

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE HASIL ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172 TERIMOBILISASI PADA Matriks
ZEOLIT ALAM**

(Skripsi)

Oleh

DINA FEBRIYANTI

NPM.2117011042



**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 TERIMOBILISASI PADA MATRIKS ZEOLIT ALAM

Oleh

DINA FEBRIYANTI

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas enzim lipase hasil isolasi dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 yang diimobilisasi pada matriks zeolit alam dalam pemisahan gliserol dari minyak kelapa sawit melalui reaksi hidrolisis enzimatik. Produksi enzim dilakukan melalui fermentasi menggunakan media yang diperkaya minyak zaitun, diikuti oleh proses pemurnian bertahap menggunakan fraksinasi amonium sulfat, dialisis, dan kromatografi filtrasi gel. Aktivitas enzim meningkat signifikan dari 10,17 U/mL menjadi 267,88 U/mL, dan mencapai maksimum 550,62 U/mL setelah proses imobilisasi menggunakan zeolit alam.

Karakterisasi enzim imobil menunjukkan kestabilan operasional yang tinggi dan potensi penggunaan ulang, dengan aktivitas optimum pada suhu 50°C dan waktu inkubasi selama 15 menit. Proses hidrolisis menghasilkan dua fraksi utama: asam lemak dan gliserol. Gliserol kemudian dipisahkan dan dimurnikan, serta dikarakterisasi melalui uji Dunstan, pengukuran pH, dan bilangan asam. Hasil menunjukkan pH akhir sebesar 1 pada gliserol dan bilangan asam 0,71–0,92 mg KOH/g, yang mengindikasikan tingkat kemurnian gliserol yang tinggi.

Secara keseluruhan, hasil penelitian membuktikan bahwa lipase terimobilisasi dari *Klebsiella* sp. LPG172 merupakan biokatalis yang efisien, stabil, dan ramah lingkungan. Zeolit alam terbukti efektif sebagai matriks imobilisasi, sekaligus berkontribusi terhadap efisiensi pemisahan gliserol. Aplikasi ini berpotensi besar untuk pengolahan limbah minyak nabati menjadi produk bernilai tambah dalam industri bioteknologi.

Kata kunci: *Klebsiella* sp. LPG172, lipase, imobilisasi, zeolit alam, gliserol, hidrolisis enzimatik.

ABSTRACT

SEPARATION OF GLYCEROL FROM PALM OIL BY ENZYMATIC HYDROLYSIS USING LIPASE RESULTS OF ISOLATED BACTERIA *Klebsiella* sp. LPG172 IMMOBILIZATION IN NATURAL ZEOLITE MATRIX

By

DINA FEBRIYANTI

This study aims to evaluate the effectiveness of lipase enzyme isolated from *Klebsiella* sp. LPG172 immobilized on natural zeolite matrix for glycerol separation from palm oil via enzymatic hydrolysis. Enzyme production was initiated through fermentation using an olive oil-enriched medium, followed by stepwise purification involving ammonium sulphate fractionation, dialysis, and gel filtration chromatography. The lipase activity increased significantly from 10.17 U/mL to 267.88 U/mL and reached a maximum of 550.62 U/mL after the immobilization process using natural zeolite. Characterization of the immobilized enzyme revealed high operational stability and good reusability, with optimal activity observed at 50°C and 15 minutes of incubation. The hydrolysis process yielded two main fractions: fatty acids and glycerol. Glycerol was subsequently separated and purified using natural zeolite and analyzed qualitatively through the Dunstan test, pH measurement, and acid value determination. The results showed a final pH of 1 and acid values ranging from 0.71 to 0.92 mg KOH/g, indicating high glycerol purity. Overall, the findings demonstrate that the immobilized lipase from *Klebsiella* sp. LPG172 is an efficient, stable, and eco-friendly biocatalyst. The use of natural zeolite not only enhances enzyme stability but also enables enzyme reuse in industrial biotechnology applications, particularly in converting vegetable oil waste into value-added products such as purified glycerol.

Keywords: *Klebsiella* sp. LPG172, lipase, immobilization, natural zeolite, glycerol, enzymatic hydrolysis.

**PEMISAHAN GLISEROL DARI MINYAK KELAPA SAWIT SECARA
HIDROLISIS ENZIMATIK MENGGUNAKAN LIPASE HASIL ISOLAT
BAKTERI *Klebsiella* sp. LPG172 TERIMOBILISASI PADA MATRIKS
ZEOLIT ALAM**

Oleh

Dina Febriyanti

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 TERIMOBILISASI PADA MATRIKS
ZEOLIT ALAM

Nama Mahasiswa : Dina Febri Yanti

Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011042

Program Studi : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Prof. Dr. Kamisah Delilawati P., S.Si., M.Si.
NIP. 197212051997032001

2. Ketua Jurusan Kimia

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

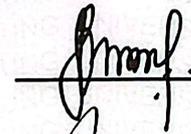
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

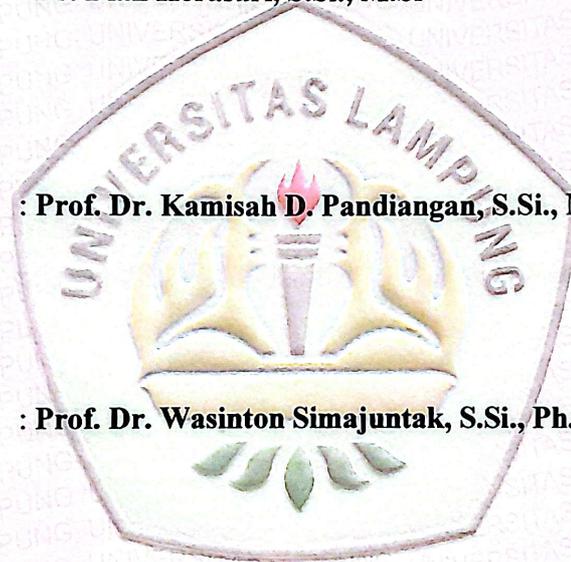
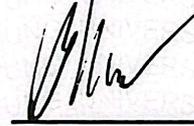
Ketua : Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si



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



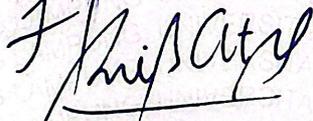
Anggota : Prof. Dr. Wasinton Simajuntak, S.Si., Ph.D



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

NIP 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dina Febriyanti
NPM : 2117011042
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini saya menyatakan dengan sungguh-sungguh bahwa skripsi saya yang berjudul **“Pemisahan Gliserol Dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatik Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Terimobilisasi Pada Matriks Zeolit Alam”** adalah karya asli saya sendiri, tanpa adanya karya orang lain kecuali yang telah disebutkan dalam daftar pustaka. Selain itu, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh program studi untuk keperluan publikasi, selama nama saya dicantumkan dalam publikasi tersebut sesuai kesepakatan bersama.

Demikianlah surat ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 4 Agustus 2025

Yang Menyatakan

A 10000 Rupiah postage stamp with a signature over it. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text 'REPUBLIK INDONESIA', '10000', 'METERAI TEMPEL', and the serial number '485BFAMX450322298'. The signature is written in black ink over the stamp.

Dina Febriyanti

NPM. 2117011042

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Dina Febriyanti dilahirkan di Tanjung Waras, Merak Batin, Natar pada 12 Februari 2002. Putri pertama dari pasangan Bapak Adi Waluyo dan Ibu Zaenab. Penulis mengawali jenjang pendidikan dari Taman Kanak-Kanak AL-AZHAR 8 yang diselesaikan pada tahun 2008. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 5 Merak Batin pada tahun 2014, kemudian melanjutkan pendidikan kejenjang sekolah menengah pertama (SMP) di SMP Budi Karya Natar diselesaikan pada tahun 2017 dan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 2 Natar pada tahun 2020. Pada tahun 2021, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN) yang diselesaikan pada 2025.

Selama diperguruan tinggi, penulis pernah bergabung dalam bidang organisasi kemahasiswaan, sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2021, dan kemudian menjadi anggota biro kesekretariatan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2022, serta menjadi anggota Bidang Hubungan Masyarakat (HUMAS) Rois FMIPA periode 2022-2023. Penulis pernah mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) Pertukaran Mahasiswa antar Universitas Lampung dan Universitas Bengkulu pada tahun 2023. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Bulan Januari-Februari 2024 di kecamatan Lempasing, Pesawaran. Pada tahun 2025, penulis menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “Pemisahan Gliserol Hasil Produksi Hidrolisis

Dari Isolat Bakteri *Klebsiella* sp.LPG172". Penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Biokimia untuk Mahasiswa S1 Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2024 dan asisten Praktikum Biokimia untuk mahasiswa S1 Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2025.

MOTTO

“Siapa yang menjauhkan diri dari sifat suka mengeluh, maka berarti ia mengundang kebahagiaan”

(Abu Bakar As Siddiq)

“Memaafkan adalah kemenangan terbaik”

(Ali bin Abi Thalib)

“Barang siapa menempuh jalan untuk mencari ilmu, maka Allah akan memudahkan baginya jalan menuju surga “

(HR. Muslim)

فَإِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا (5) إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا (6)

"Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan”

(QS. Al-Insyirah : 6)

يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اسْتَعِينُوا بِالصَّبْرِ وَالصَّلَاةِ إِنَّ اللَّهَ مَعَ الصَّابِرِينَ

“Allah bersama orang-orang yang sabar”

(QS. Al-Baqarah: 153)

PERSEMBAHAN



“Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”

Segala puji bagi Allah Subhanahu wa Ta'ala, Tuhan semesta alam, yang telah melimpahkan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Selawat serta salam semoga selalu tercurah kepada junjungan Nabi Muhammad SAW., beserta keluarga, sahabat, dan umat beliau hingga akhir zaman.

Dengan penuh rasa syukur, karya ini kupersembahkan kepada:

Alm. Bapak, Dan Mamak

Yang dengan cinta, doa, dan pengorbanan tanpa lelah telah menjadi sumber kekuatan dalam setiap langkah. Terima kasih atas segala kasih sayang dan dukungan yang tiada henti.

Ibu, Ayah, dan Adiku

Yang dengan cinta, doa pengorbanan tanpa lelah mendoakan dan mendukung kekuatan setiap langkah. Terima kasih atas segala kasih sayang yang tiada henti.

Dengan rasa hormat,

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

Prof. Dr. Kamisah D. Pandiangan, S.Si., M.Si., Prof. Dr. Wasinton Simajuntak, S.Si., Ph.D serta para dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah membimbing dan meluangkan waktu serta tenaga. Terima kasih atas ilmu, kesabaran, dan keikhlasan yang telah diberikan.

Keluarga besar, teman-teman seperjuangan, dan diriku sendiri
Serta almamater yang kebanggakan
Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhānahu wa Ta'ala atas limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya. Selawat dan salam semoga selalu tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. suri teladan umat manusia, beserta keluarga, sahabat, dan seluruh pengikutnya hingga akhir zaman. Alhamdulillah atas izin dan keridhaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pemisahan Gliserol Dari Minyak Kelapa Sawit Secara Hidrolisis Enzimatik Menggunakan Lipase Hasil Isolat Bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 Terimobilisasi Pada Matriks Zeolit Alam”**.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak, skripsi ini tidak akan terselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Mamak, Ibu, Ayah dan Bapak (Alm) yang telah melimpahkan kasih sayang dan do'a serta saran, kesabaran, keikhlasan dan perjuangan untuk mendukung penulis. Semoga Mamak, Ibu dan Ayah diberikan kesehatan, dilancarkan rezekinya, dan kebaikan kalian dibalas oleh Allah SWT, serta Bapak ditempatkan disisiNya.
2. Pakde, Bude, dan Paman ku yang tak henti-hentinya memberikan dukungan dan memberi masukan serta nasehat kepada penulis. Terima kasih selalu ada disaat dan diwaktu yang tepat.
3. Kepada Mbak ku Eva Yulianti, Mamasku Erick Dwi Yulianto dan Adiku Dika Marvel Prasetyo, terima kasih sudah menjadi pendengar yang baik

dalam mendengarkan keluh kesah penulis selama menjalani perkuliahan dan menjalani penelitian ini.

4. Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si, selaku pembimbing I yang selalu memberikan bimbingan, ilmu, nasihat, saran, dan semangat serta meluangkan waktu, tenaga dan kesabaran kepada penulis selama proses menyelesaikan skripsi. Semoga segala kebaikan ibu di balas oleh Allah SWT.
5. Ibu Prof. Dr. Kamisah D Pandiangan, S.Si., M.Si, selaku pembimbing II yang telah membimbing dan memberikan masukan, saran, ide, kritik serta nasihat dalam penyusunan skripsi ini.
6. Bapak Prof. Dr. Wasinton Simanjuntak, S.Si., Ph.D, selaku pembahas yang telah memberikan saran, masukan, ide, gagasan dan kritik terhadap perbaikan penulisan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Bapak Prof. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si., M.T, selaku dosen pembimbing akademik yang telah meluangkan waktu dan memberikan saran kepada penulis.
8. Ibu Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
10. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah memberikan ilmu, motivasi, dan saran kepada penulis selama menjadi mahasiswa.
11. Seluruh karyawan, laboran, dan admin Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung atas segala bantuan dan pelayanannya selama perkuliahan dan penelitian kepada penulis.
12. Keluarga besar alm. Mbah Dasimin yang selalu mendukung dan mendoakan sehingga penulis dapat menyelesaikan studinya.
13. Sahabat tercinta Annisa Aulia Azizah, S.Pd, Wahyuni Mailanda Sari, S.I.Kom, dan Yoankha Nurul Aulia, S.Psi, Vina Ananta yang tak henti menemani, memberikan dukungan, semangat, dan menguatkan penulis dalam kondisi apapun. Terima kasih karena sudah setia menemani penulis dalam menjalani masa studi.

14. Desvica Romanda, S.Si dan Retno Dwi Anggraeni, S.Si selaku *patner* penelitian Dian Reasearch'21 yang selalu memberi semangat, serta dukungan kepada penulis. Terima kasih karena sudah menjadi rekan kerja yang baik pada penelitian ini.
15. Diah Vio Rahmadanti, S.Si, Julia Putri, S.Si dan Nida Roufiqoh, S.Si terima kasih telah menjadi teman seperjuangan ketika melakukan kegiatan MBKM dan selalu mendukung dan memberi semangat kepada penuliss untuk menyelesaikan skripsi ini.
16. Kepada Kak Virginia Nuh Reza Amanda, S.Si., M.Si, Kak Nindy Novita Sari, S.Pd., M.Si, dan Kak Armilda Nadya Kurniati, S.Si., M.Si yang telah memberikan semangat, dukungan, saran dan menjadi mentor dan selalu sabar mendampingi serta sabar menghadapi penulis dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
17. Titis Okti Ariandarini, S.Si, Harry Firmanda, S.Si, Sayyid Amanullah Gani, S.Si, Sajiddah Talfah, S.Si, Tiara Putri Berliani, S.Si dan Novi Purnama Sari, S.Si selaku *patner* asisten praktikum di Laboratorium Biokimia. Terima kasih atas segala semangat, hiburan, bantuan dan kesabarannya.
18. Teman-teman yang baik hati Adryan Daffa Dzulfiqar, S.Si, Wahyuni Eka Putri, S.Si, Azizah Rosihana T.P, S.Si, Melissa Putri, S.Si, Bela Agustin, S.Si, Difa Putri Himawan, S.Si, Nina Nurulita, S.Si, Azzahra Qurota aini, S.Si dan teman-teman Kimia Kelas A serta Angkatan 2021 yang telah menemani masa perkuliahan penulis. Terima kasih atas bantuan dan kebersamaannya selama ini.
19. Kepada teman-teman Laboratorium Biokimia HR'21, BNH'21, PY'21, MR'21, dan teman-teman asisten praktikum biokimia, terima kasih karena sudah menjadi rekan-rekan kerja yang baik.
20. Kepada adik tingkat DH'22 terima kasih atas doa dan dukungan.
21. Kepada Mba Della Rahmadhani selaku PLP Laboratorium Biokimia, terima kasih atas doa dan dukungan kepada penulis selama menyelesaikan penelitian.
22. Kepada semua pihak yang belum dan tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Terima kasih telah membantu penulis dengan tulus.

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

Bandar Lampung, 4 Agustus 2025
Penulis,

Dina Febriyanti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR GAMBAR	xix
DAFTAR TABEL	xxi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Enzim.....	5
2.1.1. Karakterisasi Enzim.....	6
2.1.1.2. Enzim Lipase	6
2.1.1.3. Uji Aktivitas Lipase	8
2.1.1.4. Tingkat Keasaman pH	13
2.1.1.5. Suhu	15
2.1.1.6. Konsentrasi substart	17
2.2. Bakteri	17
2.2.1. <i>Klebsiella sp.</i>	18
2.2.2. Fase Pertumbuhan Bakteri	20
2.3. Amobilisasi.....	21
2.4. Gliserol	22
2.5. Zeolit.....	23
2.6. Minyak sawit	23

III. METODE PENELITIAN	25
3.1. Waktu dan Tempat	25
3.2. Alat dan Bahan	25
3.3. Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1. Tahap Persiapan.....	26
3.4. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Enzim Lipase	27
3.4.1. Penentuan Kadar Protein	27
3.4.2. Penentuan Aktivitas Hidrolisis	27
3.5. Peremajaan Bakteri.....	28
3.6. Produksi Enzim Lipase.....	28
3.7. Pemurnian Enzim Lipase.....	28
3.8. Aktivasi Zeolit Alam	31
3.9. Enzim Lipase Terimobilisasi.....	31
3.10. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Terimobil	31
3.11. Uji Pemakaian Berulang Enzim Lipase Terimobil.....	32
3.12. Pemisahan Gliserol.....	32
3.13. Pemurnian Gliserol.....	32
3.14. Uji Kualitatif Gliserol.....	33
3.15. Uji kuantitatif gliserol.....	33
3.16. Skema Penelitian	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAAN.....	36
4.1. Peremajaan Bakteri.....	36
4.2. Produksi Enzim Lipase dari <i>Klebsiella</i> sp. LPG172	37
4.3. Pemurnian Enzim Lipase dari <i>Klebsiella</i> sp. LPG172	40
4.3.1. Fraksinasi Ammonium Sulfat dan Dialisis	41
4.3.2. Kromatografi Filtrasi Gel.....	44
4.4. Aktivasi Zeolit Alam	49
4.5. Imobilisasi Enzim.....	50
4.6. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Terimobil	51

4.6.1. Suhu Optimum.....	51
4.6.2. Waktu Inkubasi Optimum.....	52
4.7. Uji pemakaian berulang enzim lipase terimobil.....	54
4.8. Pemisahan Gliserol.....	55
4.9. Pemurnian Gliserol.....	58
4.10. Uji kualitatif gliserol.....	60
4.11. Uji kuantitatif gliserol.....	62
V. KESIMPULAN DAN SARAN	67
5.1. Simpulan.....	67
5.2. Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA	69
LAMPIRAN.....	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi transesterifikasi	9
2. Reaksi hidrolisis	10
3. Reaksi esterifikasi	13
4. Kurva penentuan pH	14
5. Pengaruh suhu	16
6. Hubungan antara konsentrasi dengan enzim	17
7. Kurva pertumbuhan bakteri	21
8. Skema fraksinasi enzim	29
9. Skema penelitian	35
10. Peremajaan bakteri <i>klebsiella</i> sp. LPG172.....	37
11. Perubahan warna media inokulum (a). media inokulum sebelum ditumbuhi bakteri, (b). media inokulum setelah ditumbuhi bakteri, (c). media fermentasi atau media produksi bakteri <i>klebsiella</i> sp.LPG172.	38
12. Mekanisme reaksi yang terjadi pada hidrolisis enzim lipase	40
13. Proses dialisis	43
14. Hubungan dialisis dengan aktivitas unit lipase dengan penambahan 2 substrat yang berbeda yaitu minyak sawit komersial dan minyak zaitun.	44

15. Profil hubungan A280 nm dengan nilai aktivitas unit (U/mL) hasil pemurnian dengan kromatografi filtrasi gel.....	45
16. Hubungan fraksi hasil kromatografi filtrasi gel dengan penambahan substrat minyak sawit komersial dan minyak zaitun.	46
17. Zeolit alam: A). sebelum aktivasi dan B). sesudah aktivasi	49
18. Pengaruh suhu pada aktivitas enzim lipase terimobil	51
19. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas spesifik enzim lipase dalam reaksi hidrolisis	52
20. Uji stabilitas enzim imobil terhadap penggunaan berulang dalam reaksi hidrolisis.	54
21. Proses pemisahan gliserol dari enzim lipase hasil dari reaksi hidrolisis.....	56
22. Proses pemurnian gliserol menggunakan asam fosfat dengan a). sisa minyak dan b). gliserol.....	59
23. Uji Dunstan pada a). gliserol kasar, b). gliserol murni, c). minyak sisa pemurnian, d). minyak komersial, e). enzim, f). asam lemak bebas.....	61
24. Kurva standar BSA	81
25. Kurva standar asam oleat	82

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktivitas enzim lipase pada setiap tahap pemurnian	48
2. Hubungan antara penggunaan berulang dengan aktivitas unit dan hasil (%) enzim lipase.....	55
3. Hubungan antara tingkat kejenuhan ammonium sulfat fraksi 20-90% dengan aktivitas enzim lipase dari <i>Klebsiella</i> sp. LPG172.....	77
4. Nilai A_{280} enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel.....	77
5. Hubungan profil fraksi dengan nilai aktivitas enzim lipase hasil kromatografi filtrasi gel.	78
6. Pengaruh suhu pada aktivitas hidrolisis enzim lipase.....	79
7. Pengaruh waktu inkubasi pada aktivitas hidrolisis enzim lipase	79
8. Uji stabilitas pada aktivitas hidrolisis enzim lipase	79
9. Pemisahan pengulangan gliserol.....	80
10. Volume asam fosfat yang digunakan pada pemurnian gliserol	80
11. Nilai absorbansi dari kurva standar BSA.....	80
12. Nilai absorbansi dari kurva standar asam oleat.....	81
13. Hubungan konsentrasi absorbansi asam oleat.....	82

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Enzim, sebagai biokatalis alami, memiliki peran yang sangat penting dalam berbagai proses biokimia. Molekul protein kompleks ini mampu mempercepat laju reaksi kimia tanpa ikut bereaksi secara permanen. Salah satu jenis enzim yang menarik perhatian adalah lipase, yang berperan dalam hidrolisis trigliserida (lemak) menjadi asam lemak dan gliserol. Lipase dari bakteri, khususnya, telah menjadi fokus penelitian intensif karena sifatnya yang beragam dan potensi aplikasinya yang luas. Molekul protein ini mampu mempercepat laju reaksi tanpa ikut bereaksi secara permanen. Kemampuan enzim dalam menurunkan energi aktivasi suatu reaksi membuatnya menjadi alat yang sangat efektif dalam berbagai bidang, termasuk industri, farmasi, dan lingkungan (Pretti, 2022).

Enzim lipase ini memiliki kemampuan khusus dalam menghidrolisis ikatan ester pada trigliserida, yang merupakan komponen utama lemak. Lipase secara alami ditemukan pada berbagai organisme, mulai dari manusia, hewan, tumbuhan, hingga mikroorganisme seperti bakteri dan jamur pada penelitian ini didapatkan enzim lipase dari bakteri *Klebsiella sp.* LPG172. Untuk meningkatkan stabilitas, selektivitas, dan kemampuan penggunaan kembali

enzim lipase, seringkali dilakukan proses immobilisasi. Immobilisasi enzim melibatkan penempelan enzim pada suatu pendukung (matriks) sehingga enzim tidak larut dalam media reaksi. Salah satu matriks yang populer digunakan adalah zeolit alam. Zeolit memiliki struktur pori yang unik, sehingga dapat menjadi tempat yang baik untuk menempelkan molekul enzim dan melindungi enzim dari denaturasi (Nurlinda, 2024).

Lipase dari bakteri memiliki beberapa keunggulan dibandingkan sumber lain. Bakteri dapat dibudidayakan dengan mudah dan cepat, serta mampu menghasilkan lipase dalam jumlah yang cukup besar. Selain itu, lipase bakteri seringkali memiliki sifat yang lebih stabil terhadap suhu dan pH ekstrem, membuatnya lebih cocok untuk aplikasi industri. Lipase bakteri memiliki karakteristik yang unik, seperti kemampuan untuk bekerja pada berbagai kondisi pH dan suhu, serta spesifisitas terhadap substrat yang berbeda-beda. Keanekaragaman karakteristik ini memungkinkan lipase bakteri diaplikasikan dalam berbagai industri, mulai dari farmasi, makanan, hingga bioenergi. Produk penting dari reaksi hidrolisis lemak oleh lipase adalah gliserol dan asam lemak bebas (Zhao *et al.*, 2015).

Gliserol, senyawa poliol dengan tiga gugus hidroksil, adalah komponen utama lemak dan minyak alami. Sifatnya yang unik, seperti higroskopis dan tidak beracun, membuatnya menjadi bahan baku yang berharga dalam berbagai industri. Gliserol tidak hanya digunakan sebagai humektan dalam kosmetik, tetapi juga sebagai pelarut dalam farmasi dan aditif makanan. Selain itu, gliserol juga memiliki peran penting dalam metabolisme tubuh sebagai sumber energi. Seiring dengan meningkatnya kesadaran akan pentingnya sumber daya terbarukan, gliserol yang dihasilkan dari proses produksi biodiesel semakin menarik perhatian sebagai bahan baku yang berkelanjutan. Gliserol, sebagai produk samping dari reaksi hidrolisis lemak oleh lipase, memiliki nilai ekonomis yang tinggi. Gliserol memiliki berbagai aplikasi dalam industri kosmetik farmasi, dan sebagai aditif makanan. Pemurnian gliserol dari campuran reaksi menjadi sangat penting untuk meningkatkan nilai jual produk. Pemanfaatan gliserol sangat penting dan juga sebagai produk yang memiliki nilai tambah lebih besar (Panji *et al.*, 2019).

Pemurnian gliserol menjadi salah satu tantangan dalam pemanfaatannya. Matriks zeolit alam, dengan struktur porinya yang unik, menawarkan potensi sebagai adsorben yang efektif untuk memurnikan gliserol dari campuran reaksi. Zeolit alam memiliki kemampuan untuk menyerap molekul-molekul tertentu secara selektif, sehingga dapat digunakan untuk memisahkan gliserol dari komponen lain dalam campuran. Untuk mendapatkan gliserol dengan kemurnian tinggi, diperlukan proses pemurnian. Salah satu metode yang menarik adalah menggunakan matriks zeolit alam. Zeolit adalah mineral alumino silikat yang memiliki struktur berpori unik. Struktur pori ini memungkinkan zeolit untuk menyerap molekul tertentu, termasuk gliserol, sehingga dapat digunakan sebagai adsorben. Pemurnian gliserol dapat dilakukan melalui berbagai metode, seperti adsorpsi, distilasi, membran, kristalisasi, dan ekstraksi cair-cair. Setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing, sehingga pemilihan metode yang tepat akan bergantung pada jenis dan jumlah pengotor yang terdapat dalam gliserol mentah, skala produksi, dan tingkat kemurnian yang diinginkan. Adsorpsi menggunakan zeolit atau karbon aktif merupakan salah satu metode yang populer karena selektivitasnya yang tinggi dan kemampuannya untuk menghilangkan berbagai jenis pengotor (Aziz dkk., 2008).

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Produksi enzim lipase dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
2. Melakukan immobilisasi enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 menggunakan zeolit alam.
3. Pemisahan gliserol hasil dari produk aktivitas hidrolisis enzimatik lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.

4. Melakukan perbandingan produk hidrolisis gliserol dari lipase bebas dan lipase amobil.

1.3. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Mendapatkan hasil gliserol dari pemurnian produk aktivitas hidrolisis enzim lipase secara enzimatik.
2. Dapat menentukan aktivitas enzim dan kondisi optimum bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
3. Mendapatkan hasil pemurnian enzim lipase hasil produksi dari isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.
4. Dapat memanfaatkan gliserol sebagai bahan bakar biodiesel atau biomassa.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Enzim

Enzim adalah biokatalisator yang berfungsi sebagai katalis dalam proses biologis (Lehninger, 1982). Enzim yang dikenal luas penggunaannya adalah enzim amilase, lipase, dan protease yang merupakan enzim hidrolitik pemecah senyawa makromolekul karbohidrat, lemak, dan protein. Enzim merupakan sekelompok protein yang mengatur dan menjalankan perubahan-perubahan kimia dalam sistem biologi. Enzim dihasilkan oleh organ-organ pada hewan dan tanaman yang secara katalitik menjalankan berbagai reaksi, seperti hidrolisis, oksidasi, reduksi, isomerasi, adisi, transfer radikal, pemutusan rantai karbon (Sumardjo, 2009). Secara umum, enzim menghasilkan kecepatan, spesifikasi, dan kendali pengaturan terhadap reaksi dalam tubuh. Enzim berfungsi sebagai katalisator, yaitu senyawa yang meningkatkan kecepatan reaksi kimia (Marks, dkk., 2000).

Suatu enzim dapat mempercepat reaksi 10⁸ sampai 10¹¹ kali lebih cepat dibandingkan ketika reaksi tersebut tidak menggunakan katalis. Seperti katalis lainnya, enzim juga menurunkan atau memperkecil energi aktivasi suatu reaksi kimia (Poedjiadi dan Supriyanti, 2009). Dalam reaksi tersebut enzim mengubah senyawa yang selanjutnya disebut substrat menjadi suatu senyawa yang baru yaitu produk, namun enzim tidak ikut berubah dalam reaksi tersebut (Palmer, 1991). Setiap enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai. Setelah itu kenaikan suhu lebih lanjut akan menyebabkan aktivitas enzim menurun (Megiadari, 2009). Lipase merupakan enzim yang bekerja untuk menghidrolisis lipida menjadi asam lemak dan gliserol yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Lipase akan memecah ikatan ester pada permukaan antara fase cair, enzim terlarut, dan fase substrat

yang tidak terlarut. Tingginya aktivitas lipase dalam reaksi hidrolisis membuat enzim ini sering digunakan dalam berbagai jenis industri kosmetik, farmasi, makanan dan minuman (Damaso, 2008). Aktivitas enzim pada umumnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti suhu, pH, jenis substrat dan konsentrasinya, perlu tidaknya ion-ion logam dan konsentrasinya, serta kondisi lainnya yang tergantung dari struktur, sifat fisika kimia dan sumber enzim tersebut diperoleh (Suckling *et al.*, 1998).

2.1.1. Karakterisasi Enzim

2.1.1.1. Enzim Lipase

Lipase (asilhidrolase triasilgliserol, EC 3.1.1.3) merupakan enzim yang mengkatalis hidrolisis dari trigliserida rantai panjang menjadi trigliserida rantai pendek, asam lemak bebas, dan gliserol (Reda *et al.* 2007). Lipase juga terlibat dalam banyak reaksi konversi seperti esterifikasi, transesterifikasi, alkoholisis, asidolisis, dan aminolisis. Banyaknya peran lipase dalam berbagai reaksi membuat enzim ini memiliki banyak kegunaan dalam industri seperti industri makanan, farmasi, tekstil, kertas, dan kosmetik (Ibegbulam-njoku *et al.*, 2014).

Enzim lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis triasilgliserol (trigliserida) untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol (Mingrui *et al.*, 2007). Enzim ini juga digunakan untuk hidrolisis triasilgliserol menjadi diasilgliserol dan asam lemak bebas.

Diasilgliserol adalah ester gliserol digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil produk makanan, kosmetika dan farmasetika (Ling *et al.*, 2007).

Enzim lipase adalah enzim yang bekerja untuk menghidrolisis lemak dan minyak. Berdasarkan fungsi fisiologisnya enzim lipase mempunyai peranan penting menghidrolisis lemak dan minyak menjadi asam lemak dan gliserol yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Enzim lipase ini dapat memecah ikatan ester pada lemak sehingga menjadi asam lemak dan gliserol (Poedjiadi dan Supriyanti., 2007). Menurut Mingrui dkk., (2007) lipase merupakan

kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis triasilgliserol (trigliserida) untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol. Enzim lipase memiliki kemampuan untuk mengkatalisasi reaksi heterogen yang larut maupun tidak larut dalam air. Sifat katalitik enzim lipase lebih luas, sehingga banyak digunakan sebagai biokatalis di berbagai industri seperti agrokimia, farmasi, deterjen, penyamakan, makanan dan industri penghasil surfaktan.

Lipase termasuk enzim hidrolase yang bekerja pada lingkungan air pada ikatan ester karboksil yang terdapat pada triasilgliserol untuk memisahkan asam lemak dan gliserol. Substrat alami untuk lipase adalah triasilgliserol rantai Panjang yang memiliki kelarutan yang rendah di dalam air, dan reaksi ini dikatalisis pada daerah yang berhubungan antara lipid dan air. Di bawah keadaan yang sedikit air, lipase memiliki kemampuan unik, yaitu melakukan reaksi yang sebaliknya, menyebabkan terjadinya esterifikasi, alkoholisis dan asidolisis. Selain lipolisis, lipase juga memiliki aktivitas esterolitik sehingga mempunyai substrat yang banyak . Beberapa jenis mikrobia penghasil lipase antara lain *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium* dan *Pseudomonas*. Lipase yang dihasilkan oleh bakteri *Pseudomonas* paling banyak digunakan untuk aplikasi bioteknologi. Salah satu jenis enzim yang mempunyai peran penting dalam perkembangan bioteknologi adalah enzim lipase. Enzim ini memiliki sifat khusus yaitu memecahkan ikatan ester pada lemak dan gliserol. Selain itu, enzim lipase mempunyai kemampuan mengkatalis reaksi hidrolisis, alkoholisis, esterifikasi, dan interesterifikasi (Dosanjh and Kaur, 2002).

2.1.1.2. Uji Aktivitas Lipase

Penentuan aktivitas lipase dilakukan dengan menggunakan metode *Kwon dan Rhee* modifikasi, yaitu substrat yang digunakan dalam metode ini adalah minyak zaitun. Minyak zaitun sebanyak 1 mL, ditambahkan dengan 1 mL buffer fosfat 0,05M pH 7 dan 1 mL larutan enzim. Campuran ini di vortes selama 10 menit dan selanjutnya diinkubasi pada *waterbath* selama 20 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan larutan 1 mL HCl 6N dan 5 mL heksana. Campuran selanjutnya dikocok kuat dengan menggunakan *vorteks tube* dan lapisan atas diambil sebanyak 4 mL, kemudian ditambahkan 1 mL reagen tembaga (II) asetat dan diaduk 1 menit. Campuran diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 715 nm. Aktivitas lipase diukur pada suhu inkubasi yang bervariasi yaitu 30, 35, 40, 45, dan 50 °C dengan menggunakan inkubator, dan masing-masing variasi diperlakukan sama seperti penentuan aktivitas yang sebelumnya (Yuneta, 2009); (Kwon dan Rhee, 1986). Untuk larutan blanko dibuat sesuai dengan prosedur untuk sampel, tanpa penambahan larutan enzim karena larutan enzim diganti dengan menggunakan aquades (Sana *et al.*, 2004). Pada suhu rendah aktivitas enzim amilase tidak optimal karena energi yang diserap oleh enzim tersebut tidak cukup menghidrolisis substrat sehingga nilai aktivitas enzim tersebut menjadi rendah. Sedangkan ketika suhu terlalu tinggi, enzim akan mengalami denaturasi yaitu terganggunya bagian aktif enzim sehingga kecepatan reaksinyapun menurun (Poedjiadi dan Supriyanti, 2007). Adapun cara penentuan aktivitas lipase dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu:

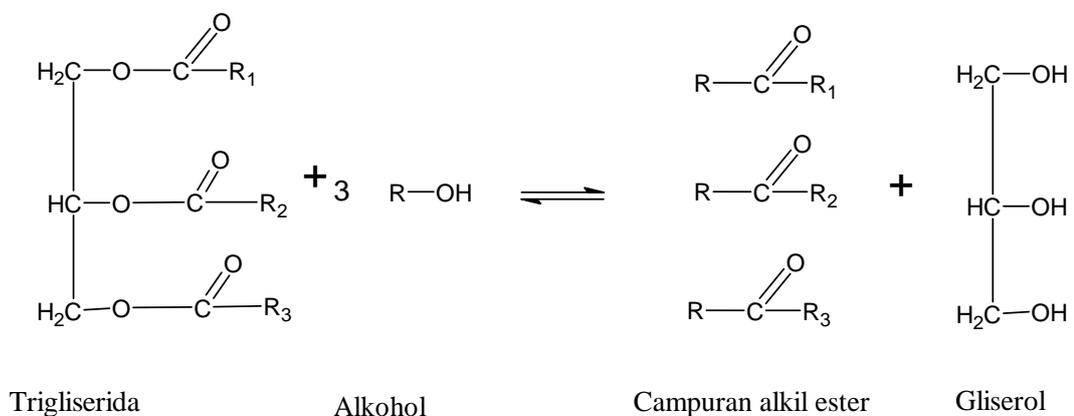
- A. Metode Titrimetri adalah metode penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan larutan basa (KOH atau NaOH) sebagai titran serta phenolphthalein sebagai indikator. Campuran etanol-aseton (1:1) ditambahkan pada larutan untuk menghentikan reaksi.
- B. Metode *Kwon and Rhee* dengan menggunakan substrat yang digunakan dalam metode ini adalah minyak zaitun (Isti'nah *et.al.*,2020).

C. Metode Spektrofotometri penentuan aktivitas lipase dengan menggunakan spektrofotometri perlu penambahan reagen tembaga (II) asetat dan diuji pada panjang gelombang 715 nm. Prinsip reaksinya adalah asam lemak yang dihasilkan dari hidrolisis triasilgliserol akan membentuk senyawa kompleks berwarna biru dengan Cu^{2+} dari tembaga (II) asetat yang dapat diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 715 nm (Sholeha dan Agustini, 2021).

Adapun reaksi yang dapat digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

A. Reaksi Transesterifikasi

Transesterifikasi adalah proses mereaksikan trigliserida yang terdapat pada minyak nabati atau lemak hewani dengan alkohol (umumnya metanol) dan tambahan katalis basa, menghasilkan metil ester asam lemak (biodiesel) dan gliserol (gliserin) sebagai produk samping (Joelianingsih dkk, 2006). Reaksi transesterifikasi trigliserida dengan alkohol dan bantuan katalis berbasis alkali yang menghasilkan produk samping berupa gliserol dengan jumlah kurang lebih 10% dari total volume produk biodiesel (Khayoon and Hameed Inggris Raya, 2011). Berikut mekanisme reaksi transesterifikasi dapat dilihat pada Gambar 1.

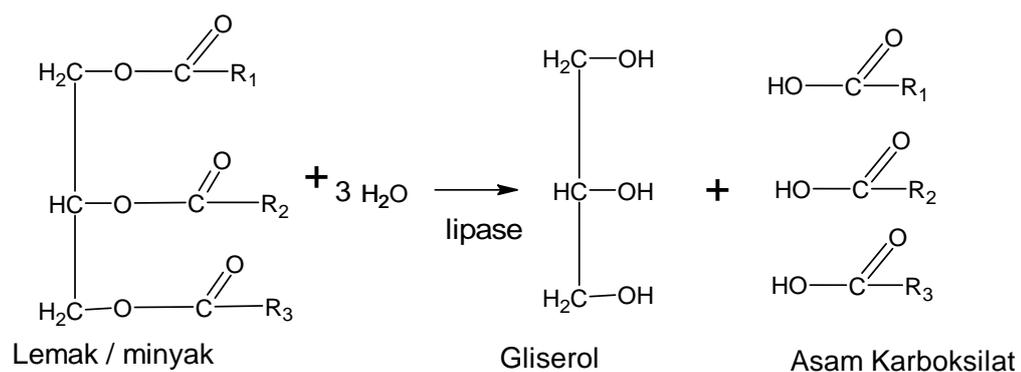


Gambar 1. Reaksi transesterifikasi (Wahyudin, 2018).

B. Reaksi Hidrolisis

Proses hidrolisis ini bertujuan untuk mencari waktu optimum dan meningkatkan konsentrasi enzim (% lipase) terbaik yang akan diaplikasikan untuk proses esterifikasi. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu 40°C. Pada akhir proses hidrolisis, akan terbentuk 2 lapisan, yaitu lapisan atas sebagai asam lemak dan lapisan bawah sebagai gliserol. Salah satu parameter yang menunjukkan tingkat konversi trigliserida menjadi asam lemak adalah angka asam dari produk hidrolisis. Angka asam menyatakan mg KOH yang diperlukan untuk menetralkan 1 g minyak (Moentamaria, 2016). Reaksi hidrolisis minyak sebagian besar menggunakan katalis homogen, misalnya KOH, NaOH, dan lain sebagainya. Katalis homogen berada dalam satu fasa dengan reaktan. Hal ini menyebabkan molekul katalis dan reaktan dapat berinteraksi dengan mudah sehingga reaksi mudah berlangsung. Akan tetapi proses pemisahan katalis dengan produk lebih sulit dibandingkan dengan katalis heterogen (Utami, 2023).

Hidrolisis ester menjadi asam lemak dan triasilgliserol oleh lipase tentunya melewati suatu rangkaian reaksi yang tergabung menjadi sebuah mekanisme hidrolisis oleh lipase. Hidrolisis ester oleh lipase ini melibatkan serangan nukleofilik pertama dari serin pada karbon karbonil ikatan ester, menghasilkan enzim asil kovalen sebagai perantara dan melepaskan alkohol (Sholeha and Agustini 2021). Berikut mekanisme reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.

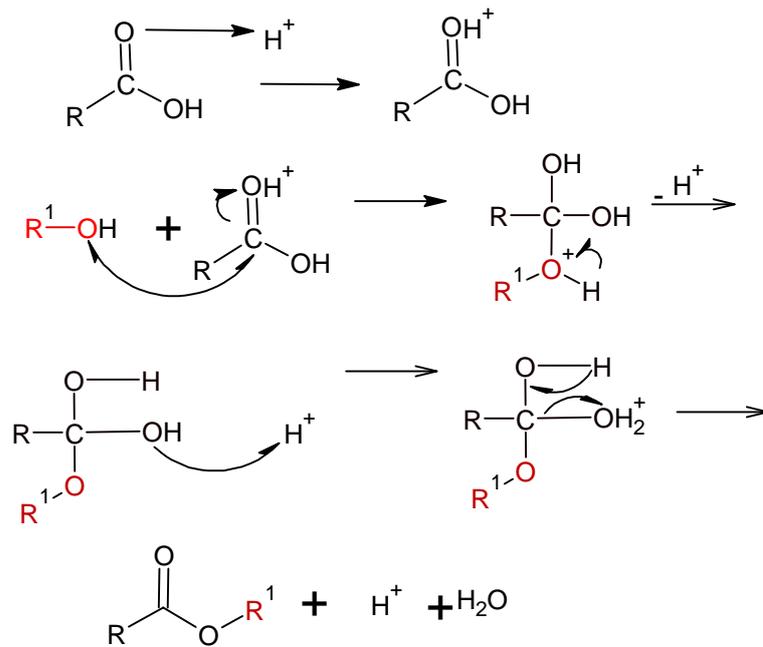


Gambar 2. Reaksi hidrolisis (Hasnisa dan Jumat Salimon, 2008).

C. Reaksi Esterifikasi

Esterifikasi merupakan reaksi untuk membentuk senyawa ester. Ester-ester organik banyak digunakan di industri, yaitu sebagai solven, bahan parfum, bahan aroma buatan, dan prekursor bahan-bahan farmasi. Reaksi esterifikasi merupakan reaksi yang berjalan lambat sehingga membutuhkan katalis untuk menunjang kecepatan reaksi. Maka dari itu banyak penelitian dilakukan untuk mempelajari kinetika reaksi, baik dengan katalis homogen maupun heterogen. Katalis homogen yang biasa digunakan dalam industri adalah asam sulfat. Ion H^+ dari asam sulfat sebagai asam kuat mendorong asam karboksilat untuk terprotonasi sehingga reaksi dapat terjadi. Oleh karena itu asam sulfat memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan katalis heterogen seperti resin atau zeolit. Reaksi esterifikasi adalah reaksi bolak-balik sehingga konversi dibatasi oleh konversi kesetimbangan. Peneliti-peneliti sebelumnya seperti Leyes dan Othmer (1945). Menurut penelitian berikut, proses esterifikasi diawali dengan mencampurkan gliserol dan asam lemak dengan rasio mol 0,94:1 pada suatu reaktor, kemudian ditambahkan katalis metana Sulfonat Asam (MESA) dengan konsentrasi 0,5%. Reaksi esterifikasi ketiga asam lemak sawit dengan gliserol tersebut bersifat bolak-balik karena dikatalisis oleh asam. Katalis asam menyebabkan asam karboksilat mengalami konjugasi (Widiyarti dan Hananfi, 2010). Proses esterifikasi dilakukan pada suhu $180^{\circ}C$ dengan lama waktu reaksi (90, 120, dan 150 menit) dan kecepatan pengadukan sebesar 400 rpm. Gas nitrogen dialirkan secara berkesinambungan untuk menghindari terjadi reaksi oksidasi dan mendorong uap air yang terbentuk ke kondensor sehingga produk yang diperoleh dapat optimal dan proses esterifikasi tetap berjalan ke arah kanan untuk menghasilkan produk, sehingga rendemen senyawa monolaurin yang dihasilkan tinggi. Esterifikasi merupakan reaksi untuk membentuk senyawa ester. Ester-ester organik banyak digunakan di industri, yaitu sebagai solven, bahan parfum, bahan aroma buatan, dan prekursor bahan-bahan farmasi. Reaksi esterifikasi merupakan reaksi yang berjalan lambat sehingga membutuhkan katalis untuk menunjang kecepatan reaksi. Maka dari itu banyak penelitian dilakukan untuk mempelajari kinetika reaksi, baik dengan katalis homogen maupun heterogen. Katalis homogen yang biasa digunakan dalam industri

adalah asam sulfat. Ion H^+ dari asam sulfat sebagai asam kuat mendorong asam karboksilat untuk terprotonasi sehingga reaksi dapat terjadi. Oleh karena itu asam sulfat memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan katalis heterogen seperti resin atau zeolit. Reaksi esterifikasi adalah reaksi bolak-balik sehingga konversi dibatasi oleh konversi kesetimbangan. Peneliti-peneliti sebelumnya seperti Leyes and Othmer (1945). Menurut penelitian berikut, proses esterifikasi diawali dengan mencampurkan gliserol dan asam lemak dengan rasio mol 0,94:1 pada suatu reaktor, kemudian ditambahkan katalis MESA dengan konsentrasi 0,5%. Reaksi esterifikasi ketiga asam lemak sawit dengan gliserol tersebut bersifat bolak-balik karena dikatalisis oleh asam. Katalis asam menyebabkan asam karboksilat mengalami konjugasi (Widiyarti dan Hananfi, 2010). Proses esterifikasi dilakukan pada suhu $180^{\circ}C$ dengan lama waktu reaksi (90, 120, dan 150 menit) dan kecepatan pengadukan sebesar 400 rpm. Gas nitrogen dialirkan secara berkesinambungan untuk menghindari terjadi reaksi oksidasi dan mendorong uap air yang terbentuk ke kondensor sehingga produk yang diperoleh dapat optimal dan proses esterifikasi tetap berjalan ke arah kanan untuk menghasilkan produk, sehingga rendemen senyawa monolaurin yang dihasilkan tinggi. Adapun mekanisme reaksi esterifikasi ketiga asam lemak sawit dengan gliserol yang dikatalisis oleh asam. Pada akhir reaksi esterifikasi, produk gliserol ester yang terbentuk terdiri dari dua lapisan, yaitu lapisan atas merupakan campuran gliserol ester dan lapisan bawah sisa gliserol yang tidak ikut bereaksi. Terbentuknya dua lapisan ini kemungkinan disebabkan karena gliserol yang diumpangkan berlebih dan lama proses esterifikasi yang masih kurang sehingga pada akhir reaksi masih terdapat sisa gliserol yang belum bereaksi. Mekanisme reaksi esterifikasi dapat dilihat pada Gambar 3.



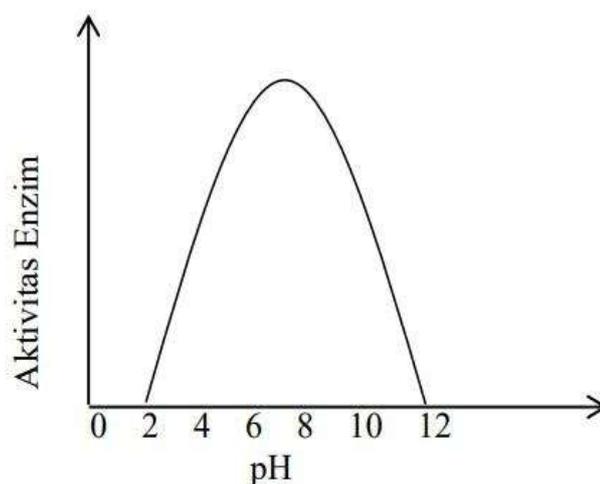
Gambar 3. Reaksi esterifikasi

2.1.1.3. Tingkat Keasaman pH

Tingkat keasaman 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. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Kondisi pH yang jauh dari kondisi spesifik ini akan menyebabkan inaktivasi enzim karena enzim mengalami kerusakan struktur protein (Lehninger, 1995).

Penurunan pH menjadi kondisi asam menyebabkan penurunan aktivitas, begitu juga kenaikan pH menjadi basa dapat menyebabkan struktur enzim menjadi rusak. Kondisi pH yang terlalu rendah mengakibatkan ion H^+ akan berikatan dengan $-NH_3^+$ pada struktur asam amino protein membentuk $-NH_4$. Proses pengikatan tersebut menyebabkan ikatan antara atom nitrogen dengan atom hidrogen lainnya terputus, sehingga enzim terdenaturasi. Kondisi pH tinggi mengakibatkan ion $-OH$ berikatan dengan atom hidrogen dari gugus $COO-$

enzim, membentuk H_2O . Hal tersebut mengakibatkan rusaknya ikatan antara atom hidrogen dengan nitrogen atau oksigen, sehingga struktur enzim mengalami kerusakan (Lehninger, 1995). Optimasi pH dilakukan dengan menggunakan bufer *Tris*-HCl pada pH 5, 6, 7, 8, dan 9. Aktivitas ditentukan pada suhu $37^\circ C$ selama 5 menit. Aktivitas tertinggi berdasarkan uji aktivitas lipase imobil menunjukkan pH optimum lipase. Stabilitas enzim imobil terhadap pH diuji dengan menginkubasi enzim dalam larutan bufer pada berbagai pH (5-10 dengan selang 1) selama 1 jam. Setelah inkubasi, larutan enzim dengan cepat didinginkan dalam wadah berisi es dengan suhu $0^\circ C$ selama 10 menit. Aktivitas enzim yang tersisa diuji dengan reaksi enzimatis lipase pada pH optimum. Nilai aktivitas enzim imobil tersisa dinyatakan dalam persentase dari aktivitas setelah perlakuan dibandingkan dengan kontrol (enzim imobil tanpa perlakuan) (Bintang dkk., 2015). Berikut kurva penentuan pH dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kurva penentuan pH (Kusumaningrum dkk.,2019).

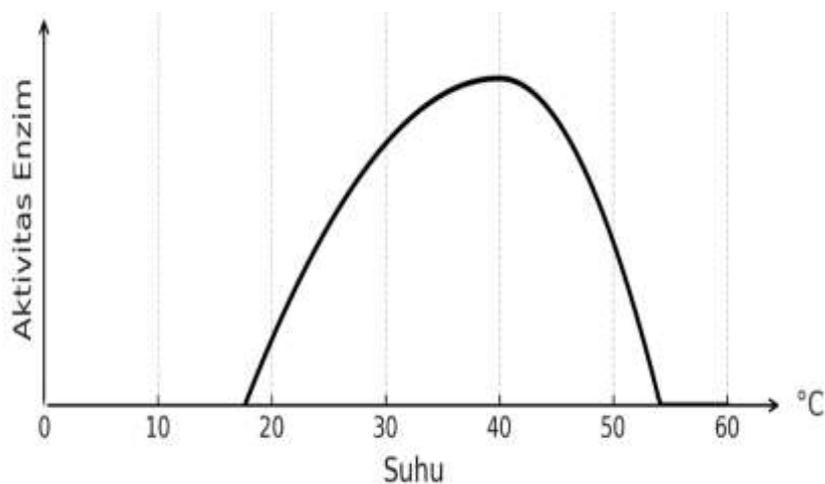
pH merupakan salah satu faktor penting yang harus diperhatikan apabila bekerja dengan enzim, hal ini dikarenakan enzim hanya mampu bekerja pada kondisi pH tertentu saja. Suatu kondisi pH dimana enzim dapat bekerja dengan aktivitas tertinggi yang dapat dilakukannya dinamakan pH optimum. Sebaliknya pada pH tertentu enzim sama sekali tidak aktif atau bahkan rusak. Penentuan pengaruh pH terhadap aktivitas lipase dilakukan pada temperatur $55^\circ C$ menggunakan 50 mM bufer dengan rentang pH dari 6-12. Pengukuran

aktivitas lipase dilakukan sesuai prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999) sistem penyangga yang digunakan meliputi penyangga natrium fosfat (pH 6,0-8,0), dan penyangga glisin NaOH (pH 8,0-11).

2.1.1.4. Suhu

Suhu optimal merupakan suhu yang paling tepat bagi suatu reaksi yang menggunakan enzim (Poedjadi dan Supriyanti, 1992). Suhu berpengaruh terhadap reaksi enzimatik. Peningkatan suhu secara umum akan meningkatkan kecepatan reaksi kimia enzim, tetapi kenaikan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim yaitu berubahnya struktur protein enzim, sehingga menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi yang dikatalisis enzim tersebut (Saropah dkk., 2012). Enzim memiliki kondisi optimal dengan adanya perubahan suhu. Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai pada batas optimalnya, kemudian aktivitas akan menurun setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik (Lehninger, 1995) Perlakuan pH berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas enzim lipase. pH optimum enzim lipase dari biji kakao berkapang adalah pH 6 yaitu 0,107 U/ml. Perlakuan suhu berpengaruh sangat nyata terhadap aktivitas enzim. Suhu optimum enzim lipase dari biji kakao berkapang adalah pada suhu 35°C yaitu 0,102 U/ml (Hutasoit dkk., 2017). Untuk mengetahui suhu optimal kerja enzim imobil. Peningkatan suhu berpengaruh pada peningkatan aktivitas enzim lipase imobil. Ini disebabkan oleh meningkatnya intensitas tumbukan antara enzim imobil dengan substrat minyak zaitun. Pada saat suhu ditingkatkan, aktivitas enzim akan mengalami penurunan yang disebabkan oleh proses denaturasi enzim. Kestabilan enzim imobil terhadap pengaruh suhu tergantung pada kesesuaian matriks dengan enzim dan kandungan gugus-gugus hidrofobik pada asam amino penyusun enzim. Kandungan gugus-gugus hidrofobik menyebabkan molekul enzim membentuk konformasi struktur lebih rapat di dalam larutan dan mudah untuk terikat secara fisik dengan matriks karbon aktif; dengan demikian, matriks

karbon aktif akan melindungi enzim dari putusya ikatan fisik akibat pemanasan (Christianasari dkk., 2014). Dalam penelitian ini, suhu divariasikan mulai dari (30, 35, 40, 45,50, 55, 60, 65, 70°C. Efek temperatur terhadap aktivitas lipase ditentukan dengan mengukur aktivitas enzim pada berbagai suhu dalam rentang 35-85°C. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur tertentu dalam penangas air, dan aktivitas lipase diukur mengikuti prosedur yang dikemukakan oleh Lee dkk. (1999). Pada temperatur tinggi, substrat juga dapat mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif lipase (Suhartono, 1989). Berikut kurva pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 5.



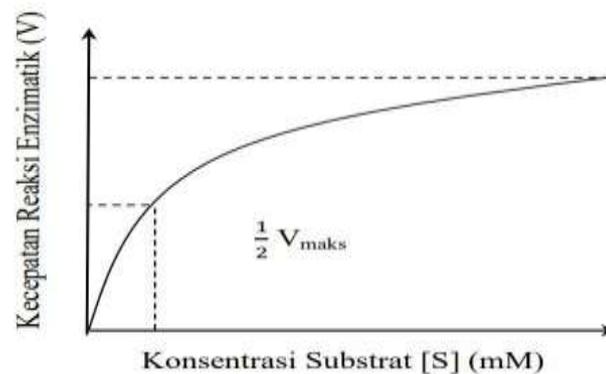
Gambar 5. Pengaruh suhu (Kusumaningrum dkk.,2019).

Seperti halnya perubahan kondisi pH, enzim memiliki kondisi optimal dengan adanya perubahan suhu. Laju reaksi akan meningkat sejalan dengan kenaikan suhu sampai pada batas optimalnya, kemudian aktivitas akan menu run setelah melewati kondisi tersebut karena enzim akan mengalami denaturasi. Suhu yang terlalu rendah akan menyebabkan aktivitas enzim kurang baik. Lipase imobil pada bahan pendukung berupa zeolit, CaCO_3 , silika gel, dan tulang sapi diuji aktivitasnya pada berbagai suhu untuk menentukan suhu optimum, kemudian dibandingkan dengan lipase bebas. Dari hasil percobaan diperoleh suhu optimum lipase bebas sebesar 30°C, hal yang sama juga diperoleh untuk

lipase imobil tulang sapi, silika gel, dan zeolit. Namun pada lipase imobil CaCO_3 diperoleh suhu optimum sebesar 35°C . Secara lengkap pengaruh suhu terhadap stabilitas enzim imobil pada masing-masing bahan pendukung (Bintang, Panji, and Saadah 2015).

2.1.1.5. Konsentrasi substart

Konsentrasi substrat mempengaruhi kerja enzim secara optimal. Dimana naiknya konsentrasi substrat maka 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. Maka dengan demikian konsentrasi kompleks enzim substrat makin besar. Sedangkan pada penambahan konsentrasi substrat yang tinggi akan menyebabkan terjadinya penurunan kecepatan reaksi (Murni *et al.*, 2011). Berikut kurva pada konsentrasi substrat dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Hubungan antara konsentrasi dengan enzim (Hutasoit dkk.,2017).

2.2. Bakteri

Bakteri merupakan salah satu golongan mikroorganisme prokariotik (bersel tunggal) yang hidup berkoloni dan tidak mempunyai selubung inti namun mampu hidup dimana saja (Jawetz *et al.*, 2004). Menurut klasifikasinya

bakteri dibagi menjadi 2 yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Beberapa bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif merupakan flora normal pada tubuh manusia. Flora normal adalah mikroorganisme yang menempati suatu daerah tanpa menimbulkan penyakit pada inang yang ditempati. Pada kulit normal biasanya ditempati sekitar $10^2 - 10^6$ CFU/cm² bakteri (Trampuz dan Widmer, 2004). Ada juga sebagian dari bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif misalnya *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan penyakit jika mencapai jumlah 1.000.000 atau 10^6 per Gram yang merupakan suatu jumlah yang cukup untuk memproduksi toksin (Synder, 1988).

Hasil pewarnaan akan menunjukkan perbedaan dasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga dapat membagi bakteri menjadi 2 kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Jawetz et al., 2004). Pada pewarnaan Gram, golongan bakteri gram positif akan memberikan warna ungu karena memiliki lapisan peptidoglikan setebal 20-80nm sedangkan Bakteri Gram negative memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis yaitu 5-10 nm dengan komposisi utama: lipoprotein, membran luar dan polisakarida (Dali *et al.*, 2012).

2.2.1. *Klebsiella sp*

Genus *Klebsiella* merupakan kelas bakteri Gram-negatif, berkapsul, tidak bergerak, berbentuk batang dan oksidase-negatif. Strain dari genus ini pertama kali diisolasi pada akhir abad ke-19 dan diberi nama oleh Trevisan (1885) untuk menghormati ahli mikrobiologi Jerman Edwin Klebs (1834-1913). *Klebsiella* diklasifikasikan dalam famili *Enterobacteriaceae* yang berisi serangkaian besar genus yang berbeda secara biokimia, termasuk organisme model *Escherichia coli* dan patogen manusia yang terkenal *Salmonella*, *Yersinia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Raoultella*, *Cronobacter*, dll. Genus *Klebsiella* saat ini mencakup keragaman spesies yang luas, termasuk spesies yang termasuk dalam kompleks spesies

K.pneumoniae (KpSC) dan spesies *Klebsiella* lainnya (*K. indica*, *K. terrigena*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. oxytoca*, *K. grimontii*, *K. pasteurii* dan *K. michiganensis*) yang berbagi rata-rata hanya 90% identitas nukleotida dengan KpSC. *Klebsiella* spp. adalah patogen oportunistik yang biasanya ditemukan pada flora hidung, tenggorokan, kulit, dan saluran usus individu yang sehat, tetapi juga dapat menyebabkan berbagai infeksi, termasuk pneumonia, infeksi jaringan lunak dan luka bedah, infeksi saluran kemih, infeksi aliran darah dan sepsis. Genus *Klebsiella* terdiri dari keragaman spesies yang luas, termasuk kompleks spesies *Klebsiella pneumoniae* (KpSC) dan beberapa spesies yang secara genetik lebih jauh. Sebagian besar infeksi yang disebabkan oleh *Klebsiella* spp. disebabkan oleh dua patotipe utama, yaitu klon multi-obat yang resistan (MDR) dan hipervirulen (hv). Galur dari dua cabang tersebut dianggap tidak tumpang tindih karena masing-masing menunjukkan latar belakang genetik yang berbeda. Namun, *Klebsiella* spp. telah menunjukkan kemampuan untuk memperoleh elemen genetik dan mutasi yang memberikan sifat resistensi antimikroba dan/atau virulensi, yang mengarah pada kemunculan klon konvergen, disebut *Klebsiella* spp. yang resistan terhadap banyak obat dan hipervirulen (MDR-hv) .

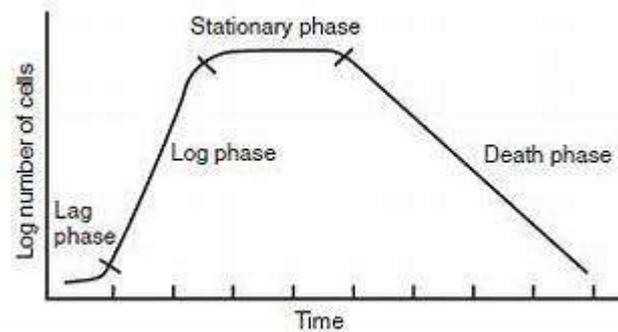
Klebsiella spp MDR-hv secara bersamaan hipervirulen dan resistan terhadap banyak antibiotik, dan diketahui mengalami evolusi lebih lanjut untuk menghasilkan galur-galur baru secara fenotip. Keragaman luas galur MDR-hv *Klebsiella* spp. yang berevolusi melalui berbagai mekanisme telah dilaporkan di berbagai benua di dunia. Meningkatnya jumlah infeksi berat dan meningkatnya keterbatasan dalam perawatan yang efektif menjadikan *Klebsiella* spp. MDR-hv sebagai bakteri super yang nyata yang menimbulkan tantangan serius bagi kesehatan masyarakat. Dalam tinjauan ini, kami memberikan gambaran umum tentang posisi taksonomi dan komposisi spesies *Klebsiella* spp. Berdasarkan informasi terkini, kami mengklasifikasikan *Klebsiella* sp. yang berbeda. klon dengan fenotipe beragam, mengeksplorasi keragaman genetik dan distribusi MDR-hv *Klebsiella* spp. di seluruh dunia, mendeskripsikan mutasi genetik dan peristiwa transfer gen horizontal (HGT) yang mendorong evolusi klon

tersebut, dan mendiskusikan dampak klinis infeksi yang disebabkan oleh strain MDR-hv (Dong *et al.*, 2022).

2.2.2. Fase Pertumbuhan Bakteri

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hasanah dkk., (2020) pertumbuhan suatu bakteri dibagi pada 4 fase berikut:

- A. Fase Adaptasi (*Lag Phase*) merupakan fase saat bakteri tidak mengalami perubahan jumlah sel karena bakteri dalam kondisi penyesuaian pada lingkungan baru. Hal ini juga dapat disebabkan oleh pemindahan bakteri pada media yang baru (Sjofjan & Ardyati, 2011).
- B. Fase Eksponensial (*Exponential Phase*) adalah fase pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan bakteri mulai aktif berkembangbiak dan akan mencapai kondisi optimal pada lingkungan baru. Hal ini juga dapat disebabkan oleh pemindahan bakteri pada media yang baru (Sjofjan dan Ardyati, 2011).
- C. Fase Eksponensial (*Exponential Phase*) adalah fase pertumbuhan bakteri. Hal ini disebabkan bakteri mulai aktif berkembangbiak dan akan mencapai kondisi optimal pada puncak akhir fase eksponensial (Hasanah dkk., 2020). Fase eksponensial pada bakteri *Bacillus* telah dilaporkan mulai terjadi pada waktu 18 jam setelah penanaman (Msarah dkk., 2020).
- D. Fase Tetap (*Stationary Phase*) terjadi ketika pertumbuhan suatu bakteri telah berhenti dan terjadi kesetimbangan populasi sel yang hidup dan jumlah sel yang mati. Hal tersebut dapat disebabkan karena perubahan jumlah nutrisi yang ada di lingkungan media biakan mulai menurun (Hasanah dkk., 2020).
- E. Fase Kematian (*Death Phase*) ditandai dengan banyaknya sel bakteri yang mati. Hal ini disebabkan nutrisi yang ada di lingkungan media biakan mulai habis (Mulyani dkk., 2018). Kurva pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva pertumbuhan bakteri (Gaffar and Mega Suryani 2023).

2.3. Amobilisasi

Imobilisasi enzim menyebabkan satu enzim dapat digunakan berulang kali karena mudah untuk dipisahkan. Imobilisasi bertujuan untuk mendapatkan enzim yang dapat terpisah dari produk dan dapat digunakan kembali setelah melalui proses reaksi katalisis (Susanti dan Febriana, 2017). Imobilisasi merupakan teknik perolehan kembali enzim yang menjadi perhatian dalam beberapa tahun belakangan, dilakukan dengan bantuan bahan pendukung sebagai media yang dapat mencegah terlarutnya enzim. Beberapa macam pendukung seperti zeolit, CaCO_3 , silika gel, dan tulang sapi. CaCO_3 memiliki kemampuan adsorpsi terbesar (99.46%), lebih besar dibandingkan zeolit (90.69%), tulang sapi (91.56%), dan silika gel (59.63%) (Bintang dkk., 2015).

Metode imobilisasi yang umum digunakan, termasuk adsorpsi fisik, penanaman dan pengikatan kovalen, dapat meningkatkan stabilitas dan penggunaan ulang lipase dengan menempelkan atau menahan lipase ke pembawa tertentu seperti kerangka organik kovalen (COF), kerangka organik logam (MOF), pembawa struktur inti-kulit, bahan magnetik, dll. (Dong dkk., 2019); (Feng dkk., 2024); (Yang dkk., 2021); (Zhou dkk., 2016). Meskipun pembawa unik ini dilaporkan sebagian besar meningkatkan stabilitas katalitik lipase, tetapi prosedur yang rumit dan memakan waktu untuk persiapan pembawa menghambat pemanfaatannya dalam skala industri. Sebaliknya, ikatan silang dan

pengikatan kovalen dibandingkan dengan pengikatan kovalen dapat mengubah struktur sekunder lipase untuk memengaruhi efisiensi katalitik, sementara enkapsulasi dapat menghalangi kontak antara enzim dan substrat. Sebaliknya, penyerapan fisik memiliki sedikit pengaruh pada struktur enzim atau menghalangi situs katalitik enzim, sehingga mempertahankan bioaktivitas lipase meskipun stabilitas imobilisasi relatif lebih rendah (Carvalho *et al.*, 2020). Oleh karena itu, kombinasi pembawa yang sesuai dan pendekatan imobilisasi yang tepat merupakan faktor kunci untuk meningkatkan efisiensi dan stabilitas katalitik lipase, tetapi juga meningkatkan prospek aplikasinya (Setyawati dkk., 2022).

2.4. Gliserol

Gliserol ($C_3H_8O_3$) merupakan senyawa golongan alkohol polihidrat dengan tiga buah gugus hidrolisis pada industri asam lemak. Pada industri biodiesel akan dihasilkan gliserol sebanyak 12,5% dari kapasitas produksinya dengan tingkat kemurnian yang masih rendah karena mengandung komponen air dan bahan pengotor lainnya. Gliserol merupakan produk samping dari produksi biodiesel. Untuk meningkatkan nilai ekonominya, gliserol dapat diesterifikasi untuk membentuk gliserol monoasetin. Kegunaan monoasetin sangat banyak untuk keperluan non-makanan seperti pelarut dalam tinta cetak, plasticizer dan bahan baku poliester yang biodegradable, gliserol dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk pembuatan bahan kimia lainnya, antara lain gliserol monoasetat (sering disebut sebagai monoasetin) (Wahyuni *et al.*, 2016).

Gliserol yang telah dimurnikan mengalami perubahan warna dari coklat gelap menjadi kuning kecoklatan. Warna gliserol dipengaruhi oleh warna *Crude Palm Oil* (CPO) sebagai bahan baku biodiesel. *Crude Palm Oil* (CPO) mengandung zat warna alami berupa α dan β -karoten, xantofil, klorofil, dan antosianin yang menyebabkan minyak berwarna kuning, kuning kecoklatan, kehijau-hijauan dan kemerah-merahan. Pigmen berwarna merah jingga atau kuning disebabkan oleh karotenoid yang bersifat larut dalam minyak. Warna

gelap pada gliserol kasar merupakan hasil degradasi zat warna alami dan suhu pemanasan yang tinggi sehingga minyak mengalami reaksi oksidasi (Ketaren, 2008).

2.5. Zeolit

Zeolit merupakan padatan kristal yang telah digunakan secara luas dalam adsorpsi molekul. Zeolit memiliki gugus hidroksil yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan enzim. Selain itu, zeolit memiliki permukaan heterogen yang cocok dengan beberapa sisi adsorpsi enzim (Datta *et al.*, 2013) Secara zeolit merupakan bahan alam yang banyak terdapat di sekitar pegunungan api. Oleh karena itu, sebagian besar wilayah Indonesia yang mengandung batuan atau rempah-rempah gunung api-termasuk juga batuan piroklastik berbutir halus (tuf), merupakan sumber mineral zeolit. Salah satu wilayah Indonesia yang diduga mengandung batuan zeolit adalah di sekitar Ngendut, Slahung, Ponorogo, Jawa Timur. Zeolit alam dapat mengandung lebih dari 50 mineral yang berbeda. Heraldly dkk., (2010), mengemukakan berbagai jenis mineral zeolit yang umum terdapat di alam, diantaranya mordenite, clinoptilolite, phillipsite, chabazite. Adapun Heraldly dkk., (2010) menyebutkan bahwa clinoptilolite adalah salah satu jenis mineral zeolit alam yang biasa digunakan untuk mengurangi logam berat dan ammonia dalam larutan. Mengingat potensi sumber daya alam zeolit di Ponorogo yang ada tersebut karakternya belum banyak diketahui dan agar potensi ini dapat dikembangkan secara optimal maka perlu dilakukan karakterisasi dan aktivasi. Karakter yang dilakukan meliputi komposisi kimia, luas permukaan dan keasaman sedangkan aktivasinya menggunakan asam (Heraldly dkk., 2010).

2.6. Minyak sawit

Minyak nabati merupakan bagian penting dalam diet manusia dan produksinya meningkat dalam satu dekade terakhir karena konsumsi yang

besar (Mohdaly *et al.*, 2017). Menurut Zulkurnain *et al.* (2012), minyak (*edible oil*) banyak digunakan di industri karena nutrisinya dan pengaruhnya terhadap rasa dan aroma produk makanan. Salah satu jenis minyak nabati yang banyak digunakan dalam proses pengolahan makanan adalah minyak sawit. Minyak sawit berasal dari ekstraksi mesokarp buah kelapa sawit (Yustina & Rahayu, 2014), yang dilanjutkan tahap pemurnian dan tahap fraksinasi. Minyak sawit banyak digunakan karena harganya yang murah, tersedia dalam jumlah banyak dan stabilitas terhadap oksidasi yang tinggi (Matthäus, 2007). Data dari oil world (2013) menunjukkan konsumsi minyak sawit pada tahun 2012 adalah 52.1 juta ton. Menurut Valenzuela *et al.*, (2003), minyak sawit banyak digunakan dalam proses penggorengan makanan, selain minyak jagung, minyak biji kapas, minyak kedelai, minyak kanola, minyak wijen dan minyak bunga matahari. Minyak sawit memiliki warna kemerahan alami karena mengandung senyawa beta-karoten. Minyak sawit adalah minyak nabati yang paling banyak diproduksi di dunia (Imoisi *et al.*, 2015).

Produk turunan kelapa sawit seperti minyak sawit merah *Red palm oil* (RPO) belum menjadi perhatian. RPO memiliki beberapa senyawa bioaktif asam lemak jenuh (37.83%), tak jenuh tunggal atau *Monounsaturated Fatty Acids* (MUFA) (36.48%), tak jenuh ganda atau *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA) (9.64%), α -tokoferol dan α -tokotrienol (468 ng/L), linoleate, total karotenoid (2511.13 ppm), β -tokotrienol dan δ -tokotrienol (Lee *et al.*, 2018); (Riyadi *et al.*, 2016). Minyak sawit mentah *Crude Palm Oil* (CPO) diekstraksi baik dengan proses basah atau kering, mengandung senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan, seperti triasilgliserol (TAG), vitamin E, karotenoid, pitosterol, fosfolipid, asam lemak, dan oksidasi lipid produk. *Crude Palm Oil* CPO dapat dimurnikan dengan sentrifugasi dan pengeringan (Tarigan *et al.*, 2022).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2024 sampai Juni 2025 di Laboratorium Biokimia dan dilakukan penentuan kadar gliserol di ruang instrumen 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 Shimadzu 1780, *Laminar Air Flow* (LAF) CURMA model 9005-FL, *shaker Labtech* LSI 1EDAM 97, *waterbath Memmert* W 350, *sentrifuse* 1725010-*Centifuge Cole- Parmer*, inkubator, oven, autoklaf, *hot plate Stuart*, *magnetic stirrer*, neraca analitik, pH meter *Metrohm*, termometer, Erlenmeyer, mikropipet *Dragon Lab*, bunsen, jarum ose, spatula, gunting, corong pemisah, kolom fraksionasi, pompa vakum, pendingin air, buret dan statif, *vorteks*, alat destilasi, tabung sentrifugasi dan alat gelas lainnya.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 koleksi dari Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, zeolit alam lampung yang berasal dari CV Minatama, *Nutrient Agar* (NA) *Merck*, *Nutrient Broth* (NB) *Merck*, *sephadex G-75 Sigma-Al Drich*, minyak zaitun, Tween 80, asam oleat, minyak sawit, HCl, tembaga (II) asetat, BSA (*Bovine Serum*

Albumin) Himedia, ammonium sulfat, buffer fosfat, boraks, KOH, indikator Phenolplatein, pereaksi C, pereaksi D, n-heksana, NaOH, akuades, kapas, tisu, kain kasa, alumunium foil, 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 ke dalam oven selama \pm 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. 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 secara aseptis. Setelah itu, sumbat digunakan untuk menutup mulut tabung. Tabung diposisikan dengan kemiringan 5°. Selama 3 hari, diamkan media di dalamnya hingga siap digunakan (Pretti 2022). Selanjutnya media ini akan digunakan untuk meremajakan bakteri *Klebsiella* sp. LPG172.

C. Pembuatan Media Produksi

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

3.4. Penentuan Kadar Protein dan Aktivitas Enzim Lipase

3.4.1. Penentuan Kadar Protein

Metode *Lowry* ((Lowry *et al.* 1951); (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 ciocelciu diencerkan dengan akuades (1:1) .
- Larutan Standar : Larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) berbagai 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. Kemudian, 0,5 mL pereaksi D ditambahkan dengan cepat, dan campuran dibiarkan selama 10 menit pada suhu kamar. Untuk mengontrol 0,1 mL sampel protein, 0,1 mL akuades diganti dengan 0,1 mL akuades, dan perlakuannya sama seperti untuk sampel. Selanjutnya, serapan

diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda 750$ nm. Untuk menentukan konsentrasi protein digunakan kurva standar BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.4.2. Penentuan Aktivitas Hidrolisis

Metode *Kwon and Rhee* modifikasi yang digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas hidrolisis enzim lipase. Untuk 7 mL enzim, 0,35 atau 3,5 ml bufer 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 divorteks 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 asam oleat dibandingkan dengan absorbansi sampel (Pretti., 2022).

3.5. Peremajaan Bakteri

Isolat bakteri *Klebsiella sp.* LPG172 diambil 1 ose dan digores ke media peremajaan miring dalam tabung secara aseptik, kemudian ditumbuhkan pada pH 7 dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C dan disimpan sebagai isolat stok serta secara berkala diremajakan setiap 1 bulan sekali (Pretti, 2022).

3.6. Produksi Enzim Lipase

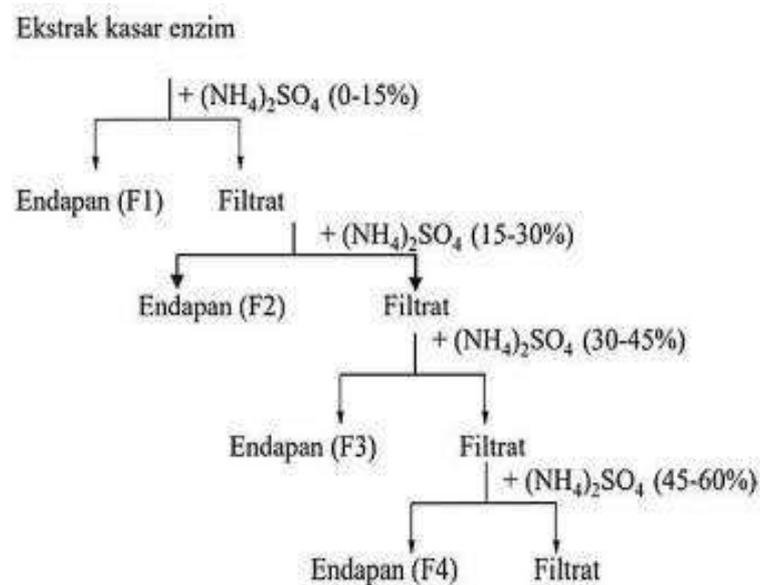
Setelah bakteri diremajakan, 2 ose dari media peremajaan dimasukkan ke dalam 200 mL starter. Kemudian diinkubasi pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 110 rpm dilakukan selama 24 jam. Setelah itu, bakteri dipindahkan ke media produksi. Sebanyak 10% dari volume media produksi bakteri pada media starter dimasukkan ke dalam 1000 mL media produksi dan diinkubasi lagi selama 66 jam. Setelah waktu inkubasi selesai, media produksi disentrifugasi untuk

memisahkan filtrat. Setelah ekstrak kasar enzim digunakan, kadar protein diukur dan aktivitas enzim lipase diuji (Pretti, 2022).

3.7. Pemurnian Enzim Lipase

A. Fraksinasi dengan Amonium Sulfat dan Dialisis

Secara perlahan, ekstrak kasar enzim dan garam ammonium 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 ammonium sulfat. Selanjutnya, endapan yang diperoleh dilarutkan dengan bufer 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. Untuk memurnikan ekstrak kasar enzim, garam ammonium sulfat digunakan untuk fraksinasi pada beberapa derajat kejenuhan, yaitu (0–20); (20–40); (40–60); (60–80); dan (80–100). Kemudian, filtrat dari fraksi kejenuhan 0–20 digunakan untuk diendapkan kembali dengan fraksi kejenuhan (20–40) %. Dengan prosedur yang sama dilakukan hingga fraksi kejenuhan (80-100) % (Pretti, 2022). Skema fraksinasi enzim dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema fraksinasi enzim (Nurlinda, 2024).

Keterangan :

Endapan (F1) : endapan fraksi 1

Endapan (F2) : endapan fraksi 2

Endapan (F3) : endapan fraksi 3

Endapan (F4) : endapan fraksi 4

Setelah dilakukan fraksinasi dengan menggunakan amonium sulfat, endapan protein yang memiliki aktivitas tertinggi dari fraksinasi menggunakan ammonium 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 bufer 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 0,05M dengan pH 7 dan eluen sebanyak dua kali volume tabung kolom. Matriks Sephadex G-75 sebanyak 5 g dilarutkan dalam aquades, dan kemudian distirrer selama 2 jam. Setelah dilakukan selama beberapa menit, terbentuk dua fase: aquades dan gel. Fase aquades 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 bufer fosfat 0,05 M pada pH 7 sebelum dielusi dengan bufer 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).

3.8. Enzim Lipase Terimobilisasi

Imobilisasi enzim lipase dilakukan secara adsorpsi menggunakan zeolit alam yang telah diaktivasi. Sebanyak 7,5 mL enzim lipase ditambahkan dengan 7,5 mL buffer fosfat 0,05 M pH 7 dan 5 g zeolit kemudian dishaker selama 30 menit dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar. Selanjutnya sampel enzim tersebut disentrifugasi selama 5 sampai 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm (Firdaus dkk., 2017).

3.9. Aktivasi Zeolit Alam

Sampel Zeolit alam Lampung yang berasal dari CV Minatama, ditimbang sebanyak 10 g dalam cawan porselen lalu diaktivasi sampel zeolit alam tersebut menggunakan tanur pada suhu 600°C selama 6 jam (Putri, 2018). Sampel zeolit alam kemudian ditimbang kembali dan selanjutnya disimpan dalam desikator. Zeolit yang telah diaktivasi selanjutnya akan digunakan sebagai matriks imobilisasi enzim lipase tersebut.

3.10. Penentuan Kondisi Optimum Enzim Lipase Terimobil

Lipase yang telah terimobil akan dilakukan karakterisasi suhu, dan waktu inkubasi optimum.

A. Penentuan Suhu optimum

Penentuan suhu optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim dan substrat selama 15 menit pada suhu yang bervariasi (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, dan 70°C) dengan prosedur uji aktivitas (Su'I dkk., 2013).

B. Penentuan Waktu Inkubasi optimum

Penentuan waktu inkubasi optimum dilakukan dengan menginkubasi campuran enzim dan substrat dengan suhu dan pH optimum pada prosedur uji aktivitas

menggunakan variasi lama waktu inkubasi (5, 10, 15, 20, 25, dan 30) menit (Susanti, 2011).

C. Penentuan pH optimum

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

3.11. Uji Pemakaian Berulang Enzim Lipase Terimobil

Uji pemakaian berulang lipase imobil dilakukan untuk mengetahui kemampuan lipase imobil ketika dipakai berulang hingga kehilangan 50% dari aktivitas awal (Angsari dan Agustini, 2020). Sebanyak 1 g enzim imobil dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, ditambahkan 1 mL buffer fosfat pH optimum dan 0,70 mL substrat. Campuran diinkubasi pada waktu inkubasi optimum imobil (menit), pada suhu optimum imobil (° C). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Produk hasil imobilisasi diuji aktivitas enzimnya menggunakan metode *Kwon and Rhee* (1986) pada panjang gelombang 746 nm.

3.12. Pemisahan Gliserol

Pada proses hidrolisis digunakan (minyak sawit enzim lipase yaitu (1:1) 500 mL minyak sawit dan 500 mL enzim lipase dimasukkan ke dalam Erlenmeyer lalu di shakeer selama 30 menit. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam corong pemisah kemudian dikocok dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan yang sempurna. Lapisan atas menunjukkan gliserol dan lapisan bawah menunjukkan asam lemak bebas (Nenobahan dkk.,2020).

3.13. Pemurnian Gliserol

Pemurnian gliserol dapat dilakukan dengan menambahkan asam fosfat (H_3PO_4 5%) sampai pH yang diinginkan (2,3,4,5,6,7) ke dalam 100 mL sampel (*crude*

glycerol). Pengukuran pH dilakukan dengan pH meter. Setelah terbentuk tiga lapisan, lapisan gliserol dipisahkan dari lapisan lainnya. Selanjutnya di Analisa kadar gliserolnya, *crude glycerol* yang sudah dipisahkan tadi selanjutnya ditambahkan air dengan perbandingan 2-3, dan karbon aktif (2,5%; 5%; 7,5%; 10%). Karbon-aktif yang digunakan sebelumnya dicuci terlebih dahulu Campuran diaduk selama 30 menit dan dibiarkan selama 2, 6, 12, 24, dan 48 jam. Setelah itu disaring dan dianalisis kadar gliserolnya.

Setelah didapatkan ketiga kondisi optimum tersebut (pH, konsentrasi karbon aktif dan waktu adsorban) selanjutnya pada kondisi tersebut dilakukan pengulangan sehingga didapatkan gliserol yang siap untuk diuapkan kandungan airnya. Sampel dimasukkan ke dalam *rotary evaporator*, dimana sebelumnya sudah di set kondisinya pada tekanan vakum dan suhu 60°C. Produk bawah yang merupakan gliserol-di-ukur-kadarnya (Aziz dkk., 2008).

$$\text{Produk pemisahan} = \frac{5\% \times \text{Volume Gliserol kasar}}{\text{Konsentrasi Asam Fosfat}} \dots\dots\dots(1).$$

3.14. Uji Kualitatif Gliserol

Pada tahapan selanjutnya, dilakukan uji kualitatif gliserol untuk membuktikan adanya gliserol pada produk hasil hidrolisis, uji yang dilakukan ialah uji Dunstan.

A). Uji Dunstan

Uji Dunstan dilakukan dengan melarutkan 1 gram boraks dalam 100 mL akuades sampai tanda tera lalu larutkan 1 gram indikator PP pada 100 mL akuades sampai tanda tera. Setelah itu campurkan 1 mL larutan boraks dengan 1 mL indikator PP homogenkan lalu akan terbentuk kompleks berwarna merah muda, setelah itu campurkan dengan sampel (gliserol kasar, gliserol murni, enzim, asam lemak bebas, minyak komersial dan sisa minyak hasil pemurnian) amati perubahan yang terjadi (Dunstan, *et al.*, 2011).

3.15. Uji kuantitatif gliserol

Pada tahap selanjutnya, dilakukan uji kuantitatif gliserol, dimana dilakukan pengukuran tingkat keasaman dari sampel gliserol dengan beberapa sampel pebanding dan dilakukan juga penentuan bilangan asam dengan menggunakan KOH untuk mengetahui angka asam yang terdapat pada sampel gliserol.

A). Penentuan pH

Pada tahap selanjutnya yaitu uji fisikokimia. Uji fisikokimia ini berupa pengukuran tingkat keasaman (pH) larutan, dimana larutan yang sudah di uji dunstan dan ditambahkan dengan sampel di uji tingkat keasaman menggunakan pH meter agar diketahui pH dari masing-masing larutan (Dunstan, *et al.*, 2011).

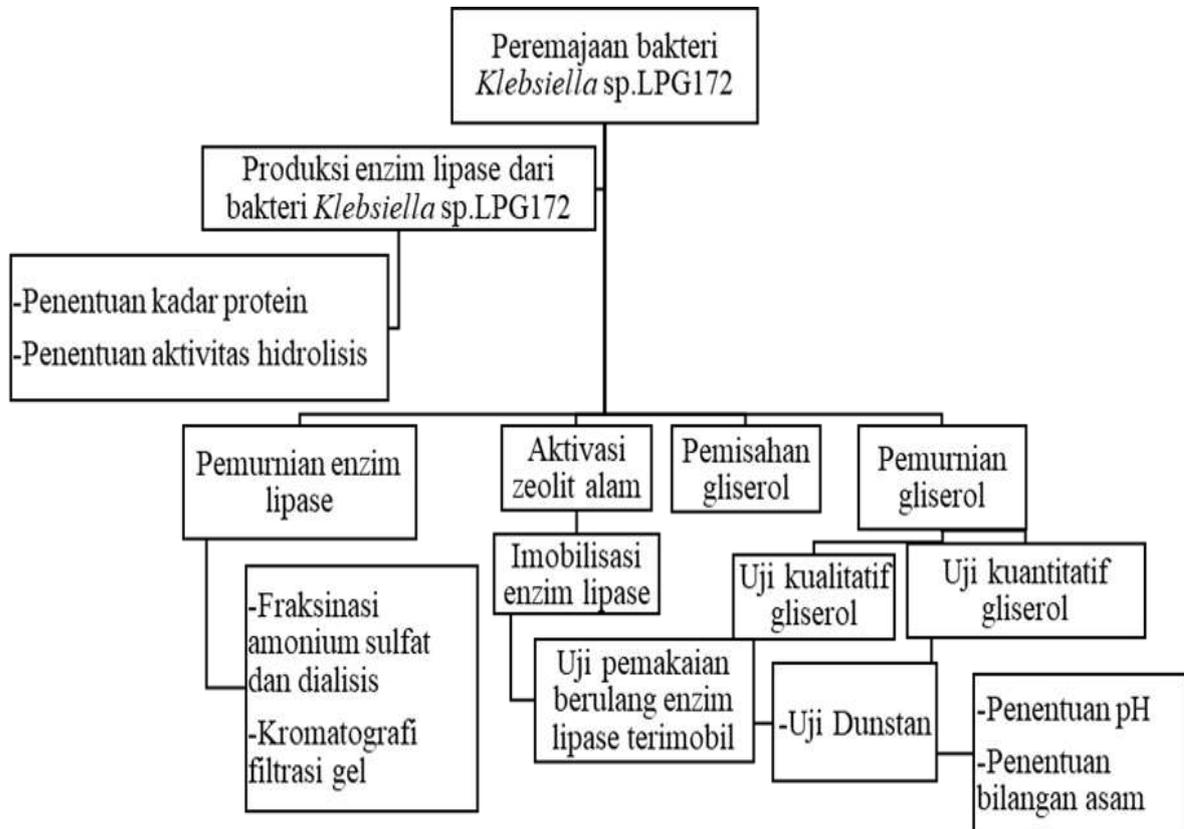
B). Penentuan Bilangan Asam

Pada tahap penelitian selanjutnya, dilakukan penentuan bilangan asam dengan tujuan mengukur aktivitas enzim lipase semakin tinggi bilangan asam, semakin banyak *Free Fatty Acid* (FFA) yang terbentuk dari hidrolisis trigliserida serta menentukan efektivitas imobilisasi enzim melalui perbandingan bilangan asam pada berbagai siklus penggunaan enzim. Pada penentuan bilangan asam ini, dilakukan pengujian dengan beberapa sampel yaitu gliserol kasar, gliserol murni, minyak sawit komersial, minyak sisa pemurnian, asam lemak bebas dan enzim. Dimana timbang sampel sebanyak 5 g lalu dimasukkan sampel tersebut ke dalam Erlenmeyer 250mL ditutup rapat menggunakan alumunium foil lalu ditambahkan 25 mL etanol 95%. Setelah itu inkubasi semua sampel pada *waterbath* sekitar 15 menit. Setelah 15 menit, tambahkan 2-3 tetes indikator PP. Lalu dititrasi dengan menggunakan KOH 0,1 N hingga tercapai warna merah muda yang akan hilang selama 30 menit (Fitri, 2019).

$$\text{Bilangan asam} = \frac{\text{Volume KOH (mL)} \times \text{Normalitas KOH} \times \text{Berat Molekul KOH}}{\text{Berat sampel (g)}} \dots\dots\dots(2).$$

3.16. Skema Penelitian

Berikut adalah skema yang dilakukan pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Skema penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

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

1. Enzim lipase yang dihasilkan dari bakteri *Klebsiella* sp.LPG172 dilakukan tahap pemurnian seperti fraksinasi ammonium sulfat dan dialisis memiliki aktivitas unit pada reaksi hidrolisis sebesar 48,14 U/mL pada minyak sawit komersial dan 62,16 U/mL pada minyak zaitun, sedangkan pada pemurnian kromatografi filtrasi gel memiliki nilai aktivitas unit sebesar 267,88 U/mL dan 227,87 U/mL pada minyak zaitun.
2. Enzim lipase dari bakteri *Klebsiella* sp. LPG172 berhasil diimobilisasi dengan substrat minyak sawit komersial pada zeolit alam. Kondisi optimum dicapai pada pH 8, suhu 50°C, dan waktu inkubasi 15 menit, dengan aktivitas tertinggi sebesar 550,62 U/mL pada siklus kedua. Enzim lipase terimobilisasi dengan zeolit alam dapat dilakukan pemakaian 4 kali dengan sisa aktivitas 40 % dari enzim bebasnya.
3. Pada pemisahan gliserol didapatkan 2 fasa dimana fasa atas ialah gliserol kasar dan fasa bawah ialah asam lemak bebas. Pada pemurnian gliserol menunjukkan hasil pH 1 dan bilangan asam 0,71–0,92 mg KOH/g, menunjukkan tingkat kemurnian yang baik.
4. Pada uji kualitatif gliserol, diketahui pada uji Dunstan lipase amobil menghasilkan gliserol dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibanding

lipase bebas, menunjukkan potensi aplikasi lipase amobil yang lebih unggul dalam proses hidrolisis trigliserida secara biokatalitik.

5.2. Saran

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

1. Disarankan pada penelitian selanjutnya pada tahap pemurnian enzim lipase dilakukan pemurnian secara bertahap dan pada penentuan aktivitas hidrolisis lipase diperhatikan untuk jumlah reagen yang akan digunakan dan masa simpan dari enzim lipase.
2. Disarankan pada saat pemurnian gliserol dilakukan uji kuantitatif gliserol menggunakan beberapa instrumen dan uji kualitatif gliserol lainnya untuk dapat mengetahui karakterisasi dari gliserol hasil dari hidrolisis enzim lipase.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel, Hafez, L. J., Elariny, E. Y. T., Ibrahim, A. E., and Abdel-Haliem, M. E. F. 2025. L-glutaminase synthesis by *Klebsiella pneumoniae* (AS KP 23) isolated from clinical strain, and its efficacy against human hepatocellular and breast cancer cell lines. *BMC Microbiology*, 25(1), 62.
- Aidha, N. N. 2013. Aktivasi Zeolit Secara Fisika dan Kimia Untuk Menurunkan Kadar Kesadahan (Ca dan Mg) Dalam Air Tanah. *Jurnal Kimia Dan Kemasan*, 35(1), 58.
- Ali, C. H., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., Gu, J. D., and Mu, B. Z. 2015. Significant enhancement of *Pseudomonas aeruginosa* FW_SH-1 lipase production using response surface methodology and analysis of its hydrolysis capability. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 52, 7–13.
- Ansari, S. A., and Husain, Q. 2012. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 512–523.
- Arsyad, A., Sulistyono, H., dan Sarto, D. 2015. Kinetika Reaksi Esterifikasi Gliserol Monoacetin dari Gliserol Hasil Samping Industri Biodiesel dan Asam Asetat dengan Katalisator Lewatit Monoplus s-100. *Jurnal Rekayasa Proses*, 9(2), 51–57.
- Aye, N. N., Thu, M. K., and Oo, W. L. 2023. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase Enzyme from Banana Peels (*Musa acuminata* Simmonds) XXI(1), 1–8.
- Aziz, I., Fadhillah, N. H. B., dan Hendrawati, H. 2017. Penggunaan H-Zeolit dan Tawas dalam Pemurnian *Crude Glycerol* dengan Proses Adsorpsi dan Koagulasi. *Jurnal Kimia valensi*, 3(1), 35–43.
- 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).

- Aziz, Z., Nurhidayati, L., Abdillah, S., Yuliana, N. D., dan Simanjuntak, P. 2020. Optimasi dan Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Menetapkan Kadar Asam Klorogenat dalam Ekstrak Etanol Daun Yakon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson). *Alchemy Jurnal Penelitian Kimia*, 16(1), 67.
- Baehaki, A., Suhartono, M. T., Palupi, N. S., dan Nurhayati, D. T. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa* [Purification and Characterization of Protease from Pathogenic Bacteria *Pseudomonas aeruginosa*]. *Hasil Penelitian Jurnal. Teknol. Dan Industri Pangan*, XIX (1), 80–87.
- Bharathi, D., Rajalakshmi, G., and Komathi, S. 2019. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 898–901.
- Bintang, M., Panji, T., dan Saadah, S. 2015. Immobilization of *Rhizopus oryzae* Lipase on Zeolit, CaCO₃, Silica Gel, and Cow Bone. *Current Biochemistry*, 2(2), 63–72.
- Cao, L. 2005. *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Wiley-VCH. ISBN: 9783527312104.
- Dali, S. D., Patong, A. R., Jalaluddin, M. N., dan Parenrengi, P. A. 2012. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Aspergillus oryzae* pada Kopra Berjamur. *Jurnal Natur Indonesia*, 14(1), 26.
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W. C., Zhang, R., and Chen, S. 2022. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 79, 103998.
- Dunstan, W. R. 1901. The formation of complexes between polyhydric alcohols and boric acid. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 79, 506–511.
- Fakhry, M. N., dan Rahayu, S. S. 2016. Pengaruh Suhu pada Esterifikasi Amil Alkohol dengan Asam Asetat Menggunakan Asam Sulfat sebagai Katalisator. *Jurnal Rekayasa Proses*, 10(2), 64.
- Firdaus, F., Dali, S., dan Rusman, H. J. 2017. Imobilisasi Enzim Lipase Dedak Padi (*Oryza Sativa* L.) Pada Karbon Aktif: Karakterisasi, dan Uji Stabilitas Kerja Enzim Imobil. *Indonesian Journal of Chemical Research*, 5(1), 32–36.
- Fitri, A. S., dan Fitriana, Y. A. N. 2020. Analisis Angka Asam pada Minyak Goreng dan Minyak Zaitun. *Sainteks*, 16(2), 115–119.

- Fitri, P. N., Nurjanah, S., dan Widyasanti, A. 2019. Pemurnian Dan Karakterisasi Gliserol Hasil Samping Produksi Biodiesel Kemiri Sunan. *Prosiding Simposium Nasional Multidisiplin (SinaMu)*, 1.
- ffar, A., dan Mega Suryani, E. 2023. Bakteriofag Dan Aplikasi Dalam Mengendalikan Bakteri Patogen Untuk Meningkatkan Keamanan Pangan. *Bioma*, 18(2), 42–48.
- Gunstone, F. D., Harwood, J. L., and Dijkstra, A. J. 2007. *The Lipid Handbook* (3rd ed.). CRC Press. ISBN: 9780849396885.
- Herald, E., SW, H., and Sulistiyono, S. 2010. Characterization and Activation of Natural Zeolit From Ponorogo. *Indonesian Journal of Chemistry*, 3(2), 91–97.
- Holderman, M. V., De Queljoe, E., dan Rondonuwu, S. B. 2017. Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator Di Salah Satu Pusat Perbelanjaan Di Kota Manado. *Jurnal Ilmiah Sains*, 17(1), 13.
- Hutasoit, N., Ina, P. T., dan Permana, I. D. G. M. 2017. Optimasi pH dan suhu pada aktivitas enzim lipase dari biji kakao (*Theobroma cacao* L.) berkapang. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 5(2), 95–102.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(2), 1.
- Ismail, A. R., and Baek, K. H. 2020. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1624–1639.
- Isnaeni, N. 2021. Review Development and Validation of Analytical Method for Mono, Di and Triacetin Analysis by HPLC/UV-Vis/DAD Detection with ¹³C NMR Identification.” January.
- Kazanci, H. Ö. 2023. Sains pengklasifikasi dalam budidaya perikanan. *Jurnal Universitas King Saud*.
- Kazemi, M., and Azizi, N. 2020. A comprehensive review on chemical and physical methods for the purification of crude glycerol produced by biodiesel industries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109487.
- Kusumaningrum, A., Wayan Gunam, I. B., dan Mahaputra Wijaya, I. M. 2019. Optimasi Suhu dan pH terhadap Aktivitas Enzim Endoglukanase Menggunakan Response Surface Methodology (RSM) *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*, 7(2), 243.

- Listyawati, A. F. 1978. Pola Pertumbuhan *Pseudomonas sp.* dengan Menggunakan Variasi konsentrasi D-glukosa dalam Media Pertumbuhan terhadap Waktu Inkubasi Growth Pattern of *Pseudomonas sp.* *Media Against Incubation Time*. 2071(2), 29–32.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., and Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463.
- McMurry, J. 2012. *Organic Chemistry* (8th ed.). Brooks/Cole Cengage Learning. ISBN: 9780840054531.
- Mohan, H., Mitha, M., and Shakiladevi, V. 2024. Extraction, purification and Characterisation of Lipase from *Ricinus communis*. 12(3), 11–15.
- Nanda, M. R., Yuan, Z., Qin, W., Poirier, M. A., and Xu, C. C. 2014. Purification of crude glycerol using a new combined process of chemical treatment and adsorption. *Fuel*, 128, 331–337.
- Natasha, N.C., Asyifa, D., Irawati, W., Iftikhar, S., and Putri, R. 2012. Energy and Environmental Biotechnology. Proceedings of the 5th Indonesia Biotechnology Conference.
- Nurlinda, B M. 2024. Imobilisasi Enzim Lipase dari Bakteri *Pseudomonas sp.* LPG171 dengan Matriks Zeolit Alam Teraktivasi. Oleh Isolat Bakteri *Klebsiella sp.* Lpg172 pada Produksi Biodiesel. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Panji, T., Dimawarnita, F., Kresnawaty, I., Saadah, S., Aminingsih, T., dan Miranti, M. 2019. Gliserolisis enzimatik *Crude Palm Oil* (CPO) dengan lipase amobil untuk produksi diasil dan monoasil gliserol (Enzymatic glycerolysis of CPO using immobilized lipase for production of diacyl- and monoacyl glycerol). *E-Journal Menara Perkebunan*, 87(1), 11–19.
- Partini. 2023. Pengaruh Rasio Molar Minyak dengan Metanol terhadap Aktivitas Transesterifikasi Menggunakan Katalis Enzim Lipase yang Dihasilkan
- Poerwadi, B., Miranda, F., Arini, D., Oktavian, R., dan Zulhijah, R. 2017. Sintesis Adsorben Zeolite Alam Aktif Dengan Bantuan Microwave Untuk Adsorpsi CO_2 . *Jurnal Rekayasa Bahan Alam Dan Energi Berkelanjutan*, 1(1), 1–7.
- Pramiadi, D., Yulianti, E., dan Rakhmawati, A. 2014. Isolasi dan uji aktivitas enzim lipase termostabil dari bakteri termofilik pasca erupsi Merapi. *Jurnal Sains Dasar*, 3(1), 9–19.

- Prasetyo AE, Widhi A, Widayat W. 2012. Potensi Gliserol Dalam Pembuatan Turunan Gliserol Melalui Proses Esterifikasi. *J Ilmu Lingkung.*;10(1):26.
- Prasetyo, A. E., Widhi, A., dan Widayat, W. 2012. Potensi Gliserol Dalam Pembuatan Turunan Gliserol Melalui Proses Esterifikasi. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 10(1), 26.
- Pratiwi A, Manurung AF, Sumitra J. 2020. Penetapan Kadar Vitamin C pada Kulit Pisang (*Musa paradisiaca*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Visible 2018. *J Farm*;2(2):56-62.
- Pratiwi, D., Sebayang, F., dan Jamilah, I. 2013. Produksi dan Karakterisasi Enzim Lipase dari *Pseudomonas Aeruginosa* dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung Serta Kofaktor Na⁺ dan Co²⁺. *Jurnal Sainia Kimia*. 1(2):1- 5.5.
- 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. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Purwati A, Eko Pambudi P, handajadi W, T. 2015. Ampas Tebu Sebagai Bahan Bakar Alternatif Pada Pusat Listrik Tenaga Uap (Pltu) “*Bagasse as an Alternative Fuel in Steam Power Plants.*” *J Elektr.*2(1):1-13.
- Putri, R., dan Rahmiati, R. 2022. Kelayakan masker wortel (*Daucus carota* L.) untuk perawatan kulit wajah kering. *Jurnal Tata Rias dan Kecantikan*, 3(1), 23.
- Putri, Z. E. 2018. Pemanfaatan jaringan sosial dalam pengembangan usaha oleh pelaku UMKM (Studi kasus: 8 pelaku UMKM pada sentra makanan rendang di Kelurahan Sungai Durian, Kecamatan Lamposi Tigo Nagari, Kota Payakumbuh). *JSSH (Jurnal Sains Sosial dan Humaniora)*, 2(1), 1.
- Radetyo, I. 2016. Pemisahan Albumin Kasar (*Crude Albumin*) Serum Manusia Menggunakan Kromatografi Filtrasi Gel Sephadex G-100 Iqbal *Radetyo Program Studi Kimia*.
- Ratnayani, K., Laksmiwati, A. A. I. A. M., dan Sudiarto, M. 2015. Penentuan Laju Reaksi Maksimum (V_{maks}) dan Konstanta *Michaelis-Menten* (KM) Enzim Lipase Pankreas pada Substrat Minyak Kelapa, Minyak Sawit, dan Minyak Zaitun. *Kimia*, 93–97.
- Rios, N. S., Pinheiro, B. B., Pinheiro, M. P., Bezerra, R. M., dos Santos, J. C. S., and Barros Gonçalves, L. R. 2018. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochemistry*, 75, 99–120.

- Rosydiati. 2019. Karakterisasi puncak kromatogram dalam *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) terhadap perbedaan fase gerak, laju alir, dan penambahan asam dalam analisis *Indole Acetic Acid* (IAA). *Kandaga*, 1(2), 65–73.
- Said, M., Prawati, A. W., dan Murenda, E. (1995). Adsorpsi Larutan Iodium. *15*(4), 50–56.
- Salimon, J., Abdullah, B. M., and Salih, N. 2012. Physicochemical Properties of Malaysian Industrial Crude Glycerin and Its Derivatives. *Bioresources*, 7(1), 106–113.
- Sana, N. K., I. H., E. M. H., and R. K. S. (2004). Identification, Purification and Characterization of Lipase from Germinating Oil Seeds (*Brassica napus* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2), 246–252.
- Savitri, N. H., Nur Indiasuti, D., and Wahyunitasari, M. R. (2019). Inhibitory activity of *Allium Sativum* L. extract against *Streptococcus Pyogenes* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Journal of Vocational Health Studies*, 03, 72–77.
- Setyawati, A., Suyatma, N. E., dan Budi, F. S. 2022. Imobilisasi enzim untuk menurunkan kadar laktosa. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*, 41(2), 130.
- Sheldon, R. A., and van Pelt, S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223–6235.
- Sholeha, R., dan Agustini, R. 2021. Lipase Biji-Bijian Dan Karakteristiknya. *Unesa Journal of Chemistry*, 10(2), 168–183.
- Suartama, I. P. J. D. A., Wirajana, I. N., dan Putra, A. A. B. 2021. Penentuan Induser Media Pertumbuhan, Suhu Dan Konsentrasi Ion Kalsium Optimum Lipase Dari Mikroba Lipolitik Tanah Hutan Mangrove Pantai Suwung Kauh Bali. *Jurnal Kimia*, 15(1), 115.
- Sulistiyani, M., Huda, N., Prasetyo, R., Alauhdin, D. M., and Abstrak, I. A. 2023. Calibration of Microplate Uv-Vis Spectrophotometer for Quality Assurance Testing of Vitamin C using Calibration Curve Method. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 12(2), 208–215.
- Suryani, P. E. 2021. Aplikasi Metode Aktivasi Secara Kimia dan Fisika, Pada Zeolit Alam Sebagai Penejrap Logam Dalam Proses Pemurnian Air. *Simetris*, 15(2), 5–7.
- Suyono, Y. 2011. *Pseudomonas* pada tanah yang terindikasi. 01, 8–13.

- Tarigan, I. L., Nelson, Nuralang, dan Ananda, H. D. 2022. Pengembangan Produk Kelapa Sawit Merah Sebagai Sumber Pangan Fungsional Dan Nutrasetikal. *Jurnal Khazanah Intelektual*, 6(2), 1409–1427.
- Taufik, M., dan Seftiono, H. 2018. Karakteristik Fisik dan Kimia Minyak Goreng Sawit Hasil Proses Penggorengan dengan Metode *Deep-Fat Frying*. *Jurnal Teknologi*, 10(2), 123–130.
- Thangaraj, B., and Solomon, P. R. 2019. Immobilization of Lipases. A Review. Part I: Enzyme Immobilization. *ChemBioEng Reviews*, 6(5), 157–166.
- Utami RM. Pengoptimalan Kondisi Aktivitas Transesterifikasi Lipase dari Bakteri *Klebsiella* sp. untuk Produksi Biodiesel. *Skripsi Jur Kim Fak Mat dan Ilmu Pengetah Alam Universitas Lampung Bandar Lampung*.
Published online 2023
- Wahyuni, S., Hambali, E., Tua, B., Marbun, H. Program Teknologi, S., Sawit, P., Kampar, P., Surfaktan, P., Bioenergi, D., dan Pertanian Bogor, I. 2016. Esterifikasi Gliserol Dan Asam Lemak Jenuh Sawit Dengan Katalis Mesa. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*, 26(3), 333–342.
- Wardana, D., Ramadhan, A., Fitri Amne, D. P., and Eddiyanto, E. 2019. Utilization of Glycerol from Used Oil as an Ester Glycerol Surfactant. *Indonesian Journal of Chemical Science and Technology (IJCST)*, 2(2), 111.
- Wiyantoko, B., Novi Andri, P., dan Anggarini, D. 2017. Pengaruh Aktivasi Fisika pada Zeolit Alam dan Lempung Alam terhadap Daya Adsorpsinya. *Jurusan Kimia FMIPA UM, November*, 124–126.
- Yao, Y., Wang, M., Liu, Y., Han, L., and Liu, X. 2020. Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment. *Food Chemistry*, 302, 125199.
- Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W., and Liu, D. 2015. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 44, 182–197.
- Zulaika, A., Rahman, H., Ningrum, S. S., and Maulida, A. F. 2024. Exploring microbial lipases: Screening and identification for biocatalyst potential in bioethanol synthesis from glycerol-based biodiesel waste. *Results in Engineering*, 23(November 2023).