

## Purifikasi Lipase *Aspergillus niger* M1407 Indigenus Menggunakan Kromatografi Pertukaran Ion

### Purification of *Aspergillus niger* M1407 Indigenus Lipase Using Ion Exchange Chromatography

Mellissa Erlyn Stephanie Ledo<sup>1\*</sup>, Hartini Realista Lidya Solle<sup>1</sup>, Merpiseldin Nitsae<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Kristen Artha Wacana Kupang, Kupang-NTT  
Email: mellissaerlynsledo@gmail.com \*Penulis untuk korespondensi

#### Abstract

Lipase can be used as biocatalyst in biodiesel synthesis. One of the plants has potential as biocatalyst that is kesambi tree (*Schleichera oleosa*) which has been identified and cultivated are. The population of kesambi trees at East Nusa Tenggara was high but it has not optimally utilized. *Schleichera* seeds were known to have high fatty acid content as miristic acid, palmitic acid, stearic acid, arachidic acid oleat acid and linoleic acid. *Aspergillus niger* M1407 was indigenous lipolitic fungi that was isolated from *Schleichera* seeds. The aim of this study were 1) to obtain purified lipase *A. niger* M1407 by purification process using ion exchange chromatography and 2) to getting a profile of crude lipase *A. niger* M1407. The procedure of this study consisted of four stages 1) synthesizing of lipase *A. niger* M1407 by *Solid State Fermentation* using *Schleichera* seeds flour as medium fermentation; 2) testing lipase *A. niger* M1407 for pH profile 3) purifying lipase *A. niger* M1407 using cation-exchange chromatography; 4) testing the activity of partial purified lipase *A. niger* M1407 activity test. The results showed that crude lipase *A. niger* M1407 had optimal pH at 8 with activity 118,52 U/mL at room temperature. Lipase *A. niger* M1407 activity after the purification process using cation exchange chromatography was 71,11 U/mL. Therefore, the optimization of lipase *A. niger* M1407 purification process and characterization was necessary to improve biodiesel production by using *Schleichera* seeds.

**Keywords:** *A. niger* M1407 lipase, lipase purification, Kesambi (*Schleichera oleosa*), East Nusa Tenggara.

#### Abstrak

Lipase digunakan sebagai biokatalis dalam proses sintesis biodiesel. Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi biokatalis telah diidentifikasi dan dibudidayakan yaitu pohon kesambi (*Schleichera oleosa*) yang populasinya cukup tinggi di Nusa Tenggara Timur dan belum dimanfaatkan secara optimal. Biji kesambi (*Schleichera seeds*) diketahui memiliki kandungan asam lemak yang cukup tinggi seperti asam miristat, asam palmitat, asam stearat, asam arakidat, asam oleat dan asam linoleat. Isolat *Aspergillus niger* M1407 adalah isolat fungi lipolitik indigenus yang diisolasi dari biji kesambi. Penelitian ini bertujuan mendapatkan lipase *A. niger* M1407 yang murni melalui proses purifikasi menggunakan kromatografi pertukaran ion dan mendapatkan profil pH lipase *A. niger* M1407. Tahapan penelitian ini adalah 1) Tahap produksi lipase melalui *Solid State Fermentation* menggunakan medium tepung biji kesambi; 2) Tahap purifikasi lipase menggunakan *cation exchange*; 3) Tahap uji profil pH Lipase *A. niger* M1407; dan 4) Uji aktivitas lipase parsial purifikasi. Hasilnya menunjukkan aktivitas ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 memiliki pH optimal pada pH= 8 dengan aktivitas sebesar 118,52 U/mL pada suhu kamar. Aktivitas lipase *A. niger* M1407 yang telah mengalami purifikasi menggunakan metode kromatografi pertukaran kation (*cation exchange chromatography*) adalah 71,11 U/mL. Dengan demikian, optimasi purifikasi lipase *A. niger* M1407 dan karakterisasinya perlu dilakukan dalam upaya pengembangan produksi biodiesel dengan pemanfaatan biji kesambi.

**Kata Kunci:** Lipase *A. niger* M1407, Purifikasi lipase, Kesambi (*Schleichera oleosa*), Nusa Tenggara Timur.

Diterima: 29 Agustus 2017, disetujui: 30 September 2017

## Pendahuluan

Biodiesel merupakan salah satu energi alternatif pengganti bahan bakar fosil yang sedang dieksplorasi saat ini untuk mengatasi permasalahan krisis global bahan bakar fosil yang terjadi di Indonesia. Diterbitkannya Peraturan Presiden No. 5 Tahun 2006 tentang kebijakan Energi Nasional untuk mengembangkan sumber energi alternatif sebagai bahan bakar pengganti minyak merupakan bentuk pengharapan dari pemerintah terhadap ketergantungan terhadap bahan bakar fosil sehingga akan berkurang dari 52% menjadi 20%. Selain itu, pemerintah serius untuk mengembangkan bahan bakar nabati dengan menerbitkan Inpres No. 1 Tahun 2006 pada tanggal 25 Juni 2006 tentang penyediaan bahan bakar nabati sebagai sumber bahan bakar. Tumbuhan yang memiliki potensi untuk menjadi bahan baku dalam proses sintesis biodiesel dan enzim lipase telah diidentifikasi dan dibudidayakan, salah satunya adalah pohon kesambi (*Schleichera oleosa*) yang populasinya cukup tinggi di Nusa Tenggara Timur dan belum dimanfaatkan secara optimal.

Biji kesambi (*Schleichera seeds*) diketahui memiliki kandungan asam lemak yang cukup tinggi. Beberapa asam lemak pada biji kesambi adalah asam miristat, asam palmitat, asam stearate, asam arakidat, asam oleat dan asam linoleat. Kandungan asam oleat memiliki persentase tertinggi yaitu berkisar 40-60%. Sele dan Ledo (2013), telah melakukan isolasi dan identifikasi fungi indigenus lipolitik dari biji kesambi, didapatkan 3 isolat fungi yaitu *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* dan *Penicillium* sp. Selanjutnya Sabath dkk. (2013) telah menggunakan tepung biji kesambi sebagai substrat untuk produksi ekstraseluler lipase, Ledo dkk. (2016) mendapatkan ekstrak *crude* lipase melalui *Solid State Fermentation* (SSF) dengan menggunakan biji kesambi sebagai substrat dari *A. niger* dan *Penicillium* sp. dengan aktivitas enzim sebesar 137,5 U/mL dan 50 U/mL. Aktivitas *crude* lipase *A.niger* yang cukup tinggi memberikan peluang yang cukup besar untuk dapat digunakan sebagai biokatalis dalam produksi biodiesel skala industri. Dengan demikian, perlu dilakukan purifikasi dan karakterisasi lipase *A. niger* M1407 parsial

purifikasi untuk meningkatkan aktivitasnya serta mendapatkan profil lipase *A. niger* M1407 yang diekstraksi dari tepung biji kesambi.

Metode purifikasi yang digunakan yaitu kromatografi *ion exchange* menggunakan matrix penukar kation *Amberlite IRA-400*. Purifikasi menggunakan kromatografi *ion exchange* memiliki beberapa kelebihan antara lain kecepatan pemisahan/pendeteksian, bisa dilakukan pemisahan menggunakan kolom kation atau anion yang sesuai dengan sampel, kolom pemisah bisa bertahan pada perubahan yang terjadi pada sampel, tidak akan mempengaruhi kestabilan material penyusun kolom. Penggunaan kromatografi *ion exchange* diharapkan dapat memisahkan molekul protein enzim dari molekul lainnya sehingga meningkatkan kemurniannya. Lipase yang telah dimurnikan kemudian diuji aktivitas lipolitiknya. Hasil penelitian ini, memberikan informasi tentang sumber lipase yang baru yaitu biji kesambi dan aktivitas lipase *A. niger* M1407 yang cukup tinggi sehingga memiliki potensi untuk pemanfaatan yang lebih luas dalam dunia industri.

## Metode Penelitian

### Bahan dan Alat

Biji kesambi, *olive oil*, n-Heksana p.a, buffer fosfat, NaCl, resin (*cation Exchanger Amberlite IR 400 Cl*), Natrium Hidroksida p.a, Indikator PP, natrium nitrat, etanol p.a, kolom kromatografi (kolom kaca, diameter kolom adalah 1,5 cm dan panjang 15 cm), autoklaf (Hiclave, HVE-50, Hirayama)Shaker (Orbital Shaker, OS-762, OPTIMA), sentrifuge 80-2, tabung ependorf, Erlenmeyer, gelas beker, mikropipet, buret, dan cool box.

### Prosedur Produksi Ekstrak Kasar Lipase Ekstraseluler Menggunakan *Solid State Fermentation* (SSF)

Sebanyak 50 g bungkil biji kesambi yang telah di-*defatting* dalam erlenmeyer 1000 mL ditambahkan dengan *olive oil* 2% (v/w), NaNO<sub>3</sub> 1% (v/w) dan akuades 50%. Medium diaduk kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit. Medium diinokulasi dengan 10 mL suspensi spora fungi (10<sup>7</sup>

spora/mL), lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari. Kemudian sampel dari hasil fermentasi (ekstrak kasar lipase) ditambah dengan 0,1 M buffer fosfat pH 8,0 (3 mL/g medium). Campuran diaduk menggunakan shaker 100 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Campuran kemudian disaring. Filtrat/supernatan disentrifuge (3000 rpm) suhu 4°C, selama 20 menit untuk memisahkan padatan. Supernatan yang diperoleh merupakan *crude* enzim disimpan pada suhu -16°C untuk selanjutnya dilakukan analisis aktivitas esterifikasinya (Modifikasi metode dari Darmasiwi, 2010).

#### **Prosedur Karakterisasi lipase *A. niger* M1407 pada Berbagai Variasi pH**

Sebanyak 1 g hasil SSF diekstrak dengan buffer 0,1 M buffer fosfat pH 6,0; 7,0; 8,0; 9,0. Selanjutnya larutan diuji aktivitas esterifikasinya dengan metode titrasi.

#### **Prosedur Purifikasi Lipase Menggunakan Kromatografi Pertukaran Ion**

Sebanyak 2 g resin (*cation Exchanger Amberlite IR 400 Cl*) dimasukkan dalam kolom kemudian dicuci dengan 0,1M buffer fosfat pH 8,0 (sebanyak 3x). Resin dimasukkan ke dalam kolom yang berisi 0,1 M buffer fosfat pH 8,0. Selanjutnya sebanyak 1 mL sampel *crude* lipase dimasukkan dalam kolom dan dialirkan ke dalam kolom. Sampel ditampung dalam tabung ependorf. Elusi dilakukan dengan 0,1 M; 0,5 M; 1 M NaCl dalam 0,1 M buffer phosphate pH 6,0 sebanyak 5 ml ke dalam kolom secara gradien. Eluen ditampung dalam tabung ependorf. Eluent yang telah tertampung kemudian di uji protein terlarutnya dan aktivitas esterifikasinya (Modifikasi metode dari Scopes, 1994).

#### **Prosedur Analisis Aktivitas Lipase dengan Metode Titrasi**

Sebanyak 2 mL asam oleat dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 2 mL enzim *crude*/parsial purifikasi. Selanjutnya diletakkan pada shaker selama 30 menit, selanjutnya substrat enzim diinaktifkan dengan menggunakan campuran aseton : etanol (1:1) sebanyak 5 mL. Campuran tersebut ditambahkan 5 tetes fenoltalein 1% sebagai indikator dan dititrasi dengan menggunakan larutan NaOH

0,05 M. Titrasi dihentikan setelah campuran berubah menjadi merah muda. Aktivitas lipase ditentukan dari volume NaOH untuk titrasi sampel dikurangi volume NaOH untuk titrasi kontrol. Setiap 1 ml NaOH 50 mM setara dengan 100 unit aktivitas lipase. Unit aktivitas enzim dihitung dengan rumus :

$$\frac{(V \text{ NaOH sampel} - V \text{ NaOH kontrol})}{\text{volume enzim}} \times 100 \text{ (unit/ mL)}$$

(Lestari dkk., 2009)

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Profil pH Lipase *Aspergillus niger* M1407**

Ekstrak kasar lipase *Aspergillus niger* M1407 diekstraksi dari hasil *Solid State Fermentation* (SSF) biji kesambi melalui proses *defatting* dan diinokulasi dengan *A. niger* M1407 indigenus yang diisolasi dari biji kesambi (*Schleichera seeds*) selama 5 hari. Proses ekstraksi menggunakan larutan buffer fosfat pH 6, 7, 8, dan 9 yang menunjukkan aktivitas yang cukup bervariasi. Tahapan ekstraksi lipase sampai pada penentuan aktivitas berdasarkan variasi pH yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 1.

Menurut Lehninger dkk., (1993), aktivitas lipase mencapai kondisi maksimal pada pH optimum dalam mengikat substrat dan mengkatalisis reaksi. Perubahan pH menyebabkan berubahnya muatan lipase atau substrat, selain itu dapat mengubah struktur atau muatan residu fungsional pada sisi pengikatan substrat lipase. Perubahan pH yang ekstrim dapat mempengaruhi derajat ionisasi asam amino yang bermuatan sehingga menyebabkan putusannya ikatan intra dan intermolekuler yang diikuti dengan berubahnya struktur lipase. Hal ini mengakibatkan terjadinya penurunan efektivitas dan efisiensi enzim dalam mengikat dan mengkatalisis substrat (Farabee, 2001). Aktivitas ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 pada larutan buffer fosfat dengan variasi pH 6,0; 7, 0; 8,0 dan 9,0 dapat dilihat pada Gambar 2.

Aktivitas ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 pada pH 6,0 adalah 65,19 U/mL kemudian pada pH 7,0 mengalami peningkatan sebesar 30%. Aktivitas tertinggi lipase *A. niger* M1407 terjadi pada pH 8,0 yaitu 118,52 U/mL

### Purifikasi Lipase *Aspergillus niger* M1407 Indigenus

dan mengalami penurunan aktivitas sebesar 30% pada pH 9,0. Menurunnya aktivitas lipase terjadi karena perubahan pH larutan yang menyebabkan ionisasi gugus-gugus fungsionalnya (-OH, -NH<sub>2</sub>, -<sup>+</sup>NH<sub>3</sub>, dan -C=O) menjadi bentuk muatan.

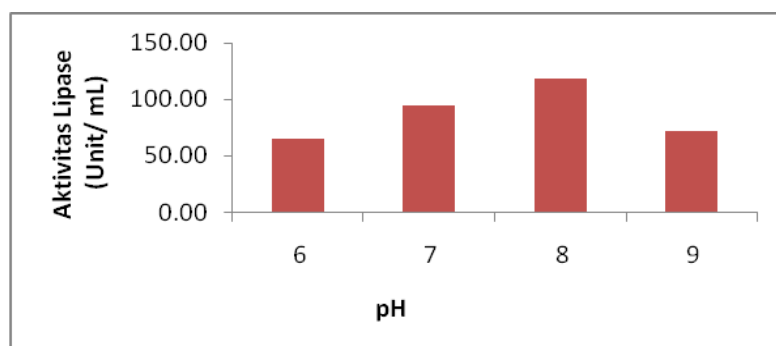
#### Aktivitas Lipase *A. niger* M1407 yang Telah Mengalami Proses Purifikasi dengan Metode *Cation Exchange Chromatography*

Purifikasi ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 menggunakan kromatografi *cation*

*exchange chromatography* dilakukan dengan menggunakan matriks *ion exchanger* Amberlite IR-120 (*strongly acidic cation exchanger* Na<sup>+</sup> form), sehingga matriks ini bermuatan negatif. Proses equilibrasi dengan pH adsorpsi akan menyebabkan matriks bermuatan negatif mengikat ion bermuatan positif. Lipase (bermuatan positif) akan terikat pada matriks dan protein pengotor bermuatan negatif akan lolos (*unbound*).



**Gambar 1.** Tahapan ekstraksi lipase sampai penentuan aktivitas enzim: (a). Fermentasi lipase menggunakan *A. niger* M1407; (b). Ekstraksi *Crude* lipase; (c). *Crude* Lipase; (d). *Crude* Lipase + asam oleat; (e). *Crude* Lipase + asam oleat digojog menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm, ± 30 menit; dan (f). Hasil akhir titrasi untuk penentuan aktivitas enzim (*crude* Lipase + asam oleat + etanol + aseton + indikator pp dititrasi menggunakan NaOH 0,1 M); (Sumber: Ledo dkk, 2016).



**Gambar 2.** Diagram aktivitas ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 pada pH yang berbeda.

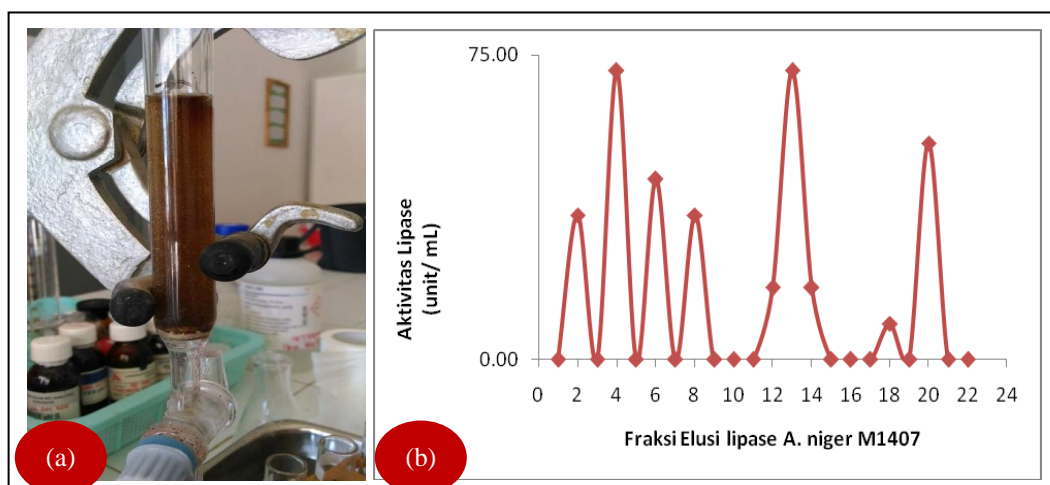
Sisi aktif lipase mempunyai 3 asam amino yang berperan dalam reaksi katalitiknya yaitu asam aspartat, histidin dan serin. Sisi aktif lipase berada pada asam amino serin yaitu gugus hidroksil (-OH) dari serin akan berikatan kovalen dengan substratnya (Pouderoyen dkk., 2001). Dengan demikian muatan yang dimiliki asam amino penyusun lipase bervariasi yaitu negatif, positif, tidak bermuatan, serta bersifat polar. Proses untuk mengubah muatan yang dimiliki oleh lipase *A. niger* M1407 perlu dilakukan sehingga dapat berikatan dengan matriks saat purifikasi. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Nurikasari (2011), titik isoelektrik (pI) *Aspergillus niger* 65I6 adalah pada pH 7,0. Hasil yang didapat sesuai dengan penelitian Hidayat dkk. (2015), tentang karakterisasi lipase *A. niger* 65I6 melalui fermentasi menggunakan medium bungkil jarak (*Jatropha seeds*) menyatakan bahwa lipase adalah enzim yang spesifik untuk substrat asam lemak rantai panjang, bersifat stabil pada pelarut polar, memiliki berat molekul 19 kDa, dan tergolong dalam lipase alkali (basa). Dengan demikian, muatan lipase *A. niger* M1407 adalah positif jika dikondisikan pada pH basa, sehingga agar lipase *A. niger* M1407 dapat berikatan dengan matriks *cation exchange* maka pH larutan buffer yang digunakan harus bersifat asam (di bawah titik isoelektrik). Dalam penelitian ini pH larutan buffer fosfat yang digunakan adalah pH 6 dengan konsentrasi 0,1 M. Proses purifikasi dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi dengan ukuran diameter kolom adalah 1,5 cm dan panjang 15 cm. Hal ini menyebabkan tahapan elusidasi akan berjalan lambat karena matriks yang digunakan semakin banyak. Sebaliknya jika diameter dan panjang kolom semakin kecil maka jumlah matriks yang digunakan sedikit menyebabkan tahapan elusidasi berjalan lebih cepat. Pada penelitian ini jumlah matriks Amberlite IR-120 digunakan sebanyak 5 g yang menempati kolom sepanjang 7,3 cm dari panjang 15 cm (Gambar 3a).

Hasil purifikasi lipase *A. niger* M1407 dengan metode *cation exchange chromatography* menunjukkan bahwa lipase yang terikat pada matriks dan dielusi menggunakan larutan NaCl dengan konsentrasi

0,1 M ; 0,5 M; dan 1 M (elusi bergradien artinya tahapan elusidasi dimulai dari konsentrasi yang kecil ke konsentrasi besar) memiliki aktivitas yang lebih rendah dari pada *crude* lipase *A. niger* M1407. Aktivitas lipase *A. niger* M1407 yang telah dipurifikasi dengan *cation exchange chromatography* didapatkan dengan menguji aktivitas lipase *A. niger* M1407 yang terdapat pada fraksi elusi menggunakan larutan NaCl dengan konsentrasi 0,1 M ; 0,5 M dan 1 M. Uji aktivitas lipase parsial purifikasi dilakukan dengan metode titrasi menggunakan larutan NaOH, hasil uji aktivitas lipase *A. niger* M1407 setelah elusidasi terlihat pada Gambar 3b.

Untuk setiap tahapan elusi yang menghasilkan 22 fraksi dibutuhkan waktu *crude* lipase melewati kolom selama 10 menit dan waktu retensi per tetes adalah 20 detik. Hal ini disebabkan karena diameter dan panjang kolom yang cukup besar menyebabkan tahapan elusi menjadi lambat. Dengan demikian, pola elusi yang disajikan dalam Gambar 3a menunjukkan aktivitas lipase parsial purifikasi pada setiap fraksi yang dielusi menggunakan NaCl dengan konsentrasi bertingkat.

Aktivitas lipase *A. niger* M1407 parsial purifikasi, pada tahap elusi menggunakan larutan NaCl 0,1 M adalah 71,11 U/mL, sedangkan pada tahap elusi dengan larutan NaCl 0,5 M, aktivitasnya adalah 35,56 U/mL (lihat Gambar 3b). Jika dibandingkan dengan *crude* lipase *A. niger* M1407 maka aktivitas lipase parsial purifikasi memiliki aktivitas 50% lebih rendah daripada aktivitas *crude* lipase, namun diduga aktivitas spesifik lipase *A. niger* M1407 parsial purifikasi lebih tinggi daripada aktivitas spesifik *crude* lipase. Hal ini disebabkan oleh total protein yang dimiliki oleh *crude* lipase lebih besar daripada total protein lipase *A. niger* M1407 parsial purifikasi. Pernyataan ini didukung oleh hasil penelitian Nurikasari (2011) yang menunjukkan bahwa hasil lipase *Aspergillus niger* 6516 menggunakan kromatografi *ion exchange* meningkatkan kemurnian lipase menjadi 12,12 kali, dengan *yield* sebesar 86,11%. Total protein pada ekstrak kasar lipase *Aspergillus niger* 6516 adalah 5,57 mg sedangkan pada lipase hasil adalah 0,57 mg sehingga aktivitas spesifik lipase hasil lebih besar daripada ekstrak kasar lipase tersebut.



**Gambar 3.** (a). Purifikasi ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 menggunakan *cation exchange chromatography* (b). Aktivitas lipase *A. niger* M1407 parsial purifikasi (fraksi elusi)

## Simpulan

Penentuan aktivitas ekstrak kasar lipase *A. niger* M1407 telah dilakukan pada kondisi pH optimum pada suhu kamar. Aktivitas lipase *A. niger* M1407 parsial purifikasi menggunakan metode *cation exchange chromatography*. Dengan demikian profil *crude* lipase *A. niger* M1407 perlu dilengkapi dengan karakterisasi berat molekulnya.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan (FKIP), Universitas Kristen Artha Wacana kupang yang telah membantu pendanaan penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Darmasiwi, S. 2010. *Screening Isolat Lipolitik Indigenus dan Karakterisasi Lipase Yang Dihasilkan Pada Solid-State Fermentation*. Thesis. Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Farabee, M.J. 2001. *Enzyme: Organic catalyst*. W.H-Freeman & Co. USA.
- Hidayat, C., Darmasiwi, S., Nurikasari, M., Cahyanto, M.N. 2015. Characterization of *Aspergillus Niger* 6516 lipase from solid-state fermentation using *Jatropha* seed cake medium. *Indonesian Journal of Biotechnology* 20 (2): 108 - 116
- Ledo, M.E.S., Dima, Y.R. dan Nope, J.V.V. 2016. *Aktivitas lipolitik Aspergillus niger dan Penicillium sp indigenus yang diisolasi dari biji kesambi (Schleichera oleosa)*. Prosiding Seminar nasional SAINS dan TEKNIK UNDANA 3. Kupang.
- Lehninger, A., Nelson, D. dan Cox, M.M. 1993, *Principles of Biochemistry 2<sup>nd</sup>*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Lestari, P., Handayani, S.N. dan Oedijjono. 2009. *Sifat-sifat Biokimiawi Ekstrak Kasar Lipase Ekstraseluler Dari Bakteri Azospirillum sp. JG3*. Program Studi Kimia, Jurusan MIPA Fakultas Sains dan Teknik UNSOED, Purwokerto Fakultas Biologi UNSOED. Purwokerto.
- Nurikasari, M. 2011. *Optimasi Kondisi, Karakterisasi Dan Kinetika Esterifikasi Lipase Aspergillus Niger 6516 Dari Solid State Fermentation Pada Medium Bungkil Jarak*. Thesis, Program Studi Bioteknologi Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Peraturan Presiden Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2006 Tentang Kebijakan Energi Nasional
- Pouderoyen, V.G., Eggert, T., Jaeger, K.E. dan Dijkstra, B.W.2001. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal  $\alpha/\beta$ Hydrolase Fold Enzyme. *Journal of J.M.B.* 309: 215-226.

*Mellissa Erlyn Stephanie Ledo dkk.*

Sabath, Y.S.A. 2013. *Produksi Lipase Oleh Aspergillus niger Dengan Pemanfaatan Biji Kesambi (Schleichera oleosa) Sebagai Medium Melalui Solid State Fermentation*. Skripsi, Program Studi Biologi, Universitas Kristen Artha Wacana, Kupang.

Scopes, R.K. 1994. *Protein Purification, Principles and Practice*. Third edition. Springer-Verlag. New York.

Sele, Y. dan Ledo, M. 2013. Isolasi dan identifikasi fungi lipolitik dari biji kesambi (*Schleichera oleosa*). *Jurnal Biotropika Sains*. Universitas Nusa Cendana, Kupang.