



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PEMANFAATAN *WHOLE CELL* CANDIDA RUGOSA SEBAGAI  
BIOKATALIS UNTUK SINTESIS BIODIESEL MELALUI RUTE NON -  
ALKOHOL**

**SKRIPSI**

**MIRZA AKBAR MAULANA**

**0806368042**

**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA  
DEPOK  
2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PEMANFAATAN *WHOLE CELL Candida rugosa* SEBAGAI BIOKATALIS  
UNTUK SINTESIS BIODIESEL MELALUI RUTE NON - ALKOHOL**

**SKRIPSI**

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Teknik**

**MIRZA AKBAR MAULANA**

**0806368042**


**DEPARTEMEN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNIK UNIVERSITAS INDONESIA**

**DEPOK**

**2012**

**HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS**

**Skripsi Ini Adalah Hasil Karya Saya Sendiri, Dan Semua Baik Yang Dikutip  
Maupun Dirujuk Telah Saya Nyatakan Dengan Benar**

**Nama** : MIRZA AKBAR MAULANA  
**NPM** : 0806368042  
**Tanda Tangan** :   
**Tanggal** : 4 Januari 2012



**HALAMAN PENGESAHAN**

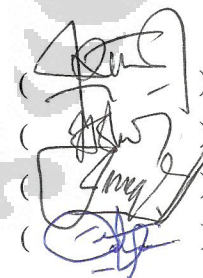
Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Mirza Akbar Maulana  
NPM : 0806368042  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul Skripsi : Pemanfaatan *Whole cell Candida rugosa*  
Sebagai Biokatalis Untuk Sintesis Biodiesel  
Melalui Rute Non – Alkohol.

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan dewan penguji dan diterima sebagai persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar sarjana teknik pada program studi teknik kimia fakultas teknik Universitas Indonesia**

**Dewan Penguji**

Pembimbing : Ir. Rita Arbianti, M. Si  
Penguji : Dr. Heri Hermansyah, ST.M.Eng  
Penguji : Dr.Eng. Muhammad Sahlan, M.Eng  
Penguji : Prof. Dr. Ir. Slamet, MT



Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 18 Januari 2012

**Universitas Indonesia**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Allah SWT karena atas berkat dan rahmat-Nya tugas seminar ini dapat terselesaikan tepat pada waktunya. Dalam penyusunan makalah seminar ini, penulis banyak mendapat bantuan, bimbingan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Widodo Wahyu Purwanto, DEA selaku Ketua Departemen Teknik Kimia FTUI.
2. Ibu Ir. Rita Arbianti, M.Si selaku dosen pembimbing dalam tugas ini. Terima kasih atas segala bantuan serta diskusinya.
3. Bapak Dr. Heri Hermansyah, ST, M.Eng selaku kepala team reserch bioproses. Terima kasih atas segala bantuannya.
4. Ibu Ir. Dianursanti M.T. selaku Kepala Laboratorium Bioproses.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Anondho Wijanarko, M.Eng, Dr. Eng. Muhamad Sahlan, S.Si, M. Eng, Ibu Tania Surya Utami, S.T., M.T. atas dukungan moril dan semangat yang diberikan.
6. Orang tua tercinta yang telah memberikan kasih sayang, perhatian, doa, dan dukungan setiap saat.
7. Teman-teman lab Bioproses yang telah banyak memberikan dukungan selama ini, Daudi, Indri, Merisa, Nadia, Dara, Mita, Sarah, prima, Nindya, Viza, Ius, syifa, destia, terima kasih.
8. Pihak-pihak lainnya yang membantu yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan.
9. My friend of misery Edilberd Napitupulu, terima kasih telah berbagi penderitaan bersama.

Depok, Januari 2012

Mirza Akbar Maulana  
0806368042

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai civitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mirza Akbar Maulana  
NPM : 0806368042  
Program Studi : Teknik Kimia  
Departemen : Teknik Kimia  
Fakultas : Teknik  
Jenis Karya : skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-eksklusif ( *Non-Exclusive Royalty free right* )** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**“PEMANFAATAN *WHOLE CELL Candida rugosa* SEBAGAI  
BIOKATALIS UNTUK SINTESIS BIODIESEL MELALUI RUTE  
NON-ALKOHOL”**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya tanpa meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada Tanggal : 4 Januari 2012

Yang menyatakan

  
( Mirza Akbar Maulana )

## ABSTRAK

Nama : Mirza Akbar Maulana  
Program Studi : Teknik Kimia  
Judul : Pemanfaatan *Whole cell Candida rugosa* sebagai biokatalis untuk sintesis biodiesel melalui rute non-alkohol.

*Whole cell* biokatalis sekarang mulai banyak digunakan di industri, seperti industri kimia, farmasi maupun pangan. Salah satu *whole cell* biokatalis yang sudah dimanfaatkan untuk sintesis biodiesel dalam rangka mengatasi krisis energi adalah *whole cell Candida rugosa lipase*. Pada penelitian ini *whole cell Candida rugosa* yang telah dibiakkan dengan metode inokulasi digunakan sebagai biokatalis. *Whole cell Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis yang digunakan yaitu dalam bentuk *free* (non-immobilized). reaksi yang digunakan yaitu reaksi interesterifikasi dimana metanol (alkohol) diganti dengan metil asetat sebagai pendonor gugus alkil. reaksi dilakukan didalam reaktor *batch*, yang merupakan tempat terjadinya reaksi antara substrat (Minyak goreng dengan metil asetat) dan dengan bantuan *whole cell Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis untuk mensintesis biodiesel. Untuk menganalisis komposisi dari produk sintesis digunakan instrument HPLC (*High performance liquid chromatograph*). variasi yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu variasi mol substrat 1:10 dan 1:12 dengan konsentrasi biokatalis 10% dari berat substrat, hasil uji HPLC dari variasi mol substrat ini belum menunjukkan adanya metil ester di sampel, untuk pekerjaan berikutnya dilakukan variasi konsentrasi biokatalis 10% dan 20% dari berat substrat dengan rasio mol 1:12, untuk uji HPLC juga belum menunjukkan adanya pick metil ester yang dipresentasikan sebagai biodiesel. Sebagai pembandingan, dilakukan sintesis biodiesel dengan menggunakan *Whole Cell Candida rugosa lipase* yang terimmobilisasi dalam alginat, dan hasil Uji HPLC menunjukkan terdapat biodiesel dengan % yield sebesar 40,16%. Sedangkan untuk Hasil dari uji karakteristik menunjukkan bahwa viskositas dan densitas berada dalam nilai range dari biodiesel yaitu 0,89 g/mL untuk sampel dengan biokatalis 20% berat dan 0,90 g/mL untuk biokatalis dengan 10% berat substrat.

Kata kunci :

*Whole cell* biokatalis, Biodiesel, interesterifikasi, katalis alkali, *Candida rugosa*, rute non-alkohol

## ABSTRACT

Name : Mirza Akbar Maulana  
Major : Chemical Engineering  
Title : Whole cell utilization of *Candida rugosa* as biocatalyst for the synthesis of biodiesel via the route of non-alcoholic

Whole cell biocatalyst now started being used in industries, such as chemical, pharmaceutical and food., In this study, whole cell *Candida rugosa* which has been bred by the method of inoculation used as a biocatalyst. Whole cell biocatalyst *Candida rugosa* lipase as that used in the form of *free* (non-immobilized). reaction used is the reaction interesterifikasi where methanol (alcohol) is replaced with methyl acetate as the donor alkyl groups. reactions carried out in a batch reactor, which is the site of reaction between the substrate (cooking oil with methyl acetate) and with the help of whole cell biocatalyst *Candida rugosa* lipase as to synthesize biodiesel. To analyze the composition of synthesis products used instrument HPLC (High performance liquid chromatograph). Variation performed in this study are variations of the substrate mole 1:10 and 1:12 with a biocatalyst concentration of 10% of the weight of the substrate, HPLC assay results from the variation of this substrate mole not indicate a pick-methyl ester in the sample, for the next job done biocatalyst concentration variation of 10% and 20% of the weight of the substrate with a mole ratio of 1:12, for the HPLC tests also do not indicate a pick-methyl ester which was presented as biodiesel. For comparison, carried out the synthesis of biodiesel using the *Whole Cell Candida rugosa lipase* immobilisation in alginate, and the HPLC test results indicate there is a% biodiesel yield of 40.16%. As for the results of the test characteristics showed that the viscosity and density are in the range of biodiesel is 0.89 for the sample with 20 wt% biocatalyst and 0.90 to 10 wt% biocatalyst with the substrate.

Key word:

*Whole cell* biocatalysts, biodiesel, interesterification, catalyts alkali, *Candida rugosa*, *non-alcohol* rute.



## DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vi
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	14
1.1. Latar Belakang.....	14
1.2. Perumusan Masalah.....	16
1.3. Tujuan Penelitian.....	16
1.4. Batasan Masalah.....	16
1.5. Sistematika Penulisan.....	17
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	18
2.1. Whole – Cell Biokatalis.....	18
2.2. Candida Rugosa.....	18
2.3. Lipase.....	20
2.3.1. Klasifikasi Lipase.....	22
2.4. Biodiesel.....	22
2.5. Sintesis Biodiesel.....	25
2.5.1. Rute Non Alkohol.....	26
2.6. Bahan Baku Biodiesel.....	27
2.6.1. Minyak Nabati.....	27
2.7. <i>State of The Art</i> .....	31
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	34
3.1. Alur Penelitian.....	34
3.2. Alat dan Bahan.....	36
A. Pembuatan Media YMA untuk Yeast <i>C. rugosa</i> .....	36

B. Penanaman Yeast Dengan Metode Inokulasi.....	36
C. Total Plate Count.....	36
D. Uji Aktivitas Lipase Kualitatif (Zona Bening ) .....	37
E. Preparasi Biokatalis <i>C. rugosa</i> .....	37
F. Uji Aktivitas Lipase Kuantitatif ( Hidrolisis ) .....	37
G. Immobilisasi <i>C. rugosa</i> dalam Alginat teknis .....	38
H. Set Up Reaktor <i>Batch</i> .....	38
I. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan NaoH Sebagai Katalis.....	38
J. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan <i>Candida Rugosa</i> sebagai biokatalis...	39
K. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan <i>Whole cell C. rugosa</i> terimmobilisasi sebagai biokatalis .....	39
3.3. Prosedur Percobaan .....	40
A. Pembuatan Media YMA Untuk Yeast <i>C. rugosa</i> .....	40
B. Penanaman yeast dengan metode inokulasi .....	41
C. Total Plate Count.....	42
D. Prosedur Uji Aktivitas Lipase Kualitatif .....	43
E. Prosedur pembuatan Biokatalis <i>C. rugosa</i> .....	44
F. Prosedur perangkaian Reaktor.....	45
G. Prosedur Uji aktivitas lipase kuantitatif (Hidrolisis).....	46
H. Immobilisasi <i>C. rugosa</i> ke dalam Alginat Teknis.....	47
I. Prosedur sintesis biodiesel rute non – alkohol menggunakan NaoH sebagai katalis .....	47
J. Prosedur Sintesis biodiesel Rute Non – Alkohol menggunakan <i>C. rugosa</i> sebagai biokatalis .....	49
K. Prosedur Sintesis Biodiesel Rute Non – Alkohol menggunakan <i>C. rugosa</i> terimmobilisasi dalam Alginat sebagai biokatalis .....	50
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	51
4.1. Preparasi Biokatalis <i>Candida Rugosa</i> .....	51
4.1.1. Media YMA Untuk Yeast <i>Candida Rugosa</i> .....	51
4.1.2. Inokulasi.....	51
4.2. <i>Total Plate Count</i> .....	52
4.3. Uji Aktifitas Lipase secara Kualitatif ( Zona Bening ).....	52
4.4. Uji Aktifitas Lipase secara Kuantitatif ( Hidrolisis ) .....	55
4.5. Sintesis Biodiesel .....	56

4.5.1.	Sintesis Biodiesel menggunakan Whole cell candida rugosa lipase sebagai biokatalis .....	57
4.5.2.	Sintesis Biodiesel Menggunakan whole cell candida rugosa yang terimmobilisasi dalam Alginat teknis.....	59
4.6.	Uji karakteristik Produk.....	64
4.6.1.	Viskositas .....	64
4.6.2.	Densitas.....	65
4.6.3.	Uji bakar / nyala .....	66
4.7.	Analisa HPLC ( High Performance Liquid Chromatography ) .....	61
BAB V KESIMPULAN .....		68
5.1.	Kesimpulan .....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>69</b>
LAMPIRAN.....		72
LAMPIRAN A.....		72
LAMPIRAN B .....		73
LAMPIRAN C .....		74
LAMPIRAN D.....		76
LAMPIRAN E .....		78
LAMPIRAN F.....		84

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus Kimia Biodiesel .....	23
Gambar 2.2	Reaksi Interesterifikasi.....	26
Gambar 2.3	Reaksi Minyak Nabati dengan Metil Asetat .....	27
Gambar 2.4	Struktur Molekul – Molekul.....	28
Gambar 2.5	Struktur Trigliserida Pada Minyak Sawit.....	29
Gambar 2.6	Struktur Molekul Asam Lemak Jenuh .....	30
Gambar 3.1	Diagram Alir Penelitian .....	35
Gambar 3.2	Diagram Alir pembuatan media agar.....	41
Gambar 3.3	Diagram Alir Inokulasi .....	42
Gambar 3.4	Diagram Alir Total Plate Count .....	43
Gambar 3.5	Diagram Alir Uji aktivitas kualitatif.....	44
Gambar 3.6	Diagram Alir preparasi biokatalis .....	45
Gambar 3.7	Diagram Alir Uji aktivitas kuantitatif.....	46
Gambar 3.8	Diagram Alir sintesis biodiesel menggunakan NaOH.....	48
Gambar 3.9	Diagram Alir sintesis biodiesel menggunakan biokatalis .....	49
Gambar 4.1	Isolat <i>C. rugosa</i> membentuk zona bening.....	53
Gambar 4.2	Sampel hasil reaksi Hidrolisis .....	57
Gambar 4.3	produk biodiesel menggunakan katalis NaOH.....	58
Gambar 4.4	Sintesis Biodiesel menggunakan biokatalis .....	59
Gambar 4.5	<i>Whole cell</i> terimmobilisasi dalam alginat .....	61
Gambar 4.6	Diagram viskositas sampel.....	64
Gambar 4.7	Uji viskositas sampel menggunakan viscometer oswold.....	64
Gambar 4.8	Uji densitas menggunakan piknometer.....	65
Gambar 4.9	Hasil uji nyala sampel.....	67
Gambar 4.10	Diagram % yield komponen dalam sampel 1:12 .....	67
Gambar 4.11	Diagram % yield komponen dalam sampel 1:10 .....	68
Gambar 4.12	Diagram % yield variasi konsentrasi biokatalis .....	69

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1	Penggunaan <i>Candida Rugosa</i> .....	19
Tabel 2.2	Jenis Biokatalis dan Produk yang dihasilkan .....	20
Tabel 2.3	Karakteristik Biodiesel .....	22
Tabel 2.4	Perbandingan Karakteristik Biodiesel .....	23
Tabel 2.5	Spesifikasi Biodiesel.....	24
Tabel 2.6	Komposisi Triglicerida Dalam Minyak sawit .....	29
Tabel 2.7	Komposisi Triglicerida Dalam Minyak sawit .....	30
Tabel 2.8	Summary state of the art <i>whole cell</i> biokatalis .....	33
Tabel 4.1	Data Diameter zona bening .....	54
Tabel 4.2	Data konversi Triglicerida dengan reaksi hidrolisis .....	56
Tabel 4.3	Data karakteristik biodiesel.....	63
Tabel 4.4	Data densitas sampel hasil interesterifikasi.....	65

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Penggunaan biokatalis merupakan metoda yang tidak asing dalam proses sintesis di ranah akademis maupun dalam tataran industri. Sampai saat ini, metoda tersebut banyak berperan dalam industri kimia dan farmasi, industri pangan, serta dalam pengelolaan limbah dan remediasi lingkungan. Sehingga tidaklah mengherankan bila biokatalis dianggap sebagai komponen penting dan bagian yang tak terpisahkan dari industri.

Biokatalis yang berupa enzim dari sel bakteri atau yeast secara tradisional telah digunakan untuk mengkonversi bahan baku yang berasal dari bahan organik menjadi bahan baku yang terbarukan. Namun, pemanfaatannya terus meluas, sehingga digunakan juga untuk mengolah material yang berasal dari bahan bakar fosil. Pemanfaatannya juga begitu beragam, dari biotransformasi senyawa khiral secara enzimatis untuk produksi obat sampai sintesis biodiesel. Secara umum, enzim digunakan sebagai biokatalis dalam beragam reaksi, seperti hidrolisis, transesterifikasi, interesterifikasi dan lain-lain. Biokatalis ini di ekstrak dari sel yeast yang kemudian digunakan untuk sintesis biodiesel.

Penggunaan enzim sebagai biokatalis untuk sintesis biodiesel memiliki prospek yang menguntungkan karena dapat memperbaiki kelemahan katalis Basa yaitu tidak bercampur homogen sehingga pemisahannya mudah dan mampu mengarahkan reaksi secara spesifik tanpa adanya reaksi samping yang tidak diinginkan. Namun, rintangan menggunakan lipase powder sebagai katalis adalah harga yang tinggi serta Pengolahan dan pemurniannya yang sulit. Dengan demikian, penelitian ini menggunakan biokatalis *whole-cel Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis alternatif, karena bisa menghindari teknik pemurnian dan pemisahan yang kompleks dan mahal.

Penggunaan *whole-cell* sebagai biokatalis maksudnya adalah penggunaan seluruh bagian sel yeast sebagai biokatalis, dimana yeast tersebut menghasilkan enzim lipase. Pada penelitian sebelumnya seorang peneliti Jepang bernama Akihiko Kondo (Akihiko kondo, *et al*, 2001) telah melakukan penelitian tentang sintesis biodiesel menggunakan *whole cell Rhizopus oryzae lipase* sebagai biokatalis, proses reaksi yang digunakan adalah reaksi transesterifikasi, yaitu menggunakan metanol sebagai pendonor gugus alkil yang di reaksikan dengan minyak kedelai sebagai substrat untuk menghasilkan metil ester, Kondo menggunakan reaktor dengan sistem *batch*, dan menggunakan *gas chromatography* untuk menentukan jumlah metil ester yang terbentuk. Hasil konversi produk dari penelitian Kondo mencapai 90%.

Pada penelitian ini digunakan yeast *Candida rugosa* sebagai biokatalis, Karena *Candida rugosa* memiliki sifat-sifat khusus yang baik untuk sintesis biodiesel diantaranya *Candida rugosa* bersifat *non-patogenik* (tidak menimbulkan penyakit) dan sangat aktif terhadap rantai panjang trigliserida pada suhu optimumnya yaitu antara 30-40°C pada pH 7. Penggunaan *whole cell* biokatalis juga dapat menekan biaya menjadi lebih murah. penelitian ini juga melakukan uji variasi konsentrasi biokatalis untuk melihat pengaruh persen konversi terhadap produk hasil sintesis yang dihasilkan.

Penggunaan *Whole cell Candida rugosa lipase* ini bertujuan untuk mensintesis Biodiesel yang terbuat dari minyak nabati yang berasal dari sumber daya yang dapat diperbaharui. Bahan dasar pembuatan biodiesel berasal dari minyak nabati. Minyak goreng merupakan salah satu minyak nabati. Minyak goreng adalah minyak yang berasal dari lemak tumbuhan atau hewan yang dimurnikan dan berbentuk cair dalam suhu kamar dan biasanya digunakan untuk menggoreng makanan. Minyak goreng dari tumbuhan biasanya dihasilkan dari tanaman seperti kelapa, biji-bijian, kacang-kacangan, jagung, dan kedelai.

Biodiesel merupakan salah satu bahan bakar alternatif yang ramah lingkungan, tidak mempunyai efek samping terhadap kesehatan serta dapat dipakai sebagai bahan bakar kendaraan bermotor dan juga dapat menurunkan emisi. bila dibandingkan dengan minyak diesel, Pembuatan biodiesel tidak memerlukan peralatan canggih, pembuatan biodiesel ini hanya membutuhkan

reaktor kimia tempat berlangsungnya reaksi, reaktor yang digunakan adalah reaktor dengan sistem *batch*.

## 1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan sebelumnya, maka dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana kondisi reaksi ( rasio substrat, konsentrasi biokatalis ) untuk menghasilkan % *yield* biodiesel yang tinggi yang dihasilkan dari sintesis biodiesel melalui rute non alkohol.
2. Bagaimana aktivitas dari *whole-cell Candida rugosa* yang akan digunakan sebagai biokatalis untuk sintesis biodiesel. Aktifitas ini di lihat secara kualitatif dan kuantitatif.

## 1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui jumlah pembentukan produk dengan melakukan variasi rasio mol substrat, konsentrasi biokatalis terhadap substrat, untuk menghasilkan % *yield* biodiesel yang tinggi yang dihasilkan dari sintesis biodiesel.
2. Mengetahui aktivitas *whole-cell Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis secara kualitatif dan kuantitatif dalam proses sintesis biodiesel melalui reaksi interesterifikasi.

## 1.4. Batasan Masalah

Dalam penelitian ini, pembatasan masalah yang akan dibahas adalah sebagai berikut:

1. Substrat yang dipakai untuk sintesis biodiesel melalui rute non alkohol berasal dari minyak goreng sawit.
2. Menggunakan *whole-cell Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis.
3. Menggunakan metil asetat sebagai penyuplai gugus alkil.
4. Reaksi yang dilakukan dalam reaktor bersistem *batch*.



### **1.5. Sistematika Penulisan**

Sistematika penulisan dalam skripsi ini adalah sebagai berikut :

#### **ABSTRAK**

#### **BAB 1: PENDAHULUAN**

Menjelaskan tentang latar belakang, rumusan masalah, tujuan penelitian, batasan masalah, dan sistematika penulisan.

#### **BAB 2 : TINJAUAN PUSTAKA**

Dalam bab ini berisi tentang prinsip dasar ilmu yang berkaitan dengan penelitian ini. Membahas tentang mekanisme sintesis biodiesel, dan perlakuan untuk *whole-cell Candida rugosa lipase* sebagai biokatalis yang akan digunakan.

#### **BAB 3 : METODOLOGI PENELITIAN**

Yang meliputi alur penelitian, bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian, serta prosedur kerja.

#### **BAB 4 : HASIL DAN PEMBAHASAN**

Berisi tentang pembahasan hasil penelitian dan analisis- analisis terhadap hasil penelitian tersebut.

#### **BAB 5 : KESIMPULAN DAN SARAN**

Berisi tentang kesimpulan penelitian secara keseluruhan serta saran yang diperlukan untuk kelanjutan penelitian berikutnya.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

#### **LAMPIRAN**

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Whole – Cell Biokatalis*

*Whole cell* biokatalis banyak digunakan di industri-industri. Pada umumnya digunakan untuk proses sintesis biodiesel melalui reaksi transesterifikasi dan interesterifikasi.

Penggunaan *whole cell* sebagai biokatalis maksudnya adalah penggunaan seluruh bagian sel bakteri sebagai biokatalis, dimana bakteri/yeast tersebut menghasilkan enzim lipase (*free lipase*). Penggunaan *whole-cell* sebagai biokatalis juga dapat dilakukan secara immobilisasi. Immobilisasi *whole cell* disini maksudnya adalah menggabungkan *whole-cell* dengan suatu matrik padat (support) secara fisik, sehingga biokatalis dapat digunakan secara berulang kali. Metoda yang digunakan dalam immobilisasi pada umumnya dapat dilakukan dengan 4 cara, yaitu : *adsorpsi, entrapment, cross linking, dan covalent binding*. (Marno *et,al*,2008)

Pada penelitian ini digunakan yeast *C. rugosa* sebagai *whole-cell* biokatalis, dengan proses interesterifikasi yaitu dengan mengganti metanol menjadi metil asetat sebagai pendonor alkil karena bisa menghindari teknik pemurnian dan pemisahan yang kompleks dan mahal terkait dengan immobilisasi lipase. Selain itu, produk samping dari proses interesterifikasi yang berupa triasetilgliserol memiliki nilai jual yang lebih tinggi dibandingkan nilai jual produk samping dari proses transesterifikasi yaitu gliserol .

### 2.2. *Candida rugosa*

*Candida* sp. merupakan organisme yang tergabung di dalam kingdom fungi. Kelas taksonomi lengkapnya sebagai berikut (Anonim Protein data bank, 2009) :

<i>Kingdom</i>	:	<i>Fungi</i>
<i>Phylum</i>	:	<i>Ascomycota</i>
<i>Subphylum</i>	:	<i>Ascomycotina</i>
<i>Class</i>	:	<i>Ascomycetes</i>
<i>Order</i>	:	<i>Saccharomycetales</i>

*Family* : *Saccharomycetaceae*  
*Genus* : *Candida*  
*Species* : *C. rugosa*

*Candida* sp. merupakan fungi yang hampir tersebar di seluruh dunia. Biasanya hidup berkoloni pada kulit manusia, pada daun, bunga, air, tanah, dan membran mukrosa. Genus *candida* terdiri dari 154 spesies yang sudah diketahui. Sebagian besar dari mereka umumnya bersifat patogen dan dapat menginfeksi manusia. Beberapa yang paling berbahaya adalah *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*. Infeksi yang disebabkan *Candida* adalah *Candidiasis*.

Namun ada juga beberapa spesies yang tidak patogen. Salah satunya adalah *C. rugosa*. Telah dilaporkan oleh *Food Standards Australia New Zealand* (FSANZ) pada 5 oktober 2005 bahwa *Canndida rugosa* adalah organisme non-patogen. Lipase yang dihasilkan dari organisme ini merupakan lipase yang dapat menyerang ketiga gugus lemak pada rantai trigliserida.

Koloni *Candida* sp. berupa krim yang berwarna kekuningan, tumbuh dengan cepat dan matang dalam tiga hari. *Candida* sp. termasuk dalam golongan *yeast* atau ragi. Ragi merupakan kelompok fungi yang penting. Fungi, sama seperti bakteri, tersebar banyak di alam, meskipun mereka biasanya hidup di tanah dan pada daerah yang relatif lembab dibanding tempat hidup bakteri. Fungi tidak dapat mengambil energi dari sinar matahari. Walaupun kebanyakan fungi memiliki morfologi yang relatif kompleks, ragi dapat dibedakan karena merupakan mikroorganisme bersel satu, dan berukuran panjang dari 5 sampai 30  $\mu\text{m}$  dengan lebar 1 hingga 5  $\mu\text{m}$ .

*Candida rugosa* lipase biasanya digunakan secara luas untuk reaksi katalitik yang mana termasuk hidrolisis non spesifik dan streospesifik, kebalikan dari hidrolisis melalui esterifikasi. Sejauh ini, tidak ada lipase yang tersedia yang spesifikasinya (substrat, posisi, asam lemak, dan streopreference) yang dapat dihubungkan dengan *candida rugosa* lipase. (Benjamin *et.al*, 1998)

Pemurnian dan karakteristik dari berbagai macam lipase yang berasal dari *yeast* (*Candida rugosa*, *Candida antarctica*) dapat menjadi lebih kompleks di dalam biologi molekuler. *Candida rugosa lipase* dan *G. Candidum* telah

dilakukan studi secara bersamaan sejak kedua jenis lipase tersebut menunjukkan persamaan – persamaan dalam berbagai aspek.

Adapun penggunaan enzim *Candida rugosa* yang pernah dilakukan oleh peneliti – peneliti adalah sebagai berikut.

**Table 2.1 Penggunaan *Candida rugosa***

Tahun	Nama	Penggunaan
2008	Heri Hermansyah	Sintesis biodiesel
2005	Yadaf, et al	Sintesis reusable lipase
2002	Maruyama, et al	Lipase menghidrolisis ikatan peptida
2001	Iso, et al	Produksi biodiesel
1998	Linko, et al	Pruduk biodegradable

### 2.3. Lipase

Lipase (*asilgliserol; triasil gliserol hidrolase; gliserol ester hidrolase*) merupakan enzim yang tersebar yang mengkatalisis hidrolisis lemak dan minyak (enzim yang mampu memecah lemak). Lipase merupakan enzim yang dapat diproduksi oleh beberapa mikroorganisme diantaranya yaitu bakteri dan jamur. Meningkatnya ketertarikan terhadap lipase karena enzim ini dapat digunakan sebagai katalis dalam hidrolisis untuk mensintesis ester asam lemak. Aktivase lipase terjadi di permukaan air-lemak, yang merupakan karakteristik struktural yang unik dari kelas enzim ini. Lipase menjadi unit oligopeptida heliks yang melindungi *active site* sehingga disebut pada interaksi dengan permukaan *hidrofobik* seperti droplet lemak, memungkinkan pergerakan seperti dalam jalan untuk membuka *active site* untuk substrat. *Active site* biasanya dikarakterkan dengan senyawa triad serin, histidin, dan aspartat, kompleks enzim asli menjadi perantara penting dalam mengkatalisis reaksi lipase. Sebagai tambahan dalam fungsi biologisnya pada bakteri, jamur, tumbuhan dan hewan tingkat tinggi, lipase digunakan dalam sejumlah proses industri seperti minyak dan lemak, detergen, roti, pembuatan keju, pembersih permukaan kulit dan proses pembuatan kertas.

Enzim mikroorganisme yang banyak digunakan dalam industri umumnya adalah enzim ekstraselular, karena lebih mudah diisolasi dibandingkan enzim intraselular (Marno, Septian. 2008). Berikut ini adalah jenis biokatalis, reaksi dan produk yang dihasilkan.

**Tabel 2.2 Jenis biokatalis dan produk yang dihasilkan (Ekky, 2008)**

<b>Biokatalis</b>	<b>Reaksi</b>	<b>Produk</b>
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Pseudomonas fluorescense</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>P. Cepacia</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Mucor javanicus</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Rhizopus niveus</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Candida antarctica</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Candida cylindracea</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Rhizopus usarii</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Porcine pancreatic</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Novozym 435</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Rhizopus oryzae</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Candida sp</i>	Transesterifikasi	Metil ester
<i>Lipozyme TL IM</i>	Transesterifikasi	Metil ester

Lipase mempunyai beberapa kelebihan bila dibandingkan dengan katalis lain. Lipase mempunyai spesififikasi dan stereoselektivitas reaksi relatif tinggi, sangat stabil pada pelarut organik. lipase mempunyai sifat lebih ramah lingkungan bila dibandingkan dengan katalis lainnya, terutama katalis logam toksik. Lipase mempunyai peranan penting dalam mewujudkan proses dan produk industri yang ramah lingkungan.

Lipase yang dimanfaatkan dalam bioteknologi industri banyak diproduksi dari bakteri termofilik. Hal ini karena enzim yang dihasilkan oleh bakteri termofilik bersifat tahan panas (termostabil). Enzim tersebut sering disebut termozim. Termozim selain mempunyai termostabilitas tinggi juga mampu mempertahankan stabilitas serta aktivitasnya, baik pada pH ekstrim maupun pada

agen denaturan lain, sehingga dapat digunakan untuk menggantikan enzim mesofilik dan katalis lain dalam beberapa proses industri.

Aplikasi termozim dalam proses industri pada suhu tinggi (lebih dari 50°C) lebih menguntungkan karena laju reaksi berjalan lebih cepat sehingga produk yang dihasilkan lebih tinggi. Laju reaksi yang lebih cepat pada suhu tinggi disebabkan oleh penurunan viskositas dan peningkatan kelarutan substrat. Proses industri pada suhu tinggi juga menurunkan resiko kontaminasi oleh mikroba. Selain itu penggunaan enzim yang berasal dari mikroorganisme mesofilik memerlukan pendinginan bioreaktor untuk mencapai kondisi reaksi optimal sehingga di perlukan biaya lebih besar bila dibandingkan dengan penggunaan termozim.

### 2.3.1. Klasifikasi Lipase

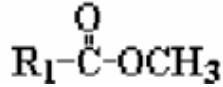
Lipase yang diisolasi dari mikroba dapat digolongkan menjadi tiga kelompok. Kelompok tersebut antara lain (Marno, Septian. 2008):

1. Lipase yang menghidrolisis triasilgliserol (TAG) secara acak terhadap posisi lemak pada triasilgliserol menjadi asam lemak. Kelompok mikroba tersebut antara lain *Candida sp.* dan *Pseudomonas sp.* enzim dapat menghidrolisis ikatan ester secara sempurna, menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol.
2. Lipase yang menghidrolisis spesifik pada posisi 1 dan 3 dari triasilgliserol. Contoh mikroba penghasil tersebut adalah *A. niger* dan *M. miehei* produk yang dihasilkan berupa asam lemak bebas, 1,2-diasilgliserol, dan 2-monoasilgliserol.
3. Lipase yang menghidrolisis secara spesifik asam lemak tertentu dari triasilgliserol. Contoh mikroba penghasil lipase tersebut adalah *G.candidum* yang mempunyai spesifitas terhadap asam lemak rantai panjang.

### 2.4. Biodiesel

Biodiesel didefinisikan sebagai monoalkil ester dari rantai panjang asam lemak yang terdapat pada sumber daya alam yang terbarukan, seperti minyak tumbuhan dan lemak hewan, yang digunakan untuk mesin diesel. Beberapa minyak nabati yang sudah dan dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan

biodiesel yaitu minyak kelapa sawit, minyak kelapa, minyak kedelai, dan minyak biji bunga matahari.



**Gambar 2.1 Rumus kimia biodiesel (Bode, 2002)**

Biodiesel memiliki beberapa kelebihan dibanding bahan bakar diesel petroleum. Kelebihan tersebut antara lain :

1. Merupakan bahan bakar yang tidak beracun dan dapat dibiodegradasi
2. Mempunyai bilangan setana yang tinggi.
3. Mengurangi emisi karbon monoksida, hidrokarbon dan NO<sub>x</sub>.
4. Terdapat dalam fasa cair.

Keuntungan lain pemakaian biodiesel adalah angka setananya lebih tinggi dari angka setana solar yang ada saat ini, gas buang hasil pembakaran biodiesel lebih ramah lingkungan karena hampir tidak mengandung gas SO<sub>x</sub>, akselerasi mesin lebih baik, dan tarikan lebih ringan

**Tabel 2.3 Karakteristik Biodiesel (Hendartono, 2005)**

Parameter	Spesifikasi
Gravitasi spesifik (g/mL)	0,87 – 0,89
Viskositas kinematik (mm <sup>2</sup> /s) @ 40 °C	3,7 – 5,8
Angka setana	46 – 70
Nilai pemanasan tertinggi (btu/lb)	16928 – 17996
Sulfur, (% berat)	0,0 – 0,0024
Titik asap (°C)	-11 – 16
Titik tuang (°C)	-15 – 13

Penggunaan biodiesel dapat menurunkan fraksi karbon dari partikel padatan. Hal tersebut karena dalam biodiesel terdapat atom oksigen yang mendukung terjadinya oksidasi sempurna karbon monoksida menjadi karbon

dioksida (CO<sub>2</sub>). Dibandingkan solar, biodiesel memiliki sifat yang ramah lingkungan. Dibawah ini adalah Perbandingan karakteristik biodiesel dengan solar.

**Tabel 2.4** Perbandingan karakteristik biodiesel dengan solar (Bode, 2002)

No	Parameter	Satuan	Biodiesel	BBM Solar
1	Densitas	kg/m <sup>3</sup>	850 – 890 (40 °C)	820 – 870 (40 °C)
2	Viskositas kinematik (40 °C)	mm <sup>2</sup> /s (cSt)	2,3 – 6,0	1,6 – 5,8
3	Angka setana	°C	Min.51	Min.45
4	Titik nyala	°C	Min.100	Min.60
5	Titik embun	°C	Min.18	
6	Titik tuang	Rating		Maks.18
7	Korosi garis tembaga	(3 jam pada 50 °C)	Maks. no 3	Maks. no 3
8	Sedimen dan air	%-vol	Maks. 0,05	Maks. 0,05
9	90% (v/v) kembali pada suhu distilasi	°C	Maks. 360	-
10	95% (v/v) kembali pada suhu distilasi	°C	-	Maks.370
11	Kandungan debu (debu sulfat)	% (m/m)	Maks. 0,02	Maks. 0,01
12	Kandungan sulfur	ppm-m (mg/kg)	Maks. 100	Maks. 5000
13	Kandungan fosfor	ppm-m (mg/kg)	Maks. 10	-
14	Tingkat keasaman	Mg-KOH/g	Maks. 0,8	Maks. 0,6
15	Gliserol bebas	% (m/m)	Maks. 0,02	-
16	Gliserol total	% (m/m)	Maks. 0,24	-
17	Kandungan ester	% (m/m)	Min. 115	-

Pada tabel di atas dapat dilihat bahwa perbedaan spesifikasi biodiesel dan BBM solar dari segi kualitas penggunaan biodiesel lebih baik dari pada BBM solar, baik untuk kualitas terhadap lingkungan dan mesin. Hal ini dapat dilihat dari angka setana, titik nyala, dan parameter lain. Produk biodiesel (metil ester)



harus memenuhi persyaratan atau spesifikasi yang sudah ditetapkan oleh suatu negara untuk dapat dipakai sebagai bahan bakar setara solar. Amerika Serikat mempunyai spesifikasi berdasarkan ASTM D 6751-02, dan Eropa berdasarkan EDIN 51606 dan juga Indonesia mempunyai Standar Nasional Indonesia (SNI). Spesifikasi yang sudah diterapkan berdasarkan standar tersebut disajikan pada Tabel 2.3 untuk menjamin konsistensi kualitas biodiesel untuk memenuhi spesifikasi tergantung pada kondisi proses pengolahan dan pemurnian produk setelah diproduksi.

**Tabel 2.5 Spesifikasi biodiesel menurut ASTM (USA), EDIN (Eropa), dan SNI (INDONESIA)**

<b>Karakteristik</b>	<b>ASTM D-6751</b>	<b>EDIN 51606</b>	<b>SNI</b>
Density @ 15 °C	0.875 – 0.9 g/ml	0.875 – 0.9 g/ml	0.85 – 0.89 g/ml
Viskositas # 40 °C	1.9 – 6.0 mm <sup>2</sup> /sec	3.5 – 5.0 mm <sup>2</sup> /sec	2.3 – 6.0 mm <sup>2</sup> /sec
Flash point	130 °C	110 °C	100 °C
Water & Sediment	0.05 max % vol	0.03 max % vol	0.05 max % vol
Acid number	0.8	0.5	0.8
Free glycerin	0.02	0.02	0.02 max
Total Glycerin	0.24	0.25	0.24 max
Cetane number	47 min	47 min	51 min
Cloud point	tidak terdefiniskan	-20 °C	18 °C max

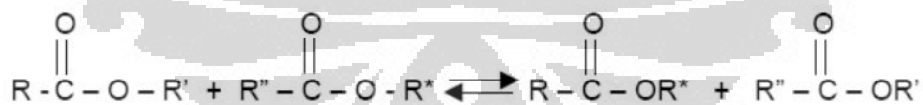
## 2.5. Sintesis Biodiesel

Sintesis biodiesel terbagi menjadi 2 cara yaitu sintesis biodiesel melalui rute alkohol dan sintesis biodiesel melalui rute non alkohol. Pada sintesis biodiesel melalui rute alkohol, metanol berperan sebagai pensuplai alkil (metil), sedangkan pada rute non alkohol menggunakan metil asetat sebagai pensuplai alkil. Berikut akan dijelaskan mengenai sintesis biodiesel melalui rute non alkohol.

### 2.5.1. Rute Non Alkohol

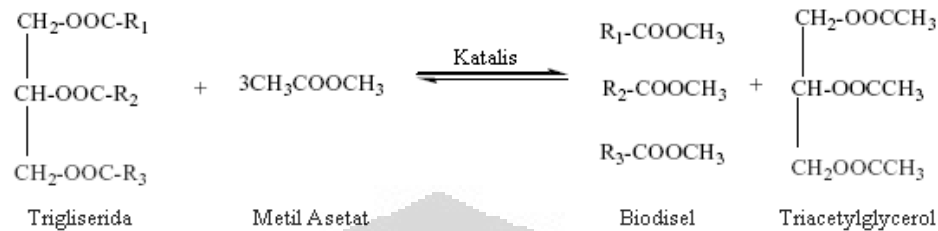
Secara konvensional, biodiesel disintesis melalui reaksi transesterifikasi dari suatu trigliserida dengan alkohol menggunakan bantuan katalis alkali. Namun penggunaan katalis alkali memiliki beberapa kelemahan diantaranya pemurnian produk dari katalis yang bercampur homogen relatif sulit. Selain itu, katalis sendiri dapat bereaksi dan dapat menyebabkan terjadinya reaksi penyabunan. Reaksi penyabunan ini tidak diinginkan karena dapat membebani proses pemurnian produk dan menurunkan yield biodiesel yang pada akhirnya mengakibatkan biaya produksi yang tinggi. Oleh karena itu, Penggunaan metil asetat sebagai katalis untuk sintesis biodiesel memiliki prospek yang menguntungkan karena dapat memperbaiki kelemahan katalis alkali yaitu tidak bercampur homogen sehingga pemisahannya mudah dan mampu mengarahkan reaksi secara spesifik tanpa adanya reaksi samping yang tidak diinginkan (Watanabe et al, 2000).

Metanol akan digantikan perannya oleh metil asetat sebagai pensuplai alkil. Selain dapat menjaga aktivitas dan stabilitas enzim, rute non alkohol juga dapat menghasilkan produk samping, yakni *triacetilglycerol* yang memiliki nilai jual lebih tinggi dibandingkan produk samping rute alkohol. Sintesis biodiesel melalui rute non alkohol ini termasuk ke dalam reaksi interesterifikasi, interesterifikasi dapat digambarkan sebagai pertukaran gugus antara dua buah ester, dimana hal ini hanya dapat terjadi apabila terdapat katalis. Secara umum reaksi interesterifikasi dapat dituliskan sebagai berikut:



**Gambar 2.2** Reaksi interesterifikasi secara umum (xu et al, 2005)

Reaksi interesterifikasi minyak nabati dapat dilihat pada Gambar 2.7 di bawah ini :



**Gambar 2.3** Reaksi interesterifikasi minyak nabati dengan metil asetat  
(Xu et al., 2005)

## 2.6. Bahan Baku Biodiesel

Biodiesel dapat dibuat dari minyak nabati maupun lemak hewan, namun yang paling umum digunakan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel adalah minyak nabati.

### 2.6.1. Minyak Nabati

Biodiesel dapat dibuat dari minyak nabati maupun lemak hewan, namun yang paling umum digunakan sebagai bahan baku pembuatan biodiesel adalah minyak nabati. Minyak nabati dan biodiesel tergolong ke dalam kelas senyawa-senyawa organik yang sama, yaitu kelas ester asam-asam lemak. Akan tetapi, minyak nabati adalah triester asam-asam lemak dengan gliserol, atau trigliserida, sedangkan biodiesel adalah monoester asam-asam lemak dengan metanol. Perbedaan wujud molekuler ini memiliki beberapa konsekuensi penting dalam penilaian keduanya sebagai kandidat bahan bakar mesin diesel :

1. Minyak nabati (yaitu trigliserida) berberat molekul besar, jauh lebih besar dari biodiesel (yaitu ester metil). Akibatnya, trigliserida relatif mudah mengalami perengkahan (*cracking*) menjadi aneka molekul kecil, jika terpanaskan tanpa kontak dengan udara (oksigen).
2. Minyak nabati memiliki kekentalan (viskositas) yang jauh lebih besar dari minyak diesel/solar maupun biodiesel, sehingga pompa penginjeksi bahan bakar di dalam mesin diesel tak mampu menghasilkan pengkabutan

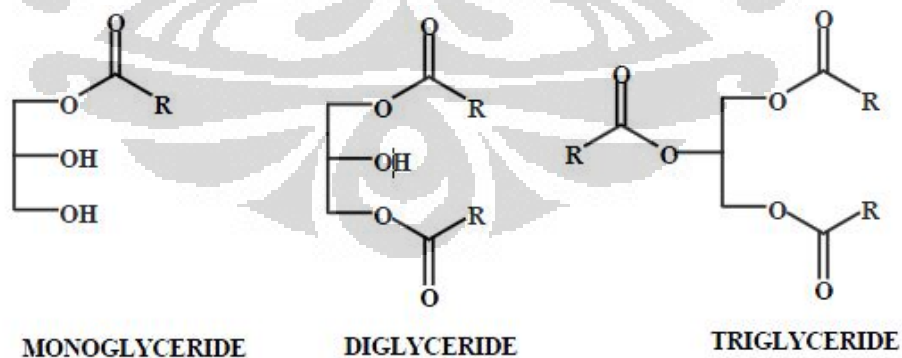
(*atomization*) yang baik ketika minyak nabati disemprotkan ke dalam kamar pembakaran.

3. Molekul minyak nabati relatif lebih bercabang dibanding ester metil asam-asam lemak. Akibatnya, angka setana minyak nabati lebih rendah daripada angka setana ester metil. Angka setana adalah tolok ukur kemudahan menyala/terbakar dari suatu bahan bakar di dalam mesin diesel.

Di luar perbedaan yang memiliki tiga konsekuensi penting di atas, minyak nabati dan biodiesel sama-sama berkomponen penyusun utama ( $\geq 90\%$  berat) asam lemak. Pada kenyataannya, proses transesterifikasi minyak nabati menjadi ester metil asam lemak, memang bertujuan memodifikasi minyak nabati menjadi produk (yaitu biodiesel) yang berkekentalan mirip solar, berangka setana lebih tinggi, dan relatif lebih stabil terhadap perengkahan. Pada minyak nabati mengandung trigliserida-trigliserida yang merupakan bahan baku pembuatan biodiesel. Trigliserida merupakan kandungan terbanyak dalam minyak nabati.

#### 2.6.1.1. Trigliserida

Trigliserida adalah triester dari gliserol dengan asam lemak, yaitu asam karboksilat beratom karbon 6 s/d 30. Trigliserida banyak dikandung dalam minyak dan lemak, merupakan komponen terbesar penyusun minyak nabati. Selain trigliserida, terdapat juga monogliserida dan digliserida. Struktur molekul dari ketiga macam gliserid tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.8.



**Gambar 2.4** Struktur molekul monogliserida, digliserida, dan trigliserida (marno, 2008)

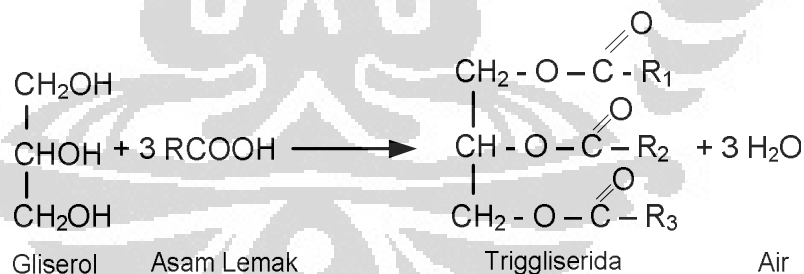
### 2.6.1.2.Sumber Triglicerida

Sumber – sumber triglicerida terdapat pada jarak pagar, biji alpukat, minyak kelapa sawit, dan berbagai sumber lainnya.

#### 2.6.1.2.1.Minyak Kelapa Sawit

Minyak kelapa sawit diperoleh dari pengolahan buah kelapa sawit (*Elaeis guinensis* JACQ). Secara garis besar buah kelapa sawit terdiri dari serabut buah (pericarp) dan inti (kernel). Serabut buah kelapa sawit terdiri dari tiga lapis yaitu lapisan luar atau kulit buah yang disebut pericarp, lapisan sebelah dalam disebut mesocarp atau pulp dan lapisan paling dalam disebut endocarp. Inti kelapa sawit terdiri dari lapisan kulit biji (testa), endosperm dan embrio. Mesocarp mengandung kadar minyak rata-rata sebanyak 56%, inti (kernel) mengandung minyak sebesar 44%, dan endocarp tidak mengandung minyak. Minyak kelapa sawit seperti umumnya minyak nabati lainnya adalah merupakan senyawa yang tidak larut dalam air, sedangkan komponen penyusunnya yang utama adalah triglicerida dan nontriglicerida.

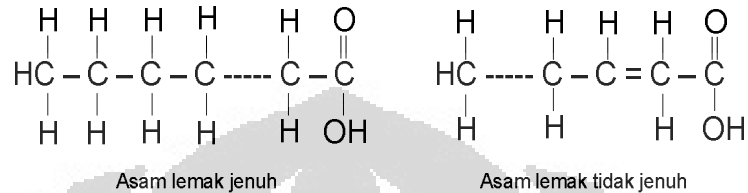
Seperti halnya lemak dan minyak lainnya, minyak kelapa sawit terdiri atas triglicerida yang merupakan ester dari gliserol dengan tiga molekul asam lemak menurut reaksi sebagai berikut :



**Gambar 2. 5** Struktur triglicerida pada minyak kelapa sawit

Bila  $R_1 = R_2 = R_3$  atau ketiga asam lemak penyusunnya sama maka triglicerida ini disebut triglicerida sederhana, dan apabila salah satu atau lebih asam lemak penyusunnya tidak sama maka disebut triglicerida campuran. Asam lemak merupakan rantai hidrokarbon; yang setiap atom karbonnya mengikat satu atau dua atom hidrogen ; kecuali atom karbon terminal mengikat tiga atom

hidrogen, sedangkan atom karbon terminal lainnya mengikat gugus karboksil. Asam lemak yang pada rantai hidrokarbonnya terdapat ikatan rangkap disebut asam lemak tidak jenuh, dan apabila tidak terdapat ikatan rangkap pada rantai hidrokarbonnya karbonnya disebut dengan asam lemak jenuh. Secara umum struktur asam lemak dapat digambarkan sebagai berikut :



**Gambar 2.6 Struktur molekul asam lemak jenuh**

Struktur molekul asam lemak jenuh dan asam lemak tidak jenuh Minyak kelapa Sawit adalah lemak semi padat yang mempunyai komposisi yang tetap. Berikut ini adalah tabel dari komposisi trigliserida dan tabel komposisi asam lemak dari minyak kelapa sawit.

**Tabel 2.6 Komposisi Trigliserida Dalam Minyak Kelapa Sawit**

Trigliserida	Jumlah (%)
Tripalmitin	3 – 5
Dipalmito – Stearine	1 – 3
Oleo – Miristopalmitin	0 – 5
Oleo – Dipalmitin	21 – 43
Oleo- Palmitostearine	10 – 11
Palmito – Diolein	32 – 48
Stearo – Diolein	0 – 6
Linoleo - Diolein	3 – 12

**Tabel 2.7** Komposisi Asam Lemak Dalam Minyak Kelapa Sawit

<b>Asam Lemak</b>	<b>Jumlah (%)</b>
Asam Kaprilat	-
Asam kaproat	-
Asam Miristat	1,1 – 2,5
Asam Palmitat	40 – 46
Asam Stearat	3,6 – 4,7
Asam Oleat	30 – 45
Asam Laurat	-
Asam Linoleat	7 – 11

### 2.7. *State of The Art*

Biodiesel merupakan bahan bakar alternatif yang sangat berpotensi untuk dikembangkan, karena selain memiliki bahan baku dalam jumlah yang melimpah, biodiesel juga bersifat ramah lingkungan dibandingkan dengan bahan bakar fosil. Sintesis biodiesel menggunakan biokatalis merupakan proses alternatif yang banyak menarik perhatian untuk menggantikan proses konvensional dengan menggunakan katalis alkali karena mempunyai keunggulan di proses separasi yang lebih mudah dan tidak menghasilkan reaksi samping yang merugikan. Namun, biokatalis ini mudah terdeaktivasi oleh alkohol yang merupakan reaktan dalam reaksi sintesis biodiesel. Oleh karena itu, digunakan rute non – alkohol dengan menggunakan alkil asetat sebagai pengganti alkohol yang juga berfungsi sebagai penstabil alkil yang mampu mempertahankan aktivitas dan stabilitas biokatalis selama reaksi berlangsung.

Penggunaan metil asetat sebagai reaktan untuk sintesis biodiesel memiliki potensi yang baik untuk menggantikan katalis basa pada rute konvensional. Biasanya, metanol digunakan sebagai sebagai pendonor alkil untuk sintesis biodiesel. Namun, lingkungan beralkohol dapat membuat aktivitas enzim turun. Masalah ini dapat menjadi bumerang untuk industri – industri yang memproduksi biodiesel dengan enzim sebagai biokatalis.

Belakangan ini, metil asetat sedang dikembangkan sebagai pendonor alkil pengganti metanol dalam sintesis biodiesel. tim peneliti dari Cina, yakni Du et al.

(2004), melakukan studi komparasi antara rute alkohol dan non alkohol, dimana dalam laporan Du *et al.* yang mereaksikan 9.65 g minyak kedelai, 30 % *novozym 435* (oil wt) pada suhu 40<sup>0</sup>C menghasilkan yield biodiesel sebesar 92%. Sementara itu Xu *et al.* (2005), melakukan studi dan penelitian tentang persamaan model kinetika sederhana untuk reaksi interesterifikasi menggunakan substrat trigliserida dengan metil asetat sebagai pendonor alkil untuk memproduksi biodiesel.

Pada tahun 2007 Wei Li juga melakukan penelitian reaksi Transesterifikasi dengan menggunakan *whole cell R. oryzae* enzim lipase, menghasilkan yield biodiesel sebesar 90%, (Wei li *et al*, 2007)

Pada tahun 2005 dilakukan juga penelitian tentang reaksi interesterifikasi dari penggantian etanol menjadi metil asetat yang dilakukan oleh Sunil S. Bhagwat *et al.*, dengan menggunakan katalis lipase. Dari penelitian tersebut juga dilakukan studi tentang model kinetika dan molecular dari reaksi transesterifikasi etil asetat dan etanol yang diganti dengan *Porcine pancreatic* lipase (PPL) dan *Candida cylindracea* lipase. Menghasilkan yield biodiesel sebesar 83%. (Sunil *et al*, 2005)

Pada tahun 2009, peneliti jepang Shago Arai *et al*, melakukan penelitian produksi biodiesel kacang kedelai melalui proses transesterifikasi dengan mengkombinasikan empat jenis *whole cell*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus oryzae*, *Candida antarctica*, *A. Oryzae*. (Shogo aria *et al*, 2009)

Prasasti PDK Wulan menggunakan *whole cell R. oryzae* yang di imobilisasi melalui metode adsorpsi, reaksi yang diamati adalah reaksi hidrolisis minyak zaitun dalam sistem emulsi minyak air. (Prasasti PDK Wulan)

Pada tahun 2006 seorang peneliti bernama Akihiko kondo melakukan penelitian produksi biodiesel melalui proses Transesterifikasi menggunakan *Whole cell R. oryzae* Biokatalis Intracellular lipase yang diimobilisasi dalam Poliuretan. Substrat yang digunakan yaitu minyak goreng dan alkohol (metanol). (Akihiko Kondo, 2006)

Shinji Hama melakukan penelitian menggunakan fungus *whole cell* biokatalis *Rhizopus oryzae*, yang diimobilisasi kedalam poliuretan berukuran 6 mm x 6 mm x 3 mm. reaksinya yaitu transesterifikasi karena menggunakan



metanol sebagai katalis. Penelitian ini menggunakan PBR (Packed Bed Reaktor) yang diisi oleh poliuretan yang mengandung sel *Rhizopus oryzae* kering. Substrat dialirkan dengan menseset laju alir pada pompa melewati selang menuju PBR untuk mendapatkan produk biodiesel.

Peneliti Ayumi Yoshida juga menggunakan PBR seperti yang dilakukan oleh Shinji Hama, tetapi menggunakan *Aspergillus oryzae* yang terimobilisasi, dengan hasil konversi diatas 95%.

Hideki Fukuda peneliti dari jepang menggunakan *S.cerevisiae* sebagai whole cell biokatalis untuk memproduksi biodiesel, fukuda juga sedang meneliti potensi dari alga untuk memproduksi biodiesel guna menciptakan sumber energi terbarukan.

**Tabel 2.8 Summary State of the art whole cell biokatalis**

<i>S.cerevisiae</i>	Immobilized	<b>Hideki Fukuda (2008)</b>		
	Free			
<i>Aspergillus oryzae</i>	Immobilized	<b>Ayumi Yoshida</b>		
	Free			
<i>Rhizopus oryzae</i>	Immobilized	<b>Shinji Hama (2006)</b>		
	Free			
<i>Rhizopus oryzae</i>	Immobilized	<b>Akihiko Kondo (2001)</b>		
	Free			
<i>Candida cylindracea</i>	Immobilized			
	Free	<b>Sunil, et al (2005)</b>		
<i>Aspergillus oryzae</i>	Immobilized		<b>Shogo Arai,et al (2009)</b>	
	Free			
<i>Rhizopus oryzae</i>	Immobilized	<b>T.Matsumoto, et al (2003)</b>	<b>Wei Li, et al (2007)</b>	<b>Prasati PDK wulan</b>
	Free			
<i>Candida antartica</i>	Immobilized		<b>Heri Hermansyah ,et al(2008)</b>	
	Free		<b>Xu,Du,et al (2005)</b>	
<i>Candida rugosa</i>	Free		<b>Penelitian ini (2011)</b>	
	Immobilized			
		Transesterifikasi	Interesterifikasi	Hidrolisis

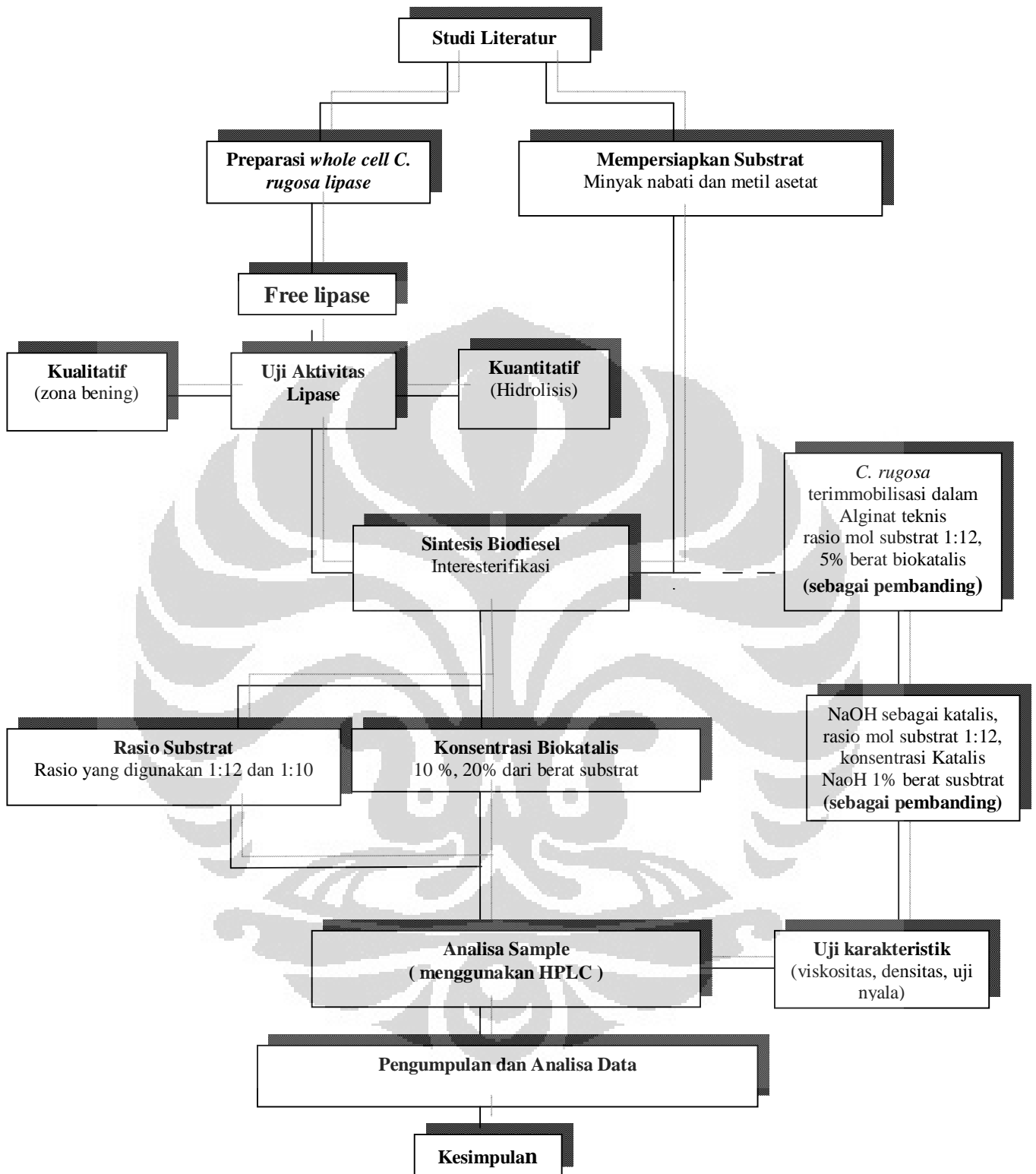
## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

Dalam bab ini akan dibahas alur proses penelitian, peralatan dan bahan yang digunakan selama penelitian, variabel penelitian, dan prosedur penelitian. Sebagian besar penelitian dilakukan di Laboratorium Bioproses di lantai 4, Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia, dan di Laboratorium Mikrobiologi LIPI Cibinong. Untuk melakukan analisis produk dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dilakukan di Lab TIAB PUSPIPTEK Serpong.

### 3.1. Alur Penelitian

Inti pekerjaan dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Studi literatur teknik Penggunaan budidaya bakteri *C. rugosa*, sebagai biokatalis.
2. Preparasi Biokatalis *C. rugosa* dan substrat yang akan digunakan.
3. Uji aktivitas lipase secara kualitatif dan kuantitatif (preliminary running)
4. Uji interesterifikasi dengan variasi rasio substrat 1:10 dan 1:12 (minyak baru dengan metil asetat), variasi konsentrasi biokatalis *C. rugosa* yang digunakan 10%, dan 20% berat dari berat substrat. Waktu reaksi yang dilakukan yaitu selama 50 jam
5. Analisa sampel menggunakan HPLC untuk melihat %yield biodiesel.



**Gambar 3.1.** Diagram alir penelitian

### 3.2. Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan yang digunakan selama penelitian adalah sebagai berikut:

#### A. Pembuatan Media YMA untuk Yeast *C. rugosa*

Media YMA (*yeast Manitol Agar*) dibuat dalam 300 mL

- Bakteri *C. rugosa*
- Yeast Extract
- Malt Extract
- Glukosa
- Peptone
- Agar
- Aquadest
- Beaker Glass 500 mL
- Batang pengaduk
- Kertas Timbang
- Timbangan Digital

#### B. Penanaman Yeast Dengan Metode Inokulasi

- Alkohol 70%
- Jarum ose
- Lemari LAF (Laminar Air Flow)
- Media YMA Miring ( yang sudah didiamkan selama 1 malam)
- Yeast *C. rugosa*
- Burner / Pembakar Spiritus
- Inkubator

#### C. Total Plate Count

- Tabung Microbial
- NaCl 1 M
- Spektrofotometer UV
- Mikropipet
- Burner / Pembakar Spiritus
- Buffer Phospat pH 7

- Pengaduk Vortex
- Cawan Petri

#### **D. Uji Aktivitas Lipase secara Kualitatif (Zona Bening )**

- Media YMA
- Gliserol Tributirin
- Erlenmeyer 500 mL
- Cawan Petri
- Mikro pipet
- *C. rugosa* yang telah diinkubasi selama 2 dan 4 hari
- Jarum ose
- Buffer phospat pH 7
- Disk Blank

#### **E. Preparasi Biokatalis *C. rugosa***

- Biakan Yeast *C. rugosa*
- Jarum ose
- Tabung reaksi
- Beaker glass 100 mL
- Alkohol 70%
- Burner / pembakar spiritus
- Mikro centrifuge merk VWR
- Tabung mikro bial 1,5 mL
- Pengaduk vortex
- Pipet Tetes

#### **F. Uji Aktivitas Lipase secara Kuantitatif ( Hidrolisis )**

- Minyak Goreng Baru
- Aquadest
- PVA ( poly vinil Alcohol )
- Waterbath Shaker
- Indikator Phenolptalein

- NaOH 0,05 M
- Biokatalis *C. rugosa* Tersuspensi
- Biuret

#### **G. Immobilisasi *C. rugosa* dalam Alginat teknis**

- Biakan yeast *C. rugosa*
- Aseton
- Microbial
- Alat sentrifuge
- Buffer phospat pH 5.0
- NaCl
- Na-Alginat
- Kasein

#### **H. Set Up Reaktor Batch**

- Erlenmeyer stopper 250 mL
- Magnetic stirrer dan bar stirrer
- Wadah Tupperware
- Waterbath
- Pompa sirkulasi air
- Selang

#### **I. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan NaOH Sebagai Katalis**

- Minyak Nabati
- Metil Asetat PA (Absolute 99.9 %)
- Beaker glass 500 mL
- Magnetic stirrer
- waterbath
- spatula besi
- Botol sampel
- NaOH Padatan
- Erlenmeyer 100 mL

**J. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan *Candida Rugosa* sebagai biokatalis**

- Minyak Nabati
- Metil asetat PA ( absolute 99.9%)
- Biakan Yeast *Candida rugosa*
- Magnetic stirrer
- waterbath
- Botol sampel
- Jarum ose
- Pembakar spiritus
- Timbangan digital
- Corong pisah
- Erlenmeyer 100 mL

**K. Reaksi Interesterifikasi Menggunakan *Whole cell C. rugosa* terimmobilisasi sebagai biokatalis**

- Minyak Nabati
- Metil asetat PA ( absolute 99.9%)
- *C. rugosa* yang telah diimmobilisasi dalam alginat
- Magnetic stirrer
- waterbath
- Botol sampel
- Jarum ose
- Pembakar spiritus
- Timbangan digital
- Erlenmeyer 100 mL

Peralatan lainnya yang digunakan pada percobaan ini adalah sebagai berikut:

- 1) *Beaker glass* sebagai tempat bahan penelitian. (Asahi Techno Glass, Iwaki, Japan).

- 2) Gelas ukur untuk mengukur volume bahan yang dibutuhkan. (Asahi Techno Glass, Iwaki, Japan).
- 3) Tabung reaksi sebagai tempat budidaya bakteri. (Glass, Brand, Unknown made).
- 4) Termometer digunakan untuk mengukur suhu pada reaksi yang sedang berlangsung. (Iwaki, Asahi Techno Glass, Japan)
- 5) *Syringe auto transfepette* digunakan untuk mengambil sampel berukuran micron.. (Transferpette, Brand, Germany)
- 6) *Waterbath* digunakan sebagai alat pemanas untuk memberikan sumber panas bagi reaksi yang terjadi di dalam labu Erlenmeyer sebagai reactor batch.
- 7) HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yang akan digunakan untuk mengukur konsentrasi substrat dan produk.
- 8) *Tupperware* yang akan digunakan untuk menampung air hangat.

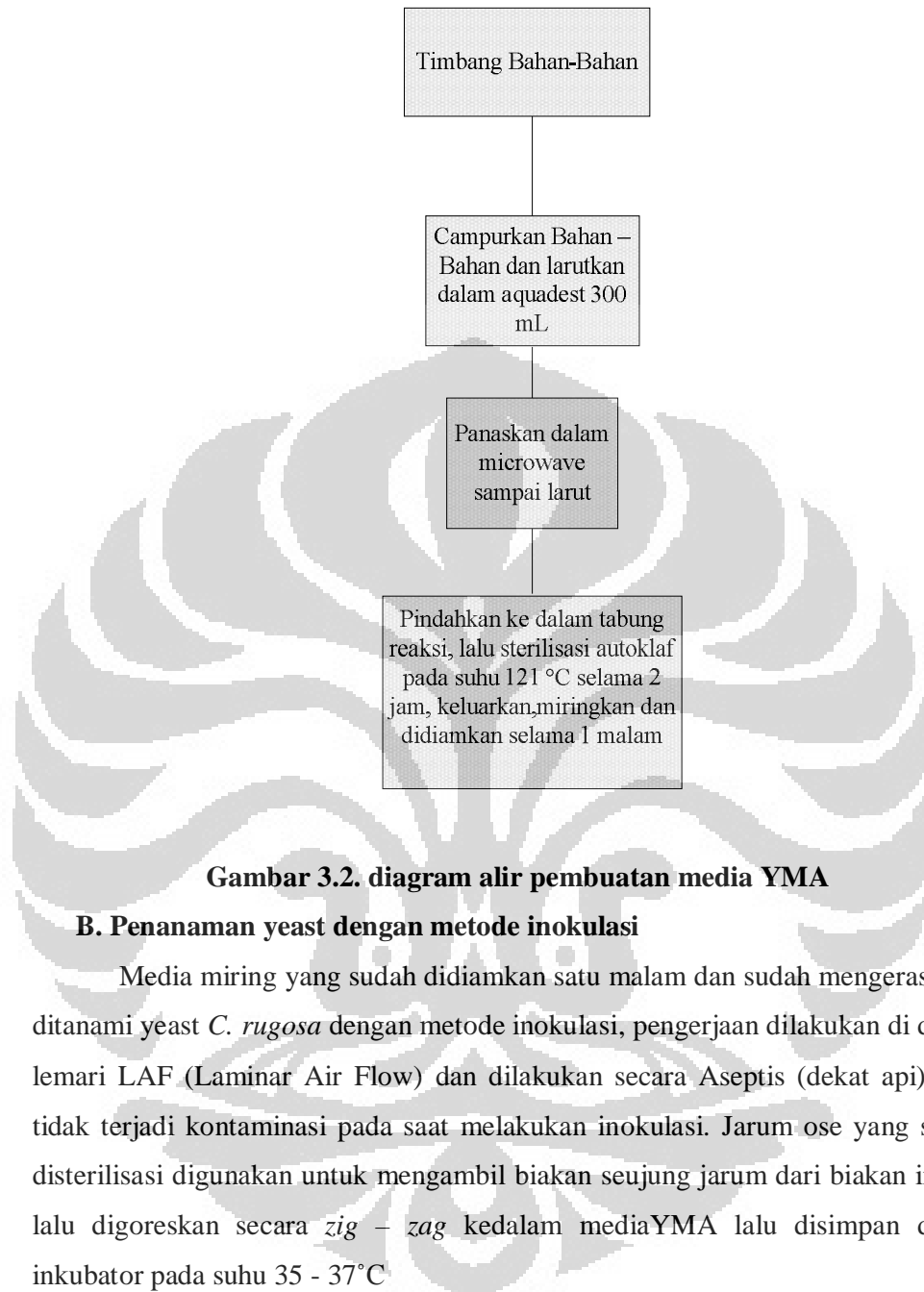
### 3.3. Prosedur Percobaan

Pada bagian ini akan diuraikan tahap-tahap yang sebelumnya telah digambarkan pada diagram alir penelitian.

#### A. Pembuatan Media YMA Untuk Yeast *C. rugosa*

Media YMA ( yeast Manitol Agar ) dibuat dalam 300 mL, Timbang malt extract seberat 0.903 gr, Yeast extract 0.903 gr, Glukosa 3.012 gr, Peptone 1.506 gr, Agar 7 gr yang berfungsi untuk memadatkan, lalu dilarutkan dalam aquadest sebanyak 300 mL. panaskan dalam microwave selama 10 menit sampai larutan menjadi homogen, setelah microwave pindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam, lalu miringkan dan didiamkan selama 1 malam.

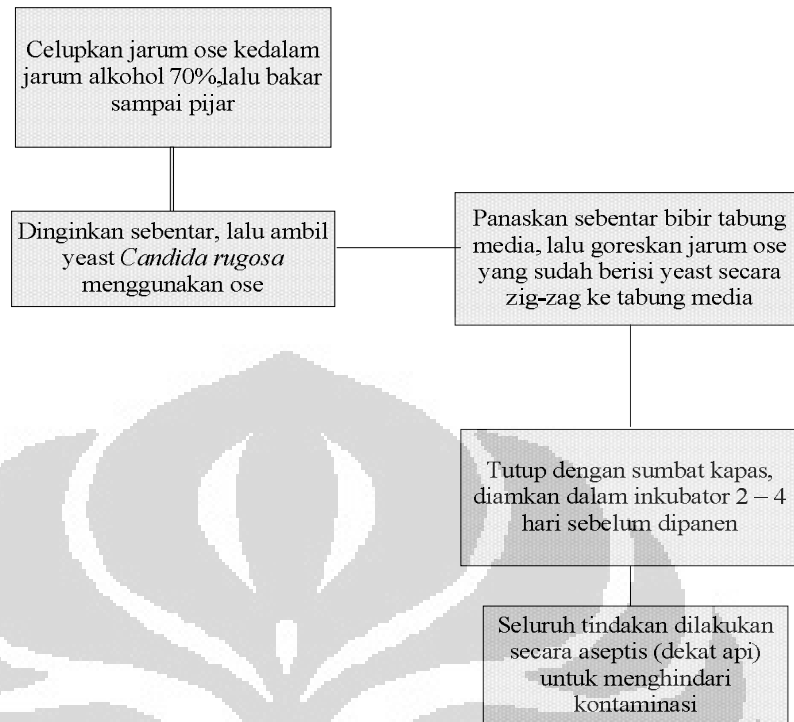




**Gambar 3.2. diagram alir pembuatan media YMA**

### **B. Penanaman yeast dengan metode inokulasi**

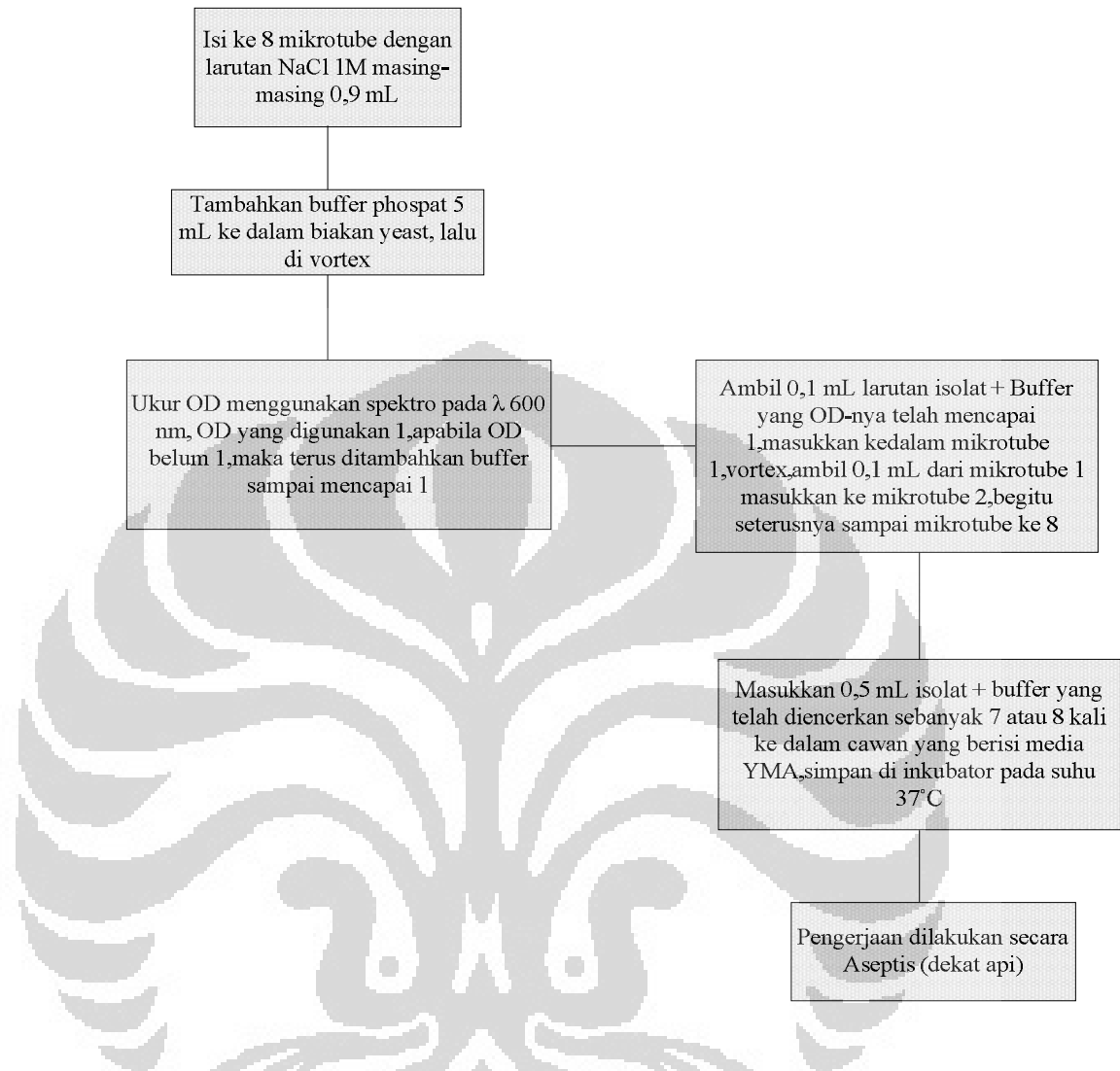
Media miring yang sudah didiamkan satu malam dan sudah mengeras, lalu ditanami yeast *C. rugosa* dengan metode inokulasi, pengerjaan dilakukan di dalam lemari LAF (Laminar Air Flow) dan dilakukan secara Aseptis (dekat api) agar tidak terjadi kontaminasi pada saat melakukan inokulasi. Jarum ose yang sudah disterilisasi digunakan untuk mengambil biakan seujung jarum dari biakan induk, lalu digoreskan secara *zig – zag* kedalam media YMA lalu disimpan dalam inkubator pada suhu 35 - 37°C



**Gambar 3.3 Diagram alir inokulasi**

### **C. Total Plate Count**

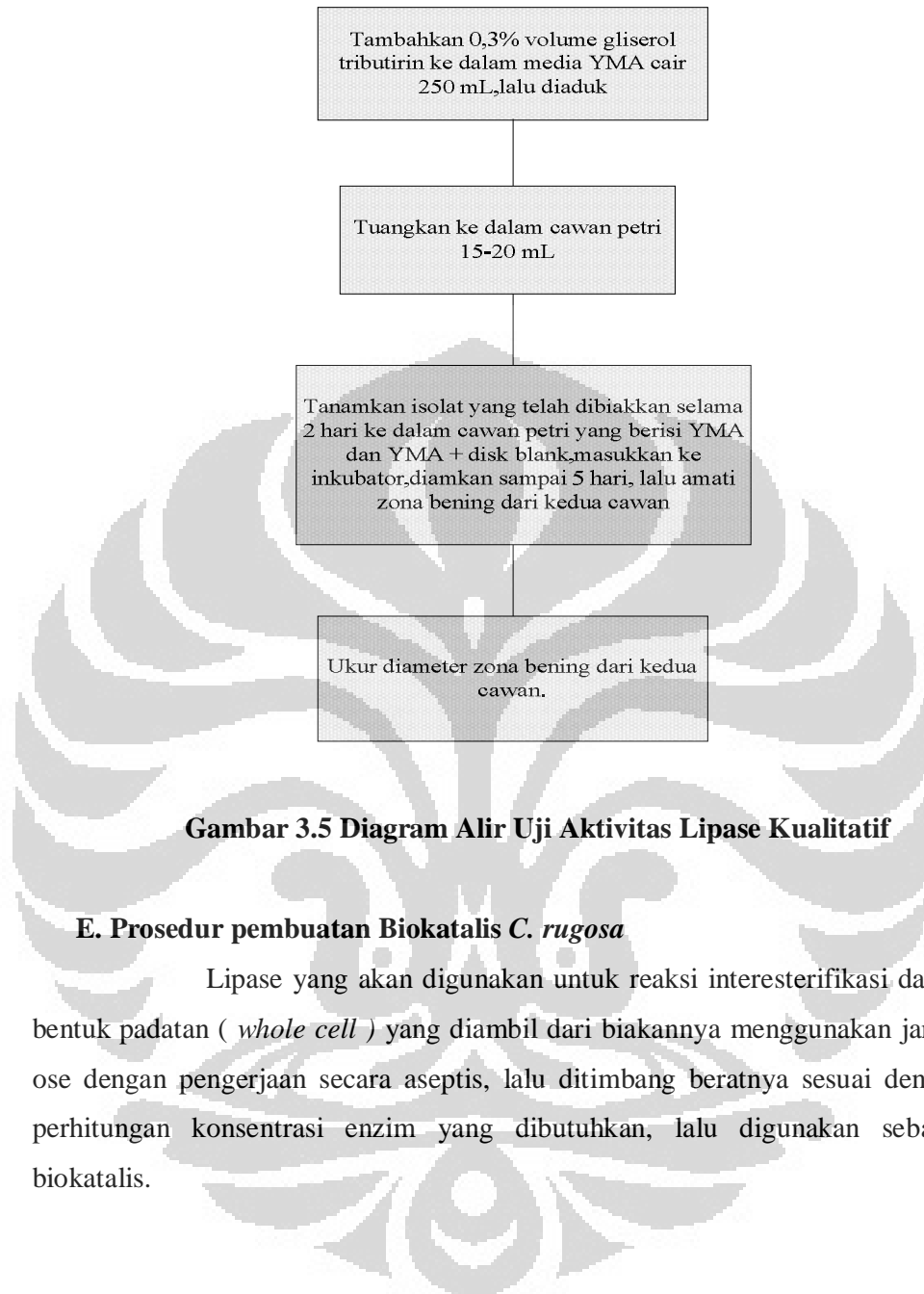
Prosedur total plate count dilakukan untuk mengetahui jumlah populasi bakteri dalam suatu kultur, juga untuk melihat apakah yeast *C. rugosa* hidup atau tidak di dalam media YMA miring. Biakan yeast yang telah dibiakkan 2 hari ditambahkan buffer phospat dan diukur OD (Optical Density) pada panjang gelombang 600 nm, OD yang digunakan adalah 1.



**Gambar 3.4 Diagram Alir Total Plate Count**

#### **D. Prosedur Uji Aktivitas Lipase secara Kualitatif**

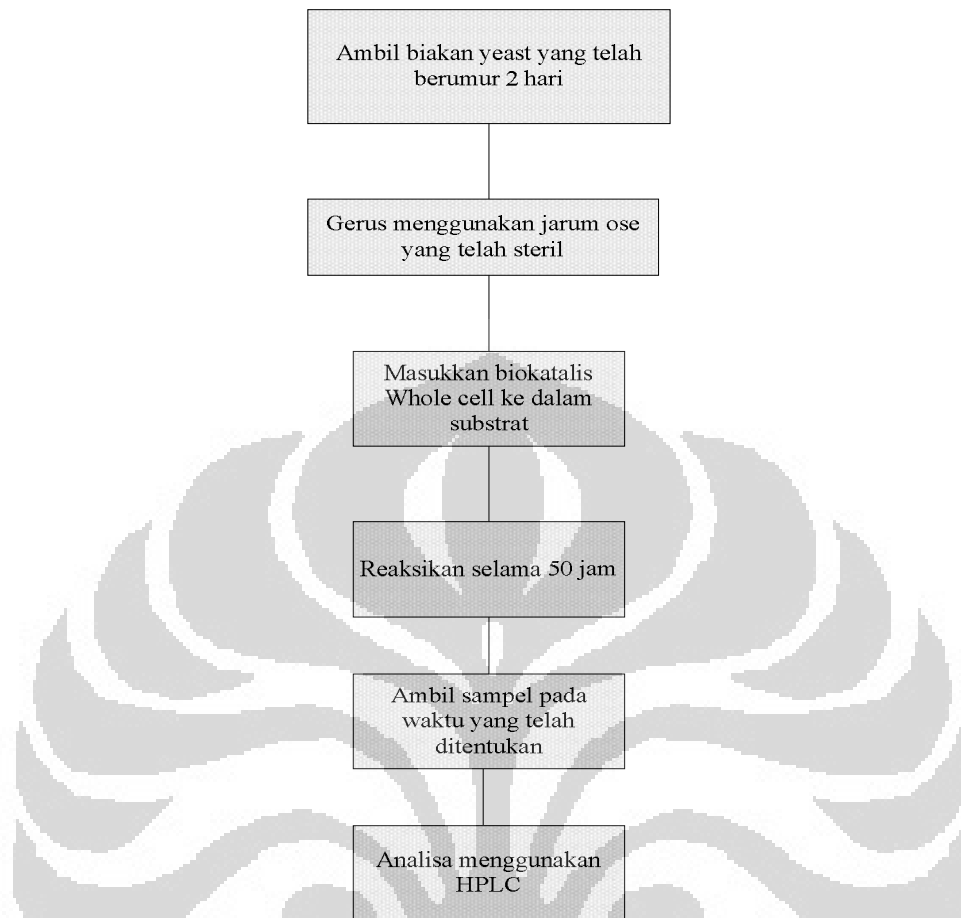
Uji aktivitas Lipase kualitatif dilakukan untuk melihat aktivitas dari yeast *C. rugosa* dalam menghasilkan lipase. Media YMA 250 mL ditambahkan gliserol tributirat sebanyak 0.3% dari 250 mL, yaitu 0.75 mL. Lipase yang dihasilkan dari yeast *C. rugosa* akan mengurai lemak yang terdapat dalam media dan membentuk zona bening. Semakin lebar diameter zona bening maka semakin tinggi aktivitas lipase.



**Gambar 3.5 Diagram Alir Uji Aktivitas Lipase Kualitatif**

#### **E. Prosedur pembuatan Biokatalis *C. rugosa***

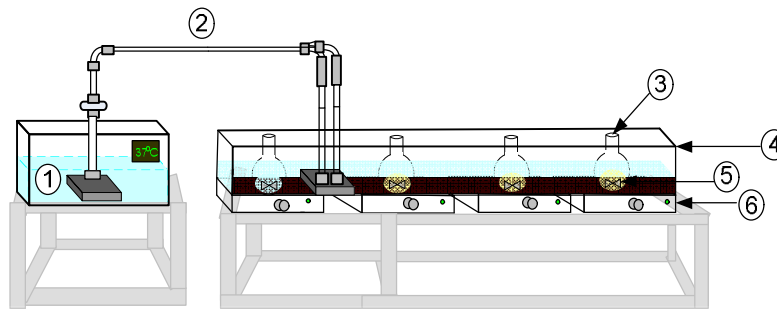
Lipase yang akan digunakan untuk reaksi interesterifikasi dalam bentuk padatan ( *whole cell* ) yang diambil dari biakannya menggunakan jarum ose dengan pengerjaan secara aseptis, lalu ditimbang beratnya sesuai dengan perhitungan konsentrasi enzim yang dibutuhkan, lalu digunakan sebagai biokatalis.



**Gambar 3.6 Diagram Alir Pembuatan biokatalis *C. Rugosa***

#### **F. Prosedur perangkaian Reaktor**

Reaktor yang digunakan adalah reaktor bersistem *batch*, dengan proses pengadukan menggunakan magnetic stirrer. Erlenmeyer stopper 250 mL diletakkan di dalam wadah tupperware berisi air yang disirkulasi dari waterbath dengan suhu 37°C, lalu magnetic stirrer diletakkan dibawah wadah untuk proses pengadukan.



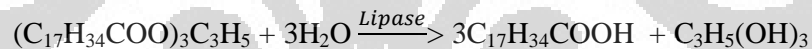
**Keterangan :**

1. Water bath; 2. Rangkaian Pompa air;
3. Erlenmeyer 25 ml; 4. Wadah Air (Tupper Ware);
5. Bar stirer; 6. Magnetic stirrer

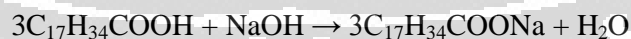
Gambar 3.7 skematic diagram reaktor batch interesterifikasi

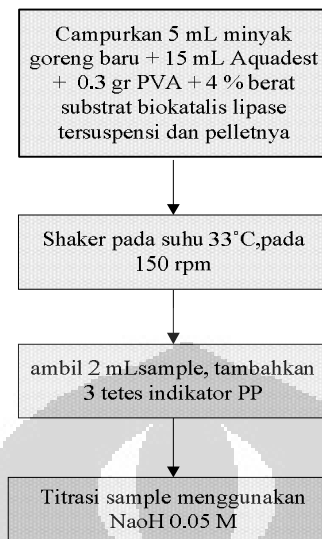
**G. Prosedur Uji aktivitas lipase secara kuantitatif (Hidrolisis)**

Uji aktifitas Lipase kuantitatif dilakukan untuk melihat jumlah lipase berdasarkan volume titran NaOH 0.05 M. Trigliserida dalam minyak goreng akan terhidrolisis dengan adanya penambahan air. Reaksi trigliserida dengan air dan *Whole cell C. rugosa lipase* sebagai biokatalis secara spesifik adalah sebagai berikut :



Trigliserida yang terhidrolisis dengan biokatalis lipase berubah menjadi asam lemak bebas (*Free Fatty Acid*), asam lemak bebas yang terbentuk di titrasi menggunakan NaOH 0.05 M, Reaksi NaOH dengan asam lemak bebas adalah sebagai berikut :





**Gambar 3.7 Diagram alir uji aktifitas lipase secara kuantitatif**

#### **H. Immobilisasi *C. rugosa* ke dalam Alginat Teknis**

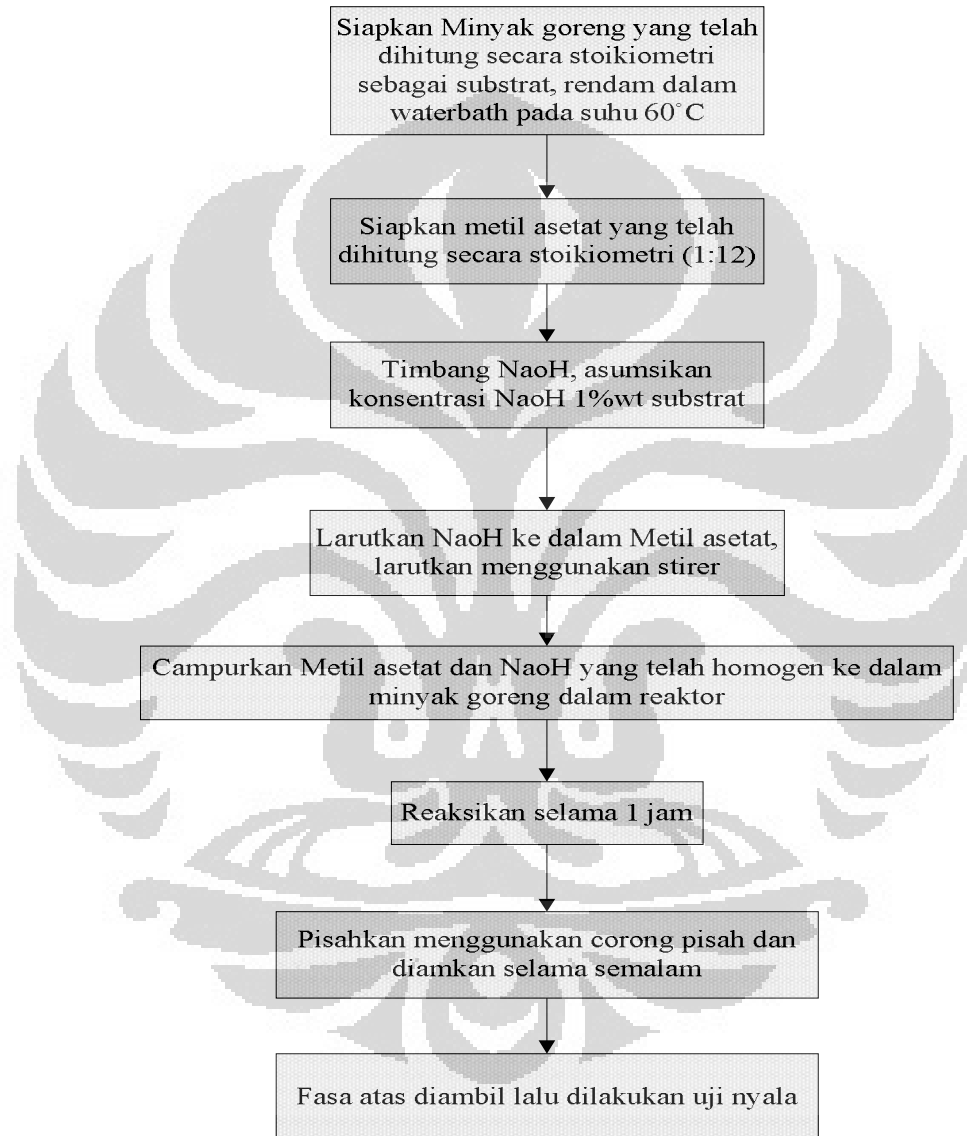
Supernatan diberi perlakuan dengan aseton (1:4 v/v) selama 1 jam pada suhu 4°C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan dilarutkan dalam 50 mM buffer fosfat (pH 5,0) dan dikering bekukan (*freeze dry*).

Enkapsulasi enzim lipase dilakukan melalui prosedur sebagai berikut, pelet yang didapat dicuci dengan NaCl 0,85%, kemudian ditambahkan 100 mL NaCl 0,85%, kasein 5 g dan Na-alginat 5 g. *Spry drying* dengan suhu *inlet* 165°C dan *outlet* 60°C. Sampel disimpan di lemari pendingin 4°C, selanjutnya digunakan untuk interesterifikasi dengan minyak goreng.

#### **I. Prosedur sintesis biodiesel rute non – alkohol menggunakan NaOH sebagai katalis**

Reaksi akan dilangsungkan dalam reaktor *batch* (labu Erlenmeyer 250 mL) yang berisi minyak nabati, metil asetat dengan perbandingan mol 1:12 . yang telah dihitung secara stoikiometrik dimasukkan ke dalam Erlenmeyer secara terpisah. Percobaan ini direaksikan pada suhu 60°C. Konsentrasi NaOH yang digunakan adalah 1% dari berat substrat campuran minyak goreng dan metil asetat. Sebelum reaksi dimulai, minyak goreng didalam labu erlenmeyer direndam

terlebih dulu dalam air hangat (waterbath) pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ , kemudian NaOH yang telah ditimbang beratnya di larutkan dalam metil asetat dan dilarutkan menggunakan magnetic stirrer, apabila telah homogen lalu dituangkan ke dalam minyak pada suhu  $60^{\circ}\text{C}$ , lalu reaksikan.



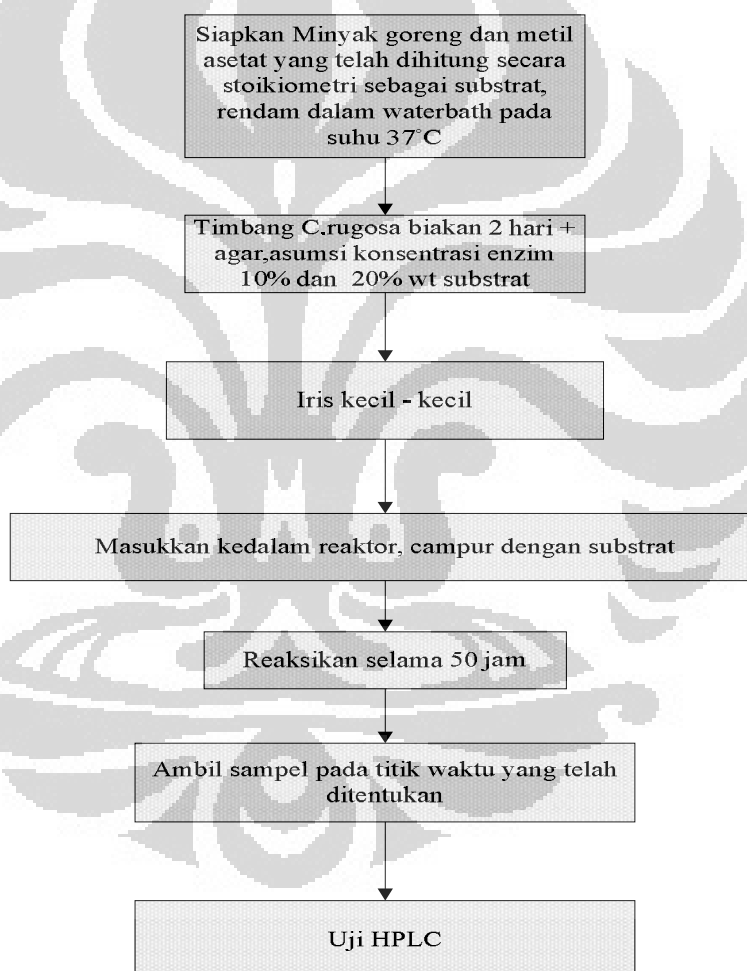
**Gambar 3.8** Diagram alir sintesis biodiesel menggunakan NaOH



### J. Prosedur Sintesis biodiesel Rute Non – Alkohol menggunakan *C. rugosa* sebagai biokatalis

Reaksi dilangsungkan dalam reaktor *batch* (labu erlenmeyer 250 ), yang berisi minyak goreng dan metil asetat yang telah dihitung volumenya secara stoikiometrik, lalu dimasukkan dalam waterbath bersuhu 37°C. variasi yang dilakukan yaitu variasi rasio mol substrat dan variasi konsentrasi enzim.

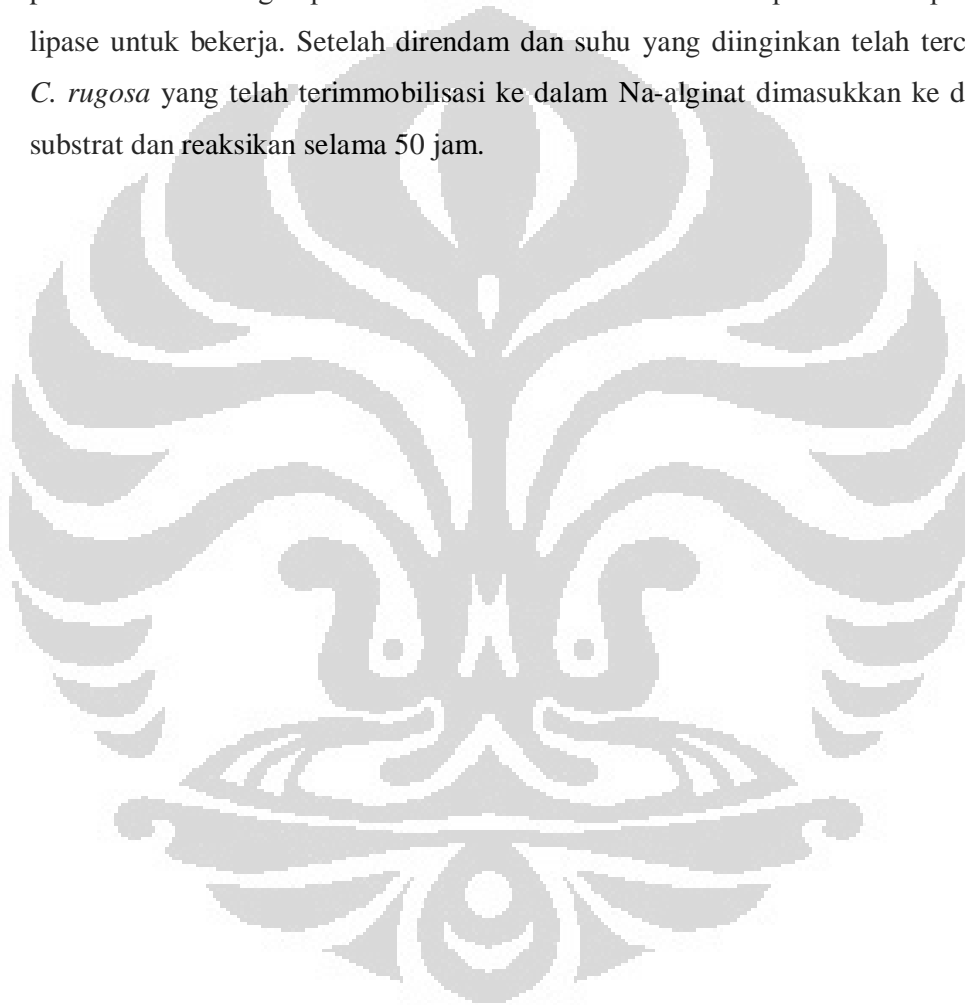
Timbang *C. rugosa* yang akan digunakan sebagai biokatalis dengan variasi konsentrasi 10% dan 20% dari berat substrat. lalu dicampurkan ke dalam substrat yang telah mencapai suhu 37°C dalam waterbath, lalu reaksi.



Gambar 3.9 Diagram alir sintesis biodiesel menggunakan biokatalis

**K. Prosedur Sintesis Biodiesel Rute Non – Alkohol menggunakan *C. rugosa* terimmobilisasi dalam Alginat sebagai biokatalis**

Reaksi dilangsungkan dalam reaktor *batch* (labu erlenmeyer 250 mL), yang berisi minyak goreng dan metil asetat yang telah dihitung volumenya secara stoikiometrik, lalu dimasukkan dalam waterbath bersuhu 37°C. Konsentrasi enzim yang digunakan yaitu 5% berat substrat, substrat direndam di dalam waterbath pada suhu 37°C agar pada saat enzim dimasukkan sudah pada suhu optimum lipase untuk bekerja. Setelah direndam dan suhu yang diinginkan telah tercapai, *C. rugosa* yang telah terimmobilisasi ke dalam Na-alginat dimasukkan ke dalam substrat dan reaksikan selama 50 jam.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini difokuskan pada reaksi Interesterifikasi minyak Nabati dengan metil asetat, dan preparasi Yeast *C. rugosa* sebagai biokatalis untuk menghasilkan biodiesel. Biokatalis yang digunakan dalam bentuk padatan. Produk yang dihasilkan akan di uji Karakteristiknya dan di uji konsentrasi kandungannya dengan menggunakan instrument HPLC (*high performance liquid chromatography*).

#### 4.1. Preparasi Biokatalis *Candida Rugosa*

Pada penelitian ini digunakan yeast *C. rugosa* karena bersifat Non-patogen yaitu tidak menyebabkan penyakit, *C. rugosa* menghasilkan lipase yang akan digunakan sebagai biokatalis untuk reaksi interesterifikasi biodiesel.

##### 4.1.1. Media *Yeast manitol agar* (YMA) Untuk Yeast *Candida Rugosa*

Media YMA merupakan tempat tumbuhnya Yeast *C. rugosa* penghasil lipase. Media ini mengandung pepton, yeast extract dan malt extract sebagai nutrisi untuk *C. rugosa*. Pembuatan media YMA ini dilakukan melalui Proses autoklaf, proses ini bertujuan untuk menjaga agar tidak terjadi kontaminasi dan media tetap steril sebelum inokulasi. Setelah proses autoklaf selesai, media cair dimiringkan, dengan adanya kandungan agar pada media, maka dalam waktu satu malam media akan menjadi keras dan siap di inokulasi.

##### 4.1.2. Inokulasi

Tahap Inokulasi merupakan tahap penanaman yeast *C. rugosa*, yang bertujuan untuk mengembangbiakkan *C. rugosa* penghasil lipase. *C. rugosa* dibiakkan pada media *yeast manitol agar* untuk dapat digunakan sebagai biokatalis pada reaksi interesterifikasi. inokulasi dilakukan secara aseptis (dekat api) agar tidak terjadi kontaminasi, teknik ini dikerjakan pada lemari *Laminar air flow* (LAF) yang telah dilengkapi dengan lampu UV. Yeast yang telah ditanam dalam media disimpan pada suhu ruang selama dua malam untuk kemudian dipanen dan dapat digunakan sebagai biokatalis.

#### 4.2. **Total Plate Count**

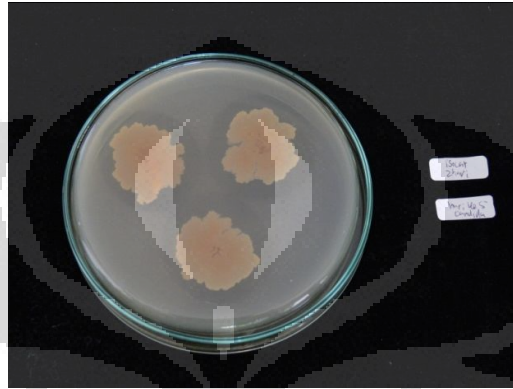
*total plate count* dilakukan untuk menghitung populasi yeast *C. rugosa* dalam media, uji ini dilakukan juga untuk melihat dan memastikan bahwa yeast hidup dalam medianya. Teknik Total plate count yang dilakukan adalah teknik dilusi (pengenceran). Biakan yeast *C. rugosa* yang telah berumur 2 hari dan 4 hari dipanen dengan cara menambahkan buffer fosfat pH 7 untuk menjaga pH pada media, lalu diukur Optical Density – nya (OD) menggunakan spektrofotometer, OD bertujuan untuk melihat tingkat kekeruhan sampel, Absorbansi yang digunakan adalah 1.

Untuk biakan 2 hari, terlihat pertumbuhan bakteri pada pengenceran  $10^8$  (pengenceran ke 8), dengan jumlah titik koloni 14 dan 13, rata – ratanya adalah 13.5, jadi jumlah populasi yeast  $1.35E9$  CFU (*Colony Forming Unit*), sedangkan untuk biakan 4 hari terlihat pertumbuhan yeast pada  $10^6$  dan  $10^7$ , tetapi pada pengenceran  $10^8$  tidak tumbuh. Pada  $10^6$  memiliki jumlah titik koloni 21 dan 19, dengan nilai rata – rata 20, jadi jumlah populasi pada biakan hari ke 4 adalah  $2E7$  CFU, dari data dapat dilihat bahwa ada penurunan jumlah populasi pada yeast, hal ini menandakan banyak *C. rugosa* yang mati dari hari ke dua di panen sampai hari ke 4.

#### 4.3. **Uji Aktifitas Lipase secara Kualitatif ( Zona Bening )**

Uji aktifitas lipase kualitatif dilihat dengan cara pengukuran luas zona bening yang dihasilkan dari *C. rugosa*. Uji zona bening dilakukan untuk mengetahui aktifitas yeast *C. rugosa* dalam menghasilkan lipase, pengerjaan dilakukan dengan bentuk 2 jenis isolat, yaitu isolat murni dan isolat yang ditambahkan buffer fosfat pH 7. Pada proses uji zona bening digunakan cawan petri yang telah berisi media YMA yang telah di campur dengan gliserol. Biakan yeast *C. rugosa* yang telah berumur 2 dan 4 hari dipanen, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri dan diletakkan di dalam inkubator pada suhu  $37^{\circ}C$ , suhu ini merupakan suhu optimal untuk *C. rugosa* agar dapat hidup. untuk uji aktifitas zona bening isolat yang telah ditambahkan buffer fosfat, pada media ditambahkan cakram disk untuk menyerap buffer. Biakan *C. rugosa* yang telah ditambahkan buffer fosfat di ukur OD nya menggunakan alat spektrofotometer

UV-VIS pada panjang gelombang 600, OD yang digunakan adalah 1. OD atau disebut dengan *Optical Density*, yaitu angka yang menunjukkan tingkat pertumbuhan bakteri dengan melihat tingkat kekeruhan sampel berdasarkan absorbansinya. Berikut ini adalah data dari luas zona bening yang dihasilkan oleh *C. rugosa*.



**Gambar 4.1** Isolat *C. rugosa* membentuk zona bening

Tabel 4.1. data diameter zona

Nama Isolat Candida Rugosa	Inkubasi																								
	Cawan	Panen 2 Hari												Panen 4 Hari											
		Isolat (cm)						Isolat + Buffer (cm)						Isolat (cm)						Isolat + Buffer (cm)					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
I		0,16	0,25		1,4																				
		0,20	0,15		0,95																				
		0,13	0,15		0,90																				
		<b>0,16</b>	<b>0,18</b>		<b>1,08</b>																				
II		0,3	0,3																						
		0,6	0,6																						
		0,2	0,35																						
		<b>0,36</b>	<b>0,45</b>																						
III								0,15	0,4		0,85											0,35			
								0,1	0,4		0,9											0,45			
								<b>0,12</b>	<b>0,4</b>		<b>0,87</b>											0,30			
																							<b>0,36</b>		
IV								0,1	0,35		0,75														
								0,2	0,25		0,75														
								<b>0,15</b>	<b>0,3</b>		<b>0,75</b>														
V								0,1	0,275																
								0,115	0,1																
								<b>0,107</b>	<b>0,18</b>																
VI								0,125	0,2																
								0,075	0,3																
								<b>0,1</b>	<b>0,75</b>																

Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa luas zona bening yang dihasilkan oleh *C. rugosa* yang lebih lebar yaitu pada panen biakan hari ke 4 dan isolat murni tanpa penambahan buffer phospat. Luas diameter rata – ratanya yaitu 0.60 cm. zona bening terbentuk karena adanya enzim lipase yang mendegradasi lemak yang telah dioleskan pada media, hal ini terjadi karena *C. rugosa* mensekresikan lipase dan mendegradasikan lemak sehingga membentuk zona bening.

#### 4.4. Uji Aktifitas Lipase secara Kuantitatif ( Hidrolisis )

Uji aktifitas lipase dengan reaksi hidrolisis dilakukan untuk mengetahui jumlah aktifitas lipase yang terdapat dalam yeast *C. rugosa*. reaksi hidrolisis dilakukan dengan cara menambahkan 5 mL minyak goreng baru dengan 15 mL aquadest, kemudian masukkan PVA teknis (*Poly Vinil Alcohol*) sebanyak 0.3 gram, PVA berfungsi sebagai pengemulsi supaya minyak dan air dapat larut. setelah itu masukkan *whole cell C. rugosa* dalam bentuk pellet (padatan) dengan konsentrasi biokatalis 10% berat substrat. Setelah proses pencampuran substrat dan biokatalis selesai, masukkan sampel ke dalam reaktor. Reaksi hidrolisis dilakukan selama 1 dan 10 jam, setelah reaksi hidrolisis selesai, diambil sebanyak 2 mL dari sampel untuk kemudian dititrasi menggunakan NaOH 0.05M. *Free Fatty Acid* ( FFA ) yang terbentuk dari hasil hidrolisis merupakan hasil konversi dari trigliserida. Semakin banyak FFA yang terbentuk, menunjukkan semakin banyak trigliserida yang terkonversi. Hal ini menandakan bahwa semakin tinggi aktifitas dari *C. rugosa lipase* .

Dari Hasil percobaan dapat dilihat bahwa persen konversi trigliserida meningkat dari 0.21% menjadi 0.58% dengan bertambahnya waktu reaksi (Data tercantum di lampiran), hal ini menunjukkan bahwa aktivitas lipase semakin meningkat, hal ini telah dibuktikan oleh Titis rejosso yang melakukan uji aktivitas lipase menggunakan bakteri *Rhizophus oryzae*, Titis melakukan reaksi selama 10 jam dan mendapatkan hasil konversi trigliserida sebesar 32.06%. walaupun kecendrungan konversi akan terus naik, diperkirakan diatas jam ke-8 tidak akan jauh berbeda dari data ini. Analisis aktifitas / konversi enzimatik dilakukan dengan melihat kandungan total FFA, tanpa menghiraukan dari rantai mana FFA tersebut berasal, konversi yang ditunjukkan dengan persentase hidrolisis ini tidak dapat menunjukkan aktifitas enzim secara detail, hanya dapat melihat seberapa besar FFA yang terbentuk dari hasil persentase trigliserida yang terkonversi.



Gambar 4.2 sampel hasil reaksi hidrolisis

#### 4.5. Sintesis Biodiesel

Proses sintesis biodiesel konvensional atau biasa dikenal dengan rute alkohol memang paling sering digunakan, menggunakan metanol sebagai pendonor gugus alkil. Tetapi lingkungan yang beralkohol membuat lipase dapat terdeaktivasi dengan cepat. Pada penelitian ini proses sintesis biodiesel yang digunakan dari minyak goreng dan dilakukan melalui rute non – alkohol, dengan kondisi operasi pada suhu 37°C. Metanol yang berfungsi sebagai pendonor gugus



alkil pada saat reaksi diganti dengan metil asetat. Untuk percobaan *pre – elementary* dilakukan percobaan sintesis biodiesel dengan katalis NaOH.



**Gambar 4.3. produk biodiesel menggunakan katalis NaOH**

Temperature reaksi yang digunakan yaitu  $60^{\circ}\text{C}$ , dan waktu reaksi dilakukan selama 1 jam. Hasil dari reaksi yang terbentuk berupa dua fasa yaitu lapisan atas yang merupakan metil ester yang berwarna kuning bening dan jernih, sedangkan di lapisan bawah merupakan triasetilgliserol yang berwarna keruh. Lapisan atas diambil untuk diuji karakteristiknya, yaitu densitas, viskositas dan uji nyala. Hasil yang didapat akan dibandingkan dengan literatur karakteristik biodiesel.

#### **4.5.1. Sintesis Biodiesel menggunakan *whole cell C. rugosa* lipase sebagai biokatalis**

Pada percobaan kali ini akan dilakukan pengujian terhadap *Whole cell C. rugosa* lipase sebagai biokatalis. Penggunaan lipase sebagai biokatalis disebabkan oleh kemampuan lipase yang sangat efektif dalam memecah minyak dan lemak, selain itu lipase juga dapat digunakan sebagai biokatalis yang sangat aktif untuk meningkatkan laju reaksi dan jumlah *yield* produk dalam proses reaksi transesterifikasi, alkoholisis, dan esterifikasi serta interesterifikasi.



**Gambar 4.4 sintesis biodiesel menggunakan biokatalis *C. rugosa***

Lipase yang akan digunakan pada percobaan ini yaitu lipase yang dihasilkan dari yeast *C. rugosa*. Pada penelitian sebelumnya Akihiko kondo menggunakan *whole cell R. oryzae lipase* dengan proses reaksi transesterifikasi. Nilai konversi biodiesel yang didapat yaitu 90%. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktifitas dari *whole cell C. rugosa* yang akan digunakan sebagai biokatalis langsung (intraseluler) dalam sintesis biodiesel. Percobaan ini dilakukan melalui rute non-alkohol, substrat yang digunakan yaitu minyak nabati dan metil asetat yang berfungsi untuk menyuplai gugus alkil. Dalam sintesis biodiesel menggunakan rute non alkohol, trigliserida mengalami pemutusan rantai menjadi digliserida, monogliserida dan triacylglicerol, dimana disetiap tahap tersebut dihasilkan metil ester yang dipresentasikan sebagai biodiesel.

Pada penelitian ini dilakukan variasi rasio mol substrat dan variasi konsentrasi enzim. Rasio mol substrat antara minyak goreng dengan metil asetat yang divariasikan yaitu 1:10 dan 1:12, dan variasi konsentrasi enzim yang

digunakan 10% dan 20% dari berat substrat. Reaksi interesterifikasi dilakukan selama 50 jam, karena dari hasil percobaan zona bening yang dilakukan, *yeast C. rugosa* menghasilkan lipase pada saat hari ke 2 sampai hari ke 4 setelah dia diinokulasikan ke dalam media agar. Lalu dilakukan sampling untuk dianalisa sampelnya menggunakan HPLC (*high performance liquid chromatography*).

Percobaan pertama dilakukan dengan melakukan variasi perbandingan mol substrat antara 1:10 dengan 1:12. Dengan konsentrasi enzim tetap yaitu 10% wt substrat. Dari stokiometri reaksi interesterifikasi terlihat bahwa dibutuhkan tiga mol metil asetat untuk bereaksi dengan satu mol trigliserida agar dihasilkan tiga mol *fatty acid methyl ester* dan satu mol triasetilgliserol. Penggunaan metil asetat yang berlebih dimaksudkan agar kesetimbangan reaksi dapat bergerak ke arah produk. Konsentrasi metil ester akan bertambah seiring dengan pertambahan rasio mol metil asetat dan minyak goreng. Setelah variasi mol substrat dilakukan, maka tahap berikutnya dari percobaan ini yaitu memvariasikan konsentrasi biokatalis (*whole cell C. rugosa lipase*), dengan meningkatnya konsentrasi biokatalis, maka akan meningkatkan jumlah berat dari biokatalis yang digunakan untuk percobaan sintesis biodiesel. Prinsip mekanisme dalam reaksi enzimatik pada umumnya berbanding lurus terhadap produk yang dihasilkan. Semakin besar jumlah konsentrasi biokatalis yang digunakan, maka akan semakin besar jumlah % yield biodiesel yang digunakan. Pengaruh penambahan biokatalis dapat menyebabkan laju reaksi dari pembentukan produk akan menjadi semakin besar dengan meningkatnya konsentrasi enzim yang digunakan.

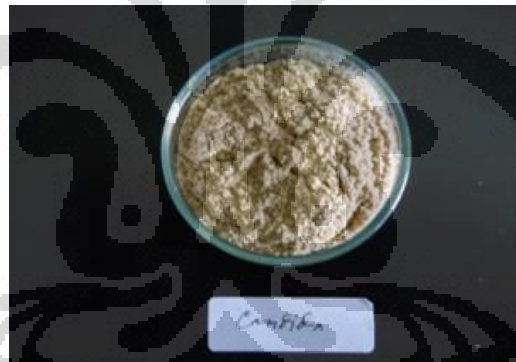
Sisi aktif suatu enzim dapat digunakan berulang kali oleh banyak substrat. Substrat yang berikatan dengan sisi aktif enzim akan membentuk produk. Pelepasan produk menyebabkan sisi aktif enzim bebas untuk berikatan dengan substrat yang lainnya. Oleh karenanya hanya dibutuhkan sejumlah kecil enzim untuk mengkatalis sejumlah besar substrat.

#### **4.5.2. Sintesis Biodiesel Menggunakan whole cell candida rugosa yang terimmobilisasi dalam Alginat teknis.**

Pada percobaan tambahan ini dilakukan uji sintesis biodiesel menggunakan *whole cell C. rugosa* yang terimmobilisasi dalam alginat teknis,

percobaan ini dilakukan sebagai tambahan untuk dilihat hasil pembentukan produknya sebagai pembandingan dalam uji sintesis biodiesel, proses pembuatan biokatalis terimmobilisasi dilakukan dan dikerjakan oleh Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang berlokasi di Cibinong.

Teknik pembuatannya adalah sebagai berikut, media yang diinkubasi selama 4 hari di sentrifugasi, kemudian Supernatan diberi perlakuan dengan aseton (1:4 v/v) selama 1 jam pada suhu 4°C, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama 10 menit. Endapan dilarutkan dalam 50 ml buffer fosfat (pH 5,0) dan dikering bekukan untuk digunakan sebagai sediaan lipase, Enkapsulasi *Whole cell* dilakukan melalui prosedur sebagai berikut, pelet (*whole cell*) yang didapat dicuci dengan NaCl 0,85%, kemudian ditambahkan 100 mL NaCl 0,85%, kasein 5 g dan Na-alginat 5 g. *Spry drying* dengan suhu *inlet* 165°C dan *outlet* 60°C. Sampel disimpan di lemari pendingin 4°C, selanjutnya digunakan untuk reaksi interesterifikasi dengan minyak sawit.



**Gambar 4.5** *Whole cell C. rugosa* terimmobilisasi dalam alginat

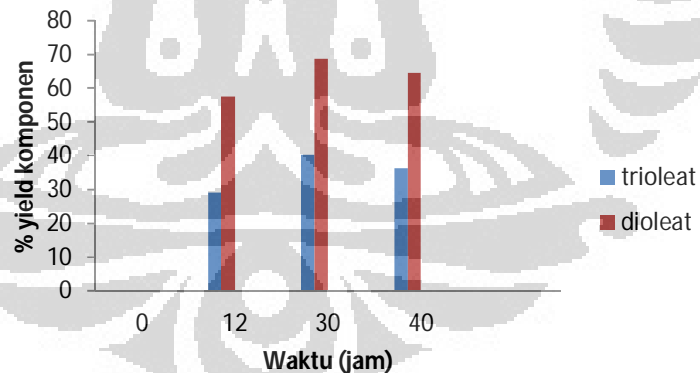
Penelitian tentang teknik penggunaan kembali lipase adalah dengan teknik reaksi immobilisasi dengan bantuan *support* sebagai media pembantu yang dapat menahan enzim dalam struktur molekulnya sehingga enzim dapat digunakan kembali sehingga biaya produksi reaksi secara enzimatik dapat ditekan dengan kata lain immobilisasi dapat meningkatkan stabilitas kerja enzim lipase. Terdapat beberapa macam teknik immobilisasi yang dapat diaplikasikan. Setiap metode memiliki keunggulan dan kelemahan masing-masing. Pada penelitian ini, dilakukan immobilisasi dengan menggunakan Alginat. Alginat ini merupakan polimer linier organik polisakarida yang terdiri dari monomer  $\alpha$ -L asam guluronat

(G) dan  $\beta$ -D asam manuronat (M), atau dapat berupa kombinasi dari kedua monomer tersebut.

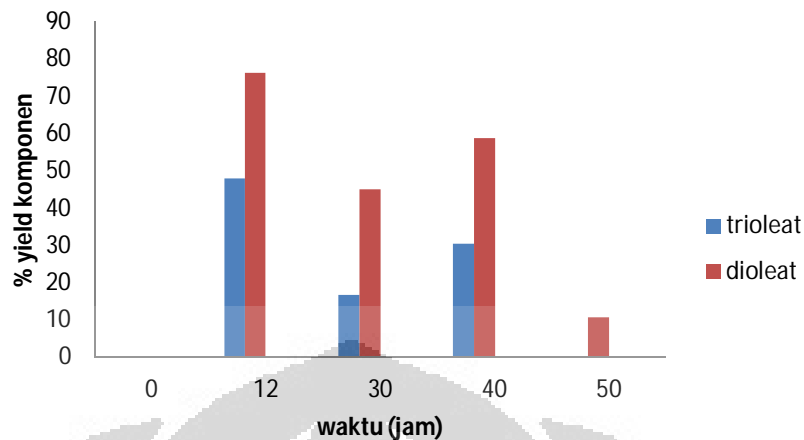
Setelah proses immobilisasi selesai, *whole cell* yang telah terimmobilisasi digunakan sebagai biokatalis pada reaksi interesterifikasi, rasio mol yang digunakan yaitu 1: 12 dengan konsentrasi biokatalis 1% wt substrat. Suhu yang digunakan pada saat reaksi berlangsung yaitu 37°C dimana suhu ini merupakan suhu optimum untuk lipase.

#### 4.6. Analisa HPLC ( *High Performance Liquid Chromatography* )

Pada pengujian HPLC, digunakan standar metil oleat karena metil oleat merupakan komponen dengan jumlah terbesar dalam biodiesel, sehingga jumlah metil oleat yang terkandung dalam sampel dapat di presentasikan sebagai biodiesel yang terbentuk. Sampel yang dianalisa adalah sampel dengan rasio mol substrat 1:10 dan 1:12 dengan konsentrasi biokatalis 10% berat substrat, sampel dengan rasio mol substrat 1:12 dengan konsentrasi biokatalis *whole cell C. rugosa* 10% dan 20% berat substrat, dan sampel dengan rasio mol 1:12 dengan menggunakan biokatalis *whole cell C. rugosa* yang terimmobilisasi dalam alginate yang digunakan sebagai pembanding.



**Gambar 4.10** Diagram % yield komponen – komponen yang terdapat dalam sampel biodiesel dengan rasio mol substrat 1:12 dan konsentrasi biokatalis 10% wt



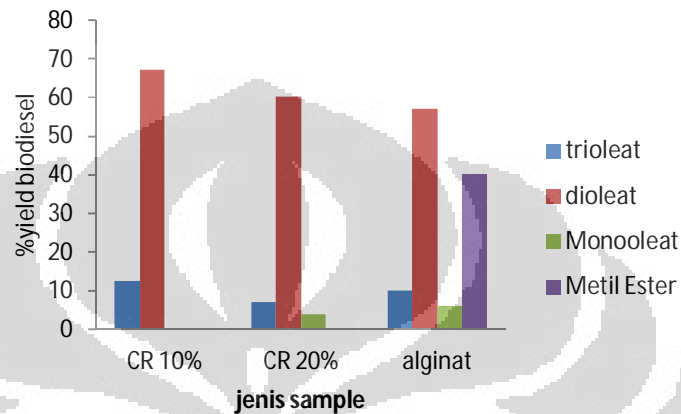
**Gambar 4.11 Diagram % yield komponen – komponen yang terdapat dalam sampel biodiesel dengan rasio mol substrat 1:10 dan konsentrasi biokatalis 10% wt dengan waktu reaksi selama 50 jam**

Dari gambar 4.11 diatas, dengan kondisi reaksi rasio mol substrat 1:10 dan konsentrasi biokatalis 10% wt, tidak terdapat metil ester yang dapat dipresentasikan sebagai biodiesel, hanya terdapat trioleat dan dioleat. Biokatalis yang digunakan pada penelitian ini yaitu dalam bentuk *whole cell C. rugosa* padatan..

Metil ester tidak terbentuk karena aktifitas dari lipase yang dihasilkan dari yeast *C. rugosa* terlalu rendah, sehingga tidak dapat memotong rantai trigliserida membentuk metil ester. Reaksi dilakukan menggunakan *C. rugosa free lipase*, dimana pada proses ini tidak dilakukan immobilisasi. Pada gambar 4.10 terlihat bahwa dioleat yang terbentuk lebih banyak daripada gambar 4.11, tetapi tidak terbentuk metil oleat sama sekali. Hal ini disebabkan oleh aktifitas lipase yang terlalu kecil sehingga tidak dapat memutus rantai trigliserida hingga membentuk metil ester, tetapi hanya membentuk dioleat saja. Dioleat yang dimiliki oleh produk ini menunjukkan bahwa dengan rasio mol substrat yang lebih besar antara minyak dengan metil asetat dapat membuat laju pembentukan ke arah produk menjadi semakin besar. Maka untuk variasi konsentrasi biokatalis berikutnya, digunakan rasio mol substrat 1:12 sebagai basis substrat. hal ini didukung oleh hasil penelitian *marno* yang menggunakan rasio mol substrat 1:12, marno

mendapatkan konsentrasi produk yang lebih besar daripada menggunakan rasio mol substrat 1:10.

Pada percobaan berikutnya dilakukan variasi konsentrasi biokatalis dengan konsentrasi 10% dan 20% wt substrat. Waktu reaksi dilakukan selama 50 jam.



**Gambar 4.12** Diagram % yield komponen – komponen dalam sampel dengan variasi konsentrasi *C. rugosa* dan Alginat sebagai pembanding

Dari data table pada gambar 4.12 dapat dilihat bahwa metil ester terbentuk pada sampel yang menggunakan biokatalis *whole cell C. rugosa lipase* yang terimmobilisasi dalam alginat, sedangkan pada sampel yang menggunakan *free whole cell C. rugosa lipase* tidak terbentuk metil ester. Hal ini terjadi karena aktifitas lipase dari *whole cell C. rugosa* terlalu kecil sehingga tidak cukup kuat untuk memotong rantai trigliserida menjadi metil ester.

Lipase akan memotong trigliserida menjadi digliserida + asam lemak, kemudian memotong digliserida menjadi monogliserida + asam lemak, lalu memotong monogliserida menjadi metil ester + triacetil gliserol. Pada sampel yang mengandung konsentrasi enzim 10% hanya terbentuk dioleat, pada sampel yang mengandung konsentrasi enzim 20%, aktifitas *whole cell* meningkat hingga mampu membentuk monooleat. Dari diagram dapat dilihat juga bahwa aktifitas enzim akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi.

Sebagai pembanding, dilakukan percobaan interesterifikasi terhadap minyak nabati menggunakan *whole cell C. rugosa lipase* yang terimmobilisasi dalam alginat, *whole cell* yang terimmobilisasi memiliki aktifitas lipase yang lebih

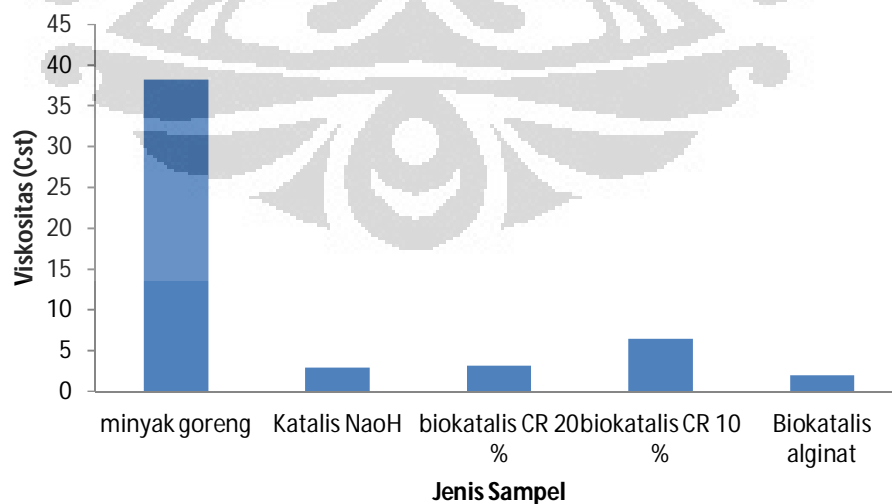
tinggi dari kedua sampel lainnya, sehingga mampu memotong rantai trigliserida. *Whole cell* yang terenkapsulasi akan memiliki beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan yang tidak terenkapsulasi, salah satu keuntungannya yaitu lebih stabil terhadap suhu dan kondisi lingkungan reaksi sehingga yeast akan terlindungi dengan baik dan dapat memiliki waktu hidup yang sedikit lebih lama. Percobaan ini telah dilakukan oleh peneliti Jepang Akihiko Kondo, dengan menggunakan *whole cell R. oryzae lipase* terimmobilisasi, persen yield biodiesel yang didapat sebesar 90%, sedangkan pada penelitian ini dengan menggunakan *whole cell C. rugosa lipase* yang terimmobilisasi didapat persen yield sebesar 40.16%.

#### 4.7. Uji karakteristik Produk

Setelah proses sintesis selesai, uji karakteristik produk dilakukan untuk menguji perubahan karakteristik dari produk biodiesel, hasil yang didapat dari uji karakteristik produk kemudian dibandingkan dengan standar SNI dari karakteristik biodiesel yang dijual di pasaran.

##### 4.6.1. Viskositas

Nilai viskositas merupakan nilai yang menunjukkan kekentalan suatu zat cair. Berikut adalah data viskositas sampel yang diukur menggunakan viscometer Oswald pada suhu 40°C.



Gambar 4.6 diagram viskositas sampel pada suhu 40°C





**Gambar 4.7 uji viskositas sampel biodiesel menggunakan viscometer Oswald pada suhu 40°C**

Dari diagram diatas dapat dilihat bahwa sampel – sampel yang telah mengalami proses reaksi interesterifikasi memiliki nilai viskositas yang jauh lebih rendah daripada viskositas minyak goreng sebelum mengalami reaksi, hal ini menunjukkan bahwa proses interesterifikasi berhasil, interesterifikasi akan menurunkan nilai viskositas dari minyak. Biodiesel harus memiliki nilai viskositas yang rendah agar pada saat digunakan tidak menyebabkan penyumbatan pada *fuel pump* kendaraan. Nilai viskositas paling rendah dimiliki oleh sampel biodiesel hasil interesterifikasi menggunakan biokatalis terimmobilisasi dalam alginat teknis dengan nilai 1.989 Cst. Diikuti dengan nilai viskositas biodiesel dengan biokatalis *C. rugosa* 20 % dan 10 % yang masing-masing nilainya 3.094 dan 6.476 Cst. Menurut *methods of testing standard B100 biodiesel*, viskositas biodiesel pada suhu 40°C yaitu 3.0 s/d 5.0 Cst. Nilai sampel yang memasuki range yaitu sampel hasil interesterifikasi dengan menggunakan *C. rugosa* dengan konsentrasi enzim 20% wt. sedangkan viskositas kinematik produk yang menggunakan katalis NaOH yaitu 2.873 Cst, nilai ini menunjukkan bahwa nilai viskositas kinematik menggunakan katalis NaOH masih terlalu encer. dari data diatas dapat diambil kesimpulan bahwa semakin besar konsentrasi enzim yang digunakan, maka nilai viskositas sampel akan semakin kecil.

#### **4.6.2. Densitas**

Densitas merupakan berat jenis atau kerapatan molekul suatu zat yang diukur berdasarkan perbandingan massa dan volume zat tersebut. Pada penelitian

ini densitas yang diukur yaitu pada suhu ruang (25°C) dengan menggunakan piknometer 10 mL.

**Tabel 4.4 data densitas sampel hasil interesterifikasi**

Sampel	berat (g)	Densitas (g/mL)
minyak goreng	24.7532	0.91
Katalis NaOH	24.612	0.89
biokatalis CR 20 %	24.645	0.89
biokatalis CR 10 %	24.685	0.90
Biokatalis alginate	24.59	0.89



**Gambar 4.8 Uji densitas biodiesel menggunakan piknometer**

Dari data diatas dapat dilihat bahwa minyak nabati yang telah mengalami proses interesterifikasi mengalami penurunan densitas. Sampel biodiesel dengan nilai densitas terendah yaitu sampel yang menggunakan katalis *C. rugosa* dengan konsentrasi 20% wt substrat dan dengan biokatalis alginat (immobilisasi) yang masing-masing nilainya 0.89 gr/ml. sebagai pembanding digunakan data densitas yang didapat dari uji densitas sampel dengan katalis NaOH yaitu 0.89 g/ml, sedangkan densitas dari minyak nabati yaitu 0.91 – 0.92 g/ml. Biodiesel yang terdapat di pasaran umumnya memiliki nilai densitas 0.84 s/d 0.89 gr/ml nilai yang didapat pada ketiga sampel tersebut masih berada dalam range, sedangkan sampel yang lain tidak berada dalam range densitas biodiesel.

#### **4.6.3. Uji bakar / nyala**

Uji nyala dilakukan untuk memastikan adanya kandungan biodiesel yang terdapat dalam sampel. Sampel dimasukkan ke dalam tabung Bunsen spiritus, kemudian dibakar dengan menggunakan sumbu. Hasil dari uji nyala menunjukkan bahwa terdapat kandungan biodiesel di dalam sampel, sampel dapat dibakar

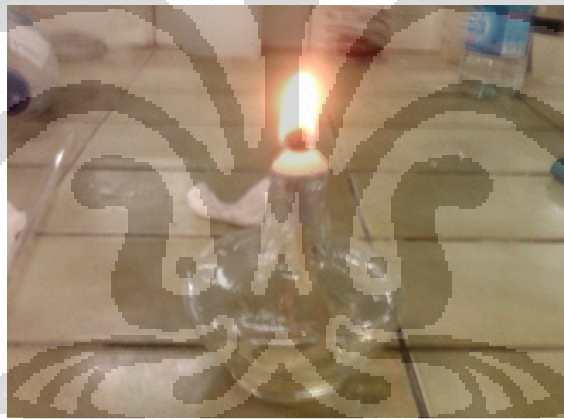
dengan mudah sama dengan halnya seperti bahan bakar solar, sedangkan minyak goreng tidak menyala.



(a)

(b)

(c)



(d)

**Gambar 4.9 hasil uji bakar solar (a) dan sampel hasil sintesis biodiesel dengan menggunakan biokatalis alginate (b), biokatalis whole cell *C. rugosa*(c), katalis NaOH**

(d)

## BAB V

### KESIMPULAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, maka dapat disimpulkan beberapa hal, yaitu :

- Dari Data hasil percobaan variasi rasio mol substrat, data percobaan dengan rasio mol 1:12 memiliki jumlah pembentukan digliserida yang lebih baik, rasio mol 1:12 mendorong reaksi terbentuk ke arah produk, sehingga pembentukan ke arah produk semakin baik daripada penggunaan rasio mol 1:10.
- Besarnya konsentrasi biokatalis mempengaruhi pembentukan ke arah produk (metil ester), ini dapat dilihat dari percobaan dengan menggunakan konsentrasi biokatalis 20%, pembentukan ke arah produk semakin terlihat dengan terbentuknya monogliserida, dimana pada penggunaan konsentrasi biokatalis 10% hanya terbentuk digliserida.
- Uji aktifitas *whole cell* secara kuantitatif memperlihatkan persen trigliserida yang terkonversi menjadi asam lemak, semakin tinggi aktifitas biokatalis, maka semakin besar persentase trigliserida yang terkonversi. Data menunjukkan hasil persen konversi untuk waktu reaksi selama 1 jam yaitu 0,2197 % dan untuk waktu reaksi 10 jam yaitu 0.58600 %. Ini menunjukkan bahwa semakin lama aktifitas biokatalis semakin meningkat.
- Pada hasil analisis HPLC, metil ester yang di presentasikan sebagai biodiesel tidak terlihat, hal ini disebabkan karena rendahnya aktivitas dari lipase sehingga tidak dapat memutus rantai trigliserida secara sempurna. Dilakukan uji interesterifikasi dengan menggunakan *whole cell C. rugosa* terimmobilisasi dengan % yield 40,16%

**DAFTAR PUSTAKA**

- HARYANTO, B. (2002). BAHAN BAKAR ALTERNATIF BIODIESEL (BAGIAN I. PENGENALAN). Medan, Sumatra Utara, Indonesia: Universitas Sumatra Utara.
- Heri Hermansyah, D. P. (n.d.). Model Kinetika Sederhana Untuk Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase.
- Hermansyah, H. (2008). Pengembangan Rute Sintesis Biodiesel Non Alkohol Menggunakan Biokatalis : State of The Arts.
- Kazuhiro Ban, M. K. (2001). Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering* , 39 - 43.
- Kondo, T. M. (2003). Enantioselective transesterification using lipase-displaying yeast whole-cell biocatalyst. *BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTS AND PROCESS ENGINEERING* , 481 - 485.
- Marno, S. (2008). Interesterifikasi Minyak Kelapa Sawit Dengan Metil Asetat Menggunakan Biokatalis Untuk Memproduksi Biodiesel. *Skripsi* . Depok, Jawa Barat, Indonesia: Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Matthew Slinn, K. K. (2009). Developing the reaction kinetics for a biodiesel reactor. *Bioresource Technology* , 2324 - 2327.
- osturk, B. (2001, november). Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports. izmir, turkey.

- Praswasti PDK Wulan, M. T. (n.d.). Reaksi Hidrolisis Minyak Zaitun Menggunakan Lipase *Rhizopus oryzae* yang di Imobilisasi Melalui Metode Adsorpsi. Depok, Jawa Barat, Indonesia: Departemen Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Indonesia.
- Prather, P. K. (2004). Lecture #5 – Using Whole Cells as Biocatalysts: Why/When, Growth vs Conversion (Screening). MIT Chemical Engineering Department.
- Prather, P. K. (2004). Lecture #6 – Whole Cell Biocatalysts: Enzyme Production (The Growth Phase); By-Product Formation, Substrate/Product Inhibition and Toxicity (The Conversion Phase). MIT Chemical Engineering Department.
- Purba, R. (2008). Sintesis Metil Ester Dari Minyak Jelantah Dengan Cara Interesterifikasi dan Pengaruh Lama Esterifikasinya Terhadap Kadar Asam Lemak. *Kimia Mulawarman* .
- RINI HANDAYANI, J. S. (2005). Transesterifikasi Ester Asam Lemak Melalui Pemanfaatan Teknologi Lipase. *Biodiversitas* , 164 - 167.
- Risa Koda, T. N. (2010). Ethanolysis of rapeseed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. *Molecular Catalysis* .
- Shinji Hama, S. T. (2006). Lipase Localization in *Rhizopus oryzae* Cells Immobilized within Biomass Support Particles for Use as Whole-Cell Biocatalysts in Biodiesel-Fuel Production. *Bioscience and Bioengineering* , 328 - 333.
- Shogo Arai, K. N. (2010). Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology* , 51 - 55.

- Shogo Arai, K. N. (2010). Production of biodiesel fuel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. *Enzyme and Microbial Technology* , 51 - 55.
- Shweta Shah, S. S. (2003). Enzymatic Transesterification For Biodiesel Production. *Biochemistry and Biophysics* , 392 - 399.
- Srivathsan Vembanur Ranganathan, S. L. (2008). An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology* , 3975–3981.
- Takeshi Matsumoto, S. T. (2002). Preparation of high activity yeast whole cell biocatalysts by optimization of intracellular production of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase. *Molecular Catalysis* , 143 - 149.
- Tianwei Tan, J. L. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review . *Biotechnology Advances* , 628 - 634.
- YAN LIU, Y. F. (2000). Preparation of High-Activity Whole Cell Biocatalysts by Permeabilization of Recombinant Yeasts with Alcohol. *BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING* , 554 - 558.
- YAN LIU, Y. F. (2000). Preparation of High-Activity Whole Cell Biocatalysts by Permeabilization of Recombinant Yeasts with Alcohol. *Bioscience and Bioengineering* , 554 - 558.

## LAMPIRAN

## LAMPIRAN A

Perhitungan jumlah reaktan yang digunakan

- Massa jenis minyak : 0.91 gr/ml
- Berat molekul minyak goreng : 846.58 gr/mol
- Berat molekul metil asetat : 74.08 gr/mol
- Massa jenis metil asetat : 0.932 gr/ml
- Volume minyak yang digunakan : 58 ml
- Massa jenis biodiesel : 0.88 gr/ml
- Basis biodiesel 20 ml x 0.88 g/ml = 17.6 gr

$$\text{Mol biodiesel} = \frac{17.6 \text{ gr}}{850 \text{ gr/mol}} = 0.021 \text{ mol}$$

$$1 \text{ mol trigliserida} = 3 \text{ mol biodiesel}$$

$$\text{Mol trigliserida} = 3 \times 0.021 = 0.063 \text{ mol}$$

$$\text{Massa trigliserida} = 0.063 \text{ mol} \times 846.58 \text{ gr/mol} = 53.33 \text{ gr}$$

$$\text{Volume trigliserida yang dibutuhkan} = \frac{53.33 \text{ gr}}{0.92 \text{ gr/mol}} = 58 \text{ ml}$$

- Rasio mol substrat yang digunakan 1:12 dan 1:10

➤ Rasio mol 1:12

$$\text{Metil asetat} : 12 \times 0.063 \text{ mol} = 0.756 \text{ mol}$$

$$\text{Massa} : 0.756 \text{ mol} \times 74.08 \text{ gr/mol} = 56 \text{ gr}$$

$$\text{Volume metil asetat yang dibutuhkan} : \frac{56 \text{ gr}}{0.932 \text{ gr/ml}} = 60.1 \text{ ml}$$

➤ Rasio mol 1:10

$$\text{Metil asetat} : 10 \times 0.063 \text{ mol} = 0.63 \text{ mol}$$

$$\text{Massa} : 0.63 \text{ mol} \times 74.08 \text{ gr/mol} = 46.6 \text{ gr}$$

$$\text{Volume metil asetat yang dibutuhkan} : \frac{46.6 \text{ gr}}{0.932 \text{ gr/mol}} = 50 \text{ ml}$$

- Perhitungan konsentrasi biokatalis yang digunakan

➤ 10 % dari berat substrat :  $\frac{10}{100} \times 109.33 \text{ gr} = 10.9 \text{ gr}$

➤ 20 % dari berat substrat : 21.8 gr



**LAMPIRAN B**

Data zona bening

Nama Isolat Candida Rugosa	Inkubasi																								
	Cawan	Panen 2 Hari												Panen 4 Hari											
		Isolat (cm)						Isolat + Buffer (cm)						Isolat (cm)						Isolat + Buffer (cm)					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
I		0,16	0,25		1,4																				
		0,20	0,15		0,95																				
		0,13	0,15		0,90																				
		<b>0,16</b>	<b>0,18</b>		<b>1,08</b>																				
II		0,3	0,3																						
		0,6	0,6																						
		0,2	0,35																						
		<b>0,36</b>	<b>0,45</b>																						
III								0,15	0,4		0,85											0,35			
								0,1	0,4		0,9											0,45			
								<b>0,12</b>	<b>0,4</b>		<b>0,87</b>											0,30			
																						<b>0,36</b>			
IV								0,1	0,35		0,75														
								0,2	0,25		0,75														
								<b>0,15</b>	<b>0,3</b>		<b>0,75</b>														
V								0,1	0,275																
								0,115	0,1																
								<b>0,107</b>	<b>0,18</b>																
VI								0,125	0,2																
								0,075	0,3																
								<b>0,1</b>	<b>0,75</b>																

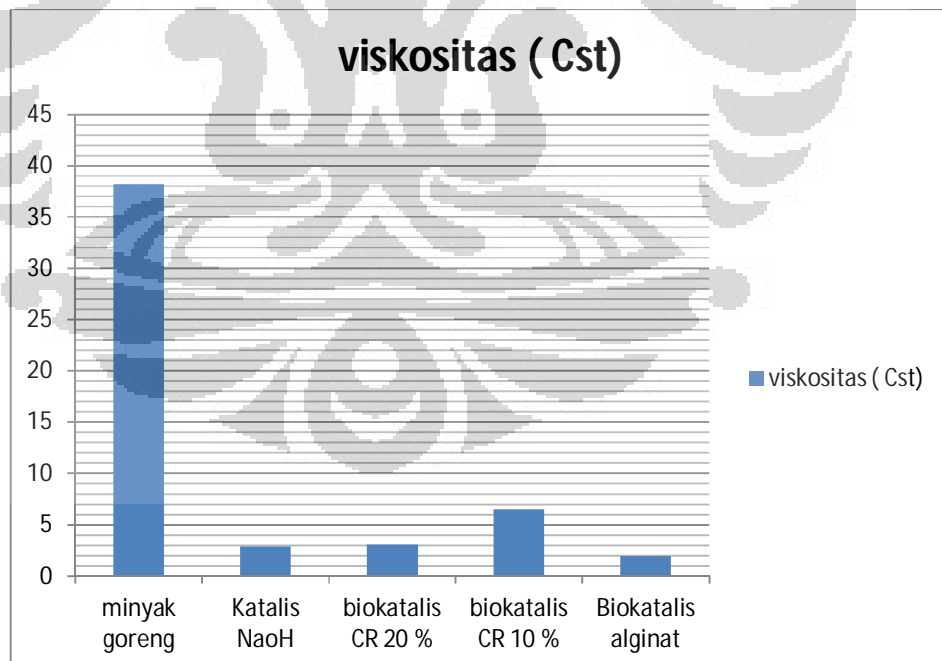
## LAMPIRAN C

### Data Hasil Uji Karakteristik

- Uji Viskositas

Data Hasil Uji Viskositas pada suhu 40°C menggunakan viskometer oswold

sampel	viskositas ( Cst)
minyak goreng	38.23
Katalis NaOH	2.873
biokatalis CR 20 %	3.094
biokatalis CR 10 %	6.476
Biokatalis alginat	1.989



- Uji Densitas

Berat Pikno kosong ukuran 10 mL : 15.6532 gr

$$\text{Densitas} : \frac{\text{berat pikno berisi sampel} - \text{berat pikno kosong}}{10 \text{ mL}}$$

sampel	berat (gr)	densitas
minyak goreng	24.7532	0.91
Katalis NaOH	24.612	0.89
biokatalis CR 20 %	24.645	0.89
biokatalis CR 10 %	24.685	0.90
Biokatalis alginat	24.59	0.89

**LAMPIRAN D**

Data Hasil Uji Aktifitas lipase Kuantitatif (Hidrolisis)

<b>Waktu reaksi 10 jam, sampling 2 ml ( whole cell padatan )</b>				
Berat 2 ml sample		1.934 gr	1934	mg
Mr. Trigliserida			850	g/mol
Mol trigliserida dalam 2 ml sample			2.275294118	mmol
Mol FFA yg terbentuk secara teoritis			6.825882353	mmol
Konsentrasi NaoH			0.05	M
PVA			0.3	gr
	Vol titran NaoH	V1	1.1	mL
		V2	0.5	mL
		V rata-rata	0.8	mL
Mol FFA = mol NaoH		0.04	mmol	
	% Hidrolisis	Mol FFA Hasil Reaksi /Mol FFA Teoritis		0.00586
				<b>0.586005</b> %

<b>Waktu reaksi 1 jam, Isampling 2 ml ( whole cell padatan )</b>				
Berat 2 ml sample		1.934 gr	1934	mg
Mr. Trigliserida			850	g/mol
Mol trigliserida dalam 2 ml sample			2.275294	mmol
Mol FFA yg terbentuk secara teoritis			6.825882	mmol
Konsentrasi NaoH			0.05	M
PVA			0.3	gr
	Vol titran NaoH	V1	<b>0.3</b>	mL
		V2	<b>0.3</b>	mL
		V rata-rata	<b>0.3</b>	mL
Mol FFA = mol NaoH		0.015	mmol	
% Hidrolisis	Mol FFA Hasil Reaksi /Mol FFA Teoritis			<b>0.219752</b> %

Cara perhitungannya adalah sebagai berikut

Mol *Free Fatty Acid* (FFA) dalam trigliserida secara teoritis dihitung dengan cara:

- Minyak zaitun seluruhnya terdiri dari trigliserida (trioleogliserol).
- Tiap 2 ml sampel minyak zaitun memiliki berat 1.7 gram = 1700 mg

- Trioleogliserol (trigliserida dari minyak zaitun) dengan rumus molekul  $(C_{17}H_{35}COO)_3C_3H_5$  memiliki berat molekul 884 g/mol, berarti dalam 2 ml sampel minyak zaitun terdapat mol trigliserida sebanyak 1.923 mmol.
- Mol FFA yang maksimal terbentuk secara teoritis dalam 2 ml sampel minyak zaitun adalah 3 x mol trigliserida, yaitu sebesar 5.769 mmol
- Reaksi NaOH dengan (FFA) adalah sebagai berikut:  
 $C_{17}H_{34}COOH + NaOH \rightarrow C_{17}H_{34}COONa + H_2O$
- Banyaknya konsentrasi asam lemak bebas atau FFA (CFFA) yang terkandung dalam 2 ml substrat minyak dihitung dengan:

$$\begin{aligned} \text{Mol FFA} &= \text{mol NaOH} \\ &= 0.05M \times \text{volume NaOH titrasi} \end{aligned}$$

$$\% \text{ Hidrolisis} = \frac{\text{Mol FFA hasil reaksi}}{\text{Mol FFA Teoritis}} \times 100\%$$

## LAMPIRAN E

### Data HPLC

- Data HPLC dengan variasi substrat 1:10, konsentrasi *whole cell* 10% wt

t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	% mol Balance
		Tri Oleat		Di Oleat		Mono Oleat		FAME	
0	923426	0.03198835	163079	0.01273919	162106	0.00175583	0	0.00000000	100.00
0	923426	0.03198835	163079	0.01273919	162106	0.00175583	0	0.00000000	100.00
12	452736	0.01568320	440551	0.03441439	0	0.00000000	0	0.00000000	94.06
12	481338.608	0.01667403	468383.7934	0.03658860	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
30	596771	0.02067271	214496	0.01675572	0	0.00000000	0	0.00000000	77.54
30	769622.8944	0.02666047	276623.7507	0.02160893	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
40	448046	0.01552074	1279600	0.09995813	0	0.00000000	0	0.00000000	200.06
40	223950.3493	0.00775785	639592.5128	0.04996285	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
50	528301	0.01830085	159064	0.01242555	0	0.00000000	0	0.00000000	64.74
50	816091.7454	0.03198835	245713.7454	0.01919435	0	0.00000000	0	0.00000000	109.05

Komponen	Perbandingan mol =1:10							
	Waktu							
	0	12	30	40	50			
3*CT, t=0	0.0960							
2*CD, t=0	0.0255							
CM, t=0	0.0018							
CB, t=0	0.0000							
3*CT, t=t	0.1180	0.0500	0.0800	0.0233	0.0960			
2*CD, t=t	0.0276	0.0732	0.0432	0.0999	0.0384			
CM, t=t	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
CB, t=t	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
% konversi trigliserida		47.8747	16.6557	75.7479	0.0000			
% Yield digliserida		76.2540	45.0350	104.1272	40.0028			
% Yield monogliserida		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
<b>% Yield biodiesel</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>			

- Data HPLC dengan variasi substrat 1:12, konsentrasi *Whole cell* 10% wt

t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	% mol Balance
		Tri Oleat		Di Oleat		Mono Oleat		FAME	
0	923426	0.03198835	163079	0.01273919	162106	0.00175583	0	0.00000000	100.00
0	923426	0.03198835	163079	0.01273919	162106	0.00175583	0	0.00000000	100.00
12	415873	0.01440623	223920	0.01749189	0	0.00000000	0	0.00000000	63.48
12	655161.3784	0.02269541	352760.905	0.02755652	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
30	464622	0.01609495	355373	0.02776057	0	0.00000000	0	0.00000000	84.26
30	551423.8734	0.01910185	421764.6951	0.03294687	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
40	471978	0.01634977	317363	0.02479135	0	0.00000000	0	0.00000000	80.06
40	589538.3526	0.02042217	396411.8247	0.03096638	0	0.00000000	0	0.00000000	100.00
50	2576138	0.08923986	273675	0.02137859	0	0.00000000	0	0.00000000	252.01
50	1022228.891	0.03198835	108596.0814	0.00848317	0	0.00000000	0	0.00000000	91.67



Komponen	Perbandingan mol =1:12							
	Waktu							
	0	12	30	40	50			
3*CT, t=0	0.0960							
2*CD, t=0	0.0255							
CM, t=0	0.0018							
CB, t=0	0.0000							
3*CT, t=t	0.1180	0.0681	0.0573	0.0613	0.0960			
2*CD, t=t	0.0276	0.0551	0.0659	0.0619	0.0170			
CM, t=t	0.0012	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
CB, t=t	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
% konversi trigliserida		29.0510	40.2850	36.1575	0.0000			
% Yield digliserida		57.4303	68.6643	64.5368	17.6797			
% Yield monogliserida		0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
<b>% Yield biodiesel</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>			

- Data HPLC dan %yield biodiesel dengan variasi konsentrasi *whole cell* dan *whole cell* terimmobilisasi sebagai pembanding, rasio substrat 1:12, variasi 10%, 20%. dengan waktu reaksi selama 50 jam

10%	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	% mol Balance
			T		D		M		F	
	0	1135503	0.0392	176496	0.0265	114992	0.0193	0	0.0000	100.00
	50.00	990117	0.0343	815336	0.0637	0	0.0000	0	0.0000	121.23

20%	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	% mol Balance
			T		D		M		F	
	50.00	1051180	0.0364	732830	0.0572	704295	0.0076	0	0.0000	121.80

alginat	t (Jam)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	Luas Area	Konsentrasi (mol/l)	% mol Balance
			T		D		M		F	
	50.00	1017662	0.0353	693824	0.0542	1070497	0.0116	94266	0.0763	159.01

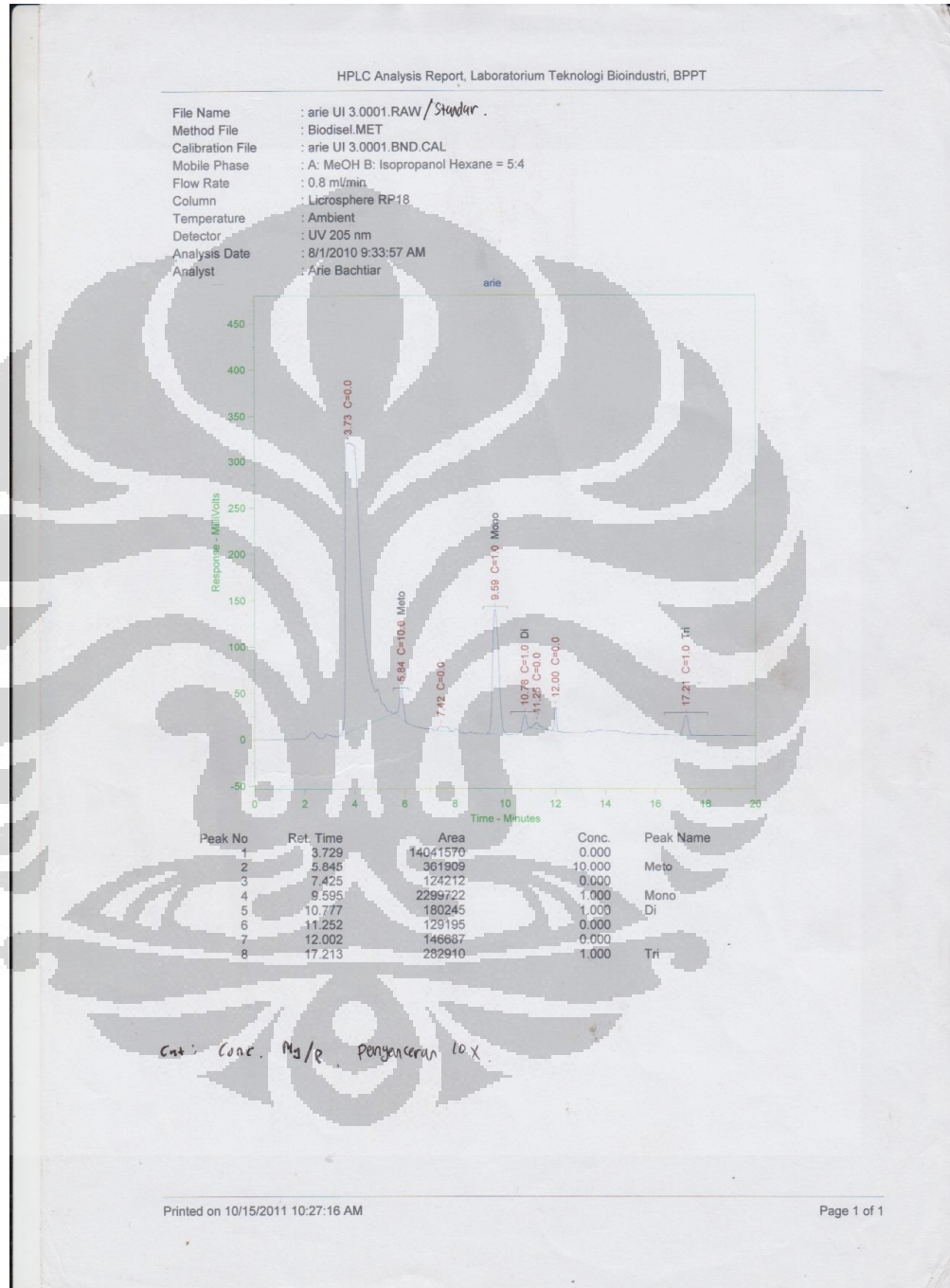
	Perbandingan mol = 1:12			
t = 50 jam	variasi Konsentrasi katalis			
Komponen	10%	20%	alginat 1%	
3*CT, t=0	0.12	0.1176	0.1176	
2*CD, t=0	0.053	0.0531	0.0531	
CM, t=0	0.0193	0.0193	0.0193	
CB, t=0	0.00	0.0000	0.0000	
3*CT, t=t	0.102896	0.109242	0.105758	
2*CD, t=t	0.127	0.1145	0.1084	
CM, t=t	0.0000	0.0076	0.0116	
CB, t=t	0.000	0.00	0.08	
% konversi trigliserida	12.49	7.098	10.06	
% Yield digliserida	67.06	60.28	57.07	
% Yield monogliserida	0.00	4.02	6.10	
% Yield biodiesel	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>	<b>40.16</b>	

konsentrasi katalis	%yield monogliserida	%yield digliserida	% yield biodiesel
10%	0.0000	67.06	<b>0.00</b>
20%	4.0160	60.28	<b>0.00</b>
alginat	6.1042	57.07	<b>40.16</b>

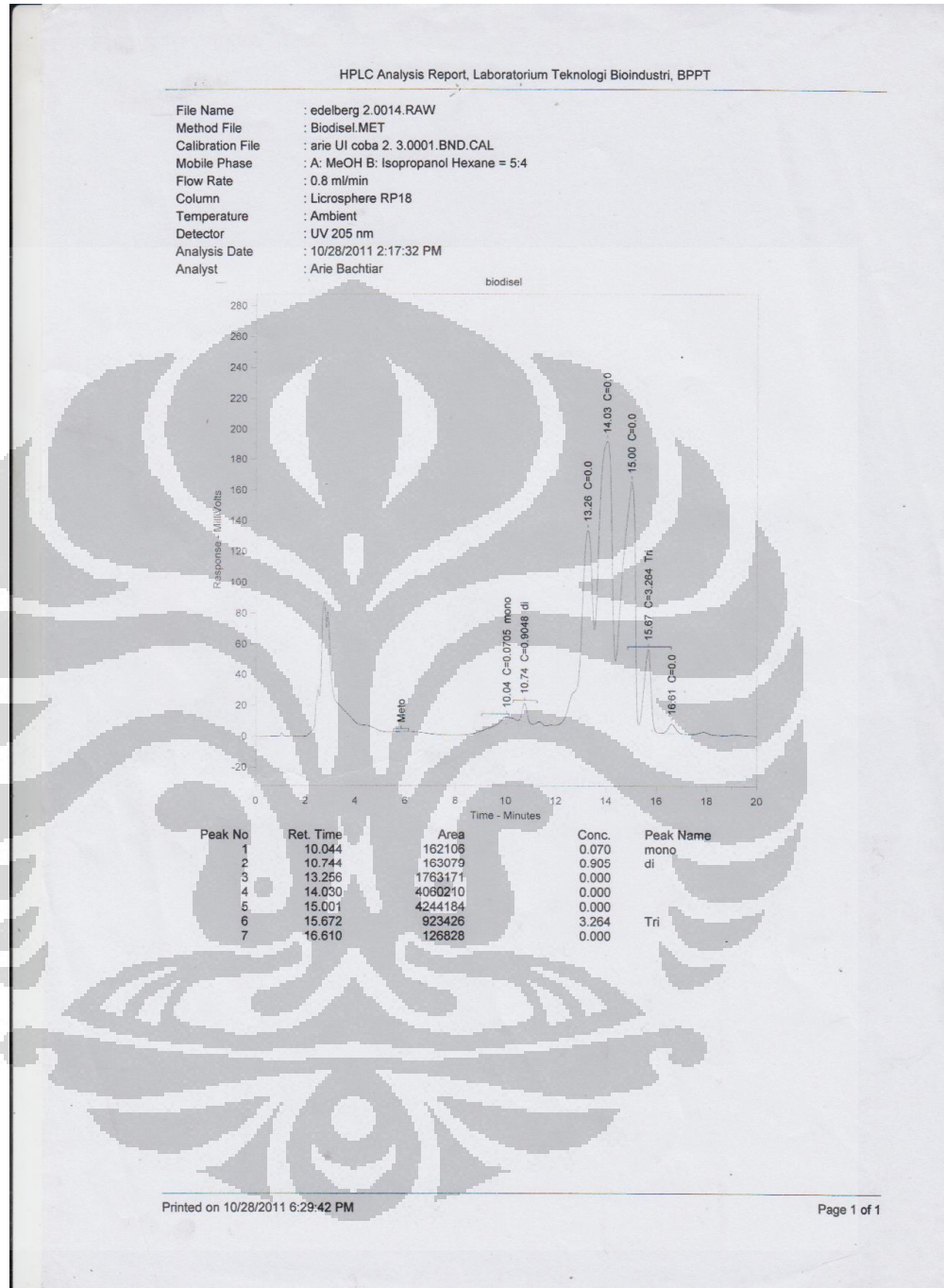
## LAMPIRAN F

Chromatogram hasil uji sampel menggunakan HPLC

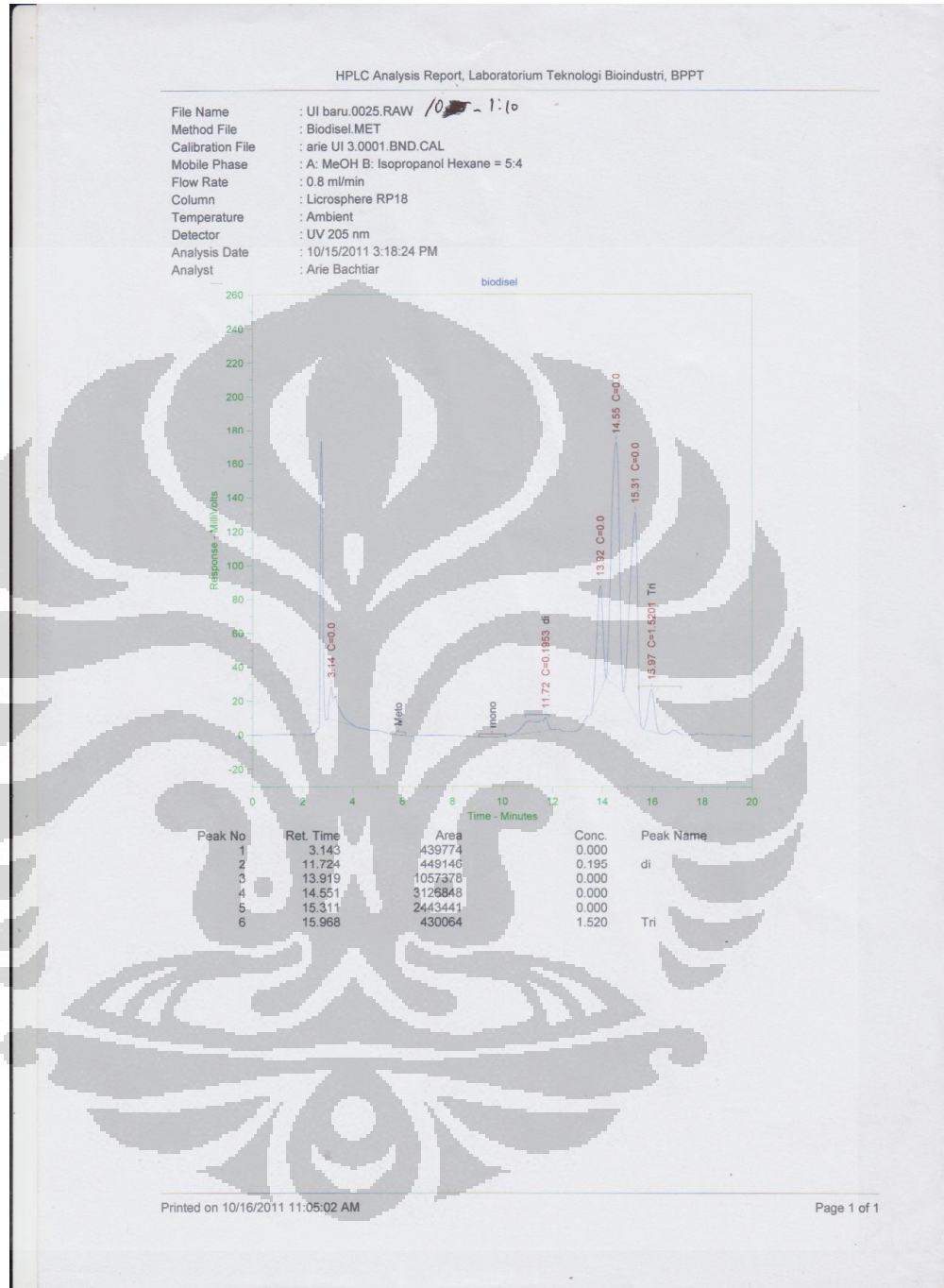
- Chromatogram standar Biodiesel



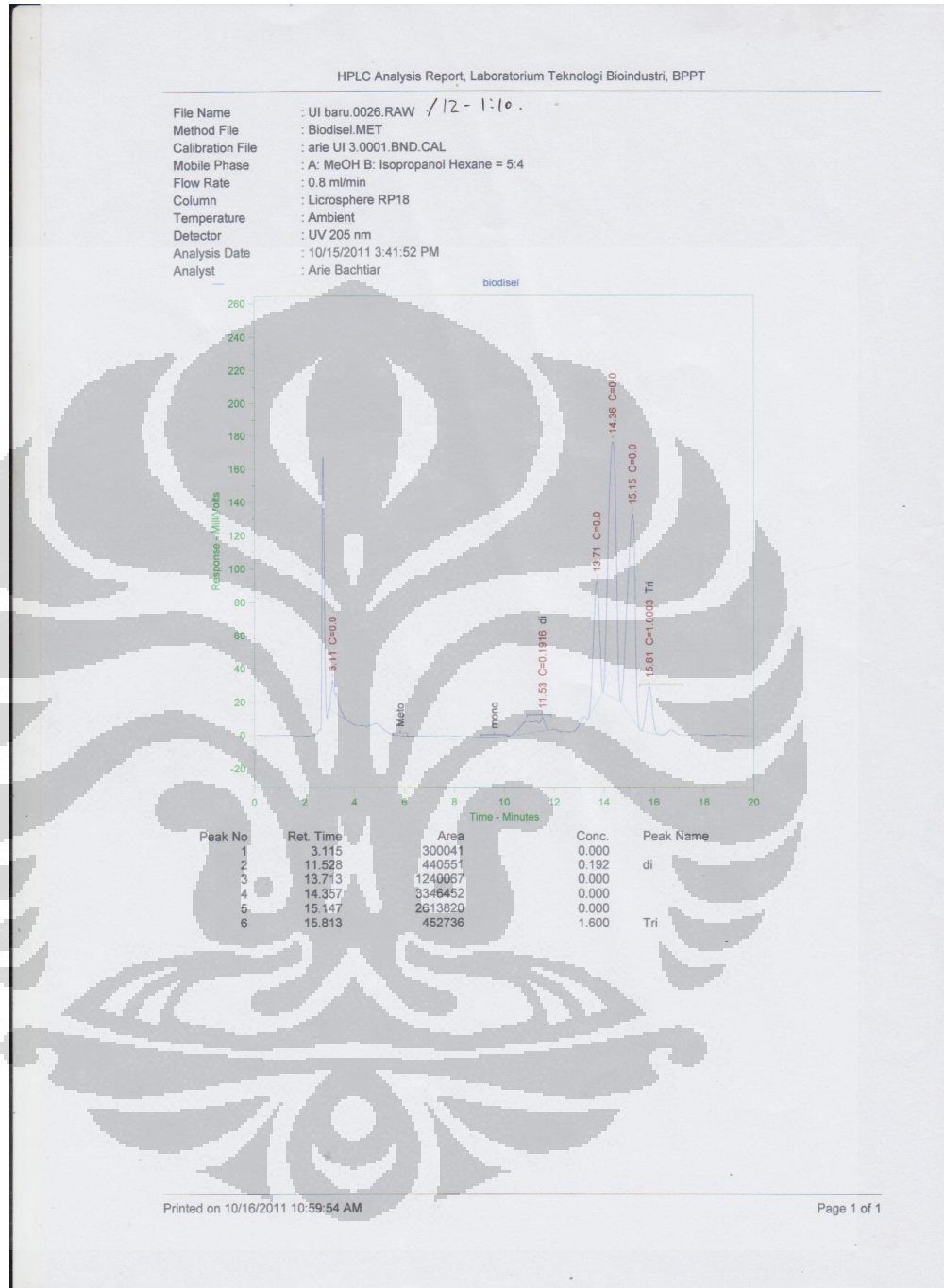
- Chromatogram minyak nabati



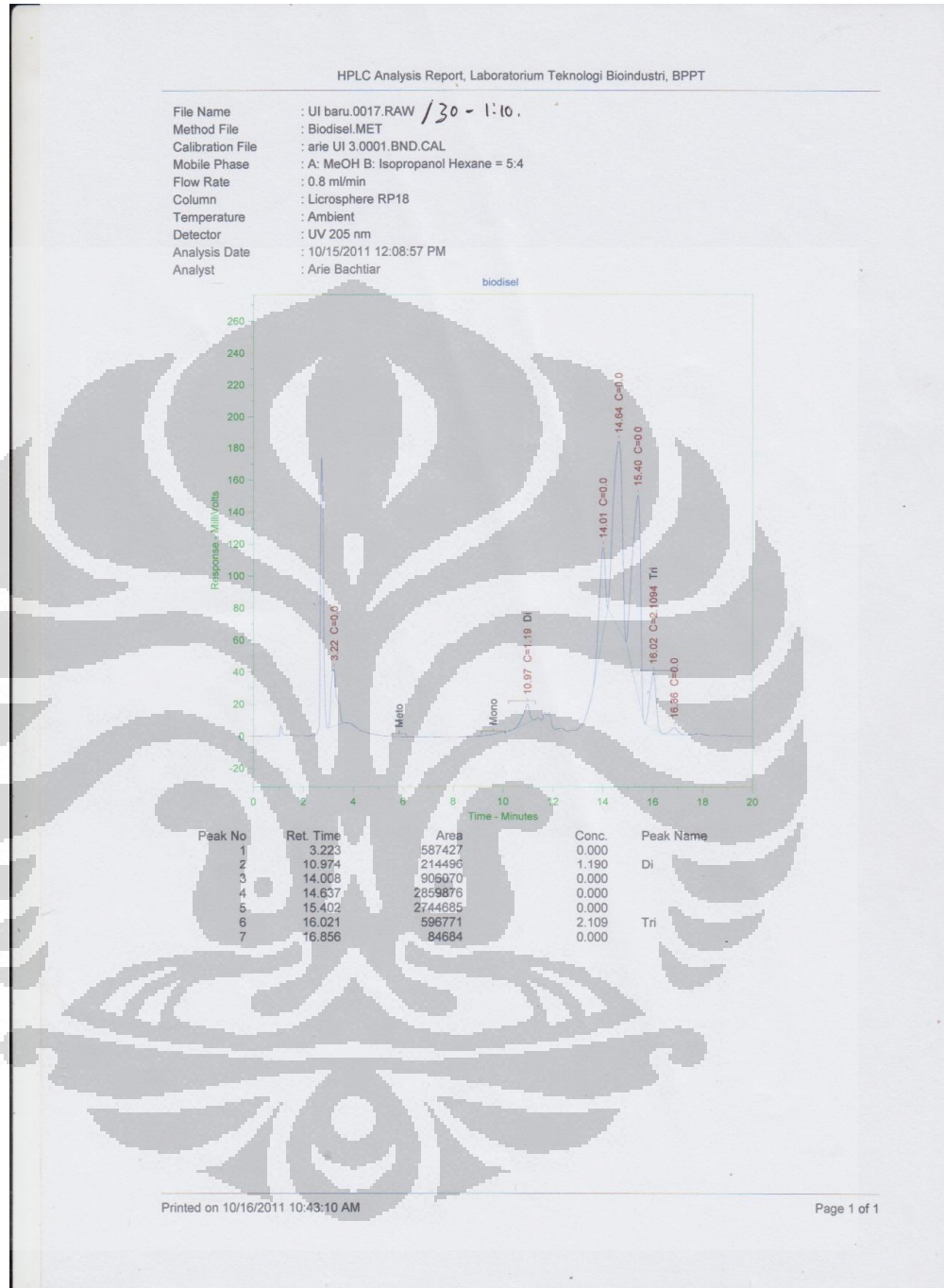
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:10, 10% *whole cell*, t : 0



- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:10, 10% *whole cell*, t : 12

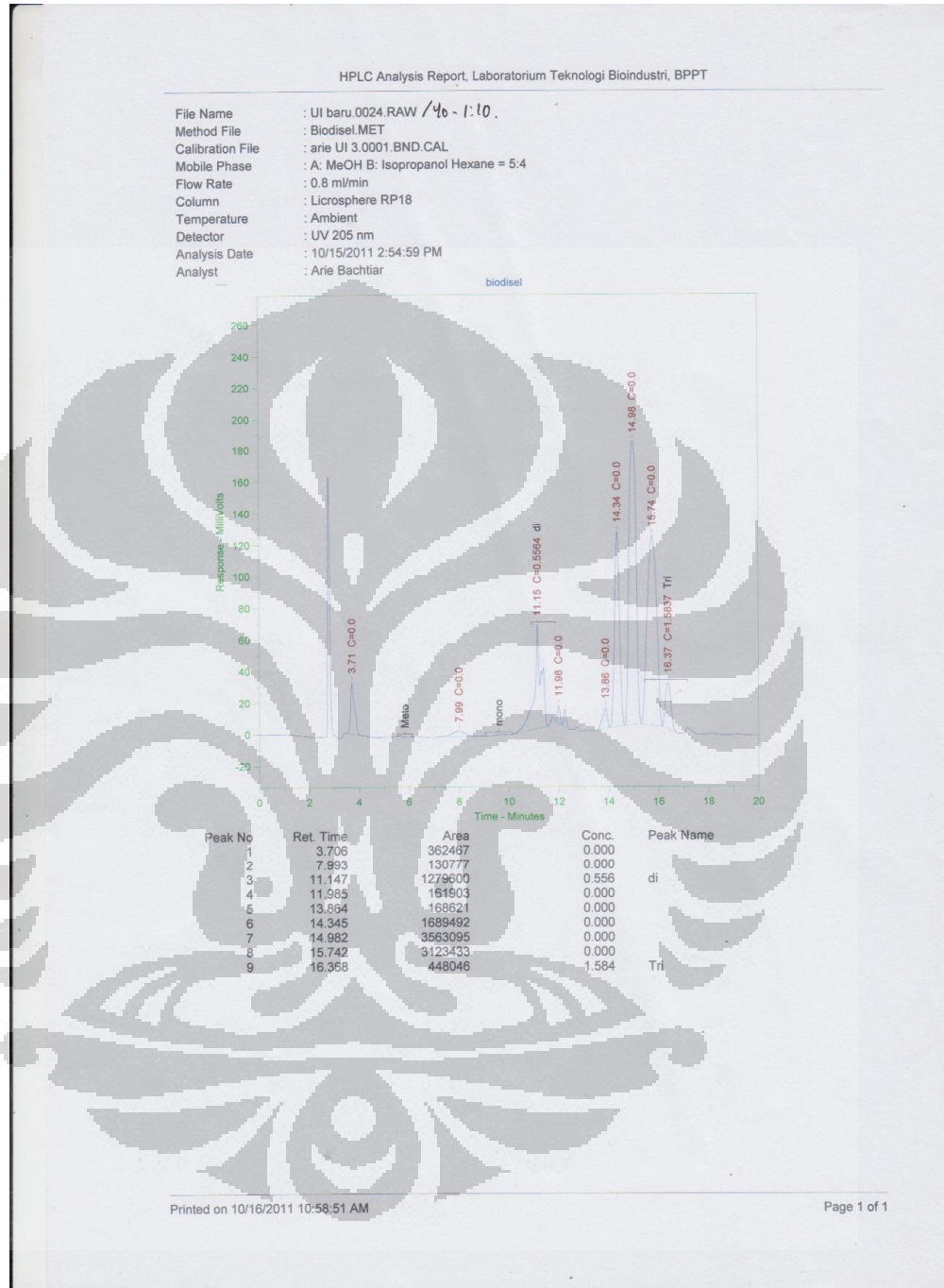


- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:10, 10% *whole cell*, t : 30

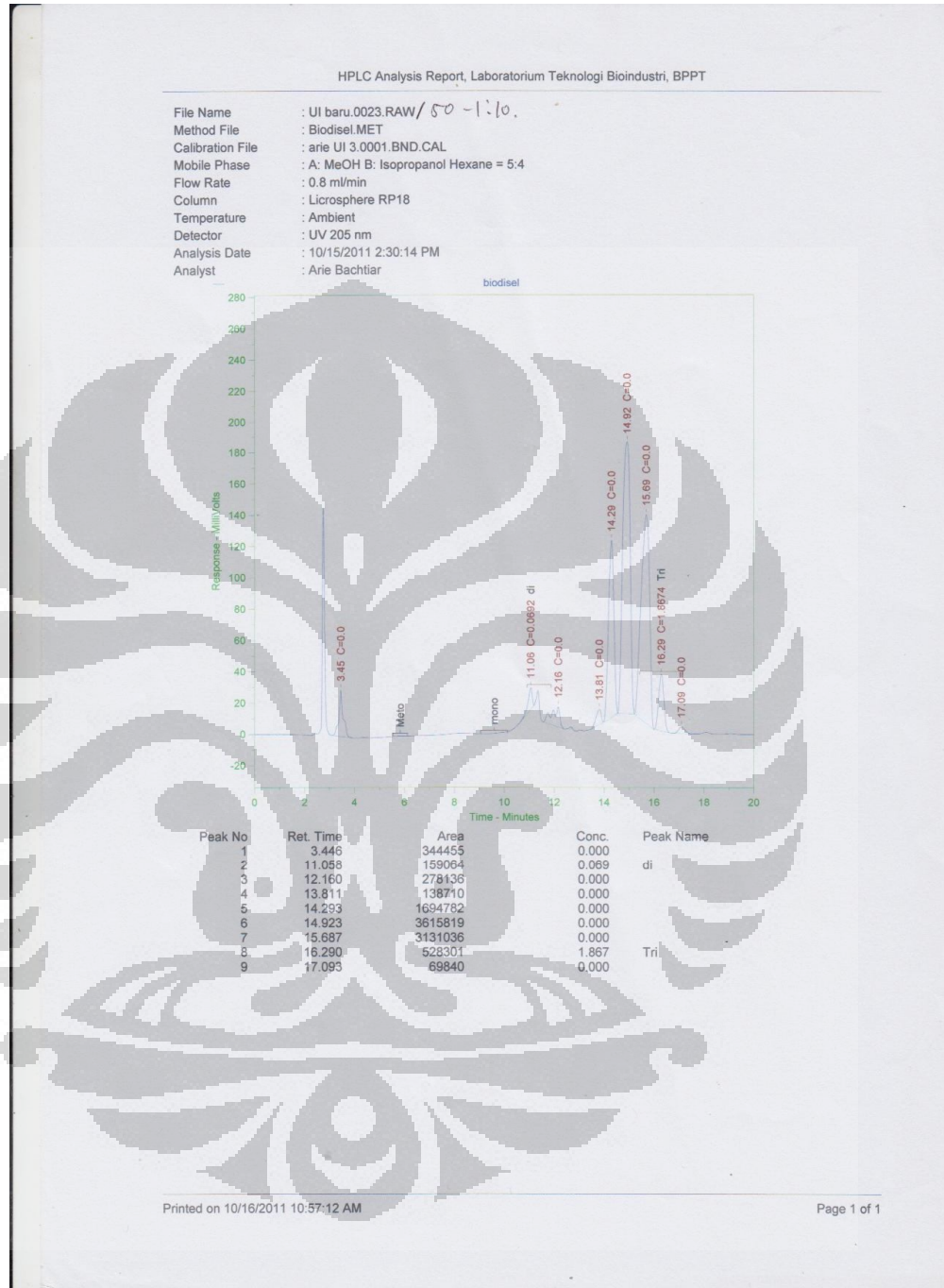




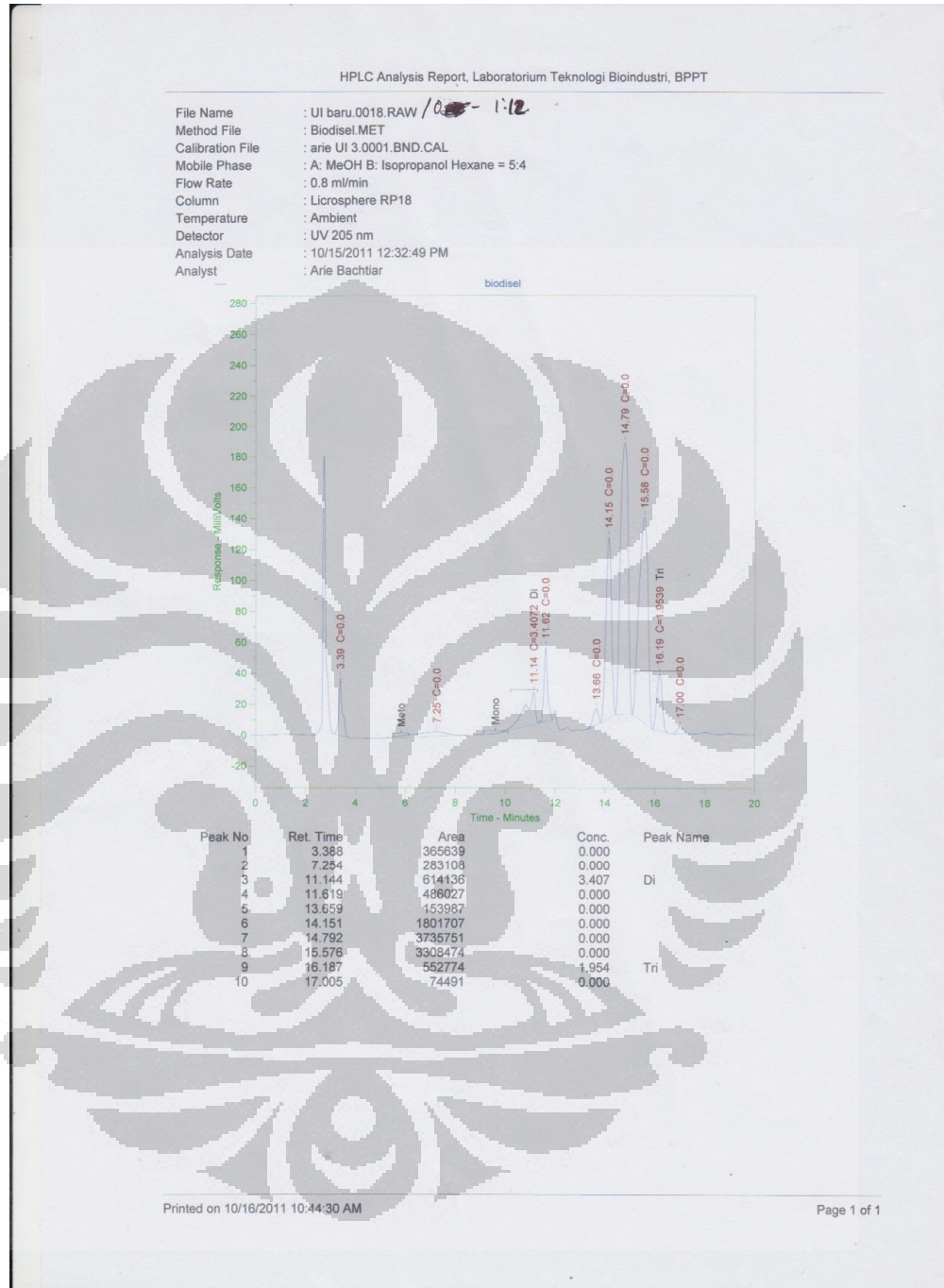
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:10, 10% *whole cell*, t : 40



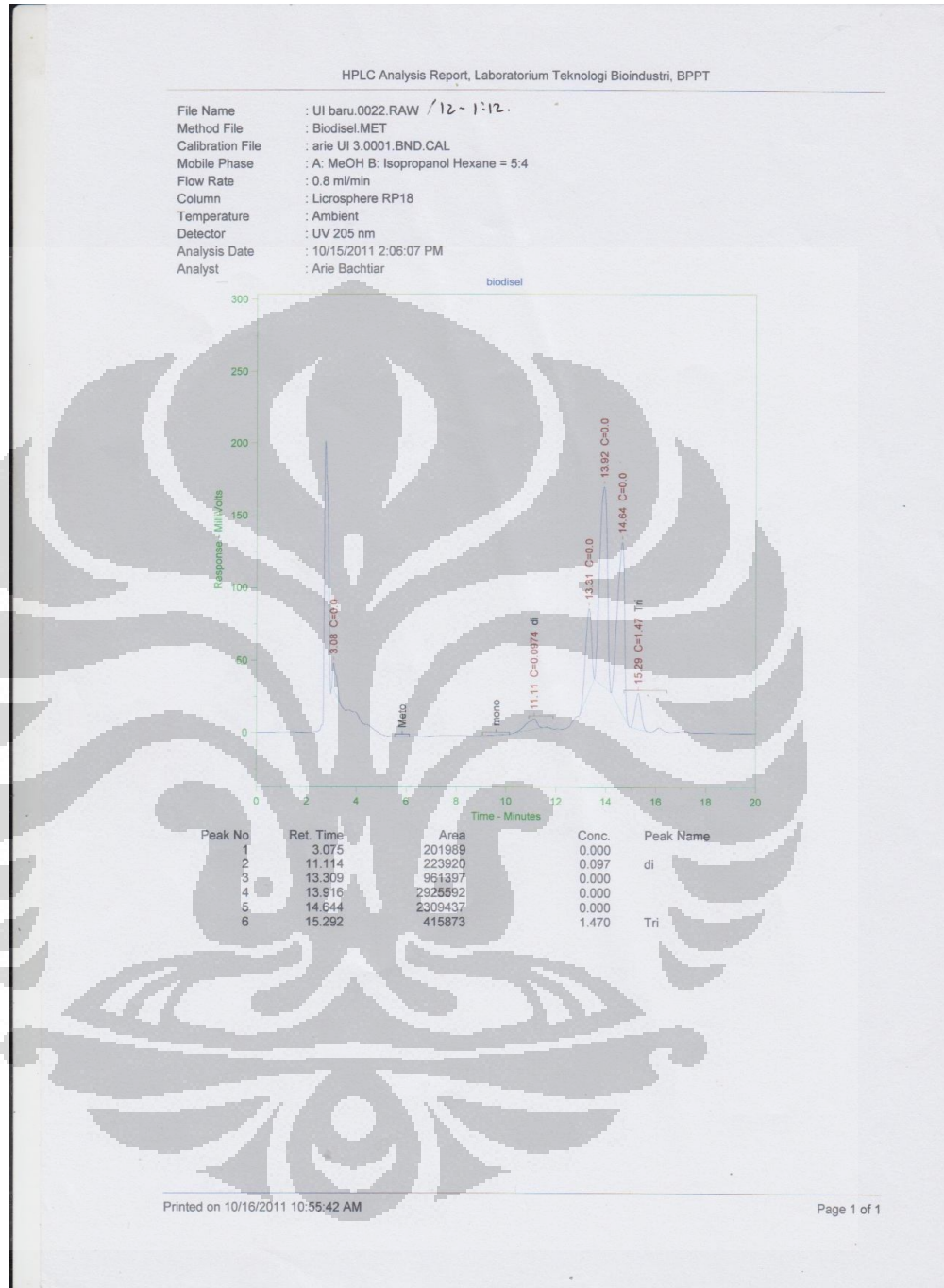
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:10, 10% *whole cell*, t : 50



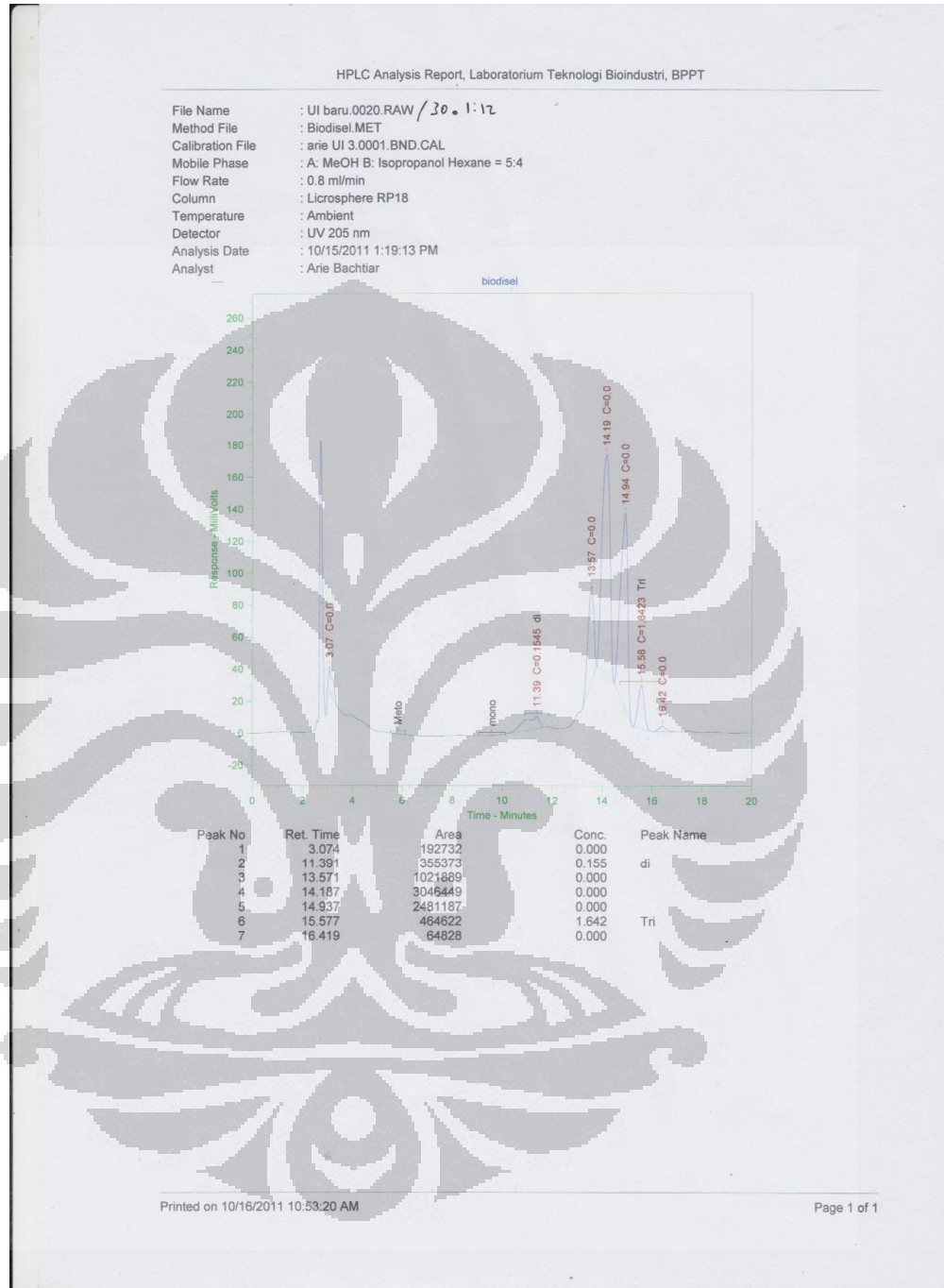
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell*, t : 0



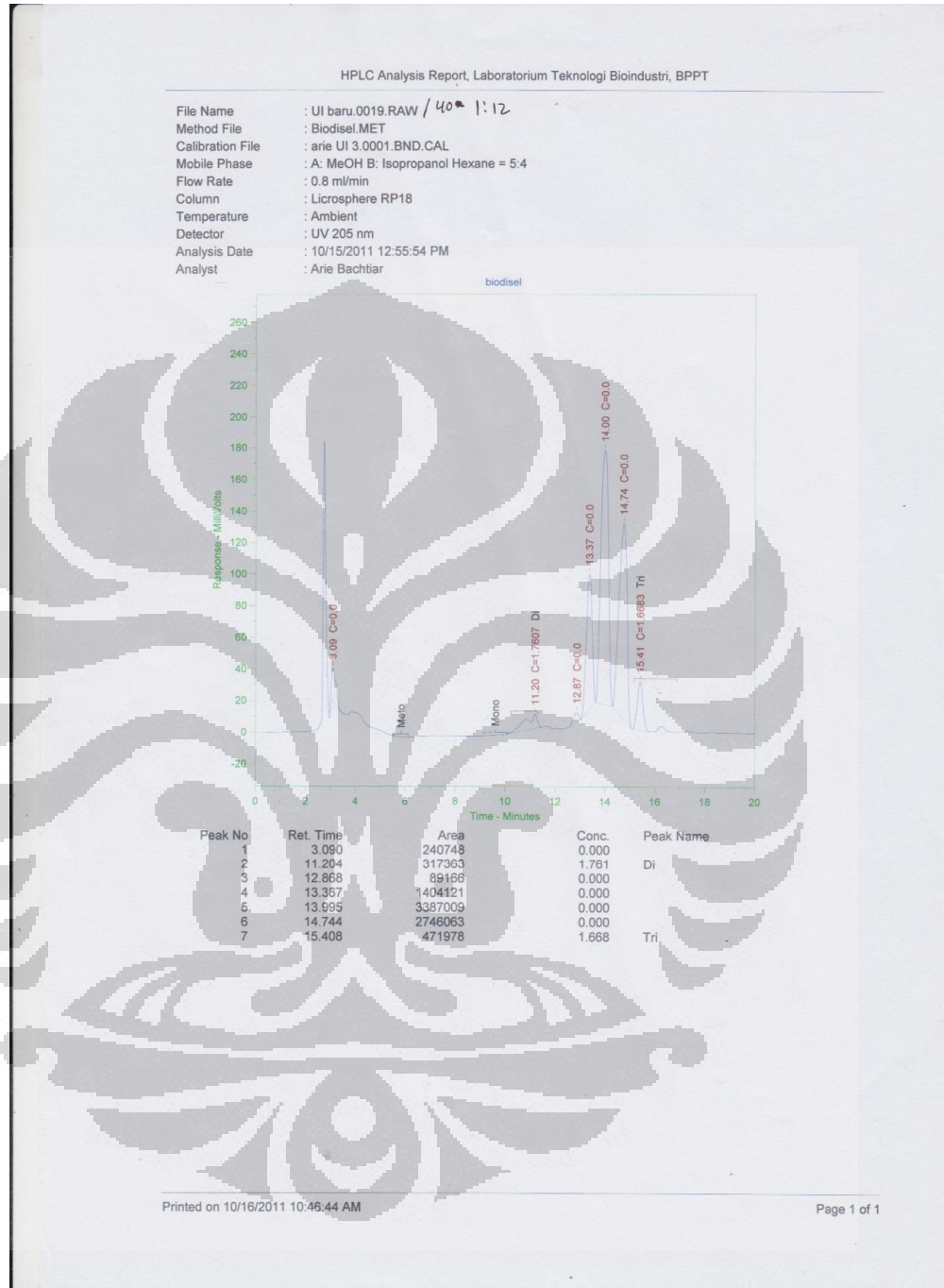
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell*, t : 12



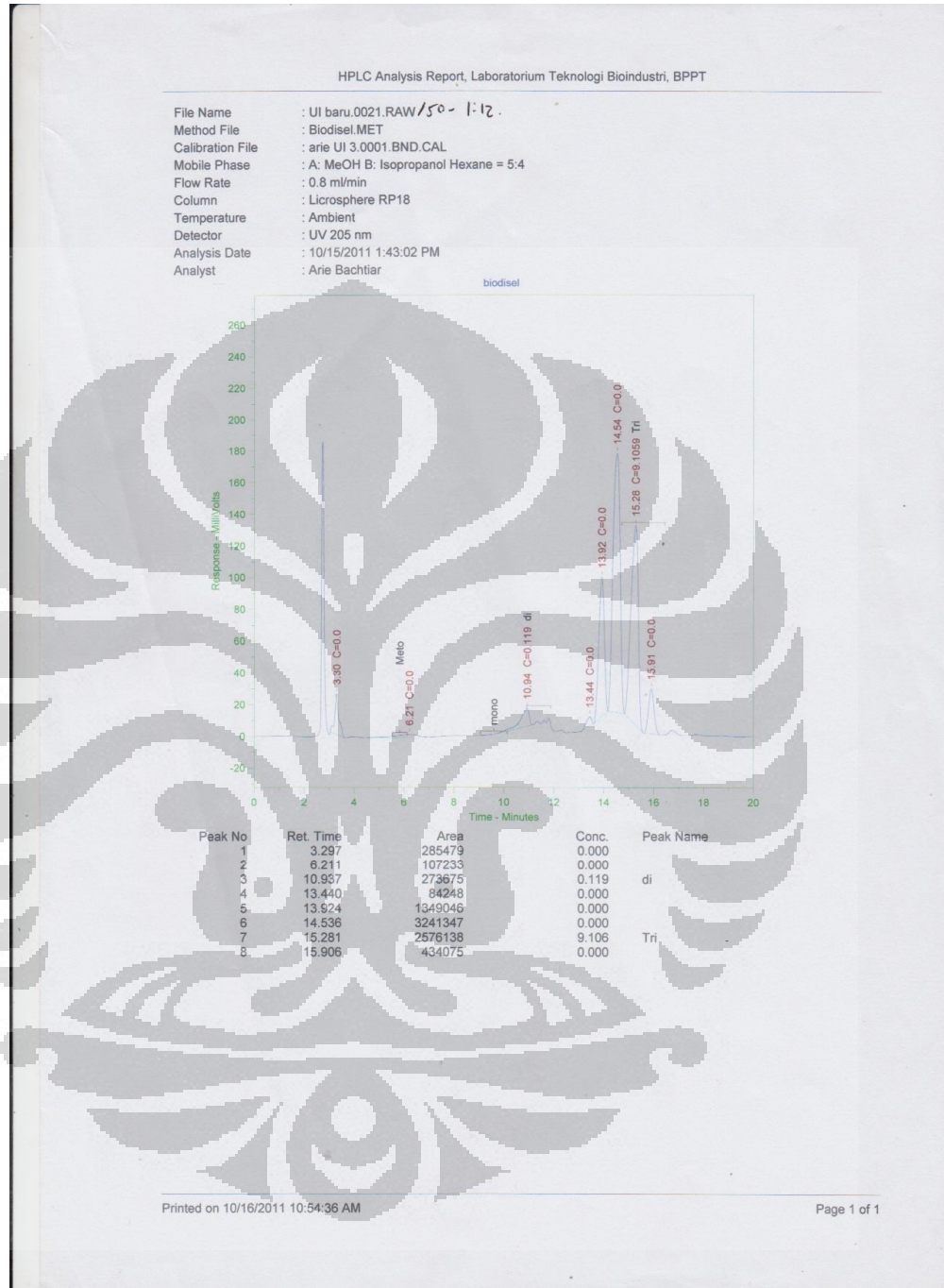
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell*, t : 30



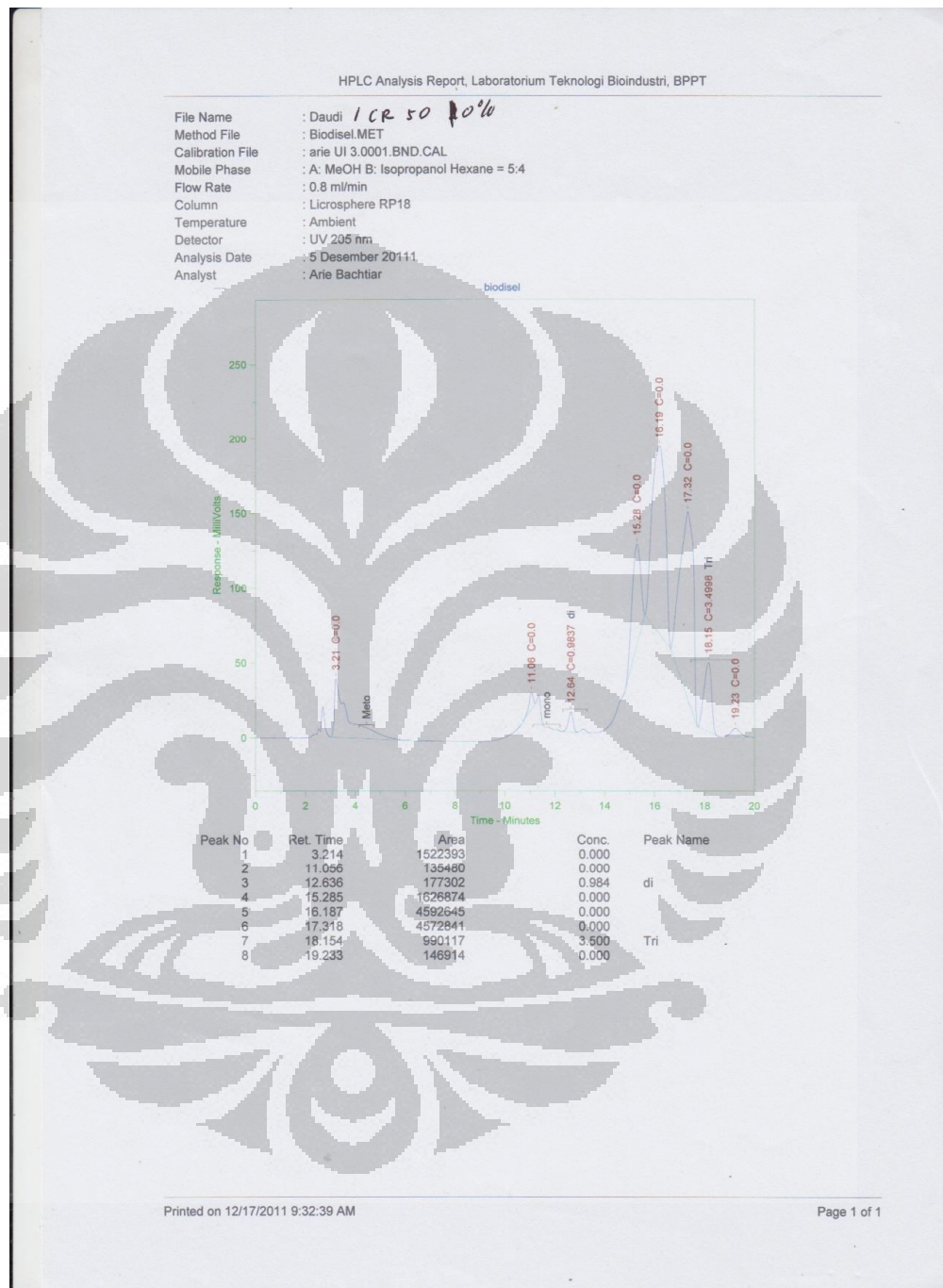
- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell*, t : 40



- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell*, t : 50

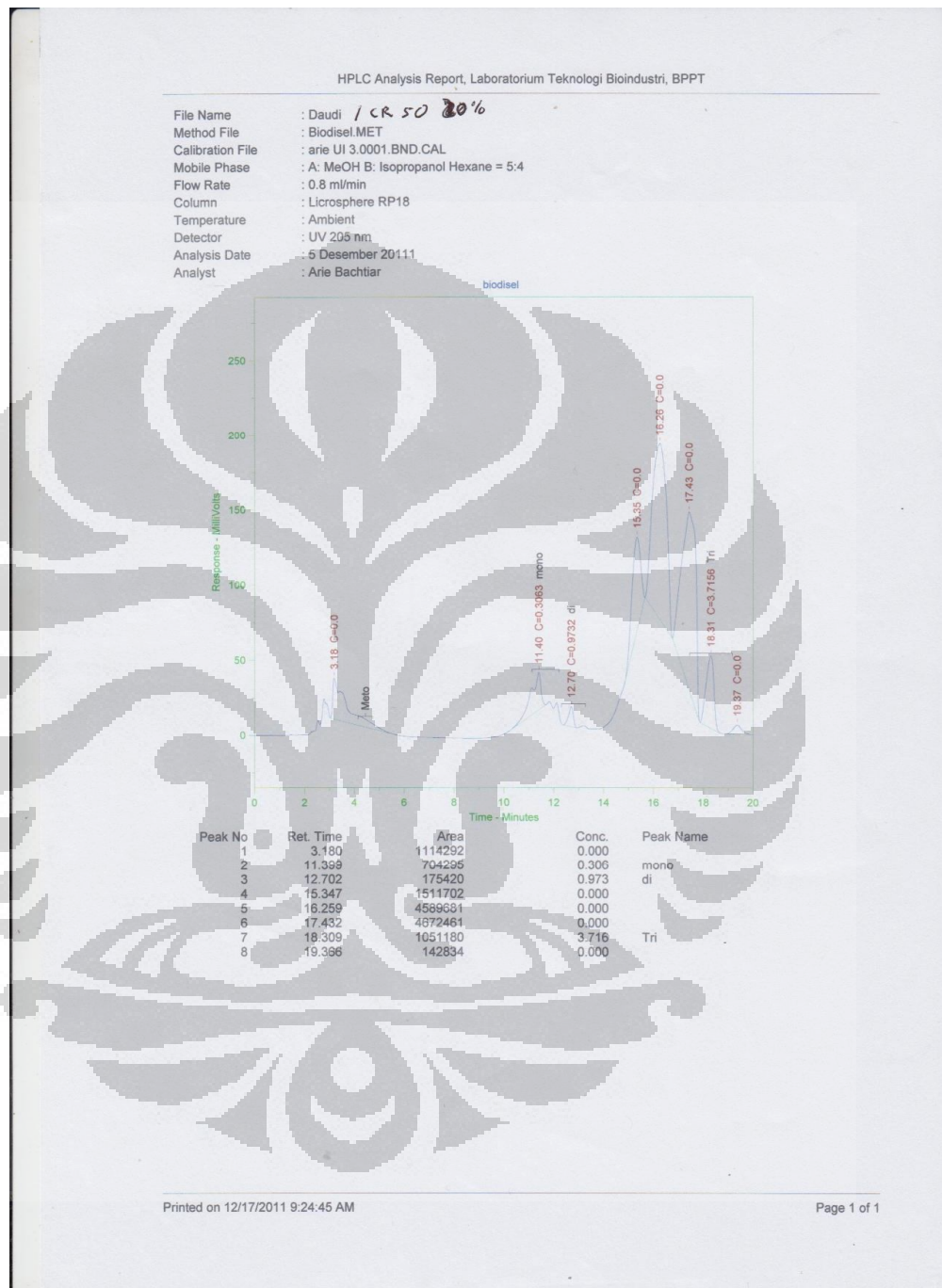


- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 10% *whole cell pellet*,  
t : 50





- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, 20% *whole cell pellet*,  
t : 50



- Chromatogram HPLC untuk variasi substrat 1:12, whole cell terimmobilisasi, t : 50

