



TUGAS AKHIR - SB184830

**PENGUNAAN SUBSTRAT LIMBAH BIJI  
*Moringa oleifera* UNTUK PRODUKSI  
LIPASE PADA *PRETREATMENT* YANG  
BERBEDA**

Adam Rizky Irfansyah  
0131144000068

Dosen Pembimbing  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2019





TUGAS AKHIR - SB184830

**PENGUNAAN SUBSTRAT LIMBAH BIJI *Moringa oleifera* UNTUK PRODUKSI LIPASE PADA  
*PRETREATMENT* YANG BERBEDA**

Adam Rizky Irfansyah  
0131144000068

Dosen Pembimbing  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2019





FINAL PROJECT - SB184830

**UTILIZATION OF *Moringa oleifera* SEEDS  
WASTE AS SUBSTRATE IN LIPASE  
PRODUCTION UNDER DIFFERENT  
PRETREATMENTS**

Adam Rizky Irfansyah  
01311440000068

Supervisor  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2019



**LEMBAR PENGESAHAN  
TUGAS AKHIR**

**PENGUNAAN SUBSTRAT LIMBAH BIJI *Moringa  
oleifera* UNTUK PRODUKSI LIPASE PADA  
PRETREATMENT YANG BERBEDA**

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar  
Sarjana Sains

Pada

Departemen S-1 Biologi

Fakultas Sains

Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

**ADAM RIZKY IRFANSYAH  
NRP. 0131144000068**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Nur Hidayatul Alami, S.Si, M.Si.



(Pembimbing 1)

Surabaya, 21 Juni 2019

Mengetahui,  
Kepala Departemen Biologi

Dr. Dewi Hidayati, S.Si., M.Si.

NIP. 19691121 199802 2 00 00







*PENGGUNAAN SUBSTRAT LIMBAH BIJI Moringa oleifera  
UNTUK PRODUKSI LIPASE PADA PRETREATMENT YANG  
BERBEDA*

**Nama Mahasiswa** : Adam Rizky Irfansyah  
**NRP** : 0131144000068  
**Departemen** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

*Abstrak*

*Sebesar 30% residu lipid dari limbah hasil pengolahan biji Moringa oleifera dapat dimanfaatkan sebagai substrat produksi lipase. Namun, senyawa fenol yang terdapat di dalam limbah sulit didegradasi dan bersifat anti mikroba sehingga perlu dihilangkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui agen pretreatment terbaik dalam menghilangkan kandungan fenol pada limbah biji M. oleifera sehingga dapat digunakan sebagai substrat produksi lipase. Beberapa agen pretreatment yang digunakan antara lain lakase, Laccase Mediator System (ABTS), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan NaOH. Lipase diproduksi menggunakan isolat Bacillus sp. SK II-5, kemudian dikarakterisasi dengan uji kandungan protein (Bradford), uji titik isoelektrik, dan uji aktivitas secara kualitatif. Hasil dari penelitian ini adalah lakase merupakan agen pretreatment terbaik yang dapat menurunkan konsentrasi total fenol pada limbah M. oleifera sebesar 70% menjadi 3,87 mg GAE/g. Hasil tersebut diikuti dengan tingginya konsentrasi total protein sebesar 0,43 mg/ml serta adanya aktivitas lipase pada rentang 100-200 ppm formaldehid*

*Kata kunci: lakase, lipase, Moringa oleifera, fenol, Bacillus sp. SK II-5*



UTILIZATION OF *Moringa oleifera* SEEDS WASTE AS  
SUBSTRATE IN LIPASE PRODUCTION UNDER  
DIFFERENT PRETREATMENTS

**Student Name** : Adam Rizky Irfansyah  
**Student Number** : 0131144000068  
**Department** : Biology  
**Supervisor** : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

Abstract

As much as 30% of lipid residue from *Moringa oleifera* seeds waste can be used as a substrate for lipase production. However, the phenolic compounds contained in the waste are difficult to degrade and have antimicrobial property which is need to be removed. This study aims to determine the best pretreatment agent in removing phenolic content in *M. oleifera* seed waste so that it can be used as a substrate for lipase production. Some pretreatment agents used include Laccase, Laccase Mediator System (ABTS), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and NaOH. Lipase is produced using *Bacillus* sp. SK II-5 isolates, then characterized by protein content test (Bradford), isoelectric point test, and qualitative activity test. The result of this study is that laccase is the best pretreatment agent that can reduce total phenol concentration in *M. oleifera* waste by 70% to 3.87 mg GAE / g. The results were followed by a high total protein concentration of 0.43 mg / ml and lipase activity in the range of 100-200 ppm formaldehyde

Key word: laccase, lipase, *Moringa oleifera*, phenolic compound, *Bacillus* sp. SK II-5



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, rasa syukur dipanjatkan kehadiran Allah SWT yang telah memberikan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir dengan judul **Penggunaan Substrat Limbah Biji *Moringa oleifera* untuk Produksi Lipase pada *Pretreatment* yang Berbeda.** Penelitian ini dilakukan pada bulan Desember 2018 hingga Maret 2019. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Dalam melakukan penelitian maupun penyusunan Tugas Akhir tidak lepas dari bimbingan dan bantuan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada, Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. selaku pembimbing serta tim penguji, Kristanti Indah Purwanti, S.Si., M.Si. dan Dr. techn. Endry Nugroho Prasetyo, S.Si., M.T. Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada Ayah dan Mama, adik-adik serta keluarga atas doa dan kasih sayangnya. Tak lupa, penulis juga berterima kasih kepada BIOMATERIAL AND ENZYME TECHNOLOGY RESEARCH GROUP 2017 yang merelakan waktu luangnya membantu penelitian ini Penelitian ini juga tidak lepas dari bantuan dan dukungan teman-teman seperjuangan angkatan 2014, dan seluruh pihak yang telah membantu.

Walaupun penulis menyadari masih banyak kekurangan, namun besar harapan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 29 Mei 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
ABSTRAK.....	ix
<i>ABSTRACT</i> .....	xi
KATA PENGANTAR.....	xiii
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xxiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Permasalahan.....	2
1.3 Batasan Permasalahan.....	3
1.4 Tujuan.....	3
1.5 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 <i>Moringa oleifera</i> .....	5
2.1.1 Karakteristik Minyak Biji <i>Moringa oleifera</i> .....	7
2.1.2 Pemanfaatan Biji <i>Moringa olifera</i> .....	12
2.2 Lipase.....	13
2.3 <i>Bacillus</i> sp. ....	16
2.4 Senyawa Fenolik.....	17
2.5 Oksidasi Senyawa Fenolik.....	18
2.5.1 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Lakase	19
2.5.2 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Mediator Lakase.....	21
2.5.3 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Hidrogen Peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	23
2.6 Depolimerisasi Lignin.....	24
2.6.1 Struktur Lignin .....	25
2.6.2 Depolimerisasi Lignin Menggunakan Katalis Basa.....	27

2.6.3 Depolimerisasi Lignin Menggunakan Katalis Asam.....	27
BAB III METODOLOGI.....	29
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.2 Metode Penelitian.....	29
3.2.1 Limbah Biji <i>M. oleifera</i> .....	29
3.2.2 <i>Pretreatment</i> .....	29
3.2.2.1 <i>Pretreatment</i> dengan Penambahan Lakase dan Lakase dengan Mediator ABTS.....	30
3.2.2.2 <i>Pretreatment</i> dengan Larutan Alkali .....	30
3.2.2.3 <i>Pretreatment</i> dengan Larutan Asam (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	30
3.2.2.4 <i>Pretreatment</i> dengan Larutan Peroksida Alkali (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	31
3.2.3 Uji Kadar Total Lipid.....	31
3.2.4 Uji Kadar Total Fenol.....	31
3.2.4.1 Kurva Standar Asam Galat .....	31
3.2.4.2 Penetapan Kadar Total Fenol pada Substrat.....	32
3.2.5 Mikroorganisme .....	32
3.2.5.1 Peremajaan <i>Bacillus</i> sp. SKII-5.....	32
3.2.5.2 Preparasi <i>Bacillus</i> sp. SKII-5.....	33
3.2.6 Produksi Lipase.....	33
3.2.7 Uji Aktifitas Lipase.....	34
3.2.8 Uji Kandungan Total Protein.....	34
3.2.8.1 Pembuatan Kurva Standar BSA.....	34
3.2.8.2 Pengujian Kandungan Protein.....	35
3.2.9 Uji Titik Isoelektrik.....	35
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	35
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 <i>Pretreatment</i> Biji <i>Moringa Oleifera</i> Menggunakan Beberapa Agen.....	37
4.2 Produksi Lipase Menggunakan Variasi <i>Pretreatment</i> Biji <i>M. oleifera</i> .....	39



4.3 Karakterisasi Produksi Lipase Variasi <i>Pretreatment</i> Substrat Biji <i>M. oleifera</i> .....	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
5.1 Kesimpulan.....	47
5.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	61
BIODATA PENULIS.....	67



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Komposisi Kimia Biji <i>Moringa oleifera</i> .....	7
Tabel 2.2 Karakteritik Fisika dan Kimia Minyak Biji <i>Moringa oleifera</i> .....	9
Tabel 2.3 Senyawa Bioaktif pada Biji <i>M. oleifera</i> ...	11
Tabel 2.4 Beberapa Kelas Utama Senyawa Fenolik pada Tumbuhan.....	18
Tabel 4.1 Hasil Analisis Total Fenol.....	37



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Bagian Tanaman <i>M. oleifera</i> ..... 6
Gambar 2.2	Hidrolisis Trigliserida Menjadi Asam Lemak Sederhana dan Gliserol Dikatalis oleh Lipase ..... 13
Gambar 2.3	Struktur Kristal Lipase <i>Bacillus subtilis</i> ..... 14
Gambar 2.4	Skema Reaksi Transesterifikasi: ( $R = CH_3$ ) Alkohol yang Merupakan Metanol ..... 16
Gambar 2.5	SEM <i>Bacillus</i> sp. AS3 (10.000 X) ..... 17
Gambar 2.6	Skema Sisi Aktif dan Siklus Katalitik Lakase ..... 20
Gambar 2.7	Skema Mekanisme Umum Oksiasi Senyawa Fenol oleh Lakase ..... 21
Gambar 2.8	Siklus Katalitik Oksidasi Mediator Lakase, Struktur Mediator Lakase ABTS, dan Oksidasi ABTS dengan Adanya Lakase ..... 22
Gambar 2.9	Skematik Mekanisme Degradasi Fenol Menggunakan Teknik Oksidasi Fenton ..... 24
Gambar 2.10	Depolimerisasi Lignin oleh Fungi Pembusuk Putih (a) dan Depolimerisasi oleh Fungi Pembusuk Coklat ..... 25

Gambar 2.11	Skematik Lignin (a) Struktur Polimer Lignin dengan Ikatan Eter, (b) <i>Building Block</i> pada Lignin .....	26
Gambar 2.12	Pemutusan Ikatan Eter pada Lignin dengan Menggunakan Katalis Basa (NaOH) .....	28
Gambar 4.1	Visualisasi Hasil Pretreatment Biji <i>M. oleifera</i> .....	38
Gambar 4.2	Profil Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5 (OD 600nm) terhadap Kandungan Total Protein (mg/ml) pada K(+), K(-), dan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	40
Gambar 4.3	Profil Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5 (OD 600nm) terhadap Kandungan Total Protein (mg/ml) pada H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , NaOH, LMS, dan Lakase.....	41
Gambar 4.4	Grafik Hasil Purifikasi Lipase dengan Berbagai Macam <i>Pretreatment</i> pada Substrat.....	42
Gambar 4.5	Pengukuran Kualitatif Aktivitas Lipase pada <i>Pretreatment</i> yang Berbeda. A. K (+), B. K (-), C. NaOH, D. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , E. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , F. LMS, G. Lakase, H. Marker Konsentrasi Formaldehid (ppm) <i>Quantofix</i> .....	43
Gamabr 4.6	Visualisasi Pengendapan Enzim Lipase pada pH 5 dalam <i>Buffer</i> Asetat .....	44



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Skema Penelitian .....	61
Lampiran 2: Pengukuran Standar Asam Galat.....	62
Lampiran 3: Pengukuran Konsentrasi Total Fenol.....	63
Lampiran 4: Pengukuran Pertumbuhan <i>Bacillus</i> sp. SK II-5 .....	64
Lampiran 5: Pengukuran Standar <i>Bovine Serum</i> <i>Albumin</i> (BSA) .....	65
Lampiran 6: Pengukuran Konsentrasi Total Protein ...	66



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Moringa oleifera* merupakan tanaman yang termasuk ke dalam family Moringaceae yang terdistribusi pada tropis dan subtropis Asia dan Afrika (Sing *et al.*, 2009). Moringa merupakan tanaman yang dapat diolah menjadi produk dengan berbagai macam kegunaan seperti bubuk teh, minyak sayur atau suplemen nutrisi. Secara umum seluruh bagian tanaman dapat dikonsumsi atau dapat diproses untuk agen terapeutik, profilaktik, medis dan kosmetik. Kebutuhan global untuk produk moringa seperti bubuk daun moringa dan minyak moringa mengalami pertumbuhan yang pesat (Addai dan Jasse, 2013).

*M. oleifera* memiliki kandungan minyak sekitar 36,7% dari berat bijinya. Minyak biji *M. oleifera* atau yang dikenal sebagai *Ben Oil* mengandung *monounsaturated fatty acid* (MUFA) tingkat tinggi dengan konsentrasi sekitar 76,73%. Dari total asam lemaknya, terkandung sekitar 73,57% asam oleat (Leone *et al.*, 2016; Ogunsina *et al.*, 2014). Asam oleat memiliki stabilitas oksidatif yang baik dibandingkan dengan *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) sehingga sering digunakan pada industri makanan karena memiliki keuntungan yaitu penyimpanan yang lebih lama dan proses penggorengan suhu tinggi (Palafox *et al.*, 2012).

Proses ekstraksi minyak biji Moringa dengan metode *cold pressing* masih meninggalkan residu minyak sekitar 30% (Leone *et al.*, 2016; Ogunsina *et al.*, 2014). Terlepas dari minyaknya, biji Moringa memiliki kandungan protein sebesar 31,4% dan karbohidrat sebesar 18,4%. Kandungan nutrisi dan kandungan asam oleat pada limbah biji Moringa memiliki potensi digunakan sebagai substrat dalam produksi lipase. Gupta (2004) menyatakan bahwa senyawa yang baik digunakan sebagai substrat dalam produksi lipase adalah senyawa yang mengandung trigliserida yang merupakan asam lemak rantai panjang.

Penelitian yang dilakukan oleh Hidayah (2016) menunjukkan kemampuan *Bacillus* sp. SK II-5 untuk memproduksi lipase. Diperoleh nilai aktivitas mencapai 3000 U/ml dengan menggunakan substrat limbah *visceral* rumah potong hewan. Limbah biji *M. oleifera* dapat menjadi substrat yang baik dalam produksi enzim lipase namun memiliki kandungan fenolik yang memiliki gugus fungsi yang sulit didegradasi dan merupakan senyawa yang bersifat anti mikroba seperti asam galat, asam elagat dan asam kafeat, juga ditemukan asam p-koumarat, asam vanilla, asam protokatekuat, asam ferulat dan asam sinamat dalam jumlah kecil. (Singh *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2013).

Degradasi senyawa fenolik pada suatu substrat dapat dilakukan dengan cara oksidasi gugus hidroksil pada cincin benzena aromatik maupun deformasi struktur cincin benzena aromatik (Cragg *et al.*, 2015).

Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan beberapa *pretreatment* untuk mengetahui metode optimal dalam menghilangkan senyawa fenolik dalam limbah biji *M. oleifera*. Jenis *pretreatment* yang digunakan antara lain: oksidasi enzimatis menggunakan lakase, oksidasi enzimatis kimiawi menggunakan *Laccase Mediator System* (ABTS), oksidasi kimiawi menggunakan hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), hidrolisis kimiawi menggunakan asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) dan natrium hidroksida (NaOH) (Baadhe *et al.*, 2014; Yilmaz *et al.*, 2016; Rencoret *et al.*, 2017)

## 1.2 Rumusan Permasalahan

Limbah hasil pengolahan biji *M. oleifera* memiliki kandungan trigliserida yang tinggi yang dapat digunakan sebagai substrat dalam produksi Moringa. Kendala yang ditemui adalah kandungan fenol dalam limbah perlu dihilangkan terlebih dahulu karena bersifat antimikroba dan sulit untuk didegradasi. Oleh karena itu dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini adalah metode *pretreatment* manakah yang sesuai untuk mendapatkan limbah biji yang bebas fenol sehingga dapat digunakan sebagai substrat produksi lipase

### 1.3 Batasan Permasalahan

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Limbah biji *M. oleifera* diperoleh dari hasil ekstraksi minyak oleh CV. Nurul Jannah Kabupaten Sumenep, Jawa Timur
2. Mikroorganisme lipolitik yang digunakan adalah *Bacillus* sp. SKII-5 koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Biologi ITS
3. Produksi lipase dalam penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium

### 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui metode *pretreatment* yang tepat untuk mendegradasi fenol pada limbah biji *M. oleifera*, sehingga limbah dapat digunakan sebagai material substrat produksi lipase.

### 1.5 Manfaat

Manfaat dalam penelitian ini adalah sebagai referensi metode *pretreatment* yang tepat untuk mendegradasi fenol pada limbah biji *M. oleifera* dan referensi dalam upaya untuk memenuhi kebutuhan biokatalis di Indonesia.



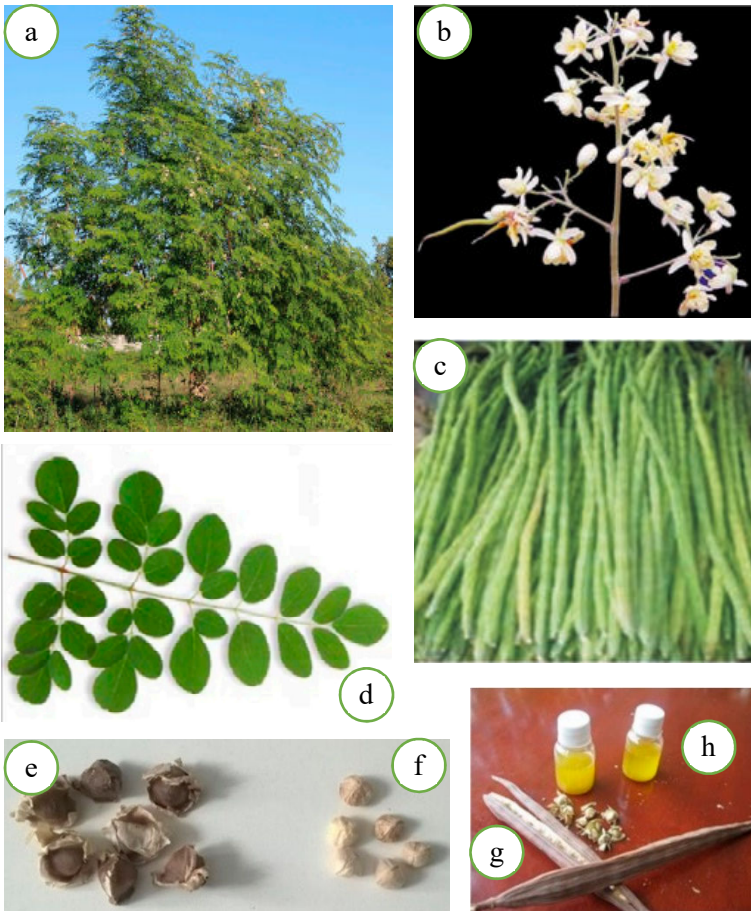
## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Moringa oleifera*

*Moringa oleifera* Lam merupakan salah satu dari 14 spesies yang termasuk ke dalam family *Moringaceae*. Tumbuhan ini dapat dijumpai pada wilayah tropis dan subtropis dengan kondisi lingkungan yaitu iklim kering atau lembab, dengan curah hujan 760-2500 mm/tahun. Tumbuhan ini memerlukan irigasi setidaknya sebesar 800 mm/tahun dan temperatur antara 18°C hingga 28°C. Dapat tumbuh pada jenis tanah apapun dengan pH antara 4,5 dan 8 pada ketinggian hingga 2000 m (Palada, 1996; Nouman *et al.*, 2014) yang dimana berasal dari India, Afrika, Arab, Asia Tenggara, Pasifik dan Kepulauan Karibia, dan Amerika Utara. (Morton, 1991). Di Indonesia sendiri *M. oleifera* Lam disebut sebagai tanaman kelor dan tersebar di Jawa, Sumatera, Kalimantan, Sulawesi, Nusa Tenggara Barat, dan lainnya. Di beberapa daerah kelor disebut kelintang, limaran, atau maronggi. (Kristina dan Syahid, 2014) Adapun Klasifikasi *Moringa oleifera* Lam adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisio : Magnoliophyta  
Classis : Magnoliopsida  
Ordo : Brassicales  
Familia : Moringaceae  
Genus : Moringa  
Spesies : *Moringa oleifera* Lam (Fahey, 2005)

*M. oleifera* merupakan tumbuhan semak atau pohon kecil dengan daun *bi-(tri)-pinnate*. Bagian dasar batangnya menggebung pada tumbuhan mudanya dan dapat dikonsumsi, baik bagian daunnya maupun biji mudanya (Ernst, 1963). *M. oleifera* memiliki batang berkayu (lignosus), tegak, berwarna putih kotor, kulit tipis, permukaan kasar.



Gambar 2.1 Bagian Tanaman *M. oleifera*: (a) Tumbuhan Keseluruhan, (b) Bunga, (c) Buah, (d) Daun, (e) Biji, (f) Inti biji, (g) Kulit Buah, (h) Minyak biji (Amjad *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2015; Leone *et al.*, 2016).

Tinggi tanaman dapat mencapai 10 m dengan percabangan simpodial, arah cabang tegak atau miring, cenderung tumbuh lurus

dan memanjang. Daun majemuk, bertangkai panjang, tersusun berseling, beranak daun gasal (imparipinnatus), helai daun saat muda berwarna hijau muda. Buah berbentuk polong bersegi tiga, panjang 20 – 60 cm, buah muda berwarna hijau – setelah tua menjadi cokelat, bentuk biji bulat – berwarna cokelat kehitaman, berbuah setelah berumur 12 – 18 bulan. Akar tunggang, berwarna putih, membesar seperti lobak (Kristina dan Syahid, 2014). Karakter morfologi *M. oleifera* tervisualisasi pada Gambar 2.1

### 2.1.1 Karakteristik Minyak Biji *Moringa oleifera*

Biji *M. oleifera* berbentuk globular dengan diameter sekitar 1 cm, memiliki 3 sudut dengan rata rata berat sekitar 0,3 g, memiliki 3 sayap dengan sayap yang diproduksi dari dasar menuju apeks sepanjang 2-2,5 cm dan lebar 0,4 -0,7. (Ramachandran, 1980)

Minyak merupakan komponen utama pada biji dan merepresentasikan 36,7% dari berat kering biji. Minyaknya dapat diekstraksi dengan hampir seluruh pelarut, pada umumnya n-heksana, sedangkan hasil yang lebih sedikit dihasilkan melalui *cold press extraction* dimana hanya sekitar 69% dari total minyak yang dapat diperoleh dengan metode ini. (Tsaknis *et al.*, 1998; L alas *et al.*, 2002; Ogunsina *et al.*, 2014). Komposisi kimia biji *M. oleifera* terangkum pada Tabel 2.1

Tabel 2.1 Komposisi Kimia Biji *M. oleifera* (g/100 g berat kering) (Leone *et al.*, 2016)

Nutrien	Biji <i>Moringa oleifera</i>		
	Mean	SD	Range
<b>Lemak</b>	36,7	2,8	(34,7-40,4)
<b>Protein</b>	31,4	1,3	(29,4-33,3)
<b>Karbohidrat</b>	18,4	1,4	(16,5-19,8)
<b>Serat</b>	7,3	0,5	(6,8-8,0)
<b>Arang</b>	6,2	0,9	(4,4-6,9)
<b>Kelembaban</b>	7,0	1,2	(5,7-8,9)

Tabel 2.2 merangkum karakteristik fisik dan kimia minyak *M. oleifera*. yang berbentuk cair pada suhu kamar dan berwarna kuning keemasan. Metode ekstraksi sama sekali tidak mempengaruhi indeks kerapatan dan bias minyak, dan keduanya serupa dengan minyak zaitun (Boskou *et al.*, 2011). Sebaliknya, titik asap kira-kira 11°C lebih tinggi dari pada minyak zaitun (Tsaknis *et al.*, 1998; Tsaknis *et al.*, 1999), menunjukkan stabilitas yang lebih besar selama proses penggorengan. Minyak yang diperoleh dengan *cold pressure extraction* memiliki viskositas dan keasaman lebih tinggi daripada yang diperoleh dengan ekstraksi pelarut. Viskositas yang lebih tinggi ini disebabkan oleh air yang terikat dalam minyak selama ekstraksi (Tsaknis *et al.*, 1999), sedangkan keasaman yang lebih tinggi dikaitkan dengan air yang ditambahkan selama penggilingan biji sebelum *cold pressure extraction*. Memang, penambahan air meningkatkan aksi enzim lipolitik (Sengupta dan Gupta, 1970) dan memperpanjang kontak benih (digiling sebelum *cold pressing*) dengan udara dan suhu. Meskipun demikian, keasaman minyak *cold pressing* umumnya sedang, menunjukkan ketahanannya yang baik terhadap hidrolisis. Jumlah yodium lebih rendah dari minyak zaitun karena minyak kelor kurang jenuh dibanding minyak zaitun (Boskou *et al.*, 2011). Akhirnya, nilai saponifikasi, terlepas dari metode ekstraksi, mirip dengan minyak zaitun (Boskou *et al.*, 2011).

Kadar asam lemak jenuhnya adalah 21,18%, dengan asam palmitat mendominasi, diikuti oleh behenat, asam stearat dan asam arakidat. Minyak mengandung kadar *monosaturated fatty acid*, sampai rata-rata 76,73%. Asam oleat adalah asam lemak utama, dan menyumbang 73,57% dari total asam lemak. *monosaturated fatty acid* yang ada di dalam minyak adalah asam gadoleat dan palmitoleat. Ada kandungan *polyunsaturated fatty acid*, rata-rata 1,18%, dan kandungan asam linoleat dan linolenat masing-masing adalah 0,76% dan 0,46%. (Ogunsina *et al.*, 2014)



Tabel 2.2, Karakteristik Fisik dan Kimia Minyak Biji *M. oleifera* (Leone *et al.*, 2016)

<b>Karakteristik</b>	<b><i>Cold Press</i></b>	<b><i>n</i>-Heksana</b>	<b>Keseluruhan</b>
<b>Densitas pada 24°C (mg/mL)</b>	0.901 ± 0.002	0.901 ± 0.011	0.901 ± 0.009
	(0.899–0.904)	(0.881–0.920)	(0.881–0.920)
<b>Indeks refraktif (40°C)</b>	1.462 ± 0.005	1.459 ± 0.004	1.460 ± 0.005
	(1.459–1.470)	(1.455–1.470)	(1.455–1.470)
<b>Unit warna merah</b>	1.7 ± 0.5	1.1 ± 0.6	1.3 ± 0.6
	(1.0–2.0)	(ND–2.2)	(ND–2.2)
<b>Unit warna kuning</b>	28.3 ± 2.4	35.8 ± 14.0	33.5 ± 12.0
	(25.0–30.0)	(22.3–70.0)	(22.3–70.0)
<b>Titik asap (°C)</b>	203 ± 2	200 ± 1	201 ± 2
	(201–204)	(198–202)	(198–204)
<b>Viskositas (mPa x s)</b>	79.5 ± 25.6	52.8 ± 8.1	64.7 ± 21.8
	(43.8–103.0)	(43.6–62.0)	(43.6–103.0)
<b>Keasaman (% asam oleat)</b>	1.91 ± 1.13	1.07 ± 1.12	1.33 ± 1.15
	(1.01–3.50)	(0.32–4.00)	(0.32–4.00)
<b>Nilai saponifikasi (mg KOH/g minyak)</b>	189.6 ± 8.0	183.7 ± 4.3	185.5 ± 6.0
	(179.8–199.3)	(178.1–191.2)	(178.1–199.3)
<b>Nilai iodin (g I/100g minyak)</b>	66.54 ± 0.97	67.86 ± 1.45	67.46 ± 1.43
	(65.73–67.80)	(65.58–69.45)	(65.58–69.45)

Nilai merupakan mean, ± merupakan standar deviasi dan () merupakan rentang dalam beberapa literatur

Biji *M. oleifera* memiliki total kandungan fenol dalam rentang 4581-4953 mg/100mg. (Singh *et al.*, 2009; Singh dan Prasad, 2013). Flavomoid tumbuhan ini direpresentasikan dalam

bentuk katesin, epikatesin, kuersetin dan kaemferol. Beberapa asam fenolat yang berhasil teridentifikasi yaitu asam galat, asam elagat dan asam kafeat, juga ditemukan asam p-koumarat, asam vanilla, asam protokatekuat, asam ferulat dan asam sinamat dalam jumlah kecil. (Singh *et al.*, 2009; Singh dan Prasad, 2013). Selain itu ditemukan beberapa senyawa bioaktif termasuk alkaloid, glukosinolat, isothiosianat dan thiokarbamat. Senyawa bioaktif yang mampu diisolasi dari biji *M. oleifera* ditunjukkan dalam Tabel 2.3.

Biji *M. oleifera* memiliki total kandungan fenol dalam rentang 4581-4953 mg/100mg. (Singh *et al.*, 2009; Singh dan Prasad, 2013). Flavomoid tumbuhan ini direpresentasikan dalam bentuk katesin, epikatesin, kuersetin dan kaemferol. Beberapa asam fenolat yang berhasil teridentifikasi yaitu asam galat, asam elagat dan asam kafeat, juga ditemukan asam p-koumarat, asam vanilla, asam protokatekuat, asam ferulat dan asam sinamat dalam jumlah kecil. (Singh *et al.*, 2009; Singh dan Prasad., 2013). Selain itu ditemukan beberapa senyawa bioaktif termasuk alkaloid, glukosinolat, isothiosianat dan thiokarbamat. Senyawa bioaktif yang mampu diisolasi dari biji *M. oleifera* ditunjukkan dalam Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Senyawa bioaktif pada biji *M. oleifera* (Leone *et al.*, 2016)

<b>Kelas</b>	<b>Senyawa</b>
Alkaloid	Moringe
Flavonoid	Katekin Epikatekin Kuersetin Kaemfenol
Asam fenolat	Asam galat <i>p-Coumaric acid</i> Asam kafeat Asam protokatekoat Asam sinamat Asam ellagat
Glikosida	Strofatidin 4-( $\alpha$ -L-rhamnosiloksi) benzil isotiosianat 4-(4'-O-asetil- $\alpha$ -L-rhamnosiloksi) benzil isothiosianat 4-( $\beta$ -D-glukopiranosil-1/4- $\alpha$ -L-rhamnopyranosiloksi) benzil thiokarboksamida 4-O-( $\alpha$ -L-rhamnosiloksi) benzil glukosinolat 4-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosiloksi)-benzilglukosinolat Niazimisin 4-( $\alpha$ -L-rhamnosiloksi) benzil asetonitril (niazirin) O-etil-4-( $\alpha$ -L-rhamnosiloksi) benzil karmat Gliserol-1-1-(9-oktadekanoat) 3-O-(6'-O-oleksil- $\beta$ -D-glukopiranosil)- $\beta$ -sitosterol $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranosida 3-Hidroksi-4-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosiloksi) benzil glukosinolat 4-(2/3/40-O-asetil- $\alpha$ -L-rhamnopyranosiloksi) benzil glukosinolat Glukosinalbin Glukoraphanin Glukoiberin

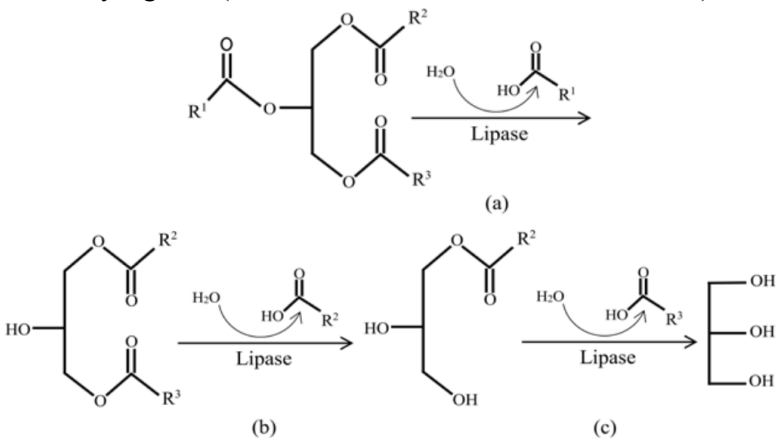
### 2.1.2 Pemanfaatan Biji *Moringa oleifera*

Biji *M. oleifera* dapat digunakan untuk produksi minyak dan kulitnya dapat digunakan untuk pakan ternak serta penjernih air. Berbagai metode telah digunakan untuk menekstraksi minyak dari biji *M. oleifera*. Metode yang paling umum digunakan yaitu *cold pressing* dimana hasilnya tergantung jenis *press* dan teknik yang digunakan. Kulit biji harus dihilangkan dari kernelnya sebelum minyak dapat diekstraksi. Berdasarkan proses penyulingannya, minyaknya dapat digunakan sebagai:

- a. Minyak Sayur. Minyak moringa biasa digunakan untuk konsumsi manusia karena rasanya yang segar saat disuling dan tahan lama. Jumlah asam lemak yang ada sangat mirip dengan minyak kacang macadamia. Selanjutnya minyak moringa dianggap berpotensi sebagai pengganti minyak zaitun.
- b. Minyak Industri. Minyak moringa digunakan sebagai pelumas untuk mesin, karena cenderung tidak memburuk atau menjadi tengik atau lengket pada suhu tinggi.
- c. Kosmetik. Minyak moringa bagus dijual di pasaran dunia sebagai 100 persen minyak murni. Hal ini juga digunakan sebagai komponen dari banyak produk lainnya, seperti sabun, *body lotion*, masker wajah, gel mandi dan pembersih rambut pra-shampo. Moringa selanjutnya digunakan sebagai karier minyak dalam penggabungan aroma dan minyak esensial. Beberapa perusahaan kosmetik telah mengambil keuntungan dari protein spesifik yang ditemukan dalam minyak moringa untuk mengembangkan produk baru, yang melindungi sel kulit dari kerusakan polutan
- d. Kegunaan medis. Biji moringa diketahui dapat menurunkan lipid peroksidase pada liver dan dapat digunakan sebagai antihipertensi (Addai dan Jasse, 2013; Amjad *et al.*, 2015)

## 2.2. Lipase

Lipase (EC 3.1.1.3) atau yang disebut triasilgliserol asilhidrolase merupakan kelas enzim hidrolase yang mengkatalis hidrolisis trigliserida menjadi gliserol dan asam lemak bebas yang ditunjukkan pada Gambar 2.2 (Sharma *et al.*, 2001; Treichel *et al.*, 2009). Lipase dapat diproduksi oleh tumbuhan, hewan, dan mikroorganisme. Lipase mikrobia lebih diminati dalam bidang industri karena stabilitas, selektivitas, dan lebih spesifik terhadap substrat yang luas (Dutra *et al.*, 2008; Griebeler *et al.*, 2009)

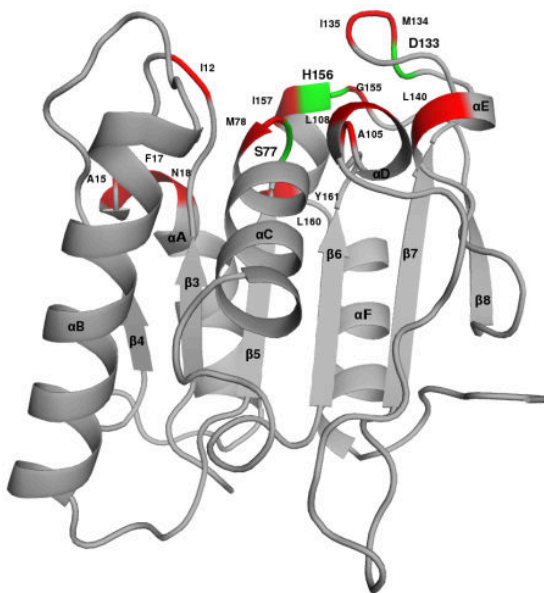


Gambar 2.2 Hidrolisis trigliserida menjadi asam lemak sederhana dan gliserol dikatalis oleh lipase. (a) hidrolisis primer trigliseridamenjadi digliserida, (b) dekomposisi digliserida menjadi monogliserol, (c) Hidrolisisi asam lemak menjadi gliserol (Jamie *et al.*, 2017).

Lipase sebagian besar aktif pada pelarut organik yang mengkatalisis beberapa reaksi termasuk esterifikasi, transesterifikasi, regioselektif asilasi glikol dan mentol, dan sintesis peptida. Aplikasi lipase terjadi dalam proses kimia organik, formulasi deterjen, sintesis biosurfaktan, industri oleokimia, proses

farmasi (Liese *et al.*, 2001; Chowdary *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2001; Guerrand, 2017).

Lipase merupakan enzim yang berlimpah di alam yang terdistribusi pada tumbuhan, hewan dan Mikroba (Duta dan Ray 2009). Lipase menjadi enzim yang diperhitungkan dalam industri karena kemampuannya bereaksi dalam lingkungan mikroakuos dan mengkatalis reaksi esterifikasi, transesterifikasi, Aminolisis, dan asidolisis (Joseph *et al.*, 2008). Banyak aplikasi industri dari enzim lipase yang berfokus dalam selektifitas regio dan anantio (He *et al.*, 2010). Lipase tidak membutuhkan kofaktor untuk mengkatalis reaksi hidrolisis dan mampu tetap aktif dengan adanya pelarut organik (Saxena *et al.*, 2003)



Gambar 2.3 Struktur Kristal Lipase *Bacillus subtilis*. Triad Residu Katalitik Ditunjukkan oleh Warna Hijau dan Residu Sisi Aktif Ditunjukkan oleh Warna Merah (Srivastawa *et al.*, 2014)

Struktur 3D lipase yang dihasilkan *B. subtilis* memiliki bentuk globular dengan dimensi  $35\text{\AA} \times 36\text{\AA} \times 42\text{\AA}$  seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3. Strukturnya menunjukkan domain tunggal yang terdiri dari 6  $\beta$  *strand* di dalam  $\beta$  *sheet* secara paralel, yang dikelilingi secara  $\alpha$  heliks. Terdapat 2  $\alpha$  heliks pada satu sisi  $\beta$  *sheet* dan 3 pada sisi lainnya termasuk daerah yang sangat kecil yang mengandung 4 residu asam amino (van Pouderoyen *et al.*, 2001). *Active site*  $\alpha/\beta$  *hydrolase fold* enzim terdiri dari tiga katalitik residu: residu nukleofilik (serin, sistein, atau aspartat), asam katalitik residu (aspartat atau glutamat), dan residu histidin, konsisten di urutan asam amino. Lipase yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp. memiliki berat molekul 19,6 kDa (Jaeger *et al.*, 1999). Berat molekul lipase oleh *Bacillus* sp. berbeda-beda yaitu 62,2 kDa

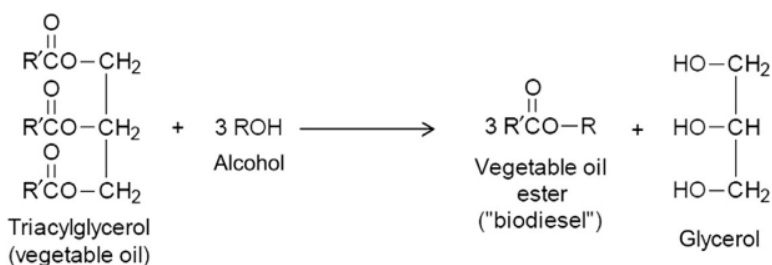
Strain bakteri lebih banyak digunakan sebagai sumber lipase karena memiliki aktivitas enzimatik lebih tinggi dibandingkan mikroorganisme lain. Enzim yang dihasilkan lebih stabil dan aman. Lipase yang dihasilkan memiliki tingkat stabilitas tinggi terhadap kisaran pH yang lebih luas, stabilitas suhu yang tinggi. Oleh karena itu sifat ekstremofil menjadi kriteria penting untuk produksi lipase yang memiliki tingkat aktifitas dan kestabilan tinggi terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim sekalipun. Lipase dengan sumber mikroba memiliki potensi besar mereka mengenai penggunaan dalam berbagai aplikasi (Sangeetha *et al.*, 2011)

Lipase (EC 3.1.1.3) telah lama digunakan sebagai biokatalis yang menggantikan katalis kimiawi dalam produksi biodiesel dengan memanfaatkan reaksi transesterifikasi (Gambar 2.4) dan esterifikasi. Terdapat beberapa keuntungan menggunakan Lipase sebagai biokatalis dalam produksi biodiesel antara lain:

- 1) Memiliki kemampuan untuk bekerja dalam lingkungan media yang beranekaragam termasuk system bifasik dan monofasik (aquos dan non aquos) (Mittelbach, 1990; Linko *et al.*, 1994; Mukesh *et al.*, 1994).
- 2) Dapat diproduksi dalam jumlah besar dan stabil.

- 3) Pemisahan tidak diperlukan jika proses transesterifikasi dengan lipase dilakukan pada reactor *packed-bed*
- 4) Profisiensi seperti rantai pendek, alcohol toleran dan stabilitas dalam suhu tinggi lipase membuatnya sangat layak dalam produksi biodiesel (Ghaly *et al.*, 2010).

Dalam proses transesterifikasi kimia, asam lemak bereaksi dengan alkohol dan membentuk monoalkil ester (biodiesel). Reaksi umum dalam produksi biodiesel ditunjukkan pada Gambar 2.3, memerlukan triasilgliserol dan alkohol (Meher *et al*, 2004)



Gambar 2.4 Skema reaksi transesterifikasi: ( $R = \text{CH}_3$ ) alkohol yang merupakan metanol (Gupta *et al.*, 2014).

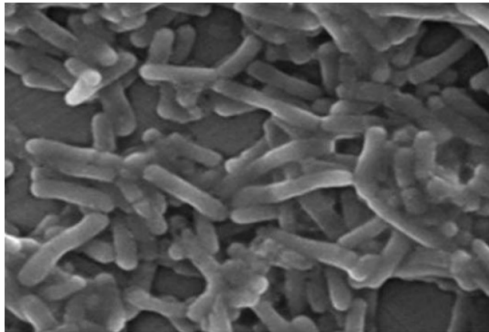
### 2.3 *Bacillus* sp.

*Bacillus* sp. merupakan kelompok bakteri gram positif dengan bentuk batang, lurus atau sedikit membengkok, muncul dalam pasangan atau tunggal, beberapa membentuk rantai, dan terkadang membentuk filamen. Bakteri ini dapat membentuk endospora yang membuatnya resisten terhadap kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan yang ditunjukkan pada Gambar 2.5. Termasuk kelompok bakteri motil dengan flagella petrisius atau petrisius terdegenerasi dan sebagian besar nonmotil. Aerob atau anaerob fakultatif namun beberapa spesies anaerobik obligat. Menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terminal, atau digantikan bagi beberapa spesies (Logan dan Vos, 2015).



Klasifikasi *Bacillus* sp. adalah sebagai berikut:

- Kingdom : Bacteria
- Divisio : Firmicutes
- Classis : Bacilli
- Ordo : Bacillales
- Familia : Bacillaceae
- Genus : *Bacillus*
- Species : *Bacillus* sp. (Logan dan Vos, 2015)



Gambar 2.5 SEM *Bacillus* sp. AS3 (10.000 X) (Akhtar *et al.*, 2012)

## 2.4 Senyawa Fenolik

Fenolik merupakan kelas senyawa kimia yang memiliki gugus hidroksil (-OH) yang terikat secara langsung pada gugus hidrokarbon aromatik dengan struktur cincin benzena (Enache dan Oliveira-Brett, 2011). Fenol ( $C_6H_5OH$ ) merupakan kelas paling sederhana pada kelompok ini (Saxena *et al.*, 2013). Beberapa kelas senyawa fenol dirangkum dalam Tabel 2.4. Kelompok utama dari kelas fenolik adalah flavonoid, asam fenolat, dan polifenol (Walton *et al.*, 2003). Beberapa kelas senyawa fenolik ditunjukkan pada Tabel 2.4. Senyawa fenolik dapat diartikan sebagai gugus konstituen kimia kompleks dan besar yang ditemukan pada tanaman. Studi farmakologi menjelaskan bahwa senyawa fenolik memiliki aktivitas biologis sebagai antiinflamasi, antikejang,

antibakteria, antitumor, dan antioksidan (Cai *et al.*, 2003; Miled *et al.*, 2017)

Tabel 2.4 Beberapa Kelas Utama Senyawa Fenolik pada Tumbuhan (Saxena *et al.*, 2013)

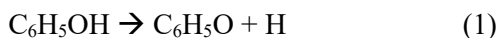
No	Jumlah atom C	Dasar skeleton	Kelas
1	6	C <sub>6</sub>	Fenol sederhana Benzoquinon
2	7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Asam fenolat
3	8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Derifat Asetofenon Tirosin
4	9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Asam Hidroksisinnamat, Koumarin
5	10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinon
6	13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xanton
7	14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stillben
8	15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoid
9	18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignan
10	30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Bioflavonoid
11	N	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tannin terkondensasi

Senyawa fenolik mendonasikan hidrogen dan kemampuan antioksidannya meliputi mekanisme *scavenge radical* atom H atau proses transfer elektron fenol yang dikonversikan menjadi radikal fenoksil. (Leopoldini, *et al.*, 2004; Soobrattee, *et al.*, 2005). Senyawa fenolik memiliki kemampuan antimikroba yang disebabkan oleh struktur kimia yang dimilikinya, khususnya pada jumlah dan posisi substitusi pada cincin benzenanya dan panjang rantai jenuh (Cueva *et al.*, 2010). Mekanisme dari aktivitas antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri berupa permeabilisasi dan destabilisasi dari membrane plasma, inhibisi enzim ekstraselular mikroba, dampak langsung pada metabolisme mikroba, dan degradasi substrat yang dibutuhkan untuk

pertumbuhan mikroba (Campos *et al.*, 2009; Dietrich dan Pour-Nikfardjam, 2009)

## 2.5 Oksidasi Senyawa Fenolik

Oksidasi senyawa aromatik memperlihatkan peranan penting dari fenol dan radikal fenoksi (Brezinsky *et al.*, 1998). Fenol, oksigen, dan air merupakan 3 spesies yang berada dalam system. Reaksi potensial inisiasi unimolekular sebagai berikut:

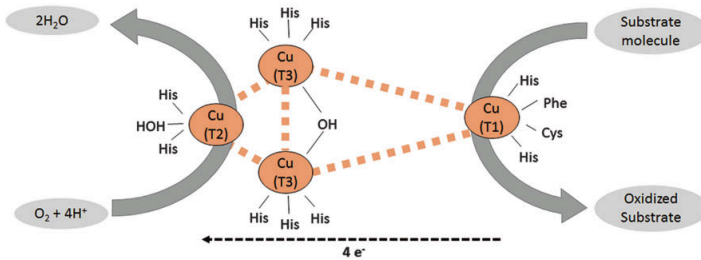


(Gopalan dan Savage, 1994)

### 2.5.1 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Lakase

Lakase (EC 1.10.3.2, *p*-benzenediol oksigen oksidoreduktase) merupakan kelas enzim fenol oksidase yang mengandung tembaga yang mampu mengoksidasi substrat fenolik dan nonfenolik kaya elektron yang diiringi dengan reduksi oksigen menjadi air melalui mekanisme reaksi radikal terkatalisis (Karigar dan Lao, 2011; Christopher *et al.*, 2014).

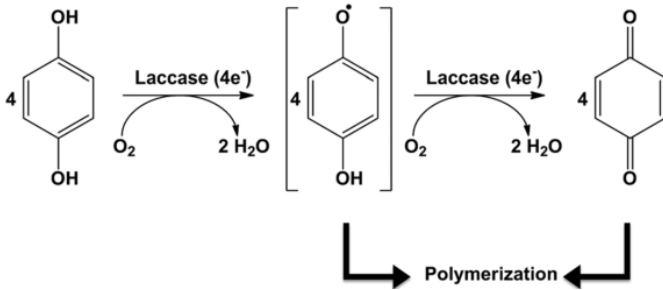
Lakase pada umumnya memiliki struktur 3 domain pada sisi aktifnya yang mengandung 4 pusat tembaga yang berperan penting dalam mekanisme katalitik. Pengelompokan atom tembaga berdasarkan distribusi terhadap struktur enzim (T1, T2, dan T3) dan spektroskopi alaminya (Piontek *et al.*, 2002; Rodriguez-Delgado *et al.*, 2017).



Gambar 2.6 Skema sisi aktif dan siklus katalitik lakase (Rodriguez-Delgado dan Ornelas-Solo, 2017)

Situs T1 dan T2 hanya memiliki satu atom tembaga; dua atom yang tersisa ditemukan di situs T3. Setiap jenis tembaga memiliki karakteristik unik: tipe 1 bertanggung jawab untuk warna biru kebiruan pada enzim yang merupakan rongga hidrofobik di mana substrat teroksidasi selama mekanisme katalitik lakase (Durán et al. 2002; Madhavi dan Lele, 2009); tipe 2 tidak berwarna karena tidak ada penyerapan dalam daerah visibel yang terlihat; tipe 3 menunjukkan puncak yang lemah pada 330 nm (Ba *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2014; Goncalves *et al.*, 2014). Bentuk tereduksi T1 (dihasilkan dari oksidasi substrat) menyumbangkan sebuah elektron, yang dikirim ke gugus trinuklear T2 / T3 (terbentuk dari atom tembaga T2 dan T3), yang mana terjadi pembentukan air (pengurangan oksigen (Durán et al. 2002; Madhavi dan Lele 2009) (Gambar 2.6).

Lakase berperan dalam oksidasi beberapa fenol dan senyawa aromatik maupun nonaromatik melalui mekanisme katalisis radikal (Gambar 2.7). Selama reaksinya, satu elektron dari masing-masing dari empat molekul substrat ditransfer ke satu molekul oksigen, yang secara bersamaan mereduksi air. Selanjutnya, substrat radikal teroksidasi dapat mengalami reaksi nonenzimatik seperti polimerisasi senyawa dengan berpasangan dengan radikal lain yang ada dalam larutan (Demarche *et al.*, 2012; Goncalves *et al.*, 2014).

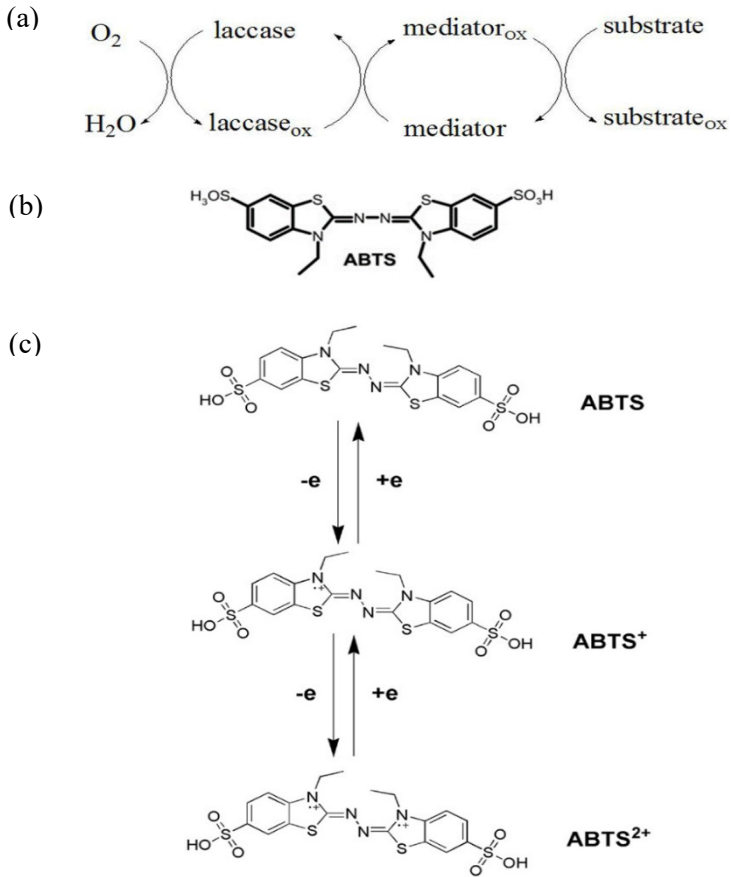


Gambar 2.7 Skema mekanisme umum oksidasi senyawa fenol oleh lakase (Goncalves *et al.*, 2014).

### 2.5.2 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Mediator Lakase ABTS [2,2'-azinobis-(asam 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)]

Mediator merupakan senyawa kimia kecil yang secara kontinyu dioksidasi oleh lakase dan kemudian mengoksidasi substrat. Mediator berperan sebagai karier elektron antara enzim dengan substrat sehingga dapat menghilangkan penghalang sterik antara keduanya. (Li *et al.*, 1999). Reaktivitas lakase akan berkurang seiring dengan peningkatan ukuran substrat sehingga aksesibilitas substrat yang terbatas dapat diatasi dengan menggunakan mediator lakase. Pada reaksi inisial, mediator akan teroksidasi menjadi intermediet stabil dengan potensial redoks yang tinggi oleh lakase. (Wells *et al.*, 2006; Christopher *et al.*, 2014).

Lakase mengoksidasi mediator yang dapat berdifusi keluar dari enzim mengoksidasi substrat kemudian mediator tereduksi kembali ke siklus katalitik. Oksidan stoikiometrik dalam reaksi ini adalah oksigen. Siklus katalitik ditunjukkan pada Gambar 2.8 (a) dengan mediator umum.



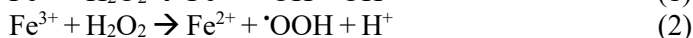
Gambar 2.8 Siklus katalitik oksidasi mediator lakase (a), struktur mediator lakase ABTS (b), dan oksidasi ABTS dengan adanya lakase (Wells *et al.*, 2006; Christopher *et al.*, 2014)

Oksidasi substrat mediator terjadi melalui mekanisme ionik atau mekanisme dua radikal, elektron transfer atau pemisahan hidrogen atom. ABTS [2,2'-azinobis-(asam 3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)] bereaksi melalui jalur radikal (Fabbrini *et al.*, 2002;

d'Acunzo *et al.*, 2003). ABTS tersedia dan dapat dioksidasi oleh radikal bebas, beberapa peroksidase dan lakase menjadi kation radikal ABTS<sup>•+</sup>. Kation radikal dapat dioksidasi lebih jauh menjadi dikation ABTS<sup>2+</sup>. Gambar 2.8 (c) menunjukkan modifikasi ABTS oleh lakase.

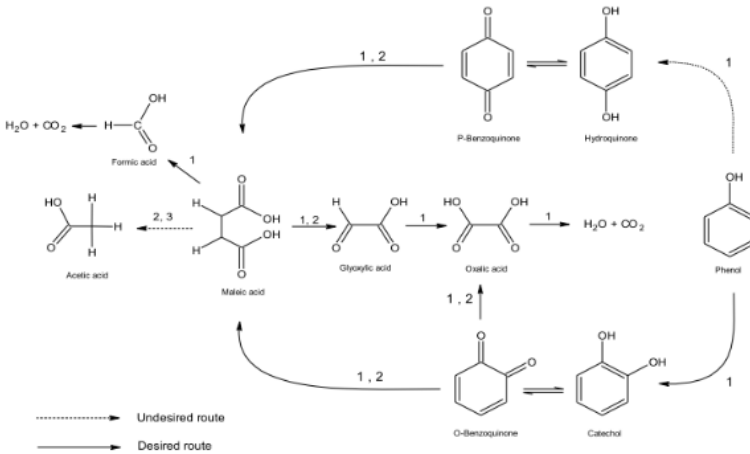
### 2.5.3 Oksidasi Senyawa Fenolik Menggunakan Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Oksidasi senyawa fenolik menggunakan hidrogen peroksida biasa digunakan dalam pengolahan air limbah yang banyak mengandung fenol (Babuponnusami dan Muthukumar, 2014). Teknik yang digunakan adalah mereaksikan hidrogen peroksida dan katalis besi untuk menghasilkan radikal atau lebih dikenal dengan teknik Fenton. Proses oksidasi divisualisasikan pada Gambar 2.9. Berikut adalah reaksi kimianya:



Efisiensi teknik Fenton bergantung pada konsentrasi Fe<sup>2+</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan pH reaksi. Kemampuan menghilangkan fenol terjadi karena adanya ferrous/ferric ion. Ion ion metalik ini memiliki peran ganda dalam proses katalisis dan koagulan (Yavuz *et al.*, 2007).

Dihasilkan senyawa aromatik seperti *hydroquinone*, *cathecol*, dan *benzoquinone* selama proses oksidasi fenol, yang mana memberikan toksisitas yang lebih seperti yang terlihat pada (gambar 2.9) Kekurangan ini dapat dikurangi dengan bantuan proses enzimatik. Fenol dapat dipolimerisasikan menjadi bifenol melalui enzim oksidoreduktasi seperti peroksidase (Azizi *et al.*, 2017).



Gambar 2.9 Skematik mekanisme degradasi fenol menggunakan teknik oksidasi Fenton, 1. Oksidasi; 2. Pemutusan ikatan C-C; 3. Transfer hidrogenase (Azizi *et al.*, 2017)

## 2.6 Depolimerasi Lignin

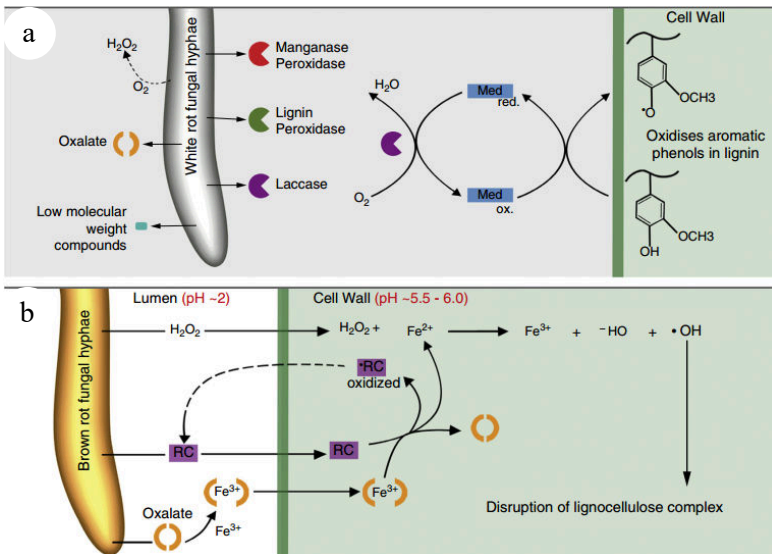
Lignin merupakan polimer dengan kelimpahan terbanyak di alam setelah selulosa. Residu agrikultur biasanya tersusun atas 10-20% lignin, 40% selulosa dan sisanya adalah hemiselulosa, sementara biomassa kehutanan tersusun atas 20-30% lignin, 30-40% selulosa dan 20-30% hemiselulosa (Mahmood *et al.*, 2016).

Beberapa Strategi yang ada di Alam untuk modifikasi lignin, meskipun rentang organisme yang mendegradasi lignin terbatas dari pada degradasi selulosa. Basidiomycetes pembusuk putih dan beberapa bakteri ligninolitik berfungsi sebagai pendegradasi utama lignin dengan mensekresikan enzim oksidatif seperti peroksidase dan lakase (Bugg *et al.*, 2011; Pollegioni *et al.*, 2015) (Gambar 2.10), menghasilkan genangan senyawa aromatik heterogen. Ini dimetabolisme seluruhnya oleh organisme penyekresi atau mikroba lainnya.

Jamur pembusuk coklat, yang tidak memiliki enzim pendegradasi lignin, menggunakan molekul spesies reaktif kecil



untuk mendepolimerisasi lignin (Gambar 2.10b), membelah rantai samping propil, dan juga demetoksilasi cincin sebelum repolimerisasi bahan di tempat lain sebagai sarana membebaskan komponen selulosa dan menghasilkan akses yang lebih besar untuk dekonstruksi (Arantes & Goodbell, 2014). Lignin yang dimodifikasi tidak dimetabolisme oleh jamur pembusuk coklat dan malah bertahan di tanah.



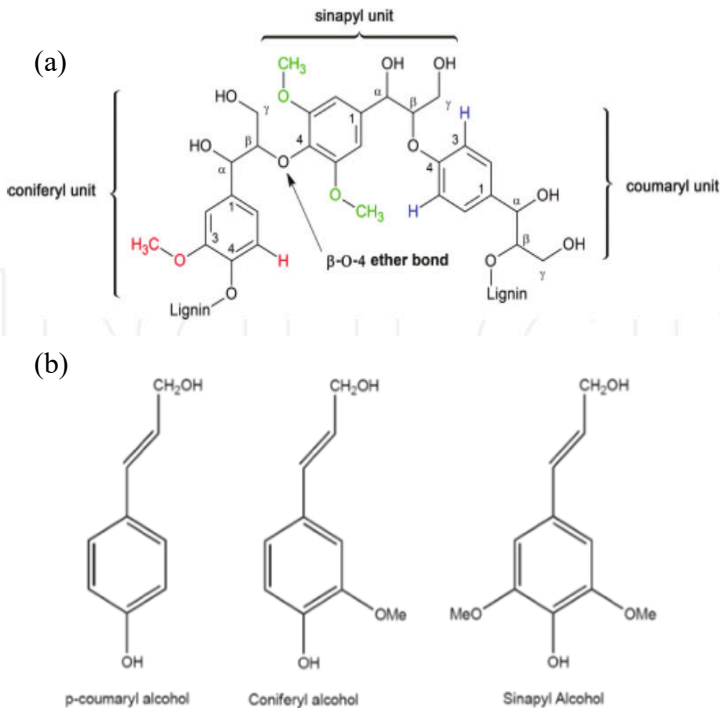
Gambar 2.10 Depolimerisasi lignin oleh fungi pembusuk putih (a) dan Depolimerisasi oleh fungi pembusuk coklat (b) (Cragg *et al.*, 2015).

### 2.6.1 Struktur Lignin

Lignin merupakan kopolimer amorf tiga dimensi yang terikat secara *cross-linked* yang tersintesis secara radikal melalui polimerisasi acak dari 3 unit *phenilpropene* sebagai *building block*: *coumaryl-*, *coniferyl-*, dan *sinapyl-alcohol* (gambar 2.11). *Building block* penyusunnya terhubung oleh ikatan eter ( $\beta$ -O-4) dan ikatan

karbon (C-C) yang secara kolektif disebut monolignin (Rossiger *et al.*, 2018).

Terdapat tiga macam lignin berdasarkan komponen penyusunnya: *hardwood*, *softwood*, dan *grass lignin*. *Softwood lignin* tersusun atas 90% *coniferyl alcohol* dan 10% *coumaryl alcohol*, dimana *hardwood lignin* memiliki persentase yang bervariasi antara *coniferyl* dan *sinapyl alcohol*, sedangkan *grass lignin* merupakan campuran dari *coniferyl*, *sinapyl*, dan *coumaryl alcohol* (Zakzesky *et al.*, 2010).



Gambar 2.11 Skematik lignin (a) struktur polimer lignin dengan ikatan eter, (b) *building block* pada lignin (Pineda and Lee, 2016).

Lignin membentuk suatu jaringan tiga dimensi yang bersifat tidak larut air. Lignin memiliki peranan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel tumbuhan karena mempengaruhi traspor air, nutrient, dan metabolit. Selain itu, lignin juga berperan sebagai pengikat antar sel sehingga menciptakan suatu material komposit yang memiliki ketahanan terhadap benturan, kompresi, dan pembengkokan (Harmsen *et al.*, 2010).

### 2.6.2 Depolimerisasi Lignin Menggunakan Katalis Basa

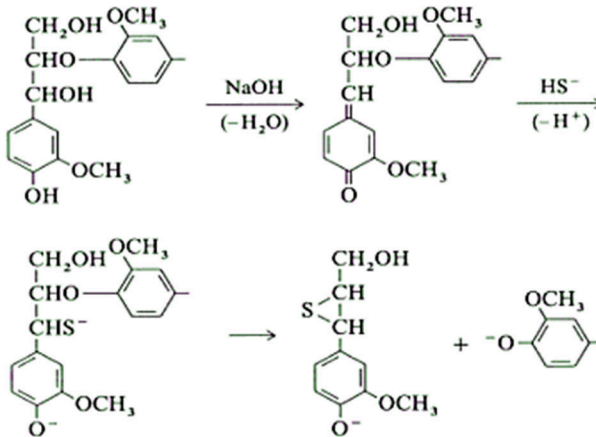
Mekanisme depolimerasi berkatalis basa bekerja pada pemutusan ikatan eter yang mana lebih mudah dilakukan daripada pemutusan ikatan karbon (C-C). Ketika lignin larut pada senyawa alkali, ikatan eter akan melemah akibat polarisasi yang dilakukan oleh senyawa alkali atau ion ion alkali metal pemutusan ikatan berfokus pada ikatan eter aril-gliseril- $\beta$ -aril ( $\beta$ -O-4) dan ikatan eter diaril (4-O-5) yang merupakan ikatan terlemah pada struktur lignin. Pemutusan ikatan eter divisualisasikan pada Gambar 2.12. Berdasarkan struktur molekul lignin akan terbentuk 25% unit monomer cincin aromatik: *phenol*, *guaiacol*, *syringol* dan derivat *catechol* (Schmiedl *et al.*, 2012).

Depolimerisasi dilakukan dengan cara perendaman dengan larutan alkali pada temperatur antara 250-350°C, tekanan tinggi (150-300 bar) dan waktu yang relatif singkat (5-15 menit). Dilaporkan penggunaan basa kuat seperti NaOH terbukti bekerja secara efektif dengan pelarut organik polar sehingga memicu pembentukan monomer yang lebih baik (Pineda dan Lee, 2016).

### 2.6.3 Depolimerisasi Lignin Berkatalis Asam

Depolimerasi berkatalis asam biasa dilakukan menggunakan asam mineral (asam sulfat atau asam nitrat) maupun asam organik (asam oksalat atau asam malat) karena memiliki kemampuan untuk menghilangkan hemiselulosa dan lignin sehingga mampu menunjang hidrolisis enzimatik. Pada saat lignin berada dalam media asam, reaksi kimia dimulai dengan protonasi

hydronium gugus fungsi hidroksil (OH) yang berada dalam kesetimbangan kimia dengan karbokation reaktif. Reaksi ini kemudian menyebabkan pemotongan ikatan eter ( $\beta$ -O-4') yang menghasilkan  $\beta$ -keton (keton Hibbert) atau aldehyd fungsional serta melepaskan fenol fungsional (Narron *et al.*, 2016)



Gambar 2.12 Pemutusan ikatan eter pada lignin dengan menggunakan katalis basa (NaOH) (Lin dan Lin, 2002).

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 hingga April 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi dan Laboratorium Zoologi dan Rekayasa Hewan Departemen Biologi, Fakultas Sains, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Laboratorium Pengujian Terpadu, Universitas Pembangunan Nasional “Veteran” Jawa Timur, dan Laboratorium Purifikasi dan Biologi Molekuler, Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya.

### **3.2. Metode Penelitian**

Metode yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yang tertera dalam lampiran 1

#### **3.2.1. Limbah Biji *M. oleifera***

Ekstraksi minyak biji *M. oleifera* dilakukan untuk memisahkan minyak dari biji. Limbah biji *M. oleifera* diperoleh setelah proses ekstraksi minyak menggunakan alat *screw-type oil expeller* yang dilanjutkan dengan *JM85 type colloid mill* untuk menghancurkan ampas biji dengan derajat kehalusan (*degree of fineness*) 2-70  $\mu\text{m}$ . Proses ekstraksi dilakukan oleh CV. Nurul Jannah Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Limbah biji *M. oleifera* yang telah dihaluskan digunakan sebagai substrat dalam produksi lipase.

#### **3.2.2. Pretreatment**

*Pretreatment* dilakukan dengan tujuan utama mendetoksifikasi atau mendegradasi senyawa fenolik pada limbah biji dan dilakukan dengan metode enzimatik dan kimiawi. Metode enzimatik dilakukan dengan penambahan enzim lakase dan menggunakan *Laccase Mediator System* (LMS) dengan ABTS sebagai mediator sedangkan metode kimiawi dilakukan dengan penambahan NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **3.2.2.1 Pretreatment dengan Penambahan Lakase dan Lakase dengan mediator ABTS**

*Pretreatment* lakase dilakukan dengan mencampurkan 2 gram bubuk ampas biji *M. oleifera* dengan 10 ml lakase dan ditambahkan 1mM/g ABTS untuk perlakuan lakase dengan ABTS. Sampel kemudian ditambahkan 50 mM buffer asetat pH 4,8 dengan konsentrasi 10% (w/v). Sampel diinkubasi pada *rotary shaker* pada kecepatan 200 rpm dengan suhu 40°C selama tiga jam. Setelah inkubasi berakhir, sampel dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C selama 90 menit (Rencoret *et al.*, 2017)

### **3.2.2.2 Pretreatment dengan Larutan Alkali**

*Pretreatment* alkali dilakukan dengan mencampurkan bubuk limbah biji *M. oleifera* dengan 2% NaOH sehingga terbentuk suspensi dengan konsentrasi 20% (w/v) (Fernandes *et al.*, 2016). Suspensi diinkubasi pada suhu 121°C selama 20 menit di dalam autoklaf (Michalska *et al.*, 2015). Setelah mencapai suhu ruang, suspensi disentrifus pada 2000 rpm selama 20 menit. Natan kemudian dibilas menggunakan akuades hingga pH netral. Padatan biomassa yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C untuk analisa lebih lanjut.

### **3.2.2.3 Pretreatment dengan Larutan Asam**

*Pretreatment* asam dilakukan dengan mencampurkan bubuk limbah biji *M. oleifera* dengan 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sehingga terbentuk suspensi dengan konsentrasi 10% (w/v) (El Asli dan Qatibi, 2009). Suspensi diinkubasi pada suhu 121°C selama 20 menit di dalam autoklaf (Baadhe *et al.*, 2014). Setelah mencapai suhu ruang, suspensi disentrifus pada 2000 rpm selama 20 menit. Natan kemudian dibilas menggunakan akuades hingga pH netral. Padatan biomassa yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C untuk analisa lebih lanjut.

### 3.2.2.4 Pretreatment dengan Larutan Peroksida Alkali

*Pretreatment* peroksida alkali dilakukan dengan mencampurkan bubuk limbah biji *M. oleifera* dengan 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terbentuk suspensi dengan konsentrasi 10% (w/v). Suspensi ditambahkan dengan NaOH bubuk hingga diperoleh pH 11,5 (Martinez-Patino *et al.*, 2017) Suspensi diinkubasi pada suhu 121°C selama 20 menit di dalam autoklaf (Baadhe *et al.*, 2014). Setelah mencapai suhu ruang, suspensi disentrifus pada 2000 rpm selama 20 menit. Natan kemudian dibilas menggunakan akuades hingga pH netral. Padatan biomassa yang diperoleh dikeringkan pada suhu 40°C untuk analisa lebih lanjut.

### 3.2.3 Uji Kadar Total Lipid

Uji kadar total lipid dilakukan untuk mengetahui kadar lipid yang masih tertinggal pada limbah biji *M. oleifera*. Lipid diekstraksi menggunakan pelarut petroleum eter. Serbuk limbah biji *M. oleifera* dibungkus kertas saring dan dimasukkan ke dalam alat ekstrakstor *soxhlet*. Ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 400 ml petroleum eter ke dalam *round bottom flask*. Ekstraksi dilakukan pada titik didih pelarut. Lipid dipisahkan dari pelarutnya dengan distilasi, sampai diperoleh lipid murni (Redfern *et al.*, 2014)

### 3.2.4 Uji Kadar Total Fenol

Kadar total fenol pada substrat diuji secara kolorimetrik menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* (Blainski *et al.*, 2013)

#### 3.2.4.1 Kurva Standar Asam Galat

Larutan stok asam galat dibuat dengan konsentrasi 1 mg/ml. 50 mg asam galat ditambahkan 1 ml etanol 96% kemudian dihomogenkan. Akuades ditambahkan secara perlahan hingga mencapai volume 50 ml. Pengenceran serial dilakukan dari pengenceran larutan stok asam galat sehingga diperoleh

konsentrasi yang diinginkan (0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200 mg/ml).

Sebanyak 0,2 ml dari masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan 15,8 ml akuades dan 1ml reagen *Folin-Ciocalteu* kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 8 menit. Ditambahkan 3 ml larutan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10% kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Absorbansi tiap larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm. Absorbansi yang diperoleh dilakukan regresi linear sehingga diperoleh kurva standar (Marjoni *et al.*, 2015).

#### 3.2.4.2 Penetapan Kadar Total Fenol pada Substrat

100 mg substrat dilarutkan dengan akuades hingga volume 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/ml. 1 ml dari suspensi ditambahkan akuades hingga mencapai volume 10 ml dan diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. 0,2 ml suspensi ditambahkan ke 15,8 ml akuades dan 1 ml reagen *Folin-Ciocalteu* kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 8 menit. Ditambahkan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Absorbansi tiap larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm. Kadar total fenol dapat ditentukan dari kurva standar asam galat (Orak, 2006; Marjoni *et al.*, 2015).

#### 3.2.5 Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bacillus* sp. SK II-5 yang diisolasi dari kawah Dieng. *Bacillus* sp. SK II-5 dilaporkan mampu memproduksi lipase dengan substrat limbah *visceral* rumah potong hewan dengan nilai aktivitas mencapai 3000 U/ml dan kandungan protein 0,22, mg/ml (Hidayah, 2016).

##### 3.2.5.1 Peremajaan *Bacillus* sp. SKII-5

Isolat *Bacillus* sp. SKII-5 dalam *glycerol stock* disubkultur sebanyak 1 ose medium *Nutrient Agar* (NA), isolat diinkubasi pada



suhu ruang selama 2 x 24 jam. Setelah koloni tumbuh pada permukaan agar proses dapat diulang sesuai kebutuhan. Isolat dapat disimpan di lemari pendingin. Batas penyimpanan adalah selama 2 minggu. Isolat yang akan diberi perlakuan dikultur sebanyak 3 ose ke dalam Erlenmeyer yang berisi 100 ml *Nutrient Broth*.

### 3.2.5.2 Preparasi *Bacillus* sp. SK II-5

Sebanyak 10 ml inokulum *Bacillus* sp. SKII-5 dimasukkan kedalam 9 ml medium aklimatisasi yang mengandung 10% minyak goreng; 0,5%  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ; 0,35%  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0,25%  $\text{NaCl}$ ; 0,1 *gum Arabic*; 0,05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7 dan diinkubasi selama 48 jam pada 150 rpm 30 °C. Setelah 48 jam 1 ml inokulum diinokulasikan lagi ke dalam 9 ml medium aklimatisasi. Proses ini dilakukan sebanyak tiga kali. Pada siklus ketiga, 10 ml inokulum diinokulasikan ke dalam 90 ml medium aklimatisasi dan dilakukan pengukuran OD pada 600 nm setiap 2 jam selama 48 jam untuk mengetahui kurva pertumbuhan bakteri (Sharma *et al.*, 2014).

### 3.2.6 Produksi Lipase

*Bacillus* sp. SKII-5 sebanyak 10 % ditumbuhkan di dalam Erlenmeyer 250 ml yang mengandung 90 ml medium fermentasi dengan komposisi 0,2% glukosa; 0,05% pepton; 10% limbah biji *M. oleifera*; 0,3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 0,01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1% *gum Arabic*; 0,1% *tween* 80; pH 7,0. Fermentasi dilakukan secara aerobik pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Pengukuran OD pada 600 nm dilakukan setiap 2 jam hingga 48 jam selama proses fermentasi untuk mengetahui kurva pertumbuhan. Panen dilakukan pada akhir fase log. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C (Ertrugul *et al.*, 2007). Supernatan mengandung *crude* lipase yang akan digunakan untuk uji aktivitas enzim (Sharma *et al.*, 2014).

### 3.2.7 Uji Aktivitas Lipase

Aktivitas lipase diukur secara kualitatif menggunakan *Quantofix*® Formaldehyde tes strip merk Machenery-Nagel (MN). Metode yang digunakan berdasarkan (Sharma *et al.*, 2014; Kuhn *et al.*, 2015) yang dimodifikasi. Lipase bekerja menghidrolisis lipid menjadi asam lemak dan gliserol. Gliserol yang diperoleh kemudian dioksidasi oleh sodium periodat sehingga terbentuk formaldehid. Formaldehid yang terbentuk selanjutnya akan terbaca pada strip tes dengan adanya perubahan warna sesuai dengan konsentrasi formaldehid pada sampel.

Penentuan aktivitas lipase dimulai dengan melarutkan 1 ml trigliserida (TG) dengan 9 ml larutan buffer fosfat pH 8 yang mengandung 0,44% tween 80 dan 0,11% gum Arab. Reaksi lipase dilaksanakan dengan penambahan 0,1 ml *crude* lipase dengan 0,9 ml larutan substrat pada suhu 30°C kemudian diinkubasi selama 10 menit.

Penentuan formaldehid dilakukan dengan membuat reagen periodat. Sodium periodat ditambahkan ke dalam akuades hingga mencapai konsentrasi 18 mg/ml kemudian ditambahkan asam asetat 10% (v/v) hingga homogen. Berikutnya ditambahkan ammonium asetat sebanyak 77mg/ml. Sebanyak 200 µl sampel direaksikan dengan 200 µl reagen periodat dan diinkubasi selama 10 menit kemudian ditambahkan 1 tetes larutan Formaldehid-1 (*Quantofix*) dan dihomogenkan kembali. Strip tes formaldehid kemudian dicelupkan pada larutan dan ditiriskan. Strip dibiarkan untuk teroksidasi selama 1 menit kemudian warna yang terbentuk disesuaikan dengan parameter warna yang tersedia.

### 3.2.8 Uji Kandungan Total Protein

Kandungan total protein diukur secara kolorimetrik menggunakan metode bradford (Bradford, 1976).

#### 3.2.8.1 Pembuatan Kurva Standar BSA

Reagen Bradford dibuat dengan melarutkan 0,1 g *Coomsie Brilliant Blue* (CBB) G-250 dengan 50 ml etanol 95%,

ditambahkan 100 ml asam fosfat 85% dan 850 ml akuades. Larutan dihomogenkan kemudian disaring menggunakan kertas saring, disimpan dalam boto gelap pada suhu rendah. Larutan standar yang digunakan adalah BSA yang dibuat dengan melarutkan 0,1 g BSA pada 100 ml akuades (diperoleh konsentrasi 1 mg/ml). Larutan stok BSA dilarutkan secara peralutan serial sehingga diperoleh konsentrasi antara 0,5-0,1 mg/ml. setiap 0,1 ml dari setiap konsentrasi larutan ditambahkan dengan 5 ml reagen Bradford dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit dalam kondisi gelap, lalu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm (Afiati *et al.*, 2018).

### **3.2.8.2 Pengujian Kandungan Protein**

Pengukuran kandungan protein sampel dilakukan dengan cara mereaksikan 0,1 ml larutan sampel enzim dengan 5 ml larutan Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit dalam kondisi gelap. Larutan diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm (Bradford, 1976).

### **3.2.9 Uji Titik Isoelektrik**

Pengujian titik isoelektrik dilakukan dengan menambahkan 1 ml lipase ke dalam 6 tabung reaksi. Tiap tabung ditambahkan 1 ml buffer asetat dengan variasi pH 3,4,5,6,7, dan 8. Setiap sampel kemudian dihomogenkan dan dicatat tingkat kekeruhannya setiap 10, 20, dan 30 menit. Reaksi dilakukan di dalam *water bath* pada suhu 25°C (Barbosa *et al.*, 2012).

### **3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data**

Analisis data menggunakan teknik analisis kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif maupun kualitatif diinventarisasi dan diolah dan dianalisis secara sistematis. Data kuantitatif dianalisis dengan menggunakan perbandingan dengan pendekatan deskriptif. Data kualitatif dianalisis dengan pendekatan teoritis.



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 *Pretreatment* Biji *Moringa Oleifera* Menggunakan Beberapa Agen

Penelitian ini diawali dengan pemberian perlakuan awal (*pretreatment*) pada biji *M. oleifera* dengan variasi berbeda. Hasil masing-masing variasi *pretreatment* ditunjukkan dengan analisis kandungan total fenol. Hasil analisis kandungan total fenol dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil Analisis Total Fenol (mg GAE/g).

Perlakuan Awal	Total Fenol (mg GAE/g)
K(-)	10,08 ± 0,007
NaOH	4,84 ± 0,002
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,87 ± 0,002
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7,84 ± 0,004
LMS	7,67 ± 0,001
Lakase	3,17 ± 0,001

Keterangan: K (-): kontrol tanpa *pretreatment*

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa kandungan total fenol mengalami penurunan setelah diberi variasi perlakuan awal. Kandungan total fenol tertinggi terdapat pada biji *M. oleifera* yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan LMS masing-masing sebesar 7,84 mg GAE/g dan 7,67 mg GAE/g. Sedangkan kandungan total fenol terendah terdapat pada biji *M. oleifera* yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan lakase masing-masing sebesar 3,87 mg GAE/g dan 3,17 mg GAE/g. Variasi *pretreatment* pada penelitian ini menginterpretasikan laju delignifikasi yang tinggi dikarenakan terjadi penurunan jumlah total fenol pada biji *M. oleifera*. Hal ini dikarenakan senyawa lignin merupakan senyawa fenolik. Pernyataan tersebut sesuai dengan (Modenbach dan Nokes, 2013; Sitarz *et al.*, 2016), bahwa senyawa fenolik yang berkurang merupakan hasil dari proses delignifikasi. Hal menarik terjadi pada

*pretreatment* menggunakan LMS yang menunjukkan kadar total fenol yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan *pretreatment* Lakase. Penggunaan mediator, dalam penelitian ini adalah ABTS, menyebabkan aksesibilitas lakase terhadap substrat menjadi lebih besar menyebabkan LMS mampu mengoksidasi tidak hanya senyawa fenolik namun juga beberapa lipid dengan gugus aromatik seperti asam oleat dan asam linoleat sesuai dengan pernyataan (Molina *et al.*, 2008), uniknya kemampuan ini tidak terjadi pada oksidasi lakase tanpa adanya mediator.

Visualisasi *pretreatment* biji *M. oleifera* oleh beberapa agen dapat diamati pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Visualisasi hasil *pretreatment* biji *M. oleifera*  
Keterangan : A. K (-) Tanpa *pretreatment*, B. NaOH, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, D. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, E. LMS, F. Lakase

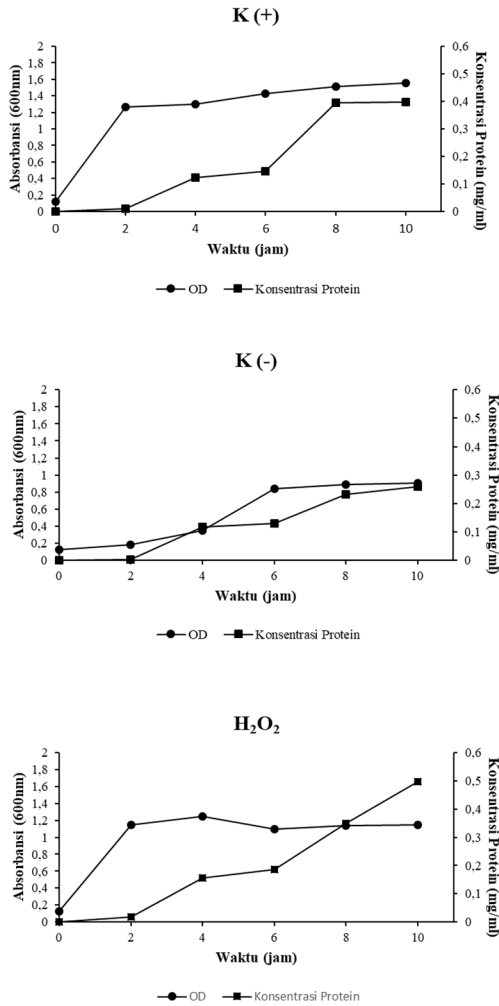
Berdasarkan Gambar 4.1, tampak bahwa *pretreatment* menggunakan oksidasi lakase menghasilkan warna yang lebih gelap dibandingkan kelompok *pretreatment* yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa kerja lakase pada biji *M. oleifera* memiliki target molekul fenolik aromatik yang menghasilkan radikal.

Hidroksi radikal pada fenolik akan menghasilkan pigmentasi warna yang lebih tua, karena delokalisasi elektron pada cincin aromatik (Paulson dan Parkas, 2012). Sebaliknya, *pretreatment* dengan metode hidrolisis baik asam maupun basa menghasilkan karakter warna yang lebih cerah dan massa yang relatif lebih ringan. Hal ini disebabkan karena pemutusan ikatan eter gliseril- $\beta$ -aril ( $\beta$ -O-4) dan ikatan eter diaril (4-O-5) pada struktur lignin (Mukherjee *et al.*, 2016; Rossiger *et al.*, 2018)

#### **4.2 Produksi Lipase Menggunakan Variasi *Pretreatment* Biji *M. oleifera***

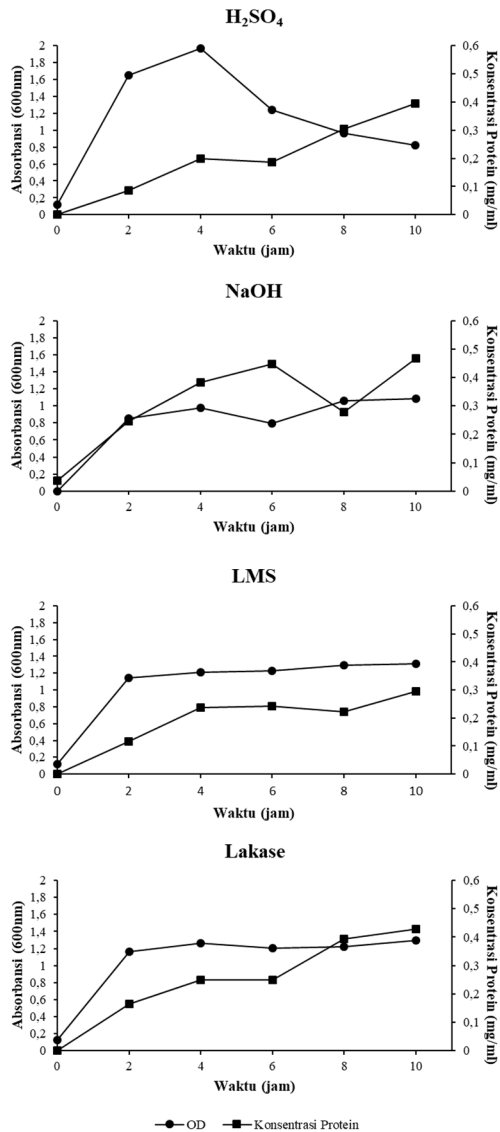
Profil pertumbuhan bakteri *Bacillus* sp. SK II-5 dan kandungan protein yang dihasilkan pada setiap waktu pengamatan tercantum dalam Gambar 4.2 dan 4.3.

Pada Gambar 4.3, tampak bahwa *pretreatment* menggunakan asam dan alkalin menghasilkan profil pertumbuhan yang selaras dengan produksi protein total. Peningkatan konsentrasi protein pada fase logaritmik hingga awal fase stasioner menunjukkan adanya penggunaan sumber karbon selain lipid yang terkandung dalam substrat. Hal ini berbanding terbalik dengan profil yang dihasilkan pada K(+) yang menunjukkan peningkatan pada fase stasioner. Sesuai yang dinyatakan Bora dan Bora (2012) bahwa peningkatan produksi enzim dikarenakan lipid sebagai substrat sehingga terjadi pemecahan lipid menjadi asam lemak yang digunakan sebagai sumber karbon utama. Sebaliknya, profil pertumbuhan dan produksi protein pada kelompok percobaan menggunakan lakase dan LMS terjadi peningkatan pertambahan protein pada fase stasioner dari pertumbuhan. Dengan demikian, dapat diperkirakan bahwa protein pada kelompok percobaan lakase dan LMS adalah metabolit sekunder, salah satunya protein lipase.



Gambar 4.2 Profil Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 (OD 600nm) terhadap Kandungan Total Protein (mg/ml) pada K(+), K(-), dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



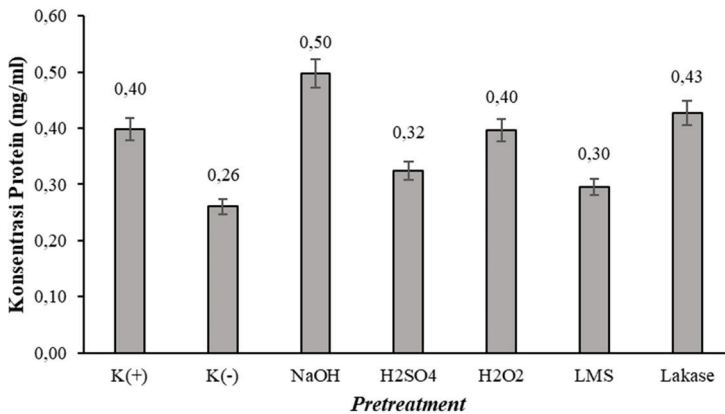


Gambar 4.3 Profil Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 (OD 600nm) terhadap Kandungan Total Protein (mg/ml) pada H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaOH, LMS, dan Lakase.

Berdasarkan studi dari (Jonsson dan Martin, 2015; Amin *et al.*, 2017; Kumar dan Sharma, 2017), menunjukkan bahwa hidrolisis asam dan alkalin akan menghasilkan prekursor serta beberapa gula pereduksi terlarut yang dominan untuk produksi metabolit primer, sebaliknya oksidasi yang dilakukan sistem enzimatik lakase hanya mengurangi jumlah total fenol yang merupakan agen antimikroba sehingga kandungan protein meningkat terjadi pada fase stasioner.

### 4.3 Karakterisasi Produksi Lipase Variasi *Pretreatment* Substrat Biji *M. oleifera*

Hasil pengukuran kadar protein setiap variasi substrat tercantum dalam Gambar 4.4.



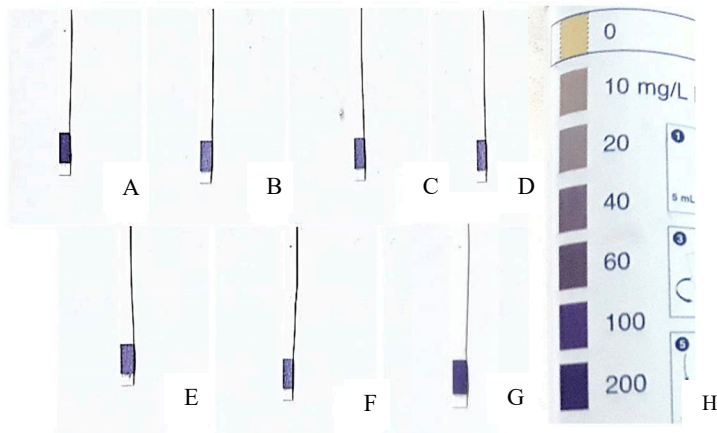
Gambar 4.4 Grafik hasil purifikasi lipase dengan berbagai macam *pretreatment* pada substrat.

Keterangan: K(+): Kontrol positif menggunakan minyak goreng. K(-): Kontrol negatif menggunakan biji *M. oleifera*.

Pada Gambar 4.4, dapat diamati bahwa konsentrasi total protein tertinggi diperoleh melalui agen *pretreatment* NaOH dengan konsentrasi 0,50 mg/ml kemudian diikuti oleh agen

*pretreatment* Lakase dan  $H_2O_2$  dengan konsentrasi sebesar 0,43 mg/ml dan 0,40 mg/ml.

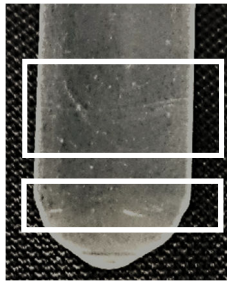
Apabila mengacu kepada Tabel 4.1., semakin rendah total fenol pada kelompok *pretreatment* seharusnya dapat meningkatkan produksi protein enzim karena tingkat penghambatan oleh antimikroba akibat fenol semakin rendah (Ouerghemmi *et al.*, 2016). Hal tersebut tidak teramati pada Gambar 4.4 yaitu nilai kandungan protein hasil produksi *pretreatment* alkalin tidak berbanding lurus dengan sisa total fenol. *Pretreatment* menggunakan senyawa alkalin dan asam kuat mampu merusak struktur lignin dan hemiselulosa sehingga meningkatkan aksesabilitas mikroba terhadap substrat. Oleh karena itu, protein yang terukur belum dapat dipastikan mengandung protein target dalam hal ini protein lipase.



Gambar 4.5 Pengukuran kualitatif aktivitas lipase pada *pretreatment* yang berbeda. (A) K (+), (B) K (-), (C) NaOH, (D)  $H_2O_2$ , (E)  $H_2SO_4$ , (F) LMS, (G) Lakase, (H) Marker konsentrasi formaldehid (ppm) *Quantofix*

Pada *pretreatment* lakase,  $H_2O_2$ , dan LMS, molekul target oksidasi adalah senyawa fenolik seperti lignin. Penurunan jumlah senyawa fenolik yang dapat bertindak sebagai antimikroba memicu peningkatan produksi protein target lipase pada saat fermentasi (Maddox *et al.*, 2010).

Konfirmasi adanya aktivitas yang tinggi dari lipase dapat diamati pada pengukuran kualitatif seperti pada Gambar 4.5. Pada Gambar 4.4 tampak bahwa oksidasi lakase memberikan warna strip *Quantofix* dengan intensitas yang paling tinggi pada rentang 100-200 ppm formaldehid. Hasil pengukuran kualitatif ini membuktikan konsentrasi protein yang lebih tinggi pada *pretreatment* NaOH tidak seluruhnya merupakan protein target yang diinginkan yaitu lipase karena warna yang terbentuk pada strip *Quantofix* tidak lebih gelap dari *pretreatment* lakase. Hal ini merupakan indikasi awal bahwa protein lipase memiliki nilai kinerja yang tinggi.



Gambar 4.6 Visualisasi Pengendapan Enzim Lipase pada pH 5 dalam *Buffer* Asetat

Konfirmasi karakter lipase dapat diketahui dari titik isoelektrik (pI). Secara umum asam amino dalam proein memiliki kisaran nilai isoelektrik yang berbeda. Berdasarkan hasil pengujian, lipase yang telah dipresipitasi mengendap pada pH 4, 5, dan 6. Endapan terbanyak dan tercepat terdapat pada pH 5 yang ditunjukkan Gambar 4.6. Hal ini dikarenakan jumlah muatan positif dan negatif protein sama, sehingga terjadi pengendapan

protein pada pH tersebut. Titik isoelektrik lipase yang diproduksi oleh genus *Bacillus* dilaporkan terjadi pada pH 4,66; 5,15; dan 6 (Imamura dan Kitaura, 2000; Castro-Ochora *et al.*, 2005).



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan dari penelitian ini adalah lakase merupakan agen *pretreatment* terbaik yang dapat menurunkan total fenol pada limbah biji *M. oleifera* sebesar 70% menjadi 3,87 mg GAE/g. Hasil tersebut diikuti dengan konsentrasi total protein lipase sebesar 0,43 mg/ml. Tingginya konsentrasi total protein dikonfirmasi secara kualitatif dengan adanya aktivitas lipase pada rentang 100-200 ppm formaldehid.

#### **5.2 Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diajukan saran, yaitu dilakukan uji aktivitas lipase secara kuantitatif menggunakan para-nitrofenil palmitat (pNPP) dan dilakukan pengukuran berat molekul protein menggunakan SDS-PAGE





## DAFTAR PUSTAKA

- Addai, A. dan Jasse, A. 2013. **Moringa Products: Opportunities and Challenges for Mozambique**. Mozambique: Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH
- Afiati, F., Setiyoningrum, F., Priadi, G. 2018. Karakterisasi Curd Kefir Susu Sapi dengan Penambahan Umbi Bit (*Beta vulgaris*). **Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon**. 4(2): 270-273.
- Akhtar, N., Sharma, A., Deka, D., Jawed, M., Goyal, D., Goyal, A. 2012. Characterization of Cellulase Producing *Bacillus* sp. for Effective Degradation of Leaf Litter Biomass. **Environmental Progress & Sustainable Energy**. : 1-7.
- Amin, F.R., Khalid, H., Zhang, H., Rahman, S.U., Zhang, R., Liu, G., dan Chen, C. 2017. Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion. **AMB Expr** 7 (2017):1-12.
- Amjad, M. S., Qureshi, H., Arshad, M., Chaudhari, S. K., dan Masood, M. 2015. The incredible queen of green: Nutritive value and therapeutic potential of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Coastal Life Medicine**. 3(9): 744-751.
- Arantes. V., dan Goodell B. 2014. Current understanding of brown-rotfungal degradation mechanisms: a review. **In Biodeterioration and Protection of Sustainable Biomaterials**. ACS Symposium Series Oxford University Press: 147-158.
- Azizi, A., Abouseoud, M., dan Amrane, A. 2017. Phenol Removal by a Sequential Combined Fenton-Enzymatic Process. **Nature Environment and Pollution Technology**. 16(1): 321-330.
- Baadhe, R.R., Potumarthi, R., dan Mekala, N.K. 2014. Influence of dilute acid and alkali pretreatment on reducing sugar production from corncobs by crude enzymatic method: A comparative study. **Bioresource Technology**. 162(2014): 213-217.

Babuponnusami, A. dan Muthukumar, K. 2014. A Review on Fenton and Improvements to the Fenton Process for Wastewater Treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 2(1): 557-572.

Barbosa, J.M.P., Souza, R.L., de Melo, C.M., Fricks, A.T., Soares, C.M.F., dan Lima, A.S. 2012. Biochemical characterisation of lipase from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. **Quim. Nova**. 35 (6) 1173-1178

Baiocco, P., Barreca, A. N., Fabbrini, M., Galli, C. and Gentili, P. 2003. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase–mediator systems. **Org. Biomol. Chem**. 1: 191–197.

Blainski, A., Lopes, G. C., and de Mello, J. C. P. 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**. 18 (2013): 6852-6865.

Bora, L. dan Bora, M., 2012. Optimization of Extracellular Thermophilic Highly Alkaline Lipase From Thermophilic *Bacillus* Sp Isolated From Hotspring Of Arunachal Pradesh, India. *Brazilian Journal of Microbiology*. **Brazilian Journal of Microbiology**. (2012): 30-42.

Boskou, D. 2011. Olive oil. In **Vegetable oils in Food Technology**; Wiley-Blackwell: Hoboken, New Jersey, USA.

Brezinsky, K., Pecullan, M., dan Glassman, I. 1998. Pyrolysis and Oxidation of Phenol. **J. Phys. Chem. A**. 102: 8614-8619.

Bugg, T. D. H., Ahmad, M., Hardiman, E. M., Rahmanpour, R. 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. **Nat Prod Rep**. 28:1883-1896.

Cai, Y., Sun, M., dan Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. **J. Agric. Food. Chem.** 51 (8): 2288 – 2294.

Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Toth, I. V., Rangel, A. O. S. S., dan Hogg, T. A. 2009. **International Journal of Food Microbiology.** 135: 144-151.

Castro-Ochoa, Lelie D., Citlali, Rodriguez-Gomez, Valerio-Alfaro, G., dan Ros, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology.** 37 (2005): 648-654.

Chowdary, G. V., Ramesh, M. N., dan Prapulla, S. G. 2001. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: multivariate analysis. **Process Biochem** 36: 331–339.

Christopher, L. P., Yao, B., dan Ji, Y. 2014. Lignin Biodegradable with Laccase-Mediator Systems. **Frontiers in Energy Research.** 2(12): 1-13.

Palafox, J.O., Navarette, A., Sacramento-Rivero, J.C., Rubio-Atoche, C., Escoffie, P.A., dan Rocha-Uribe, J.A. 2012. Extraction and Characterization of Oil from *Moringa oleifera* Using Supercritical CO<sub>2</sub> and Traditional Solvents. **American Journal of Analytical Chemistry.** 3(2012) 946-949.

Hidayah, K.N., Koentjoro, M.P., Hurhayati, A.P.D., dan Prasetyo, E.N. 2016. Visceral Organ Waste as A Substrate for Lipase Production by *Bacillus* sp. SKII-5. **International Conference on Mathematics, Science, and Education.**

Rencoret, J., Pereira, A., del Rio, J.C., Martinez, A.T., dan Gutierrez, A. 2017. Delignification and Saccharification

Enhancement of Sugarcane Byproducts by a Laccase-Based Pretreatment. **ACS Sustainable Chem. Eng.** 5(8):7145-7154

Cragg, S. M., Beckham, G. T., Bruce, N. C., Bugg, T. D. H., Distel, D. L., Dupree, P., Etxabe, A. G., Goodell, B. S., Jellison, J., McGeehan, J. E., McQueen-Mason, S. J., Schnorr, K., Walton, P. H., Watts, J. E. M., dan Zimmer, M. 2015. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. **Current Opinion in Chemical Biology.** 29: 108-119.

Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martinez-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Lopez Rivas, C., Requena, T., Rodriguez, J. M. dan Bartolome, B. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology.** 16: 372-382.

d'Acunzo, F., Baiocco, P., dan Galli, C. 2003. A study of the oxidation of ethers with the enzyme laccase under mediation by two N-OH-type compounds. **New J. Chem.** 27: 329-332.

Ertugrul, S., Donmez, G., dan Takac, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials* 149 (2007) 720-724

Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G., Gil, G., dan Petti, J. L. 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. **Applied and Environmental Microbiology.** 66(3): 925-929.

Dietrich, H. dan Pour-Nikfardjam, M. S. 2009. Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. Dalam Konig, H., Unden, F., dan Frohlich, J. **Biology of microorganisms on grapes, in must and wine.** Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 307-347.

Duta, S. dan Ray, L. 2009. Production, partial purification and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 159: 142-154.

Dutra, J. C. V., Terzi, S. C., Bevilaqua, J. V., Damaso, M. C. T., Couri, S., Langone, M. A. P., Senna, L. F. 2008. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 147: 63–75.

Enache, T. A., dan Oliveira-Brett, A. A. 2011. Phenol and *para*-substitued phenols electrochemical oxidation pathways. **Journal of Electroanalytical Chemistry.** 655: 9-16.

Ernst, W. R. 1963. The genera of Capparaceae and Moringaceae in the southeastern United States. **Journal of the Arnold Arboretum.** 44: 81–95.

Fahey, J. W. 2005. *Moringa oleifera*: A review of the medicinal evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees Life J.** 1 (5).

Fernandes, M. C., Torrado, I., Carvalheiro, F., Dores, V., Guerra, V., Lourenço, P. M. L., Duarte, L. C. Bioethanol Production from Extracted Olive Pomace: Dilute Acid Hydrolysis. **Bioethanol.** 2(2016): 103-111.

Ghaly, A. E., Dave, D., Brooks, M. S., dan Budge, S., 2010. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. **Am. J. Biochem Biotechnol.** 6: 54-76.

Godfrey, T. and S. West. 1996. **Industrial Enzymology 2<sup>nd</sup> edition.** New York: West Macmillan Publishers Inc.

Gonçalves, I., Silva, C., dan Cavaco-Paulo, A. 2014. Ultrasound enhanced laccase applications. **Green Chemistry.**

Gopalan, S. dan Savage, P. E. 1994. Reaction Mechanism for Phenol Oxidation in Supercritical Water. **J. Phys. Chem.** 98: 12646-12652.

Griebeler, N., Polloni, A.E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., Cechet, J. L., Luccio, M. D., de Oliveira, D., Treichel, H., Cansian, R. L., Rigo, E., dan Ninow, J. L. 2009. Isolation and screening of lipase producing fungi with hydrolytic activity. **Food and Bioprocess Technology** 4: 578-586.

Guerrand, David. 2017. Lipases industrial applications: focus on food and agroindustries. **OCL**. 24(4)

Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Kubicek, C. P., Saddler, J. dan Xu, F. 2014. **Bioenergy Research: Advances and Applications**. London: Elsevier.

Gusakov, A. V., Kondratyeva, E. G., dan Sinitsyn, A. P. Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. **International Journal of Analytical Chemistry**. 2011: 1-4.

Handayani, P. A. dan Juniarti, E. R. 2012. Ekstraksi Minyak Ketumbar (*Coriander Oil*) dengan Pelarut Etanol dan n-Heksana. **Jurnal Bahan Alam Terbarukan**. 1(1): 1-7.

Harmesen, P.F., Huijgen, W.J., López, L.M., dan Bakker, R.R. 2010. **Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass**.

He, P., Greenway, G., dan Haswell, S. J. 2010. Development of a monolith based immobilized lipase micro-reactor for biocatalytic reaction in a biphasic mobile system. **Process Biochem.** 45: 593-597.

Imamura, S. dan Kitaura, S. 2000. Purification and Characterization of a Monoacylglycerol Lipase from the

Moderately Thermophilic *Bacillus* sp. H-257. **J. Biochem.** 127 (2000): 419-425.

Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. dan Reetz, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, threedimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.** 53: 315-351.

Jamie, A., Alshami, A. S., Maliabari, Z. O., dan Ateih, M. A. 2017. Development and Validation of a Kinetic Model for Enzymatic Hydrolysis Using *Candida rugosa* Lipase. **J. Bioprocess Biotech.** 7 (1).

Jonsson, L.J. dan Martin, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology.** 199 (2016): 103–112.

Joseph, B., Ramteke, P. W., dan Thomas, G. 2008. Cold active microbial lipase: Some hot issues and recent developments. **Biotechnol. Adv.** 26:457-470.

Karigar, C.S. dan Rao, S.S. 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. **Enzyme Research.** 2011:11.

Kirk-Otmer, R. E. 2005. **Encyclopedia of Chemical Technology Fifth Edition.** New York: John Wiley & Sons Inc.

Kristina, N. N. dan Syahid, S. F. 2014. Pemanfaatan Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Meningkatkan Produksi Air Susu Ibu. **Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri.** 20(3): 26-29.

Kumar, A.K. dan Sharma, S. 2017. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresour. Bioprocess.** 4(2017):1-19.

Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., dan Singh, D. 2012. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: Production, Purification and Some Properties. **World Applied Sciences Journal** 16 (7): 940-948.

Lalas, S. dan Tsaknis, J. 2002. Characterization of Moringa oleifera Seed Oil Variety “Periyakulam 1”. **Journal of Food Composition and Analysis**. 15(1):65-77.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aistril, J. dan Bertoli, S. 2016. *Moringa oleifera* Seeds and Oil: Characteristics and Uses for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences** 17 (2141): 1-14.

Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., dan Bertoli, S. 2015. Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview. **Int. J. Mol. Sci.** 16: 12791-12835.

Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N., dan Toscano, M. 2004. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. **J. Phys. Chem. A**. 108: 4916-4922.

Liese A., Seelbach K., dan Wandrey C. 2001 **Industrial biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH.

Lin, S. Y. dan Lin, I. S. 2002. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth edition**. Weinheim: Wiley-VCH.

Linko, Y. Y., Lamsa, M., Huhtala, A., dan Linko, P., 1994. Lipase catalyzed transesterification of rapeseed oil and 2-ethyl-1-hexanol. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 71: 1411-1414.

Logan, N. A. dan Vos, P. D. 2015. **Bacillus. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 1–163.: John Willey & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.



Maddox, C.E., Laur, L.M., dan Tian, L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. **Curr Microbiol.** 60(2010):53.

Mahmood, N., Yuan, Z., Schmidt, J., dan Xu, C. 2016. Depolymerization of Lignins and their Applications for the Preparation of Polyols and Rigid Polyurethane Foams: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** 60(2016): 317–329.

Marjoni, M. R., Afrinaldi, dan Novita, A. D. 2015. Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.). **Jurnal Kedokteran Yarsi.** 23(3): 187-196.

Martínez-Patiño, J.C., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., López-Linares, J.C., dan Castro, E. 2017. Combined acid/alkaline-peroxide pretreatment of olive tree biomass for bioethanol production. **Bioresource Technology.** 239(2017): 326-335.

Meher, L.C., Vidya S..D. and Naik, S.N. 2004. Technical Aspect of Biodiesel Production by Transesterification. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.**10: 248-268.

Michalska, K., Bizukojc, M., dan Ledakowicz, S. 2015. Pretreatment of Energy Crops with Sodium Hydroxide and Cellulolytic Enzymes to Increase Biogas Production. **Biomass and Bioenergy.** 80(2015): 213-221.

Miled, H. B., Saada, M., Jallali, I., Barka, Z. B., Tlili, M., Alimi, H., Sakly, M., Rhouma, K. B., Abderrabba, M., Abdelmelek, H., Tebourbi, dan Ksouri R. 2017. Variability Of Antioxidant And Biological Activities Of *Rhus Tripartitum* Related To Phenolic Compounds. **EXCLI Journal.** 16:439-447.

Mittelbach, M., 1990. Lipase catalyzed alcoholysis of sunflower oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 67: 168-170.

Modenbach, A.A dan Nokes, S.E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings-a review. **Biomass Bioenerg.** 56(2013): 526–44.

Molina, S., Rencoret, J., del Río, J.C., Lomascolo, A., Record, E., Martínez, A.T., Gutiérrez, A. 2008. Oxidative degradation of model lipids representative for main paper pulp lipophilic extractives by the laccase–mediator system. **Appl Microbiol Biotechnol.** 80:211-222.

Morton, J. F. 1991. The horse radish tree, *Moringa pterygosperma*. A boon to arid Island? **Econ. Bot.** 45: 318-333.

Mukesh, D., Banerji, A. A., dan Bevinakatti, H. S., 1994. A note on transesterifications of vegetable oils catalysed by lipase in a packed tubular reactor. **Indian Chem. Eng., Sect. A** 36: 193-196.

Mukherjee, A., Mandal, T., Ganguly, A., dan Chatterjee, P.K. 2016. Lignin Degradation in the Production of Bioethanol-A Review. **ChemBioEng Rev.** 3(2): 86–96

Nouman, W., Basra, S. M. A., Siddiqui, M. T., Yasmeen, A., Gull, T., dan Alcaide, M. A. C. 2014. Potential of *Moringa oleifera* L. as livestock fodder crop: A review. **Turk. J. Agric. For.** 38: 1–14.

Ogunsina, B. S., Indira, T. N., Bhatnagar, A. S. Radha, C., Debnath, S., dan Krishna, A. G. G. 2014. Quality characteristics and stability of *Moringa oleifera* seed oil of Indian origin. **J. Food Sci. Technol.** 51: 503–510.

Orak, H. H. 2007. Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities of Selected Red Grape Cultivars and their Correlations. **Scientia Horticulturae.** 111(2007): 235-241.

Ouerghemmi, I., Bettaieb R.I., Rahali, F.Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B., Saidani, T. M. 2017. Antioxidant and

antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. **J Food Drug Anal.** 25(2): 350-359.

Palada, M. C. 1996. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): A versatile tree crop with horticultural potential in the subtropical United States. **HortScience**, 31: 794–797.

Paulsson, M. dan Parkas, J. 2012. Review: light-induced yellowing of lignocellulosic pulps – mechanisms and preventive methods. **BioResources.** 7(4): 5995-6040.

Pineda dan Lee. 2016. Heterogeneously catalyzed lignin depolymerization. **Appl Petrochem Res.** 6(2016): 243-256.

Piontek K, Antorini M, Choinowski T. 2002. Crystal Structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The Journal of Biological Chemistry.** 277(40): 37663–37669.

Pollegioni, L., Tonin, F., Rosini, E. 2015 Lignin-degrading enzymes. **FEBS J.** 282:1190-1213

Ramachandran, C., Peter, K. V., Gopalakrishnan, P. K. 1980. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Econ. Bot.** 34: 276–283.

Rodríguez-Delgado, M., Ornelas-Soto, N., Martínez-Lorán, E., Hernandez-Luna, C., García-García, A., dan Contreras-Torres, F.F. 2017. Enhanced Enzymatic Activity of Laccase (from *Pycnoporus sanguineus* CS43) Immobilized on Sputtered Nanostructured Gold Thin Films. **J. Nanosci. Nanotechnol.** 17(2):939-946

Rossiger B., Unkelbach G., Pufky-Heinrich D. Base-Catalyzed Depolymerization of Lignin: History, Challenges and Perspectives. Dalam: Poletto M. 2018. **Lignin-Trends and Applications.** London: InTechOpen.

Sangeetha, R., Arulpadi, I., dan Geetha, A. 2011. Bacterial Lipase as Potential Industrial Biocatalysts: An Overview. **Res. J. Microbiol.** 6 (1): 1-24.

Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., dan Gupta, A. 2013. Phytochemistry of Medicinal Plants. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.** 1 (6): 168 – 182.

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., dan Davidson, W. S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods.** 52: 1-8.

Schmiedl, D., Endisch, S., Pindel, E., Rückert, D., Reinhardt, S., Unkelbach, G., Schweppe, R. 2012. Base catalyzed degradation of lignin for the generation of oxy-aromatic compounds—Possibilities and challenges. **Erdöl Erdgas Kohle.** 128(10): 357-363.

Sengupta, A., dan Gupta, M. P. 1970. Studies on the seed fat composition of moringaceae family. **Fette Seifen Anstrichm.**, 72: 6–10.

Sharma, D., Kumbhar, B. K., Verma, A. K., Tewari, L. 2014. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. **Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** 3: 205-211

Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., dan Czermak, P. 2015. Rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology.** 112: 252-255

Sharma, R., Christi, Y., dan Banerjee, U.C. 2001. Production, purification, characterization, and application of lipase. **Biochnology Advances** 19: 627-662.

Singh, B. N., Singh, B. R., Singh, R. L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., dan Singh, H. B. 2009. Oxidative DNA damage

protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. **Food and Chemical Toxicology**. 47: 1109-1116.

Singh, Y. dan Prasad, K. 2013. *Moringa Oleifera* Leaf as Functional Food Powder: Characterization and Uses. **International Journal of Agrivulture and food Science Technology**. 4(4):317-324.

Sitarz, A.K., Mikkelsen, J.D. dan Meyer, A. S. 2016. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. 36(1): 70-86.

Sonia, N. M. O. dan Kusnadi, J. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Parsial Enzim Selulase dari Isolat Bakteri OS-16 Asal Padang Pasir Tengger-Bromo. **Jurnal Pangan dan Agroindustri**. 3(4): 11-19.

Soobratte, M. A., Neergheen, V. S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O. I., dan Bahorun, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**. 579: 200-213.

Srivastava, A. dan Sinha, S. 2014. Thermostability of In Vitro Evolved *Bacillus subtilis* Lipase A: A Network and Dynamics Perspective. **PloS ONE**. 9 (8).

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Luccio, M. D., dan Oliveira, J. V. 2009. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol** 3: 182-196.

Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Dourtoglou, V., dan Spiliotis, V. 1999. Characterization of *Moringa oleifera* variety mbololo seed oil of Kenya. **J. Agric. Food Chem**. 47: 4495–4499.

Tsaknis, J., Lalas, S., Gergis, V., Spiliotis, V. A 1998. total characterisation of *Moringa oleifera* malawi seed oil. **Riv. Ital. Delle Sostanze Grasse**. 75: 21–28.

Van Pouderoyen, G., Eggert, T., Jaeger, K.-E. dan Djikdtra, W. 2001. The Crystal Structure of Bacillus subtilis Lipase: A Minimal  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold Enzyme. **J. Mol. Biol.** 309: 215-226.

Wageningen University & Research centre - Food & Biobased Research (WUR-FBR, NL), Energy Research Centre of the Netherlands (ECN, NL), dan Abengoa Bioenergía Nuevas Tecnologías (ABNT, ES). < <https://www.semanticscholar.org/> > [10 Desember 2018].

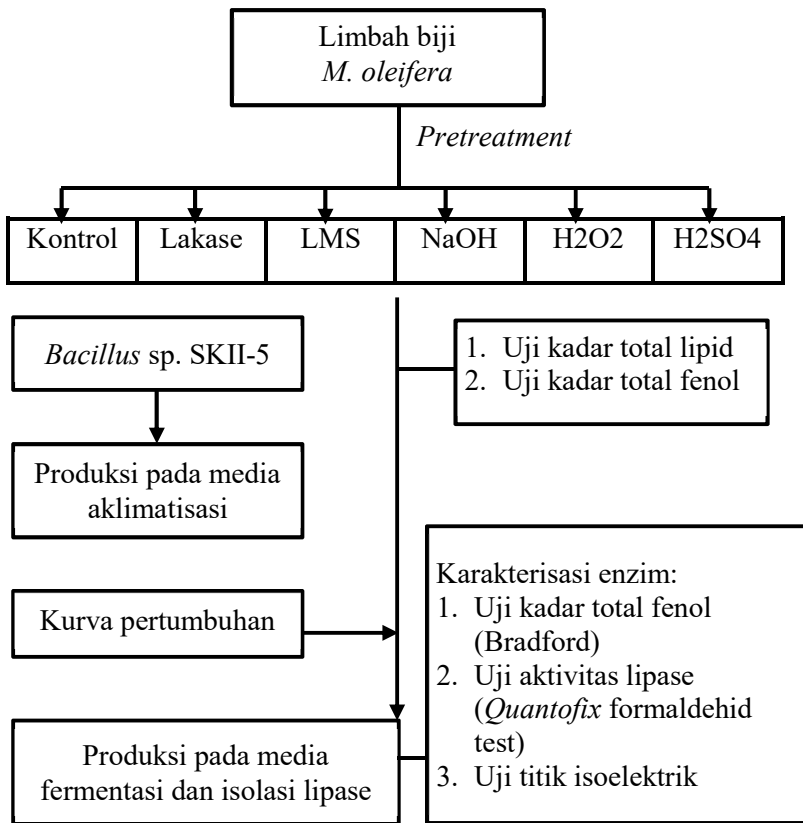
Walton, N. J., Mayer, M. J., dan Narbad, A. 2003. Molecules of interest: Vanillin. **Phytochemistry**. 63: 505-515

Wong, D. S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 157: 174-209

Zakzeski, J., Bruijninx, P. C. A., Jongerius, A. L. dan Weckhuysen, B. M. 2010. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. **Chemical Reviews**. 110(6): 3552-3599.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1: Skema Penelitian

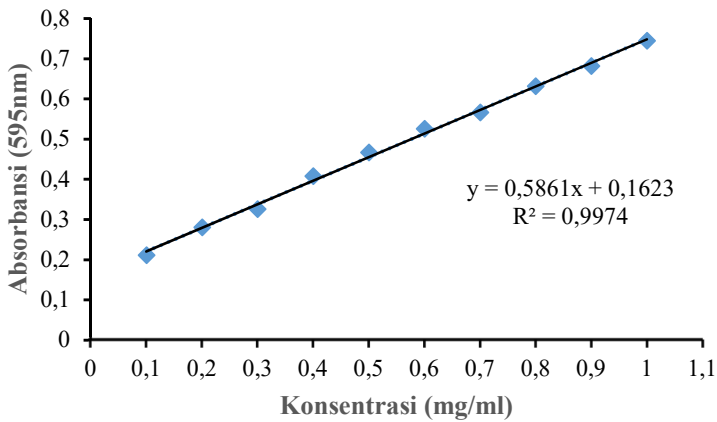


Gambar 1. Skema Penelitian

## Lampiran 2: Pengukuran Standar Asam Galat

Tabel 1. Absorbansi Asam Galat

No	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbansi (750nm)
1	0	0
2	5	0,150
2	10	0,267
4	15	0,385
5	20	0,501
6	25	0,640



Gambar 2. Kurva Standar Asam Galat



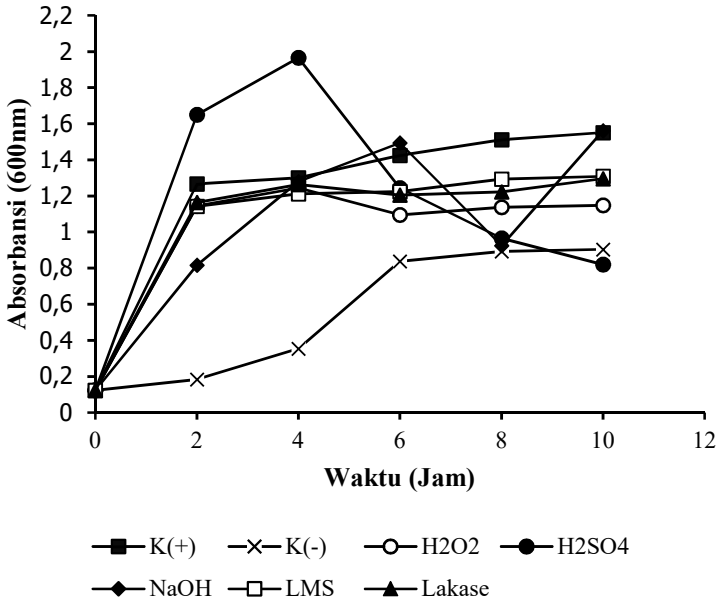
## Lampiran 3: Pengukuran Konsentrasi Total Fenol

Tabel 2. Konsentrasi Total Fenol pada Limbah Biji *M. oleifera* pada Berbagai *Pretreatment*

Ulangan Ke-	<i>Pretreatment</i>					
	K(-)	NaOH	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	LMS	Lakase
1	0,256	0,123	0,097	0,199	0,193	0,080
2	0,252	0,121	0,095	0,197	0,191	0,079
3	0,248	0,119	0,098	0,192	0,191	0,079
Rata rata	0,252	0,121	0,097	0,196	0,192	0,079
Total fenol (mg GAE/g)	10,08	4,84	3,87	7,84	7,67	3,17

Lampiran 4: Pengukuran Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5Tabel 3. Profil Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 pada Berbagai *Pretreatment* dalam *Time series* 10 jam

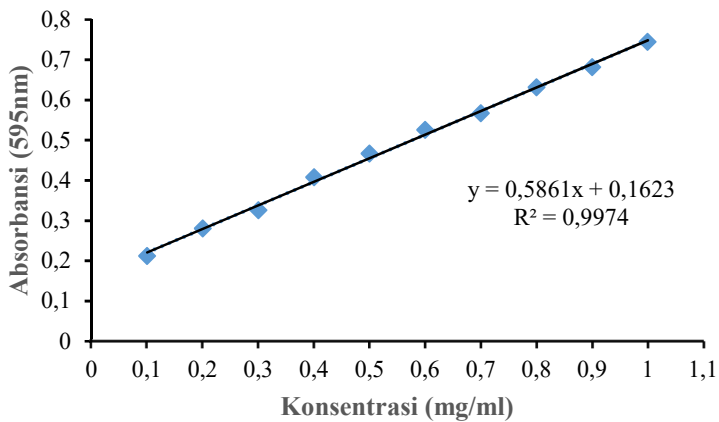
Jam ke-	Absorbansi (600nm)						
	K(+)	K(-)	NaOH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LMS	Lakase
0	0,123	0,123	0,123	0,123	0,123	0,123	0,123
2	1,267	0,183	1,145	1,65	0,817	1,143	1,164
4	1,300	0,354	1,245	1,965	1,279	1,212	1,264
6	1,425	0,838	1,095	1,244	1,493	1,225	1,205
8	1,511	0,892	1,138	0,966	0,925	1,293	1,222
10	1,551	0,904	1,148	0,82	1,561	1,309	1,296

Gambar 3. Profil Pertumbuhan *Bacillus* sp. SK II-5 pada Berbagai *Pretreatment* dalam *Time series* 10 jam

Lampiran 5: Pengukuran Standar *Bovine Serum Albumin* (BSA)

Tabel 4. Absorbansi BSA

Konsentrasi BSA (mg/ml)	Absorbansi ( $\lambda = 595\text{nm}$ )
0.1	0.212
0.2	0.281
0.3	0.326
0.4	0.408
0.5	0.467
0.6	0.526
0.7	0.567
0.8	0.632
0.9	0.682
1	0.745



Gambar 4. Kurva Standar BSA

## Lampiran 6: Pengukuran Konsentrasi Total Protein

Tabel 5. Pengukuran Konsentrasi Total Protein

Ulangan Ke-	Absorbansi (595nm) Jam ke-10						
	K(+)	K(-)	NaOH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	LMS	Lakase
1	0,119	0,074	0,142	0,118	0,094	0,086	0,126
2	0,115	0,076	0,146	0,117	0,095	0,089	0,126
3	0,116	0,079	0,149	0,113	0,096	0,085	0,124
Rata rata	0,117	0,076	0,146	0,116	0,095	0,087	0,125
ekival ensi	0,199	0,130	0,249	0,162	0,198	0,148	0,214
Total Protein (mg/ml)	0,40	0,26	0,50	0,40	0,32	0,30	0,43

## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Jakarta, 15 Juli 1997. Penulis telah menempuh pendidikan di TK Maryam Surabaya, SDN Kertajaya Surabaya, SMPN 6 Surabaya dan SMA Negeri 5 Surabaya. Penulis memiliki ketertarikan di bidang ilmu alam sejak memasuki SMP, sejak tahun pertama, sudah memulai langkah di dalam olimpiade biologi. Di tahun ke-2, penulis mampu menjadi wakil Kota Surabaya dalam Olimpiade Sains Nasional tingkat Provinsi di bidang Biologi. Langkah penulis di bidang olimpiade berujung pada capaian tertinggi yaitu memperoleh medali perunggu pada National Science Olympiad tingkat SMP RSBI. Langkah penulis di bidang olimpiade terus berlanjut hingga SMA namun prestasi yang diraih tidak maksimal karena berada dalam program akselerasi.

Setelah lulus pendidikan SMA, penulis melanjutkan pendidikan S1 di Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya di Departemen Biologi Fakultas Ilmu Alam Tahun 2014. Perjuangan dalam hal olimpiade sains berlanjut seiring dengan 2 kali menjadi wakil ITS di ONMIPA PT. Selama menempuh pendidikan S1, penulis turut aktif dalam kepanitiaan *Biological Opus Fair* HIMABITS, Tim pembuat soal Olimpiade *Biological Opus Fair* dan *Organizing Comitee* LKMM TD HIMABITS, penulis juga aktif dalam Himpunan Mahasiswa Biologi ITS sebagai Staff Ahli Departemen Dalam Negri 2015/2016. Selain organisasi dan kepanitiaan, penulis juga aktif dalam kegiatan Internasional *Sustainable Island Development Initiatives*

