ISOLASI BAKTERI PENGHASIL LIPASE DENGAN KEMAMPUAN ESTERASE UNTUK PRODUKSI METIL ESTER

ISOLATION OF LIPASE BACTERIA WITH ESTERASE ABILITY FOR METHYL ESTHER PRODUCTION

Arba Susanty[)], Fitriani[1)]dan Krishna Purnawan Candra[2)]
[1)]Balai Riset dan Standardisasi Industri SamarindaJl. Banggeris No.1, Samarinda, [2)]Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Mulawarman, Jl.TanahGrogot, Kampus Unmul Gunung Kelua, Samarinda 75119,
[1)]arba@kemenperin.go.id, [2)]candra@faperta.unmul.ac.id

Naskah diterima, 10 Oktober 2013, disetujui 2 Desember 2013

ABSTRAK

Lipase (triasilglieserol hidrolase, EC 3.1.1.3) adalah enzim yang dapat menghidrolisis mono-, di- dan triasilgliserol menjadi asam lemak bebas dan gliserol, sebaliknya enzim ini juga mempunyai aktivitas esterase yaitu dapat membentuk ester antara asam lemak bebas dengan alkohol. Mikroorganisme penghasil lipase (lipolitik) tersebar secara merata mulai dari kapang, khamir, dan bakteri. Empat isolat bakteri lipolitik (SG_T, SG_Z, DS_T, dan DS_Z) yang mempunyai kemampuan esterase untuk asam lemak dari minyak zaitun dan metanol telah berhasil diisolasi dari pangan khas Indonesia yang mengandung minyak cukup tinggi (singkong goreng, dodol salak) dengan menggunakan media isolasi tributirin agar yang mengandung tributirin atau minyak zaitun. Isolat singkong goreng mempunyai kecenderungan hidup pada lingkungan pH asam, sedangkan isolat dodol salak memiliki kecenderungan hidup pada pH basa. Semua isolat menunjukkan bahwa produksi optimum lipase (0,45 0,73 U/mL) dicapai pada waktu inkubasi kisaran 32 jam (suhu ruang). Isolat singkong goreng menunjukkan aktivitas esterase paling tinggi, yaitu dapat menghasilkan metil ester yang terbesar yaitu 15,303%. Isolat tersebut merupakan bakteri lipolitik yang potensial sebagai produsen lipase untuk keperluan produksi fatty acid methyl esther (FAME) / biodiesel secara enzimatis.

Kata kunci : lipase, isolasi, fatty acid methyl ester

ABSTRACT

Lipase (triasilglieserol hidrolase, EC 3.1.1.3) is an enzyme that can hydrolyze mono-and di and tri acylglycerols (TAG) into free fatty acids, glycerol. Lipase has esterase activity that can form between free fatty acid esters with alcohols. Microorganisms that produced lipase spread from molds, yeasts, and bacteria. Four isolates of bacterial lipolytic (SG_T , SG_Z , DS_T , and DS_Z) that has the ability esterase for fatty acids from olive oil and methanol have been isolated from typical Indonesian food containing high oil (fried cassava , dodol salak). Media isolation which used are tributyrin agar tributyrin and tributyrin - olive oil. Fried cassava isolates have a tendency to live in an acidic pH environment , while isolates dodol salak (fruit snake) has a tendency to live at alkaline pH . All isolates showed that the optimum production of lipase (from 0.45 to 0.73 U m) was achieved in the range of 32 -hour incubation time (room temperature) . Fried cassava isolates showed the highest esterase activity, which produce the largest methyl ester is 15.303%. This isolates is a potential lipolytic bacterial as a lipase producer for production of fatty acid methyl ester (FAME) / enzymatic biodiesel

Keywords : *lipase, isolation, fatty acid methyl ester*

PENDAHULUAN

Lipase (triasilglieserol hidrolase, EC 3.1.1.3) adalah enzim yang sangat penting, karena peranannya yang sangat luas dalam bidang industri (Mahadik *et al.*, 2002). Lipase dapat mengkatalis reaksi-reaksi antara lain hidrolisa triasilgliserol (TAG), esterifikasi, transesterifikasi dan interesterifikasi lipida (Colla *et al*., 2010).

Lipase dapat ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme. Disamping dikenal sebagai enzim ekstrasellular, lipase juga dapat ditemukan dalam *Rhizopus oryzae* sebagai enzim intrasellular (Saleh *et al*., 1993).Lipase yang dapat digunakan dalam proses pembuatan *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) adalah lipase yang mempunyai aktivitas esterase, dapat melakukan esterifikasi dan juga transesterifikasi. Telah banyak mikroba yang menghasilkan lipase jenis ini, antara lain adalah *Pseudomonas fluorescens* dan *Pseudomonas cepacia* (Noureddini*et al*., 2005).

Selain sebagai katalisator yang dipergunakan dalam menghasilkan lipid terstruktur, lipase juga banyak digunakan dalam berbagai macam industri. Beberapa tahun terakhir ini telah banyak dikembangkan produksi lipase yang dikaitkan dengan penggunaannya sebagai bahan tambahan pangan (modifikasi aroma), bahan aditif deterjen (hidrolisis lemak), pengolahan air limbah (dekomposisi dan mengurangi senyawa-senyawa berminyak), industri kosmetik dan farmasi (Burkert *et al*., 2004). Lipase memiliki peranan yang penting pula dalam bioenergi khususnya dalam produksi biodiesel karena semakin meningkatnya kebutuhan dunia dalam penggunaan energi terbarukan (Colla *et al*., 2010). Dengan peranan lipase yang sangat besar ini, membuat kebutuhan dan permintaan akan lipase terus mengalami peningkatan.

Lipase dapat berasal dari tanaman, hewan dan mikroorganisme. Namun demikian lipase mikrobia paling banyak digunakan karena untuk produksinya memerlukan waktu yang singkat dan aktivitasnya dapat ditingkatkan dengan kondisi pertumbuhan yang tepat serta tidak memerlukan lahan produksi yang luas. Mikroorganisme seperti bakteri, jamur, yeast dan *actinomycetes* dikenal sebagai sumber lipase ekstraseluler, yang dapat memfasilitasi pemulihan enzim dari media tumbuhnya. Jenis mikrobia seperti *Candida, Pseudomonas, Mucor, Rhizopus* dan *Geotrichum* sp merupakan sumber lipase komersial yang telah banyak tersedia (Ertugrul *et al*., 2007).

Untuk memproduksi lipase, mikrobia penghasil lipase memerlukan kondisi tertentu untuk pertumbuhannya (Lima *et al*., 2003). Komposisi media tumbuh dan kondisi pertumbuhan jamur mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan. Media dengan nutrisi yang kaya sumber energi seperti trigliserida akan meningkatkan lipase yang dihasilkan, begitu pula suhu dan pH pertumbuhan (Mayordomo *et al.,* 2000).

Bakteri merupakan salah satu mikroorganisme yang mempunyai beberapa keuntungan untuk digunakan sebagai agen penghasil lipase terutama dari segi produksi dan *kemudahannya* dalam meningkatkan kemampuan produksinya melalui rekayasa genetika. Sumber bakteri dapat berasal dari jenis jenis pangan yang ada disekitar kita atau bahan-bahan pangan yang telah rusak.

Isolasi bakteri khas Indonesia diharapkan menemukan bioagen (bakteri) penghasil lipase dengan kemampuan esterase yang dapat menunjang konservasi energi yang pada saat ini sedang dikembangkan, yaitu melalui penyediaan lipase untuk produksi biodiesel secara biokimia. Tujuan penelitian ini adalah memperoleh isolat bakteri penghasil lipase yang memiliki kemampuan esterase untuk produksi *fatty acid methyl ester* (FAME).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Sumber mikroba adalah tanah, pangan berminyak (dodol salak dan singkong goreng), roti, dan minyak jelantah. Media tributirin agar (TA) dengan komposisi (pepton daging 2,5g, pepton kasein 2,5g, esktrak ragi 3 g, agar 12g dan tributirin 10 ml), tributirin netral dan Potato Dextrose Agar diperoleh dari Oxoid; NaCl, aceton, Cu-asetat, etanol, dan isooktan diperoleh dari Merck. Minyak zaitun yang digunakan adalah minyak zaitun komersial. *Crude Palm Oil* (CPO) diperoleh dari Pabrik Kelapa Sawit PTPN XIII di Kecamatan Longikis Kabupaten Penajam Paser Utara. Mikroburet digunakan untuk pengukuran kadar asam lemak bebas.

Prosedur Penelitian

Isolasi bakteri penghasil lipase (Sharma et al., 2001, dan Cardenas et al., 2001).

Sumber mikroba diencerkan 10^{-1}dengan cara melarutkan 10 gram contoh sumber isolat dalam 90 mL larutan fisiologis. Setelah divorteks dengan merata dan padatannya dibiarkan mengendap, 1 mL larutan sumber mikroba tersebut dilarutkan dalam 9 mL larutan fisiologis dan dihomogenkan, sehingga diperoleh larutan sumber mikroba dengan pengenceran 10^{-2}.

Isolasi bakteri penghasil lipase dilakukan dengan melakukan penanaman (*plating*) larutan sumber mikroba dari masing-masing sumber isolat (tanah, singkong goreng, dodol salak, roti, minyak jelantah) sebanyak 0,1 mL ke dalam media TA yang mengandung tributirin (TAT) dan TA yang mengandung minyak zaitun (TAZ). Kemudian diinkubasi pada temperatur $\pm 40^{o}$C selama 48 jam. Dipilih koloni bakteri yang menunjukkan zona bening *(halo)* terbesar untuk masing-masing sumber isolat, dan ditanam ulang pada media dan kondisi yang sejenis sampai diperoleh isolat bakteri yang stabil menunjukkan aktivitas lipasenya.

Karakterisasi lipase

Karakterisasi lipase masing-masing isolat dilakukan dengan menentukan profil aktivitas lipasenya pada kisaran pH 4-10 dan pada suhu 37□C. Dari kondisi ini ditentukan metode assay lipase untuk masing-masing isolat yang diperoleh, yaitu kondisi assay yang menunjukkan aktivitas optimum.Satu unit lipase didefinisikan sebagai jumlah produk (mol asam lemak) yang dibebaskan dalam waktu 1 menit. Asam lemak dideteksi dengan menggunakan metode volumetri menggunakan mikroburet (Lonon*et al*., 1998; Asahara*et al*., 1993)

Produksi lipase (Lonon et al., 1988, Asahara et al., 1993)

Kondisi produksi optimum untuk lipase dari isolat terpilih dilakukan dengan *metode batch* ditentukan dengan menentukan kondisi optimum untuk masing-masing kondisi produksi, meliputi suhu inkubasi, lama inkubasi, dan komposisi media produksi. Masing-masing kondisi produksi tersebut dikerjakan secara bertahap pada inkubator bergoyang 150 rpm. Tahap pertama adalah penentuan suhu produksi (40, 50, 60°C), dengan parameter lainnya (lama inkubasi dan media produksi tetap). Tahap kedua adalah penentuan lama inkubasi, dilakukan dengan menggunakan suhu optimum produksi dikombinasikan dengan lama produksi yang berbeda (8, 16, 32, dan 40 jam) menggunakan jenis media yang sejenis. Tahap ketiga adalah penentuan jenis media produksi, dilakukan dengan menggunakan suhu dan lama inkubasi optimum produksi dikombinasikan dengan penggunaan jenis media produksi yang berbeda yaitu triburitin agar Tributirin (TAT) dan tributirin agar minyak zaitun (TAZ).

Sintesis fatty acid metil ester (FAME) (Sukartin et al., 2007)

Sebanyak 30 gram (33,9 mmol) CPO dicampurkan dengan metanol dengan perbandingan molar antara CPO dan metanol adalah 1:6. Satu mLlarutan enzim (25.000 U/ml lipase dalam larutan buffer fosfat pH 7) dimasukkan ke dalam campuran CPO-metanol, dan diinkubasikan selama 4 jam pada suhu 50°C. Reaksi sintesis metil ester dihentikan dengan cara diinkubasikan pada suhu -4°C selama 5 menit dan dianalisis kandungan FAME-nya.

Analisis FAME

Satu mL campuran reaksi (CPO-metanol-enzim) diambil dan disentrifusi dengan mikrosentrifus dengan 150 rpm selama 5 menit. Fase atas (FAME) dari CPO-metanol-enzim diambil untuk analisis dengan gas khromatografi menggunakan kolom Innowax dan detektor FID. Sebanyak 100 µL fase atas tersebut ditambahkan 1 gram natrium sulfat anhidrat dan 1,0 mL heksan untuk menghilangkan air dari FAME. Campuran FAME-natrium sulfat anhidrat-heksandivorteks dan disentrifus sehingga terbentuk dua lapisan, dan diambil fase atasnya. Sebanyak 1µL fase atas tersebut diinjeksikan ke GC menggunakan metode split, dan standar FAME.

Kondisi uji FAME adalah suhu inlet 220°C, suhu detektor 275°C, sedangkan suhu kolom diatur secara gradien, yaitu 150°C selama 1,0 menit, suhu dinaikkan 15°C per menit ke 240°C, dinaikkan lagi 5°C per menit ke 260°C, kemudian suhu dipertahankan pada 260°C selama 8 menit. Untuk beberapa kasus digunakan juga suhu awal 150°C selama 0,5menit.

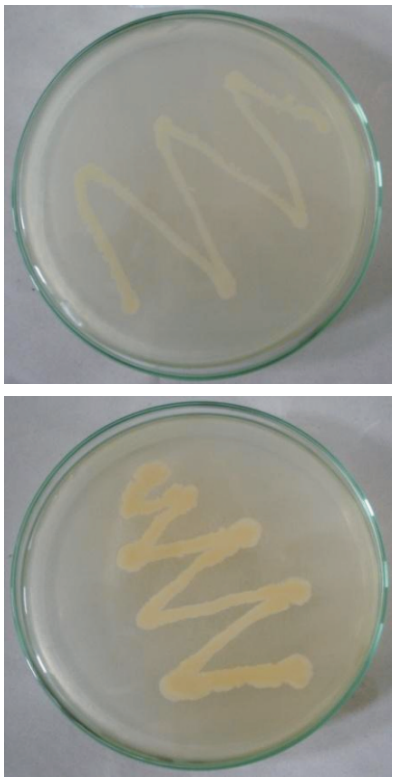
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Penghasil Lipase

Pertumbuhan koloni mikroorganisme pada media seleksi (TAT dan TAZ) mulai terlihat setelah inkubasi selama 48 jam. Pada hari kedua (48 jam) disekitar beberapa koloni terlihat zona bening *(halo)*. Dari enam sumber isolat yang diteliti, hanya dua sumber isolat yang menghasilkan koloni bakteri yang menunjukkan *halo*, yaitu sumber isolat singkong goreng dan dodol salak. Dari hasil pengamatan diambil koloni yang menunjukkan *halo* paling besar. Pertumbuhan isolat singkong goreng dan dodol salak tersebut disajikan pada Gambar 1.

(a)

(b)



Gambar 1. Isolat bakteri lipolitik. *(a) dari singkong goreng dengan media TAT (SG_T), (b) dodol salak dengan media TAT (DS_T)*

Singkong goreng dan dodol salak menjadi isolat yang potensial diduga karena mengandung unsur-unsur yang lebih lengkap dibandingkan sumber isolat lainnya. Unsur-unsur seperti C dan N dibutuhkan oleh bakteri untuk menghasilkan enzim lipase.

Bakteri penghasil lipase dapat tumbuh baik dalam media tributirin yang menggunakan substrat tributirin maupun minyak zaitun, hal ini kemungkinan disebabkan karena mikroorganisme yang tumbuh pada media tersebut dapat

menghidrolisis asam lemak rantai pendek (4 atom C). Speck (1984) menyatakan bahwa tributirin dapat dihidrolisis oleh beberapa mikroorganisme yang tidak dapat menghidrolisis trigliserida yang mengandung asam lemak rantai panjang, akan tetapi untuk tujuan isolasi, tributirin merupakan substrat yang paling cocok. Cardens *et al. (2001)* mengisolasi 2000 mikroorganisme penghasil lipase, diperoleh 450 mikroorganisme menghasilkan zona bening disekeliling koloninya pada media yang mengandung minyak zaitun.

Tributirin, minyak zaitun, triolein, butter oil emulsion dan minyak babi *(lard)* adalah substrat alami yang sering digunakan sebagai substrat untuk mengukur aktivitas lipase (Ibrik*et al.,* 1998; Miranda*et al*., 1999; Kermasha *et al*., 1998).

Karakterisasi Lipase Isolat Terpilih

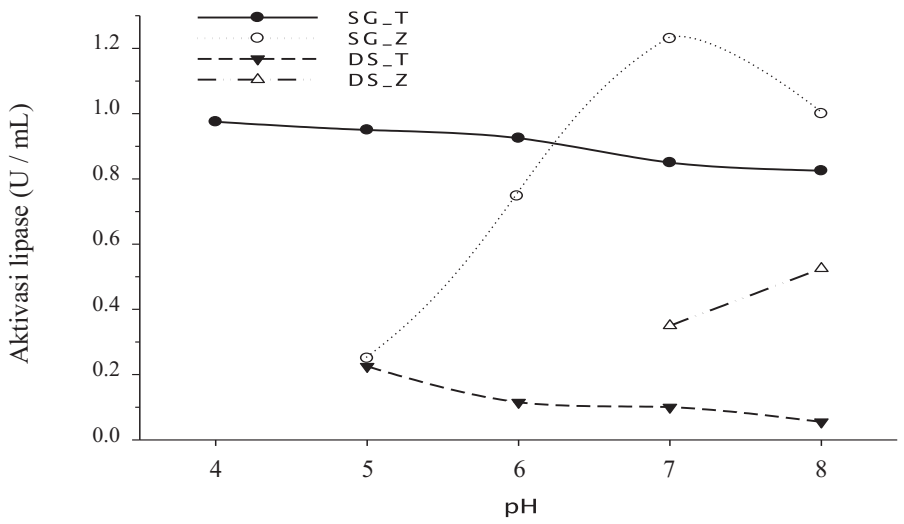
Aktivitas enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya seperti pH dan suhu (Weete, 2002). Aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh konsentrat substrat, aktivator, inhibitor spesifik enzim, kekuatan ionik, dan dalam beberapa kasus tertentu juga dipengaruhi oleh interaksi dengan protein atau membran (Tucker, 1995).

Aktivitas lipase kedua isolat bakteri potensial penghasil lipase ditentukan dengan menguji aktivitas hidrolitik lipase pada filtrat hasil fermentasinya dalam media cair. Hasil uji aktivitas lipase terhadap pH dan lama masa inkubasi dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

Hasil uji aktivitas lipase pada Gambar 2 menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh pada media tributirin agar yang menggunakan substrat minyak zaitun, cenderung mempunyai aktivitas lipase yang optimum pada media yang mempunyai pH mendekati netral cenderung basa. Aktivitas lipase pada media dengan pH ekstrim (asam atau basa) menunjukkan hasil kecil bahkan negatif. Hal ini kemungkinan bakteri yang tumbuh pada media tributirin dengan substrat minyak zaitun tersebut adalah bakteri tidak tahan basa atau asam kuat.

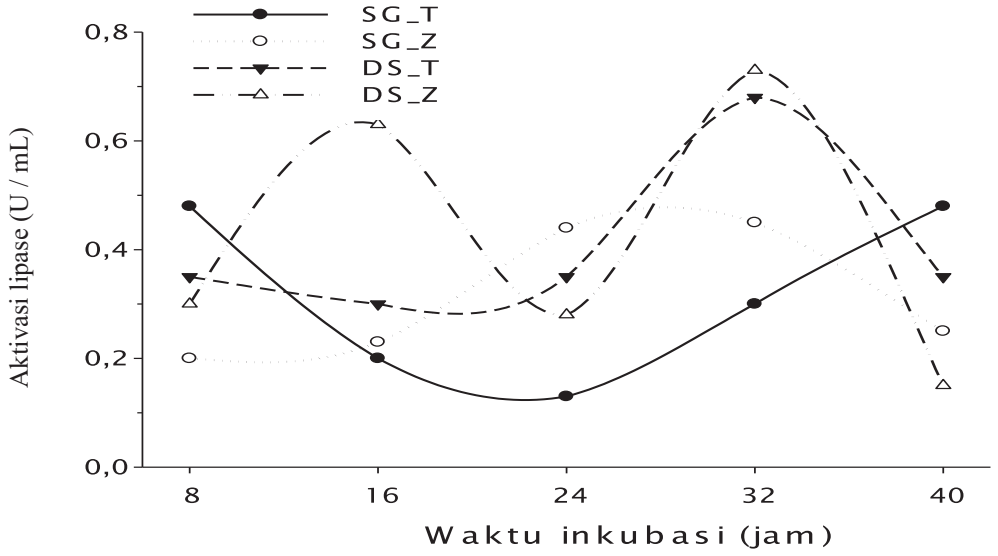
Hasil uji aktivitas lipase pada Gambar 2 juga menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh pada media tributirin agar dengan substrat tributirin agar - tributirin (TAT) mempunyai pH optimum yang lebih tahan asam. Hasil uji aktivitas lipase Isolat SG_T pada pH 4 sebesar 0.975 U/mL dan DS_T pada pH 5 sebesar 0.225 U/mL, dibandingkan pada perlakuan dengan pH yang netral atau basa (6 10) yang menurun aktivitas hidrolitiknya.

Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh pada kedua sumber isolat cenderung mempunyai aktivitas lipase yang optimum pada media yang mempunyai pH mendekati netral cenderung basa. Menurut Ismadi (1998), beberapa enzim memiliki toleransi terhadap perubahan pH, tapi yang lainnya bekerja dengan baik pada rentang pH yang tidak terlalu jauh. Jika suatu enzim diberi pH yang ekstrim, maka akan terdenaturasi. Seperti dilaporkan oleh Pratiwi*et al.* (2013) yang meneliti karakterisasi enzim lipase dari *Pseudomonas aeruginosa* yang menyebutkan bahwa aktivitas enzim mengalami peningkatan hingga pH 7,5 dan menurun secara drastis pada pH 8, yang disebabkan oleh putusnya ikatan hidrogen sehingga struktur enzim tersebut berubah atau terdenaturasi.



Gambar 2. Profil aktivitas lipase dari 4 isolat terpilih terhadap pH.

SG_T (Singkong Goreng pada media tributirin agar-tributirin), SG_Z (Singkong Goreng pada media tributirin agar-minyak Zaitun), DS_T (Dodol Salak pada media tributirin agar-tributirin), DS_Z (Dodol Salak pada media tributirin agar-minyak Zaitun)



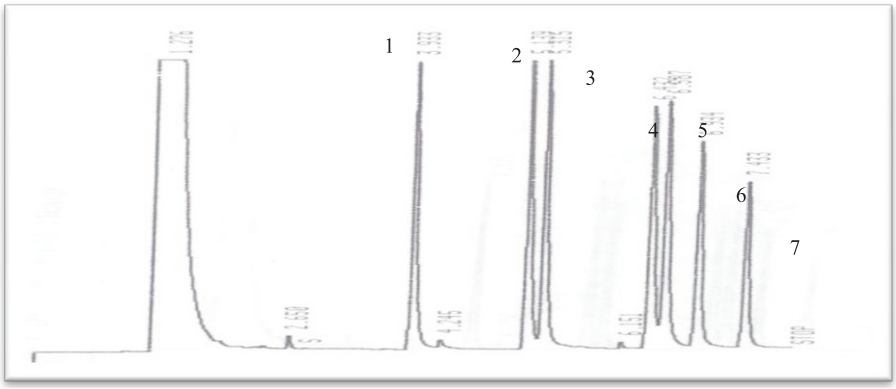
Gambar 3. Produksi lipase 4 isolat bakteri terhadap waktu inkubasi.

SG_T (Singkong Goreng pada media tributirin agar-tributirin), SG_Z (Singkong Goreng pada media tributirin agar-minyak Zaitun), DS_T (Dodol Salak pada media tributirin agar-tributirin, DS_Z (Dodol Salak pada media tributirin agar-minyak Zaitun).

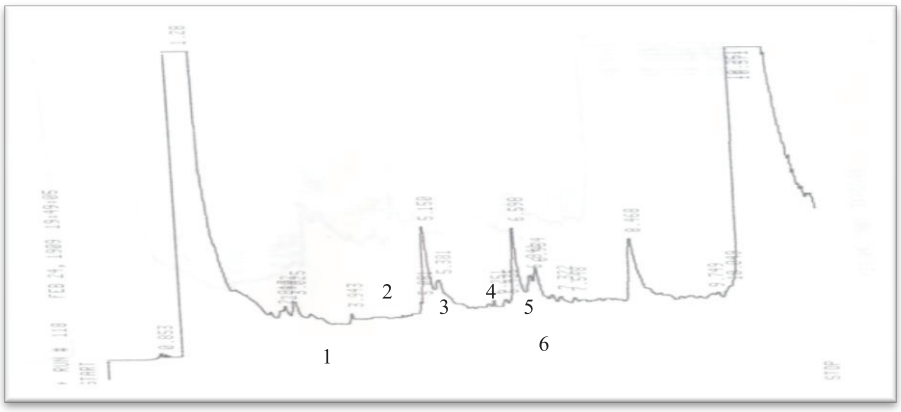
Selain faktor derajat keasaman (pH), faktor lama inkubasi juga merupakan hal yang penting untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan bakteri sehingga dapat menghasilkan enzim lipase yang optimum. Hasil uji aktivitas lipase berdasarkan lama masa inkubasi dapat dilihat pada Gambar 3. Pada lama masa inkubasi 32 jam menunjukkan angka aktivitas lipase tertinggi, hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin lama masa inkubasi juga terjadi peningkatan aktivitas lipase pada semua isolat baik yang menggunakan substrat tributirin agar - minyak zaitun maupun yang menggunakan substrat tributirin agar - tributirin, walaupun pada masa inkubasi 40 jam terjadi penurunan aktivitas lipase.

Produksi Metil Ester

Berdasarkan penelitian Sukartin *et al.*(2007) perbandingan metanol dan CPO yang digunakan untuk produksi FAMEa dalah 1 : 6, yang kemudian ditambahkan enzim lipase dari sumber isolat terpilih. Untuk mengetahui kemampuan enzim lipase yang diproduksi dalam menghasilkan metil ester dilakukan pengujian metil ester menggunakan alat gas kromatografi (GC) dengan hasil seperti terlihat pada Gambar 4 dan 5.



Gambar 4. Standar FattyAcid Metil Ester (FAME). *Keterangan gambar: 1. asam miristat (C14:0), (2) asam palmitat (C16:0), (3) asam palmitoleat (C16:1), (4) asam stearat (C18:0), (5) asam oleat (C18:1), (6) asam linoleat (C18:2), (7) asam linolenat (C:18:3).*



Gambar 5. Metil ester dari CPO setelah proses metanolisis menggunakan enzim lipase dari sumber isolat singkong goreng zaitun (SG-Z). *(1) asam palmitat (C16:0), (2) asam palmitoleat (C16:1), (3) asam stearat (C18:0), (4) asam oleat (C18:1), (5) asam linoleat (C 18:2).*

Gambar 4. menunjukkan khromatogram dari FAME standar yang digunakan yaitu metil ester untuk C:14 (asam miristat), C:16 (asam palmitat), C:16:1 (asam palmitoleat), C18:0 (asam stearat), C18:1 (asam oleat), C18:2 (asam linoleat), C18:3 (asam linolenat). Sedangkan pada Gambar 5 menunjukkan lipase dari isolat singkong goreng yang ditumbuhkan pada media tributirin-zaitun (SG_Z) dapat mengkatalisis reaksi transesterifikasi CPO menjadi metil ester. Hal ini terlihat dari munculnya puncak (*peak*) pada *retention time* yang sama sesuai dengan standar FAME pada Gambar 4. Adapun prosentase metil ester yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1. Untuk perbandingan dilakukan pula esterifikasi CPO menggunakan enzim komersil yaitu *Pseudomonas fluorescens.*

Tabel 1. Prosentase FAME dari Sumber Isolat Terpilih.

Asal enzim	Yield (%)
Pseudomonas fluorescens	10,417
SG_Z	15,303
DS_Z	10,597
SG_T	5,956
DS_T	7,766

Tabel 1 menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari singkong goreng yang ditumbuhkan pada media tributirin minyak zaitun (SG_Z) mempunyai yield yang paling besar yaitu 15.3% dibandingkan dengan yield dari isolat lainnya. Besarnya prosentase FAME pada isolat SG_Z kemungkinan dapat disebabkan komposisi minyak zaitun yang juga mengandung asam palmitat dan asam stearat yang hampir sama dengan komposisi metil ester yang terkandung dalam CPO sebagai bahan baku FAME dalam penelitian ini. Dengan komposisi yang mirip ini menyebabkan enzim lipase bekerja lebih optimum untuk mempercepat reaksi esterifikasi menghasilkan metil ester dan gliserol.

KESIMPULAN

Bakteri penghasil lipase dengan kemampuan esterase dapat diisolasi dari pangan berminyak yaitu dodol salak dan singkong goreng sebagai sumber isolat potensial.Bakteri penghasil enzim lipase pada media tributirin agar tributirin mempunyai kecenderungan hidup pada pH asam sedangkan pada media tributirin agar minyak zaitun memiliki kecenderungan hidup pada pH basa, dengan masa inkubasi optimum pada 32 jam. Isolat yang berasal dari singkong goreng yang ditumbuhkan pada media tributirin agar minyak zaitun menghasilkan fatty acid metil ester (FAME) yang terbanyak yaitu 15,303%.

DAFTAR PUSTAKA

Abigor RD, Uadia PO, Foglia TA, Haas MJ, Jones KC, Okpefa E, Obibuzor JU, Bafor ME (2000) Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. Bochemical Society Transaction 28(6): 978-981.

Burkert JFM., meugeri F., Rodriquez MI. 2004. Optimization of Extraceluller Lipase Production by *Geotrichium* sp using Factorial Design. Bioresource Tecnhnology. 91:77-84

Colla LM., Rizzardi J., Pinto MH., Reinher CO, Bertolin TE, Vieira Costa JA. 2010. Simultaneous Production of Lipases and Biosurfactans by Submerged and Solid State Bioprocesses. Bioresources Technology. 101:8308-14

Fukuda,H., Kondo,A., dan Noda,H. 2001. Biodiesel fuel production by transeterification of oils. Journal of Biosciences and Bioengginering 92(5): 405-416

Ibrik, A., Chahinian, H., Rugani, N., Sarda, L., dan Comeau, L.C. 2000. Purification and Characterization of

triacyglycerol lipase from *Penicilium cyclopium.* Lipids. 33(4):377-384.

Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S .2001. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. J Molecular Catalysis 16: 53-58

Joseph B, Ramteke PW, Thomas G, Shrivastava N (2007) Standard review cold-active microbial lipases: a versatile tool for industrial application. Biotechnology and molecular Biology Review 2(2): 39-48.

Kaieda M, Samukawa T, Kondo A, Fukuda H. 2001. J Biosci Bioeng 91(1): 12-15.

Macrae, A.R. 1983. Lipase catalyzedinteresterification of oilsandfats. JAOCS 60(2):291-294.

MahadikND.,Puntambaker US., Bastawde KB., Khire JM., Gokhale DV. 2002. Production of Acidic Lipase by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. Process Biochem. 38:715-21.

Mayordomo, I., randez_Gil, F., dan Prieto, J.A. 2000. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulan.* J. Agric. Food Chem. 48:105-109.

Miranda, O.A., Salguiero, A.A., Pimentel, M.C.B., Lima Filho, J.L., Melo, E.H.M., dan Duran, N. 1999. Lipase production by Brazillian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. Bioresource Technology 36:145-147.

Mukesh Kumar Modi, Reddy JRC, Rao BVSK, Prasad RBN (2006) Lipase-mediated Transformation of Vegetable Oils into Biodiesel using Propan-2-ol as Acyl Acceptor BiotechnologyLetters28(9): 637-640.

Noureddini H, Gao X, Philkana RS. 2005. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. Bioresource technology 96(7): 769-777.

Pratiwi D, Firman Sebayang, It Jamilah. 2013. Produksi dan karaketrisasi Enzim Lipase Dari Pseudomonas aeruginosa Dengan Menggunakan Induser Minyak Jagung Serta Kofaktor Na+ dan Co2+. Jurnal Saintia Kimia. 1(2).

Said, E Gumbira. 1987. Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi. Medyatama Sarana Perkasa Jakarta

Salleh, A.B., Musani, R., Basri, M., Ampon,K., Yunus, W.M.Z., dan Razak, C.N.A. 1993. Extra and intracelullar lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. Can.J. Microbiol. 39: 978-981.

Sharma R., Chisti Y., Banarjee UC. 2001. Production Purification Characterization and Application of Lipase. Biotechnology Advances. 19: 627-62.

Sulaiman Al-Zuhair. 2005. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetics study. Biotechnol. Prog. 21(5): 1442-1448.

Sukartin, Chandra, K.P., Susanty, A., Mutawakkil, A. dan Fitriani. 2007. Pengembangan CPO Sebagai Biodiesel Dengan Menggunakan Katalis Enzim Lipase. Baristand Industri Samarinda

Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu .2003. Lipase-catalysed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continous batch operation. Biotechnol. Appl. Biochem. 38:103-106.