkatalisis sintesis ester melalui berbagai strategi *in vitro*, seperti esterifikasi, transesterifikasi, reaksi interesterifikasi atau asidolisis (Sampaio *et al.*, 2022).

Selain kemampuan untuk menghidrolisis, enzim lipase juga dapat mengkatalisis reaksi interesterifikasi. Reaksi interesterifikasi bertanggung jawab atas pembentukan lipid terstruktur. Enzim lipase banyak digunakan sebagai biokatalis di berbagai industri seperti agrokimia, farmasi, deterjen, penyamakan, makanan, dan industri yang menghasilkan surfaktan. Karena sifat katalitiknya yang luas, enzim lipase dapat mengkatalisis reaksi yang berbeda, baik yang larut maupun tidak larut dalam air. Enzim lipase menghidrolisis lemak susu pada industri pangan menjadi lemak bebas dengan rasa keju. Industri deterjen juga menggunakan enzim sebagai bahan tambahan karena mereka memiliki kemampuan untuk menghidrolisis lipid. Diketahui bahwa enzim lipase memiliki kemampuan untuk mengaktivasi faktor nekrosis tumor, yang merupakan alasan mengapa enzim tersebut dapat digunakan dalam pengobatan tumor. Enzim lipase

di laboratorium digunakan secara bath. Lipase hanya dapat dilakukan satu kali siklus reaksi (Fatimah, 2021).

2.3.1. Sumber Enzim Lipase

Enzim lipase dikelompokkan berdasarkan sumbernya yaitu enzim lipase pada mamalia, enzim lipase dari tanaman, dan ezim lipase dari mikroorganisme. Namun, lipase yang digunakan dalam industri sebagian besar berasal dari mikroorganisme. Lebih dari 50 % lipase diperoleh dari fungi, dan sekitar 30 % dari bakteri. Hingga saat ini, lipase yang dikomersialkan adalah lipase ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Hal ini dikarenakan produksi enzim dengan menggunakan mikroorganisme memerlukan budidaya mikroorganisme yang cepat dalam ruang yang kecil untuk menghasilkan enzim dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat, serta kontrol dan prediksi yang mudah terhadap kandungan enzim yang dihasilkan, komposisi medium, dan sebagainya (Layly dan Wiguna, 2016). Secara umum, enzim yang berasal dari mikroba lebih disukai oleh banyak orang karena potensi penerapannya di berbagai industri. Selain itu, meskipun enzim lipase mikroorganisme umumnya tahan panas, namun tubuh yang memproduksinya tidak. Cara paling sederhana untuk mendeteksi keberadaan mikroorganisme penghasil lipase adalah dengan menggunakan nutrisi agar (Pratiwi dkk., 2013).

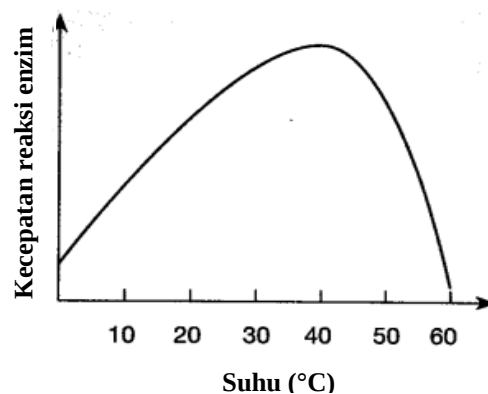
2.3.2. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

Menurut Cartono, (2023) beberapa faktor krusial yang mempengaruhi aktivitas enzim adalah sebagai berikut:

a. Suhu

Suhu dapat mempengaruhi enzim karena sebagian besar enzim adalah protein, suhu mempengaruhi aktivitasnya. Enzim paling aktif pada suhu sekitar 40 °C. Aktivitas enzim meningkat ketika suhu naik sekitar 40 °C hingga 50 °C. Jika

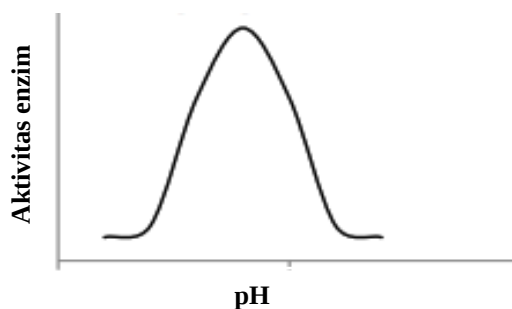
suhunya lebih rendah atau lebih tinggi dari suhu optimum enzim, maka kerja enzim dapat berkurang atau tidak bekerja sama sekali. Ini karena suhu yang terlalu rendah tidak mendorong kerja enzim secara efektif, dan suhu yang terlalu tinggi dapat merusak sisi aktif enzim. Hubungan antara suhu dan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Kurva hubungan suhu dengan kerja enzim

b. PH

Kebanyakan enzim beroperasi pada pH netral, namun beberapa enzim bekerja paling baik pada kondisi asam atau basa. Enzim yang berfungsi paling baik pada pH netral dapat kehilangan aktivitas atau rusak dalam lingkungan asam atau basa. Hubungan antara pH dan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 2.

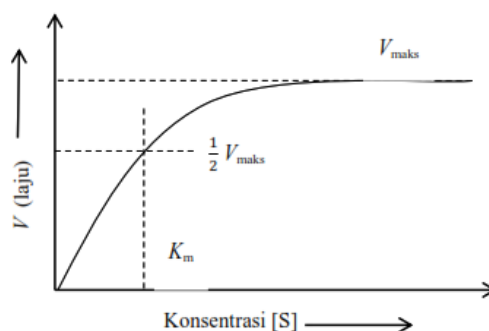


Gambar 2. Kurva hubungan pH dengan kerja enzim

c. Konsentrasi Substrat

Efisiensi enzim dipengaruhi oleh jumlah substrat yang ada. Ketika substrat kekurangan, enzim bekerja lebih lambat. Sebaliknya aktivitas enzim meningkat

seiring bertambahnya substrat. Namun, ketika kecepatan maksimum (V_{maks}) telah tiba, meningkatkan konsentrasi substrat dalam jumlah tertentu tidak akan dapat meningkatkan kecepatan reaksi enzim; sebaliknya, itu dapat menurunkan aktivitas enzim atau kecepatan reaksi. Hubungan antara konsentrasi substrat dan kerja enzim dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva hubungan konsentrasi substrat dan kerja enzim

2.3.3. Aktivitas Enzim Lipase

Aktivitas lipase diukur dalam satuan unit, di mana satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai kemampuan enzim untuk menghasilkan 1 μmol asam lemak bebas dari hidrolisis substrat oleh 1 mL enzim lipase per menit. Untuk menentukan kondisi optimum aktivitas enzim, perlu dilakukan pengukuran aktivitas lipase pada berbagai suhu dan pH, sehingga diketahui performa enzim pada setiap rentang suhu dan pH yang diuji. Uji aktivitas lipase dapat dilakukan dengan metode potensiometri, yang melibatkan pembuatan substrat dalam bentuk emulsi, penambahan enzim lipase yang belum teridentifikasi aktivitasnya, dan inkubasi pada suhu serta pH optimum. Selama inkubasi, proses reaksi melepaskan asam lemak, yang kemudian dihitung berdasarkan jumlah mol NaOH yang diperlukan selama titrasi. Aktivitas lipase dapat dihitung menggunakan persamaan berikut (Adio *et al.*, 2015).

$$\text{Aktivitas Unit (U/ml)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 1.000}{V_e \times t} \quad (1)$$

Keterangan:

- V_1 = Volume NaOH sampel (mL)
 V_2 = Volume NaOH blanko (mL)
 V_e = Volume enzim (mL)
 N = Normalitas NaOH (0,01-0,05 N)
 1.000 = Konversi dari mmol ke μ mol
 t = Waktu inkubasi

Aktivitas spesifik enzim adalah jumlah unit enzim per miligram protein. Ini diukur dalam satuan U/mg. Karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air, substrat harus diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air untuk memaksimalkan aktivitas lipase. Minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein adalah bahan yang sering digunakan dalam penelitian (Azizah, 2018). Karena lipase hanya bekerja pada fasa antara minyak dan air, substrat harus diubah terlebih dahulu menjadi emulsi minyak-air untuk memaksimalkan aktivitas lipase. Minyak zaitun, lemak susu, atau senyawa murni seperti tributirin dan triolein adalah bahan yang sering digunakan dalam penelitian. Adanya garam juga berdampak besar pada aktivitas lipase (Kurnia, 2010).

$$\text{Aktifitas spesifik} = \frac{\text{Aktivitas enzim (U/mL)}}{\text{Kadar protein (Mg/mL)}} \quad (2)$$

2.4. Gliserol

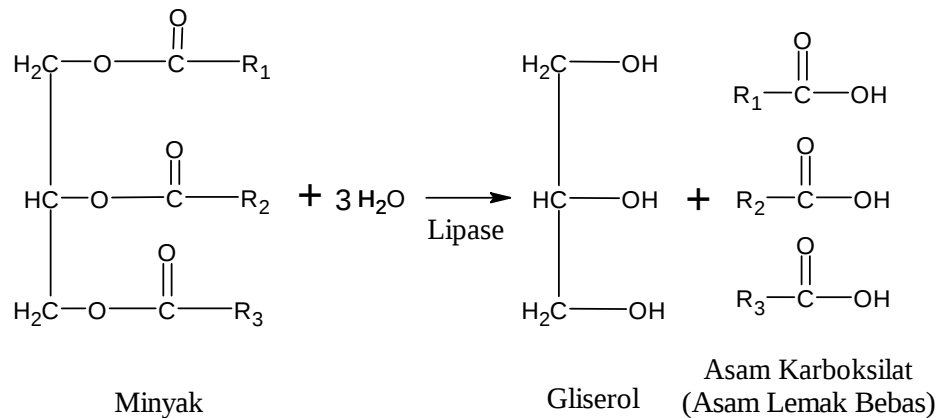
Gliserol adalah sumber daya terbarukan dan biokompatibel, salah satu dari sepuluh bahan kimia tambahan bernilai terbaik yang berasal dari biomassa. Bisa digunakan dalam industri untuk membuat produk berbasis bio, seperti asam akrilat. Namun, gliserol mentah mengandung pengotor, yang, ketika dimurnikan, menyebabkan biaya tinggi dan masalah lingkungan (Wikaputri *et al.*, 2024). Gliserol dikenal sebagai gliserin, adalah gula alkohol yang viskos, tidak berwarna, tidak berbau, memiliki rasa manis, dan tidak beracun. Tiga gugus alkoholnya sangat mudah larut dalam air dan banyak digunakan dalam berbagai formulasi.

Dalam reaksi transesterifikasi minyak, minyak bereaksi dengan alkohol untuk menghasilkan gliserol dan methyl ester (Qadariyah dkk., 2010). Karena gliserol kasar (*crude*) tidak dapat digunakan langsung oleh industri, melumpuhkan produksinya akan menurunkan harga gliserol di pasaran. Dengan jumlah gliserol yang cukup besar, ada peluang untuk pengembangan metode pengolahan gliserol yang lebih besar. Oleh karena itu, diperlukan tindakan lebih lanjut untuk mendapatkan kembali gliserol. Industri makanan, kosmetik, dan obat-obatan menggunakan banyak gliserol. Selain itu, gliserol dapat diubah menjadi bahan bakar seperti hidrogen atau methanol, atau produk kimia lain yang dapat meningkatkan nilai ekonomi gliserol, seperti akrolin, propana, dan asam laktat, karena gliserol didegradasi (Kalla *et al.*, 2016).

2.5. Reaksi Hidrolisis

Tujuan dari proses hidrolisis ini adalah untuk mencari waktu optimal dan meningkatkan konsentrasi enzim (% lipase) yang optimal untuk diterapkan pada proses esterifikasi. Proses hidrolisis berlangsung pada suhu 40 °C. Pada akhir proses hidrolisis terbentuk dua lapisan, lapisan atas terdiri dari asam lemak dan lapisan bawah terdiri dari gliserin. Salah satu parameter yang menunjukkan derajat konversi trigliserida menjadi asam lemak adalah bilangan asam produk hidrolisis. Bilangan asam menunjukkan berapa mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan 1 g minyak (Moentamaria *et al.*, 2016).

Sebagian besar reaksi hidrolisis minyak menggunakan katalis homogen seperti KOH, NaOH, dll. Katalis homogen berada dalam fase yang sama dengan reaktan. Hal ini memudahkan molekul katalis dan reaktan untuk berinteraksi sehingga memungkinkan reaksi terjadi lebih mudah. Namun, memisahkan katalis dari produk lebih sulit dibandingkan dengan katalis heterogen. Industri makanan, farmasi, dan bioteknologi sangat membutuhkan proses ini untuk menghasilkan bahan seperti asam lemak yang berfungsi sebagai antimikroba dan antioksidan. (Utami, 2023). Reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi hidrolisis

2.6. Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit adalah salah satu sumber reaksi hidrolisis yang melimpah dan banyak digunakan dalam industri, terutama di negara-negara penghasil minyak sawit seperti Indonesia. Minyak kelapa sawit adalah substrat yang ideal untuk reaksi hidrolisis karena terdiri dari campuran asam lemak jenuh dan tak jenuh. Enzim lipase memecahkan trigliserida dari minyak sawit menjadi asam lemak bebas dan gliserol (Kareem *et al.*, 2017). Minyak kelapa sawit merupakan minyak nabati yang dihasilkan dari tanaman kelapa sawit, adalah bahan baku yang sangat dicari karena banyak digunakan di berbagai industri. Minyak kelapa sawit tidak hanya murah karena mudah didapat, tetapi juga memiliki komposisi asam lemak yang stabil, seperti asam oleat dan asam palmitat, yang memudahkan hidrolisis untuk menghasilkan gliserol dan asam lemak bebas dalam jumlah besar (Pratomo dan Saputra, 2022).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 sampai Juni 2025 di Laboratorium Biokimia dan Laboratorium Anorganik-Fisik Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, Bandar Lampung. Peremajaan bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dilakukan menggunakan koleksi stok isolat dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

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

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 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, asam fosfat (H_3PO_4), etanol, pereaksi C *Lowry*, pereaksi D *Lowry*, n-heksana, NaOH, akuades, boraks, indikator *fenolftalein* (PP), indikator universal, KOH, etanol 95 %, kapas, tisu, kain kasa, alumunium foil, pendingin (air es), dan plastik wrap.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Tahap Persiapan

a. Persiapan Alat

Peralatan gelas yang digunakan dicuci bersih terlebih dahulu lalu dikeringkan. Sebelum disterilisasi, alat yang sudah bersih dibungkus menggunakan kertas. Kemudian sterilisasi alat yang sudah dibungkus dengan kertas ke dalam *autoclave* bertekanan 1 atm dengan suhu 121 °C selama 15 menit. Kemudian keringkan alat gelas yang telah disterilisasi kedalam oven selama ± 2 jam.

b. Pembuatan Media Selektif

Media *Nutrient Agar* (NA) yang mengandung pepton, natrium klorida, dan ekstrak daging sapi dilarutkan dengan 3 g NA dalam 100 mL akuades, kemudian ditambahkan 1 mL minyak zaitun dan 1 tetes *tween* 80, lalu dipanaskan. Setelah media dipanaskan dengan plat panas, kemudian pada sterilisasi media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada tekanan 1 atm dan suhu 121 °C. Media kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara aseptis. Setelah itu, sumbat yang telah dibuat sebelumnya digunakan untuk menutup mulut tabung reaksi. Tabung diposisikan dengan kemiringan 5°. Selama 1 hari (24 jam), kemudian diamkan media di dalamnya hingga siap digunakan (Pretti, 2022). Selanjutnya Media ini digunakan untuk meremajakan isolate bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 koleksi dari Laboratorium Biokimia.

c. Pembuatan Media Produksi

Media ini digunakan untuk memulai proses dan produksi enzim lipase. Dilakukan dengan melarutkan 13 g Media *Nutrient Broth* (NB) dalam 1000 mL 5 g buffer fosfat 0,05 M. Kemudian ditambahkan 26 mL minyak zaitun dan 20 tetes *tween* 80, lalu dipanaskan. Setelah media dipanaskan dengan plat panas, sterilkan media menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm. Selanjutnya, media ini akan digunakan untuk media produksi enzim lipase (Nurlinda, 2024).

3.3.2. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 diambil 1 ose, lalu digores ke media peremajaan miring dalam tabung reaksi secara aseptik, kemudian ditumbuhkan pada pH 7 dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C dalam incubator dan setelah itu disimpan dalam lemari pendingin sebagai isolat stok serta secara berkala diremajakan setiap 1 bulan sekali (Pretti, 2022).

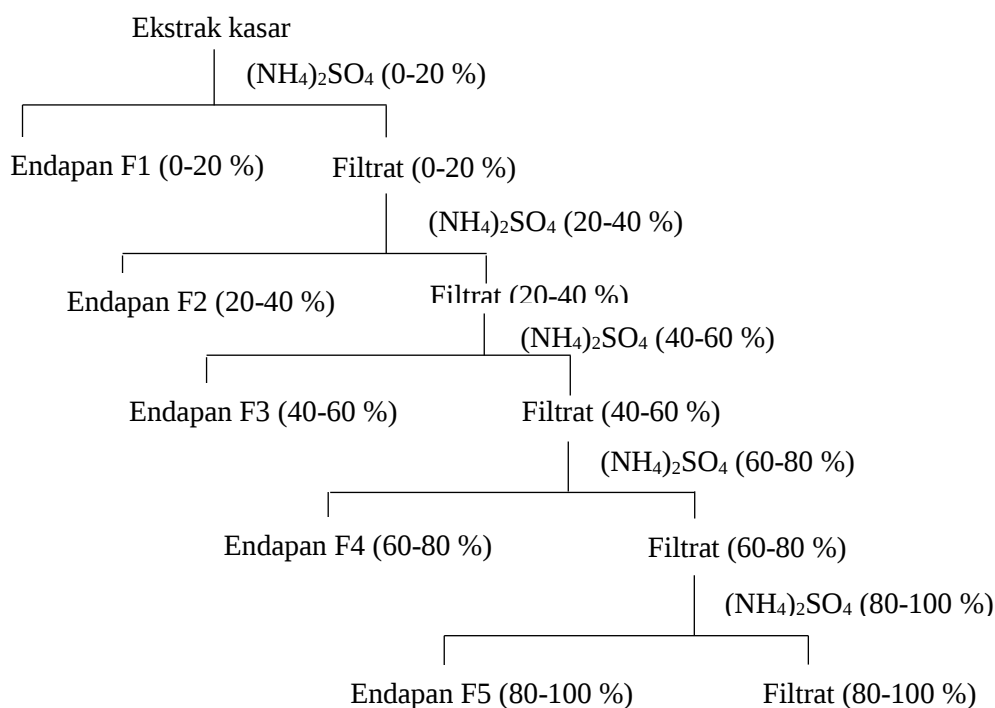
3.3.3. Produksi Enzim Lipase

Setelah bakteri diremajakan, 2 ose dari media peremajaan dimasukkan ke dalam 200 mL *starter* (media inokulum). Kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 110 rpm dilakukan selama 24 jam. Setelah itu, bakteri dipindahkan ke dalam media produksi sebanyak 10% dari volume media produksi bakteri pada media *starter* dimasukkan ke dalam 1000 mL media produksi dan diinkubasi kembali selama 72 jam. Setelah waktu inkubasi selesai, media produksi diisolasi dengan cara disentrifugasi selama 15 menit untuk memisahkan fitrat dan endapannya. Dimana filtrat tersebut merupakan ekstrak kasar enzim lipase, sedangkan endapannya merupakan sisa-sisa bakteri yang tertinggal. Setelah ekstrak kasar enzim digunakan, kadar protein diukur dan aktivitas enzim lipase diuji (Pretti, 2022).

3.3.4. Pemurnian Enzim Lipase

a. Fraksinasi dengan amonium sulfat dan dialisis

Secara perlahan, ekstrak kasar enzim dan garam amonium sulfat ditambahkan dengan *magnetic stirrer*. Sentrifugasi dingin digunakan selama 20 menit pada kecepatan 5000 rpm untuk memisahkan endapan protein enzim dari filtratnya dari tiap fraksi kejenuhan amonium sulfat. Selanjutnya, endapan yang diperoleh dilarutkan dengan buffer fosfat 0,01 M dengan pH 7 dan kadar protein diukur dan diuji aktivitasnya untuk memastikan bahwa enzim lipase yang sangat aktif terdapat pada fraksi mana saja. Skema fraksinasi enzim menggunakan ammonium sulfat dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema fraksinasi menggunakan amonium sulfat

Berdasarkan skema fraksinasi pada Gambar 5, penelitian ini hanya melakukan pada satu tingkat kejenuhan yaitu (20-90 %). Hal ini disebabkan karena pada penelitian yang dilakukan oleh Pretti (2022) sebelumnya telah mengeksplorasi pola fraksinasi dengan menambahkan garam amonium sulfat pada ekstrak kasar

enzim lipase pada beberapa tingkat kejenuhan, yaitu (0-20 %); (20-40 %); (40-60 %); (60-80 %); dan (80-100 %) dan yang dilakukan oleh Nurlinda (2024) sebelumnya telah mengeksplorasi pola fraksinasi (0-20 %) dan (20-90 %). Selanjutnya, endapan protein yang memiliki aktivitas tertinggi dari fraksinasi menggunakan amonium sulfat dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 selama $\pm$ 24 jam pada suhu dingin. Selama dialisis dilakukan pergantian larutan buffer setiap 4-6 jam sekali agar konsentrasi ion-ion di dalam kantong dialisis dapat dikurangi. Proses ini dilakukan secara *continue* sampai ion-ion di dalam kantong dialisis dapat diabaikan (Pretti, 2022).

b. Kromatografi Fitrase Gel

Kalibrasi kolom (*sephadex* G-75) dilakukan dengan mencuci buffer fosfat 0,05 M dengan pH 7 dan eluen sebanyak dua kali volume tabung kolom. Matriks *sephadex* G-75 sebanyak 5 g dilarutkan dalam akuades, dan kemudian distirrer selama 2 jam. Setelah dilakukan selama beberapa menit, terbentuk dua fase: akuades dan gel. Fase akuades dikeluarkan sampai hanya fase gel yang tersisa. Buffer fosfat 0,05 M dengan pH 7 ditambahkan sebanyak dua kali volume fase gel. Kemudian, fase gel dibiarkan mengembang selama semalam di dalam kulkas, dan buffer fosfat dengan pH 7 digunakan untuk membersihkan matriks (Utami, 2023).

Enzim yang dihasilkan dari dialisis diambil dalam jumlah 5 mL dan dimasukkan ke dalam kolom yang berisi matriks *sephadex* G-75 yang telah diaktivasi dengan buffer fosfat 0,05 M pada pH 7 sebelum dielusi dengan buffer fosfat 0,05 M pada pH 7. Mengukur laju alir (menit/mL) pada masing-masing sampel, sampel ditampung sebanyak 2 mL pada setiap tabung. Menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ 280 nm, kadar protein masing-masing fraksi diukur dan aktivitas enzim dinilai (Rusman, 2017).

3.3.5. Penentuan Kadar Protein

Berdasarkan Metode *Lowry* ((Lowry *et al.*, 1951); dan penelitian (Nurlinda, 2024) 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 cioceltea diencerkan dengan akuades (1:1).
- Larutan Standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) sebagai konsentrasi.

Metode *Lowry* digunakan untuk menghitung kadar protein. Untuk 0,1 mL sampel protein, 0,9 mL akuades ditambahkan, direaksikan dengan 5 mL pereaksi C dan campuran dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit. Kemudian, 0,5 mL pereaksi D ditambahkan dengan cepat, dan campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Untuk mengontrol digunakan sampel 0,1 mL enzim yang diganti dengan 0,1 mL akuades, dan perlakuan yang dikerjakan sama seperti perlakuan untuk sampel. Selanjutnya, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda 750$ nm. Untuk menentukan konsentrasi protein digunakan kurva standar *Bovine Serum Albumin* (BSA).

3.3.6. Penentuan Aktivitas Hidrolisis

Metode *Kwon and Rhee* (1986) modifikasi digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas hidrolisis enzim lipase. Untuk 0,70 mL enzim, 0,35 mL buffer fosfat 0,05 M dengan pH 7 dan 0,70 mL substrat minyak sawit ditambahkan. Setelah itu, campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 40 °C. Setelah proses inkubasi selesai, sebanyak 2 mL minyak diambil dan ditambahkan 0,5 mL HCl 6 N dan 3,25 mL n-heksana. Setelah terbentuk dua fase, 0,5 mL reagen tembaga (II) asetat

ditambahkan, dan divortex selama satu menit dan didiamkan selama 15 menit. Nilai absorbansi dihitung dengan spektrofotometri UV-Vis pada $\lambda 746$ nm. Proses yang sama diterapkan pada kontrol, tetapi tanpa enzim. Selanjutnya, kurva standar dibandingkan dengan absorbansi sampel (Pretti, 2022).

3.3.7. Pemisahan Gliserol

Pemisahan gliserol dapat dilakukan menggunakan proses hidrolisis dengan mencampurkan minyak sawit komersial dengan enzim lipase sebanyak (1:1), dimana masing-masing memiliki volume sebanyak 41,5 mL enzim lipase dan 41,5 mL minyak sawit komersial ke dalam erlenmeyer lalu di *shaker* pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian campuran tersebut dimasukkan kedalam corong pemisah dan dihomogenkan, lalu didiamkan hingga terjadi pemisahan yang sempurna dengan ditandai terbentuknya dua lapisan. Lapisan yang berada di atas menunjukkan gliserol, sedangkan lapisan yang berada di bawah menunjukkan asam lemak bebas (Nenobahan dkk., 2020).

3.3.8. Pemurnian Gliserol

Proses pemurnian gliserol dilakukan dengan memasukkan gliserol kasar sebanyak 40 mL ke dalam gelas beaker 250 mL dan dipanaskan diatas *hot plate* hingga mencapai suhu 20-30 °C sambil diaduk. Selanjutnya, ditambahkan larutan asam fosfat dengan konsentrasi 5 % (v/v) selama 15 menit. Campuran didinginkan dan didiamkan hingga terbentuk tiga lapisan. Setelah itu, lapisan berbentuk garam dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Kemudian hasil penyaringan tersebut didiamkan sampai membentuk dua lapisan dan dipindahkan kembali untuk mendapatkan gliserol murninya, di mana lapisan bawah merupakan gliserol yang akan diambil dan disimpan, sedangkan lapisan atas merupakan asam lemak bebas (Hazra dan Septiawan, 2014).

3.3.9. Uji Kualitatif Gliserol

Pada uji kualitatif gliserol dilakukan beberapa uji yang dapat membuktikan bahwa sampel hasil penelitian yang diperoleh adalah benar gliserol. Uji-uji tersebut, antara lain: uji Dunstan dan uji fisikokimia berupa penentuan pH.

a. Uji Dunstan

Identifikasi gliserol dilakukan menggunakan uji Dunstan, yaitu dengan mencampurkan 1 mL larutan boraks dan 1 mL indikator *fenolftalein* (PP) pada 6 tabung reaksi yang berbeda hingga larutan berubah warna menjadi merah jambu. Kemudian ditambahkan 1 mL sampel (gliserol murni, gliserol kasar, minyak sawit komersial, enzim lipase, asam lemak bebas, dan sisa asam lemak dari proses pemurnian gliserol) pada masing-masing tabung reaksi yang berbeda. Jika warna merah muda berubah menjadi putih setelah ditambahkan sampel, hal itu menandakan adanya gliserol. Perubahan warna ini hanya terlihat pada sampel yang mengandung gliserol, sedangkan sampel lainnya tidak menunjukkan perubahan warna (Saputri, 2021).

b. Penentuan pH

Penentuan pH menggunakan indikator universal juga dilakukan untuk mengetahui sifat asam atau basa dari setiap sampel. Indikator universal ditetesi dengan masing-masing sampel. Kemudian, warna yang terbentuk dicocokkan dengan skala warna standar untuk menentukan nilai pH yang tertera pada kotak indikator universal (Hazra dan Septiawan, 2014). Menurut Rahmi (2006), kondisi pH yang paling optimal pada proses pemurnian gliserol adalah pH 3, yang diketahui memberikan hasil pemurnian yang terbaik.

c. Penentuan bilangan asam

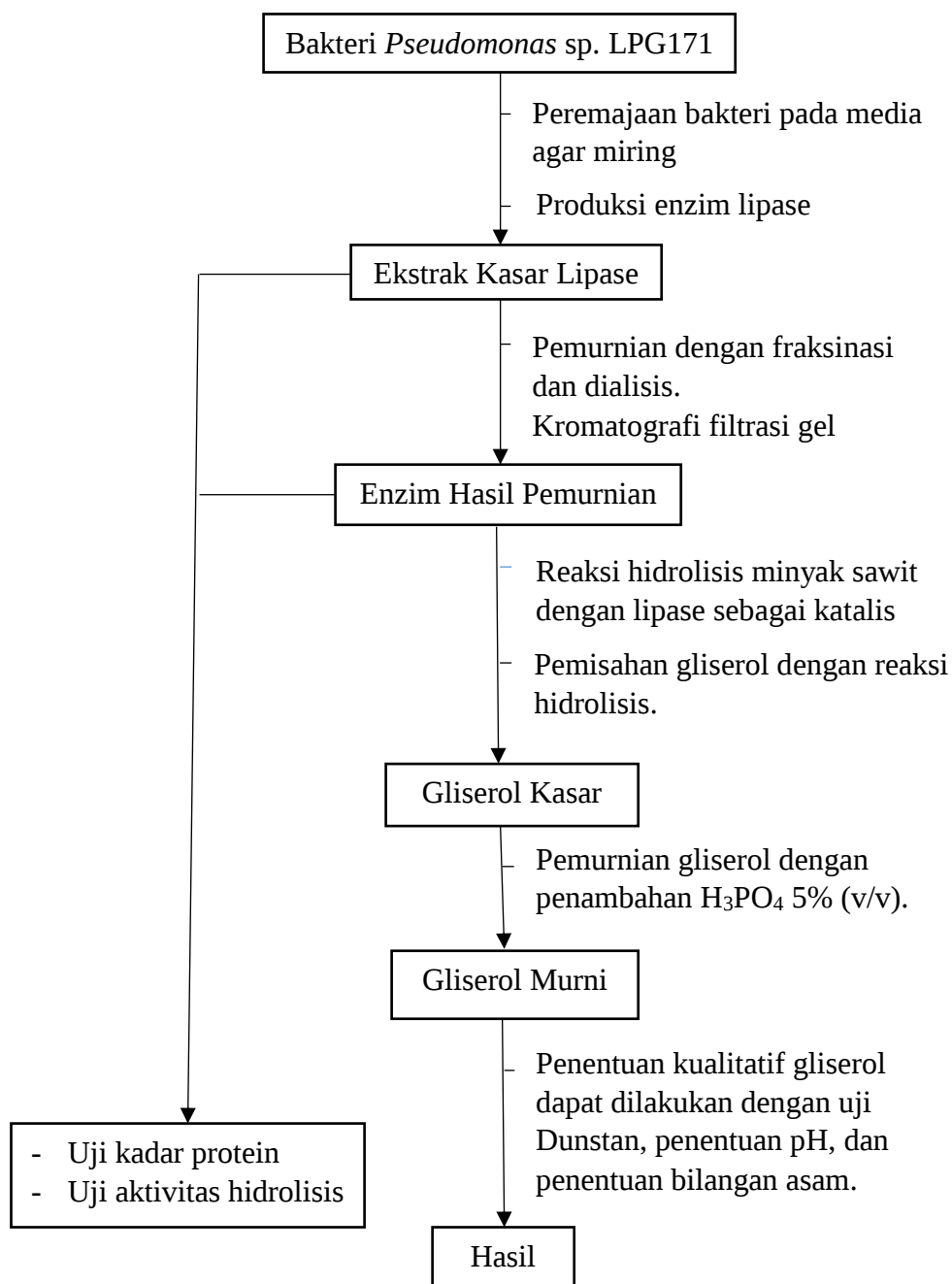
Penentuan bilangan asam pada penelitian ini dilakukan dengan cara mereaksikan 5 g sampel (gliserol, gliserol kasar, asam lemak bebas, sisa minyak, minyak sawit komersial, dan enzim lipase) dengan 25 mL etanol 95 % pada erlenmeyer 250 mL yang berbeda. Kemudian, diinkubasi pada water bath dengan suhu 50°C selama

15 menit hingga larut sempurna, lalu ditambahkan 2 tetes indikator *fenolftalein* (PP) kedalam campuran tersebut dan dititrasi menggunakan KOH 0,1 N hingga terbentuk warna merah muda membayang dan kemudian hilang dalam waktu 30 detik. Volume KOH yang digunakan kemudian dicatat untuk perhitungan angka asam (Fitri dan Fitriana, 2019). Selanjutnya, setiap sampel dianalisis dalam tiga kali ulangan untuk memperoleh nilai rata-rata angka asam. Nilai angka asam dihitung berdasarkan jumlah KOH (mg) yang dibutuhkan untuk menetralkan asam lemak bebas dalam 1 g sampel yang dapat dilihat pada persamaan berikut:

$$\text{Angka Asam (mg KOH/gram)} = \frac{V \times N \times 56,1}{b} \dots\dots\dots (3)$$

3.4. Diagram Alir Penelitian

Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini dirangkum melalui diagram alir yang dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir penelitian

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Produksi enzim lipase dari bakteri *Pseudomonas* sp. LPG171 dilakukan kondisi pertumbuhan pada suhu ruang (30 °C), pH 7, dan waktu inkubasi selama 72 jam. Mempunyai aktivitas unit sebesar 6,42 U/mL menggunakan substrat minyak sawit komersial dan 20,54 U/mL menggunakan substrat minyak zaitun, dengan kadar protein sebesar 0,71 mg/mL.
2. Pemurnian enzim lipase dilakukan melalui fraksinasi amonium sulfat dan dialisis. Diperoleh aktivitas unit sebesar 49,19 U/mL menggunakan substrat minyak sawit komersial dan 63,67 U/mg menggunakan substrat minyak zaitun, dengan kadar protein sebesar 0,41 mg/mL.
3. Pemurnian melalui kromatografi filtrasi gel diperoleh aktivitas unit sebesar 208,83 U/mL menggunakan substrat minyak sawit komersial dan 242,16 U/mL menggunakan substrat minyak zaitun, dengan kadar protein sebesar 0,20 mg/mL.
4. Pemisahan gliserol melalui proses hidrolisis enzimatik menghasilkan dua lapisan, dimana gliserol kasar berada pada lapisan atas dan diperoleh volume sebanyak 41,5 mL dan dimurnikan menggunakan asam fosfat 5 %,

sehingga menghasilkan kemurnian sekitar 83,46 % dengan jumlah volume 3 mL.

5. Penelitian ini melakukan uji kualitatif, yaitu uji Dunstan untuk memastikan keberadaan gliserol yang ditandai dengan perubahan warna dari merah muda menjadi tidak berwarna pada sampel yang mengandung gliserol dan uji kuantitatif, yaitu penentuan pH dan bilangan asam, sehingga diperoleh pH gliserol sebesar 1, dan bilangan asam sebesar 0,845 mg KOH/g (<1 mg KOH/g) memenuhi SNI 06-1564-1995.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka terdapat saran yang dapat dilakukan, yaitu:

1. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan enzim lipase dalam proses menghasilkan gliserol dan membandingkan efisiensi pemisahan gliserol dari berbagai jenis minyak nabati agar diketahui potensi minyak terbaik yang dapat digunakan.
2. Penelitian selanjutnya disarankan untuk memproduksi enzim lipase dalam jumlah yang banyak agar dapat menghasilkan gliserol lebih banyak.
3. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif gliserol menggunakan instrumentasi agar mendapatkan hasil yang lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adio, O. Q., Kareem, S. O., Osho, M. B., Omemu, A. M., and Osho, A. M. B. 2015. Production of Lipases in Solid-State Fermentation by *Aspergillus Niger* F7-02 With Agricultural Residues. *Journal of Microbiology, Biotechnologi, and Food Science*. 4(6): 509–512..
- Agung, H. 2020. Peningkatan Daya Serap Kain Poliester dengan Proses Enzimatik Menggunakan Enzim Lipase. *Hesis. Politeknik STTT Bandung. Bandung*.
- 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.
- Arif, F. H. 2022. *Studi Produksi Biodiesel dengan Katalis Lipase yang Dihasilkan oleh Isolat Bakteri Klebsiella sp. dari Tanah Tercemar Minyak*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Astuti, S. 2022. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lipase Toleran Alkohol dari Lingkungan Tanah Berminyak Sebagai Katalis Reaksi Transesterifikasi Untuk Pembuatan Biodiesel*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Atoche, E. T., Vega-Lizama, L., and Maldonado-López, P. C. B., 2014. Use of Current and Potential Fluctuations Among Identical Electrodes to Determine the Induction Time of the Transesterification Reaction. *Int. J. Electrochem. Sci*(9): 249–255.
- 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., Nurbayti, S., dan Luthfiana, F. 2008. Pemurnian Gliserol dari Hasil Samping Pembuatan Biodiesel menggunakan Bahan Baku Minyak Goreng Bekas. *Jurnal Kimia Valensi*. 1(3): 157–162.
- Azizah, M. A. 2018. *Produksi Enzim Lipase dari Kapang dengan Metode Solid State Fermentation pada Media Ampas Kelapa*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. Jawa Tengah.
- Cartono. 2023. *Biologi Umum*. PT Sada Kurnia Pustaka. Banten.
- Dunstan, W. R. 1904. The Identification of Glycerol. *Jurnal of The Chemical Society*. 85: 176-180.
- Effendi, I. 2020. *Metode Identifikasi dan Klasifikasi Bakteri*. Desain Press. Riau.
- Fajarfika, R.; Hilmany, T.; Nafi'ah, H. H.; Satifa, N.; dan Supriatna, J. 2022. Isolasi *Pseudomonas* sp. untuk Pengendalian Biologi terhadap Layu Bakteri. *Jurnal Agroteknologi dan Sains*. 6(2): 107–114.
- Fatimah, E. 2021. Review Artikel: Karakteristik dan Peranan Enzim Lipase pada Produksi Diacylglycerol (Dag) dari Virgin Coconut Oil (Vco). *Journal of Chemistry*. 10(3): 246–256.
- Fikri, M. A. 2022. *Prosiding Seminar Nasional Biologi IV Bioteknologi dan Penerapannya dalam Penelitian dan Pembelajaran Sains*. PT Nasya Ekspanding Management. Pekalongan.
- Fitri, S. A dan Fitriana, N. A. 2019. Analisis Angka Asam pada Minyak Goreng dan Minyak Zaitun. *Sainteks*. 16(2): 115-119.
- Gunstone, F. D. 2004. *The Chemistry of Plis and Fats: Sources, Composition, Properties, and Uses*. Blackwell Publishing.
- Hadi, I. M; dan Alamudi, Y. M. 2019. *Imunodiagnostik pada Bakteri dan Jamur*. Zifatama Jawara. Sidoarjo.
- Hazra, F., dan Septiawan, I. 2014. Pemurnian Gliserol dari Hasil Samping Produksi Biodiesel Minyak Kelapa Sawit Production. *Jurnal Sains Terapan*. 1(1): 53–58.

- Jahira, S. dan S. 2021. *Pengelolaan Terpadu terhadap Patogen Bakteri Tumbuhan*. CV. Budi Utama. Yogyakarta.
- Kalla, R., Sumarno, S., dan Mahfud, M. 2016. *Degradasi Gliserol Katalitik menggunakan Tanduk Getar*. Saminar Nasional Inovasi dan Aplikasi Teknologi Di Industri (SENIATI), 52–57.
- Kareem, O. M; Pena, G; Raj, A; Alrefaai, M, M; Stephen, S; and Anjani, T. 2017. NEffects of Neem Oil-Derived Biodiesel Addition to Diesel on the Reactivity and Characteristics of Combustion-Generated Soot Title. *Energy and Fuels*. 31(10): 10822–10832.
- Koentjoro, P. M; dan Prasetyo, N. E. 2020. *Dinamika Struktur Dinding Sel Bakteri*. CV. Jakad Media Publishing. Surabaya.
- Kurnia, D. R. D. 2010. *Studi Aktivitas Enzim Lipase dari Aspergillus niger sebagai Biokatalis pada Proses Gliserolisis untuk Menghasilkan Monoasilgliserol*. Disertasi. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Kwon, D. Y., and Rhee, J. S. 1986. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. *Journal of The American Oil Chemists Society*. 63(1): 89-92.
- Larasati, D. D. 2024. *Peningkatan Kestabilan Enzim Lipase dari Bakteri Sp. Lpg172 dengan Imobilisasi Metode Adsorpsi pada Matriks Hidroksiapatit*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Layly, R, I dan Wiguna, O, T. 2016. Studi Potensi Lipase Alcaligenes Faecalis Untuk Aplikasi Biodeterjen. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 3(2): 66–71.
- Lide, D. R. 2009. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press
- Listyawati, A. F. 2016. Pola Pertumbuhan *Pseudomonas* sp . dengan Menggunakan Variasi konsentrasi D-glukosa dalam Media Pertumbuhan terhadap Waktu Inkubasi. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*. 2071(2): 29–32.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 193(1): 1–8.

- Manas; A. R. S. and Man, C. 2020. Glycerol In Food , Cosmetics And Pharmaceutical Industries : Basics And New Applications. *International Journal of Scientific and Technology Research*. 8(12): 553–558.
- Masithah, D. E. 2023. *Buku Ajar Bioteknologi Hasil Perikanan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Moentamaria, D., Againa, G., Ridhawati, M. M., dan Chumaidi, A. 2016. Hidrolisis Minyak Kelapa dengan Lipase Terimobilisasi Zeolit pada Pembuatan Perisa Alami. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 5(2):84-91.
- Nabilasani, G.C., Trismilah, Suhendar, D., dan Mubarik, N. 2019. Produksi Lipase dari Isolat Kapang Hasil Mutasi untuk Transesterifikasi. *Journal Bioteknologi Dan Biosains Indonesia*. 6(1): 20–28.
- Nadir, M. dan Marlinda. 2013. Peningkatan Kadar Gliserol Hasil Samping Pembuatan Biodiesel dengan Metode Adsorpsi Asam Lemak Bebas (ALB). *Konversi*. 2(2): 51–58.
- Nenobahan, M. A., Ledo, M. E, S., dan Nitsae, M. 2020. Pembuatan Biodiesel Minyak Jelantah Menggunakan Biokatalis Ekstrak Kasar Lipase dari Biji Kesambi. *Jurnal Saintek Lahan Kering*. 3(2622): 20–25.
- Nurlinda, B, M. 2024. *Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri Pseudomonas sp. LPG171 dengan Matriks Zeolit Alam Teraktivasi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Pratiwi, D; Sebayang, Fi; dan Jamilah, I. 2013. Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Pseudomonas Aeruginosa* dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung. *Jurnal Saintia Kimia*. 1(2): 1–5.
- Pratomo, g; dan Saputra, C. 2022). Analisis Determinan Ekspor Minyak Kelapa Sawit Indonesia Pada Negara Asia-6 Tahun 2011-2020. *Economie*. 04(2): 97–107.
- 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. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Qadariyah, L., Novita, D., dan Cempaka, D. S. 2010. Konversi Gliserol dengan Gelombang Mikro Secara Batch. *Jurnal Teknik Kimia*. 4(1): 281–286.

- Rahmadina, A. C; Ismail; Abrar, M; Erina; Rastina; dan Fahrimal, Y. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Pseudomonas* sp Pada Ikan. *Jimvet*, 2(4): 493–502.
- Rahmi U. 2006. *Pengaruh Jenis Asam dan pH pada Pemurnian Residu Gliserol dari Hasil Samping Produksi Biodiesel*. Skripsi. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- 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.
- Sampaio, C. S., Angelotti, J. A. F., Fernandez-lafuente, R., and Hirata, D. B. 2022. Lipase Immobilization via Cross-linked Enzyme Aggregates: Problems and Prospects – A review Camila. *International Journal of Biological Macromolecules*. 215: 434–449.
- Saputri, N. N. 2021. *Laporan praktikum lipid II: Uji Dunstan untuk deteksi gliserol*. Dokumen praktikum. Sekolah Tinggi Kesehatan Nasional. Surakarta.
- 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.
- 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.
- Suyono, Y. dan Salahudin, F. 2011. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Pseudomonas* pada Tanah yang Terindikasi Terkontaminasi Logam. *Jurnal Biopropal Industri*. 2(1): 8–12.

Utami, R. M. 2023. *Pengoptimalan Kondisi Aktivitas Transesterifikasi Lipase dari Bakteri Klebsiella sp. untuk Produksi Biodiesel*. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Wikaputri, A. S., Irvine, D. J., Stockman, R. A., and Shivaprasad, P. 2024. Simultaneous geraniol and citronellol transesterification using *Pseudomonas fluorescens* lipase for the production of fragrance and flavour esters : A kinetic study. *Journal of Agriculture and Food Research*, 16: 11–10.