

Aktivitas Lipase *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 pada Substrat Minyak Nabati

Lipase activity of *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 and *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 on the substrate of vegetable oil

Wibowo Mangunwardoyo^{1*}, Yuyun Lusini², dan Indrawati Gandjar¹

¹ Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok, 16424

² Akademi Kimia Analis, Caraka Nusantara, Jl. Tugu Raya, Komplek Timah, Kelapa Dua, Cimanggis, Depok, 16951

E-mail: w_mangunwardoyo@hotmail.com atau w_mangunwardoyo@yahoo.com. *Penulis untuk Korespondensi

Abstract

Two *micro-Rhizopus* were grown on the various plant natural substrate to investigate the extracellular lipase activity. The medium basal was added with the olive, coconut, corn, sunflower and soya bean oil. Lipase activity was assayed using titration method. The high lipolytic activity was found when olive oil was used for *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 (16,23 U/g Biomassa) and coconut oil for *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 (30,5 U/g Biomassa) after 48 hours incubations. The pH value tended to increase during the fermentation process.

Key words: extracellular lipolytic, *micro-rhizopus*, *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550, *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520

Abstrak

Dua biakan *micro-Rhizopus* ditumbuhkan pada substrat minyak nabati untuk meneliti kemampuan memproduksi lipase ekstraselular. Medium basal ditambahkan minyak olive, kelapa, jagung, bunga matahari dan minyak kedelai. Aktivitas lipase diuji dengan metode titrasi. Aktivitas lipase tertinggi pada substrat minyak olive pada *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 (16,23 U/g Biomassa) dan minyak kelapa pada *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 (30,5 U/g Biomassa) setelah 48 jam inkubasi. Nilai pH mengalami kenaikan selama berlangsungnya proses fermentasi.

Kata kunci: enzim ekstraselular, lipase, *micro-rhizopus*, *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC550, *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520

Diterima: 15 Februari 2010, disetujui: 16 Desember 2010

Pendahuluan

Lipase telah digunakan dalam industri makanan untuk mengkatalisis proses penggantian substituen asam lemak dari lipid dalam *cocoa butter* (Mojovick *et al.*, 1993), katalisator reaksi transesterifikasi atau esterifikasi untuk memproduksi senyawa ester yang digunakan sebagai penambah aroma dan rasa pada keju (Ward, 1985) atau teh (Ramarethiam *et al.*, 2002). Dalam industri kosmetik, lipase digunakan sebagai katalisator produksi emulsifier dan pelembap (Sarma *et al.*, 2001). Lipase juga dapat diaplikasikan pada

produksi biodiesel dan biopolimer (Hama *et al.*, 2006).

Lipase diproduksi oleh beberapa mikroorganisme, tumbuhan, dan hewan. Pada umumnya produksi lipase yang diproduksi untuk tujuan komersial berasal dari mikroorganisme (Sarma *et al.*, 2001 dan Mangunwardoyo *et al.*, 2009). Lipase berasal mikroorganisme bersifat lebih baik dibandingkan dengan sumber lain. Isolasi mikroorganisme penghasil lipase telah banyak dilakukan dari buah kelapa sawit (Hiol *et al.*, 1999), limbah industri (Ferrer *et al.*, 2000), tanah (Cardenas *et al.*, 2001) dan artik tundra (Bancerz *et al.*, 2005).

Beberapa mikroorganisme memproduksi lipase sebagai enzim induktif, (Akhtar *et al.*, 1980;

Zhang dan Wei, 2003). Akan tetapi, pada sebagian lain, lipase merupakan enzim konstitutif (Samad *et al.*, 1990; Kulkarni 2002). Produksi lipase sangat dipengaruhi oleh kondisi medium dan lingkungannya (Elibol dan Ozer, 2001). Sumber karbon, nitrogen, dan oksigen merupakan faktor yang paling menentukan aktivitas spesifik lipase suatu mikroba (Davranov dan Khalameizer, 1997; Mangunwardoyo *et al.*, 2009).

Tujuan penelitian adalah meneliti aktivitas lipase pada substrat minyak nabati dari *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550.

Metode Penelitian

Mikrob

R. microsporus var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 strain *micro-Rhizopus* koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC).

Medium Basal

Medium basal yang digunakan adalah metode Samad *et al.*, (1990) yang dimodifikasi dengan metode Ellibol dan Ozer (2002) terdiri dari pepton, 50 g/l glukosa, 10 g/l; KH_2PO_4 , 0.5 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/l dalam akuades dengan pH 6,0.

Uji Substrat Lipid yang Ditambahkan Dalam Medium Basal

Uji substrat lipid dilakukan berdasarkan metode Akhtar *et al.*, (1980) dan Kulkarni (2002). Substrat lipid yang akan ditambahkan pada medium basal, diemulsifikasi terlebih dahulu dengan polivinil alkohol (PVA). Emulsi minyak 20% (v/v) dibuat dengan mencampurkan substrat lipid dan larutan PVA (2% g/v) dengan perbandingan 1:4. Emulsi dihomogenkan dalam *shaker* 150 rpm selama satu jam dan disterilisasi dengan autoklaf 121°C, 15 menit. Emulsi substrat lipid ditambahkan ke medium fermentasi yang berisi medium basal dengan konsentrasi akhir substrat lipid 2% (v/v). Sebanyak 0,2 ml suspensi spora ($1,4-2,67 \times 10^6$ spora/ml)

diinokulasi ke dalam medium fermentasi. Diinkubasi dalam inkubator bergoyang, dengan suhu ruang (27–30°C) dan kecepatan agitasi 110 rpm. Penghitungan biomassa kering, pH dan aktivitas spesifik lipase dilakukan pada jam ke 24, 48, dan 72. Setiap perlakuan dibuat tiga ulangan.

Penentuan Aktivitas Spesifik Lipase

Aktivitas lipolitik ditentukan dengan cara titrasi menurut metode Samad *et al.*, (1990). Substrat minyak zaitun diemulsikan terlebih dahulu, dengan menambahkan 1% (b/v) PVA ke dalam minyak zaitun 50% (v/v) kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit bufer fosfat pH 7.5, 50% (v/v) sambil dikocok. Emulsi dihomogenkan dengan *shaker* 150 rpm, selama minimal satu jam. Substrat sebanyak 2,5 ml yang telah diemulsi ditambahkan 1 ml filtrat enzim dan 20 µl CaCl_2 0,02M. Campuran tersebut diinkubasi dalam inkubator bergoyang, pada suhu 35° C selama 30 menit, kecepatan pengocokan 120 rpm. Sebanyak 3,5 ml campuran etanol dan aseton p.a (1: 1) ditambahkan pada substrat setelah diinkubasi untuk menghentikan kerja enzim. Selanjutnya, ditambahkan tiga tetes larutan fenolftalein 1% dan dititrasi dengan larutan NaOH yang telah distandarisasi. Satu unit (U) aktivitas lipase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang membebaskan 1 µmol asam lemak per menit pada kondisi pengujian.

Hasil dan Pembahasan

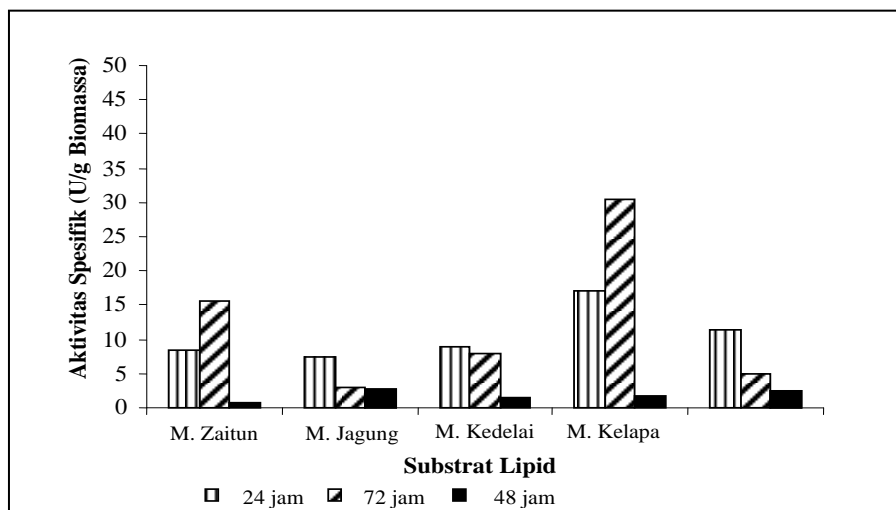
Uji Substrat Lipid (minyak nabati) yang Ditambahkan Dalam Medium Basal

Aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 pada jam ke 48 dari yang tertinggi keterendah berturut-turut adalah minyak kelapa, minyak zaitun, minyak kedelai, minyak biji bunga matahari, dan minyak jagung. Semua aktivitas spesifik lipase kapang dalam lima jenis substrat terendah pada jam ke 72 dibandingkan waktu inkubasi 24 dan 48 jam. Berat biomassa *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 520 tertinggi dicapai pada jam ke 48 dalam medium minyak biji matahari (262,5 mg/20 ml medium) tetapi aktivitas spesifiknya hanya 5,1 U/g Biomassa. Berat

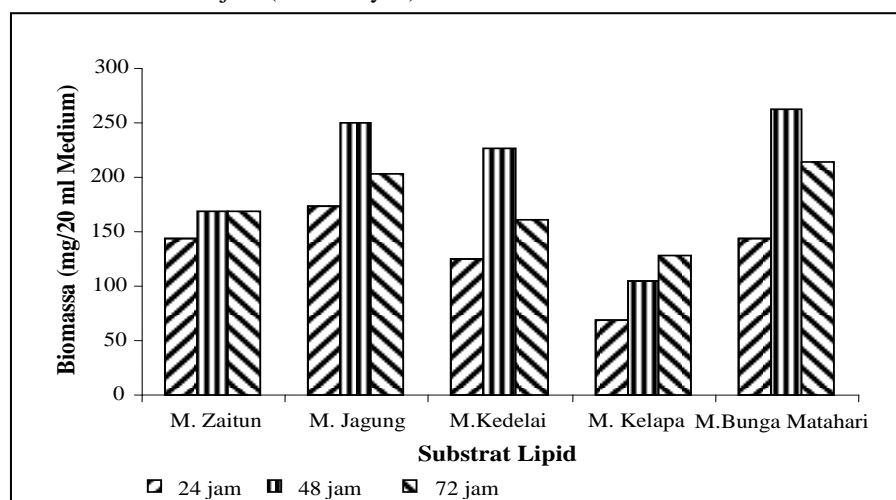
biomassa paling rendah terjadi pada medium minyak kelapa dalam tiga waktu inkubasi (Gambar 1 dan 2).

Enzim lipolitik dari *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 memberikan aktivitas tertinggi dalam medium yang ditambahkan minyak kelapa (30,5 U/g Biomassa). Kemungkinan enzim lipolitik kapang tersebut memiliki kekhususan terhadap substrat yang mengandung ester asam lemak dengan rantai sedang (C_8-C_{12}). Komposisi asam lemak minyak kelapa terdiri dari asam-asam lemak rantai pendek dan sedang seperti asam kaproat (C_6) 1%, asam kaprilat (C_8) 5–7%, asam kaprat (C_{10}) 7–9%, asam laurat

(C_{12}) 40–50% dan asam miristat (C_{16}) 9–12%. Beberapa spesies *Rhizopus* sp. menunjukkan aktivitas spesifik lipase yang tinggi terhadap asam-asam lemak dengan rantai sedang. Diketahui pula, bahwa beberapa mikroba dapat memproduksi dua atau lebih lipase dengan spesifitas substrat asam lemak yang berbeda (Saxena et al., 1999). Penambahan minyak zaitun juga memperlihatkan pengaruh terhadap aktivitas spesifik strain UICC 520 pada jam ke 48 (15,5 U/g Biomassa), walau hanya separuh dari aktivitas spesifik pada medium minyak kelapa, lebih dari minyak jagung, minyak kedelai dan minyak biji bunga matahari.



Gambar 1. Aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dengan lima jenis substrat lipid (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).



Gambar 2. Berat biomassa *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dengan lima jenis substrat lipid, (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).

Aktivitas spesifik lipase tertinggi (16,23 U/g Biomassa) *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 pada jam ke-24 dicapai pada medium minyak kelapa yang mengandung asam lemak rantai pendek; asam laurat (C_{12}) = 40–50%; asam miristat (C_{14}) = 15–20%. Aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 berikutnya adalah pada medium yang ditambahkan minyak kedelai (9,96 U/g Biomassa) yang mengandung asam linoleat ($C_{18:2}$) = 50–58% dan asam linolenat ($C_{18:3}$) = 5–10%. Aktivitas spesifik kapang pada substrat lipid minyak kelapa dan minyak kedelai lebih tinggi dari pada aktivitas spesifik lipase pada medium minyak jagung (1,98 U/g Biomassa), minyak zaitun (1,42 U/g Biomassa) dan biji bunga matahari (1,06 U/g Biomassa) pada jam ke-24. Berat biomassa *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dalam medium minyak kelapa (91 mg/20 ml medium) dan minyak kedelai terendah (108 mg/20 ml medium) dibandingkan medium dengan substrat lipid lain pada jam ke-24 (Gambar 3 dan 4).

Minyak kelapa mengandung asam lemak dengan rantai C pendek, tetapi minyak kelapa dan minyak kedelai tidak mengandung asam oleat ($C_{18:1}$). Sebaliknya minyak jagung, minyak zaitun dan minyak biji matahari masing-masing mengandung asam oleat 25–35% pada minyak jagung, 71% pada minyak zaitun dan 19% pada minyak biji matahari. Kemungkinan enzim lipolitik *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 lebih mudah menghidrolisis asam lemak rantai pendek dan asam lemak linolenat daripada asam lemak oleat, terutama pada awal inkubasi (24 jam).

Komposisi asam lemak rantai pendek yang dominan (40–50%) dalam minyak kelapa, mungkin menjadi alasan mengapa minyak kelapa mudah dihidrolisis dari minyak lain oleh enzim lipolitik yang diproduksi oleh *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 pada jam ke-24. Lipase dari *Candida deformans* misalnya, lebih cepat menghidrolisis asam lemak jenuh atau tak jenuh dengan rantai karbon yang pendek (Muderhwa dan Ratomahenia, 1985).

Hasil pengujian pengaruh lima jenis substrat lipid terhadap aktivitas spesifik lipase

R. microsporus var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 menunjukkan bahwa di kelima substrat lipid, strain *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 memproduksi enzim lipolitik dengan aktivitas, spesifikasi substrat dan waktu inkubasi yang bervariasi. Dalam penelitian ini aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dan *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550, diinduksi oleh penambahan minyak kelapa dengan nilai yang tinggi. Di samping itu minyak zaitun, minyak kedelai dan minyak biji bunga matahari juga mempunyai potensi untuk menjadi inducer aktivitas lipase pada kedua strain kapang tersebut, dengan waktu inkubasi yang berbeda. Minyak kedelai merupakan inducer yang baik untuk strain UICC 550 pada jam ke-24, minyak zaitun sebagai inducer yang baik untuk strain UICC 520 pada jam ke-48, sedangkan minyak biji matahari inducer bagi strain UICC 520 pada jam ke-24. Beberapa literatur menyebutkan produksi lipase beberapa fungi meningkat ketika difermentasi dalam medium minyak zaitun, di antaranya adalah: *Mucor hiemalis* dengan penambahan emulsi minyak zaitun 1% (Akhtar *et al.*, 1980) dan *Rhizopus oligosporus* dengan emulsi minyak zaitun 0,7% (Nahas 1988; Lima *et al.*, 2003). Minyak biji bunga matahari memberikan pengaruh yang baik terhadap penambahan biomassa kedua strain kapang tersebut terutama diawal fermentasi (jam ke-24). Minyak kelapa meningkatkan aktivitas lipase kedua strain, tetapi pertumbuhan biomasanya rendah. Aktivitas lipase suatu strain tidak selalu beriringan dengan penambahan jumlah biomassa (Yoshida *et al.*, 1968; Nahas, 1988).

Perubahan pH Medium Fermentasi

Perubahan pH medium (pH awal medium = 6,0) yang terjadi pada fermentasi menggunakan strain *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 (Gambar 5). Perubahan pH medium fermentasi dengan penambahan substrat lipid minyak zaitun, dan kedelai, mengalami pergeseran pH ke arah lebih basa hingga jam ke-72 (pH akhir kedua medium adalah 8,0). Dalam medium minyak kelapa, minyak jagung dan biji bunga matahari

pada jam ke-48, pH medium juga bergeser ke arah basa (pH 7,60 untuk minyak jagung, pH 7,87 untuk minyak kelapa, dan pH 7,60 untuk minyak biji bunga matahari), tetapi pada jam ke 72 pH medium bergeser sedikit lebih asam (pH 6,50 untuk medium dengan substrat lipid minyak jagung, 7,30 minyak kelapa dan 7,40 untuk minyak biji matahari). Menurut Bilgarmi dan Verma (1981) pH medium dalam fermentasi akan memengaruhi permeabilitas membran, pH internal miselium dan aktivitas enzim.

Gambar 5, menunjukkan pH semua medium fermentasi strain *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dengan lima jenis substrat lipid berbeda bergeser ke arah lebih basa (pH 7,30–8,30) pada jam ke-24 dan 48 (pH medium awal 6,0), dimana pada saat itu aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 (30,50 U/g Biomassa) dicapai dalam medium substrat lipid minyak kelapa dengan pH medium paling basa (pH 8,30).

Perubahan pH medium fermentasi dengan penambahan substrat lipid minyak zaitun, dan kedelai, mengalami pergeseran pH ke arah lebih basa hingga jam ke-72 (pH akhir kedua medium adalah 8,0). Dalam medium minyak kelapa, minyak jagung dan biji bunga matahari pada jam ke-48, pH medium juga bergeser ke arah basa (pH 7,60 untuk minyak jagung, pH 7,87 untuk minyak kelapa, dan pH 7,60 untuk minyak biji bunga matahari), tetapi pada jam ke-72 pH medium bergeser sedikit lebih asam (pH 6,50 untuk medium dengan substrat lipid minyak jagung, 7,30 minyak kelapa dan 7,40 untuk minyak biji matahari).

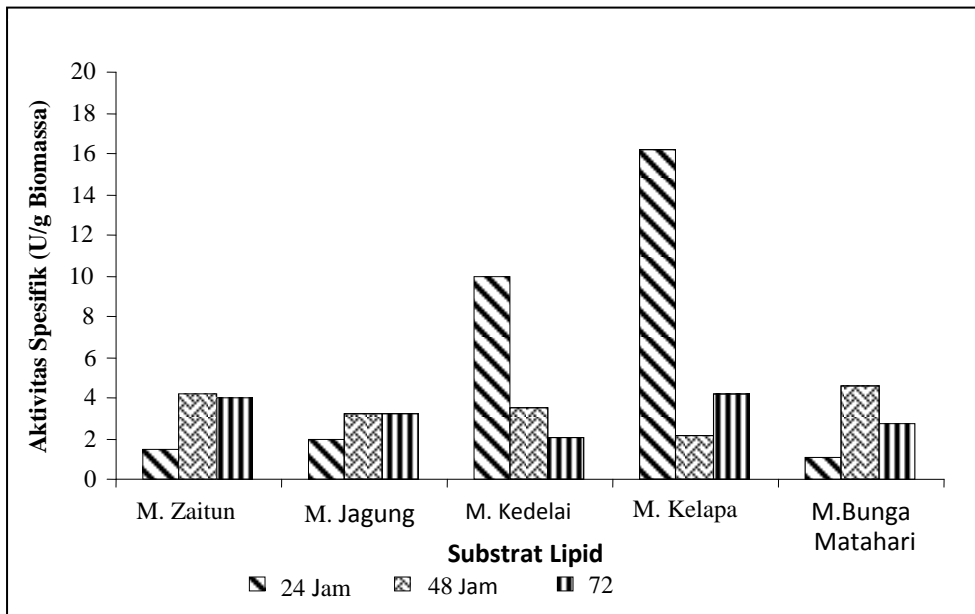
Perubahan pH medium fermentasi *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dari pH medium awal 6,0 bergeser ke arah basa untuk semua jenis minyak yang ditambahkan. Dalam medium dengan substrat lipid minyak kelapa dan minyak kedelai pada waktu inkubasi 24 jam, pH medium menjadi sedikit lebih asam (pH 5,50) dari pH awal (6,0). Aktivitas spesifik lipase pada saat tersebut sedang meningkat. Perubahan pH semua medium bergeser ke arah

pH basa, pada jam ke-48 dan 72, (6,0–7,90) (Gambar 6).

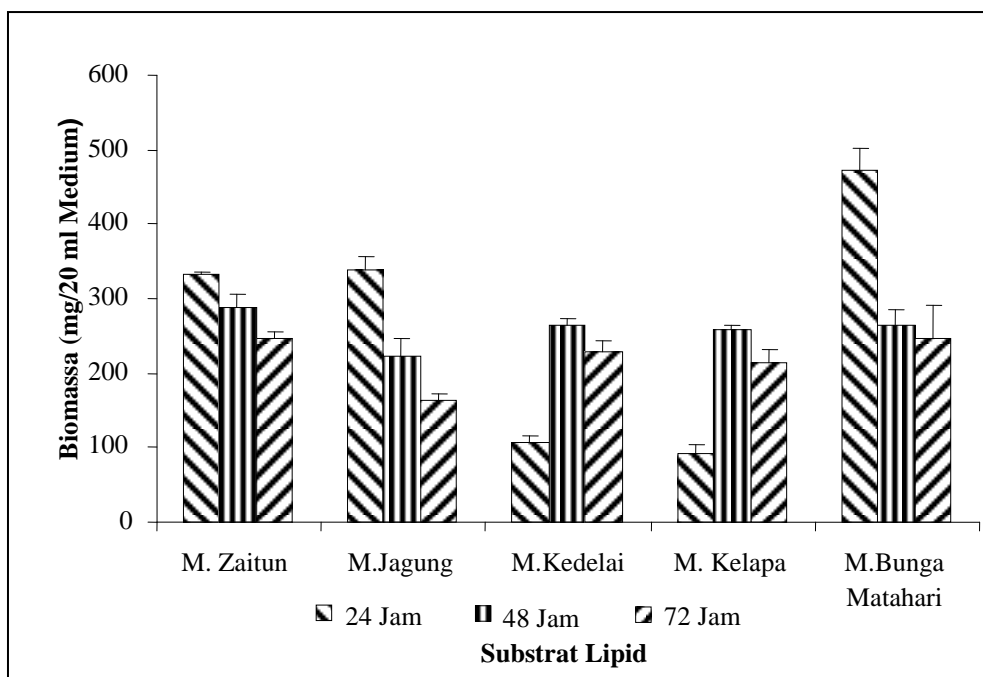
Medium fermentasi strain *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan substrat minyak zaitun, jagung dan biji bunga matahari mengalami perubahan pH ke arah yang lebih basa dengan bertambahnya waktu inkubasi. Akan tetapi, medium fermentasi dengan dua substrat lipid lain yaitu, minyak kedelai dan kelapa, mengalami penurunan pH ke arah pH asam (5,50) pada jam ke-24 dan bergeser kembali ke arah basa pada jam ke-72. Pada saat yang sama aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dalam medium minyak kedelai dan kelapa tinggi. Penurunan pH substrat mungkin disebabkan oleh peningkatan konsentrasi asam dalam medium, akibat dilepaskannya asam-asam lemak hasil hidrolisis enzim lipolitik. Waktu inkubasi selanjutnya (jam ke-72 jam), pH medium berubah menjadi lebih basa karena protein dalam medium sudah mulai didegradasi menjadi senyawa peptida, asam amino bebas, dan senyawa basa ammonium sebagai hasil deaminasi asam amino (Allonso *et al.*, 2005).

Kemungkinan perbedaan dari pH setelah fermentasi adalah perbedaan sifat karakteristik dari biakan yang digunakan dalam penelitian, misalnya, perbedaan respon antara strain *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dan *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 terhadap adanya sumber N berupa pepton. Strain *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 diduga tidak langsung (atau hanya sedikit) mendegradasi pepton diawal inkubasi (jam ke-24) sehingga dalam medium tidak banyak mengandung senyawa-senyawa peptida dan amina yang bersifat basa, sedangkan strain *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 disamping menggunakan substrat lipid (trigliserida) karena pada saat itu aktivitas spesifik lipase tinggi, juga mendegradasi pepton menjadi senyawa-senyawa basa. Karakterisasi lain dari strain *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 telah diteliti oleh Suharyanto (2000) yang melaporkan bahwa aktivitas proteolitik *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 tinggi.

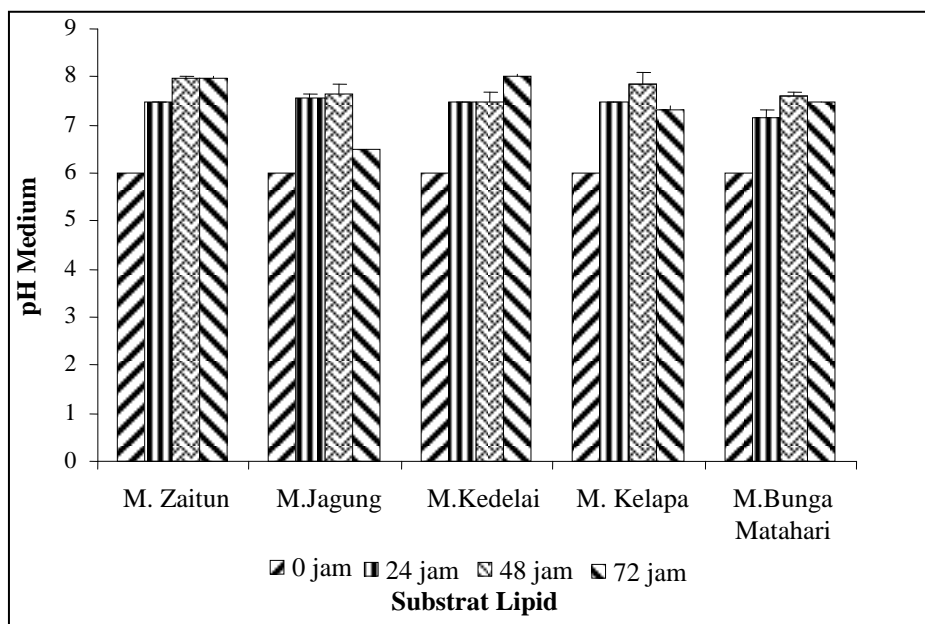
Aktivitas Lipase Rhizopus microsporus pada Substrat Minyak Nabati



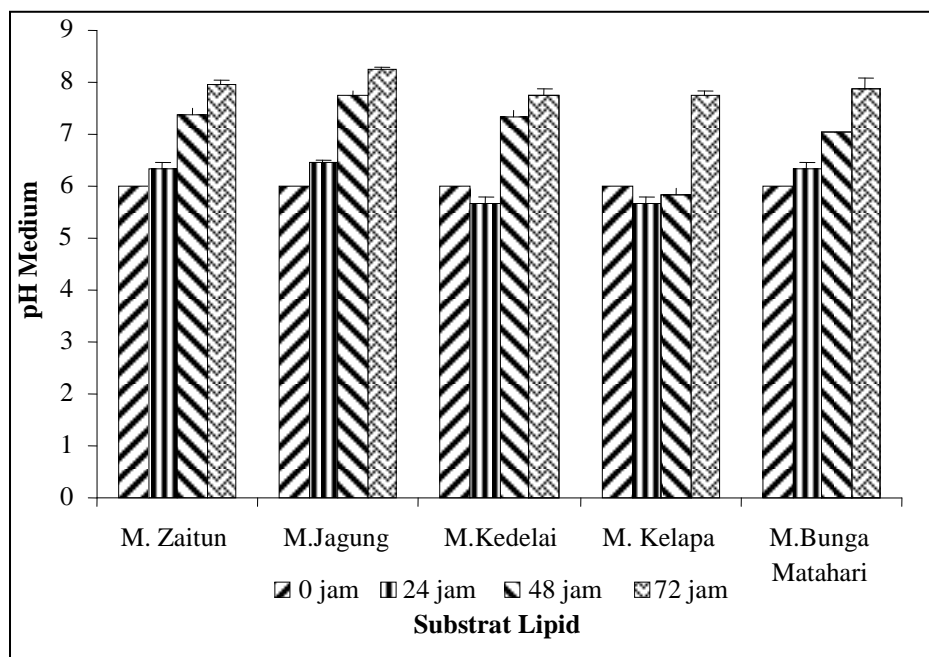
Gambar 3. Aktivitas spesifik lipase *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan lima jenis substrat lipid (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).



Gambar 4. Berat biomassa *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan lima jenis substrat lipid (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).



Gambar 5. Perubahan pH medium fermentasi *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520 dengan lima jenis substrat lipid (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).



Gambar 6. Perubahan pH medium fermentasi *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 dengan lima jenis substrat lipid (minyak nabati) pada inkubasi 24, 48, dan 72 jam (M = minyak).

Simpulan dan Saran

Simpulan

Aktivitas spesifik lipase tertinggi untuk *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* UICC 520

(30,5 U/g Biomassa) diperoleh dalam medium dengan substrat lipid minyak kelapa (2% v/v) pada jam ke-48, sedangkan untuk strain *R. microsporus* var. *oligosporus* UICC 550 aktivitas spesifik lipase tertinggi (16,23 U/g Biomassa) diperoleh dalam medium yang

ditambahkan substrat lipid minyak kelapa (2% v/v) pada jam ke-24. pH medium mengalami perubahan kearah basa selama fermentasi pada kedua kapang.

Saran

Perlu penelitian lebih lanjut tentang faktor-faktor lain yang berpengaruh terhadap produksi lipase misalnya: sumber nitrogen, pH, dan variasi agitasi untuk optimasi produksi enzim lipase.

Daftar Pustaka

- Akhtar, M.W., Mirza, A.Q. dan Chughtai, M.I.D. 1980. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 40: 257–263.
- Allonso, F.O.M., Oliveira, E.B.L., Deltamore-oritz, G.M. dan Pereira, M. 2005. Improvement of lipase production it different stirrings speed & oxygen levels. *Brazillian J. of chemistry engineering*, 22 (1): 9–18.
- Barcerz, R., Gilnalsaka, G., Fiedurek, J. dan Gromada, A. 2005. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotropic fungus *Penicillium chrysogenum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 253–260.
- Bilgrami, K.S. dan Verma, R.N. 1981. Physiology of fungi. 2nd ed. Vikas Publishing House PVT. Ltd. New Delhi.
- Cardenas, F., Alvares, E., de Castro-Alvares, M.S., Sanches-Montero, J., Valmaseda, M., Elson, S.W. dan Sinisterra, J. 2001. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *J. of molecular catalytic B. Enzymatic*, 14: 111–123.
- Davranov, K. dan Khalameizer, V.B. 1997. Current state of the study of microbial lipases. *Chemistry of Natural Compound*, 33: 113–126.
- Ellibol, M. dan Ozer, D. 2002. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.*, 38: 367–372.
- Ferrer, M., Plou, F.J., Nuero, O.M., Reyes, F. dan Ballesteros, A. 2000. Purification & properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial waste. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 75: 569–576.
- Hama, S., Tamalampudi, S., Fukumizu, T., Miura, K., Yamaji, H., Kondo, A. dan Fukuda, H. 2006. Lipase localization in *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles for use as whole-cell biocatalyst in biodiesel-fuel production. *J. of bioscience & bioengineering*, 110 (4): 328–333.
- Hiol, A.M.D., Jonzo, D. dan Comeau, L. 1999. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 80–87.
- Kulkarni, N. 2002. Studies on lipase enzyme from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Thesis. University of Pune, India.
- Lima, M.G.V., Krieger, N., Sarquis, M.I.M., David, A.M., Luiz, P.R. dan Fontana, J.D. 2003. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogresium*. *Food Technol. Biotechnol.*, 41 (2): 1205–1210.
- Mangunwardoyo, W., Yuyun. L. dan Indrawati, G. 2009. Karakterisasi, Pengaruh Sumber Nitrogen dan Karbon terhadap Produktivitas Enzim Lipase *Rhizopus microsporus* var *oligosporus* UICC 550. *Biota*, 14 (2): 115–124.
- Mojovick, L., Siler-Marikov, S., Kuki, G. dan Vunjak, N. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 438–443.
- Muderhwa, J.M. dan Ratomahenia, R. 1985. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) langeron & Guera. *JAOCS*, 62 (6): 1031–1036.
- Nahas, E. 1988. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. of General Microbiology*, 134: 227–233.
- Ramarethiam, S., Latha, K. dan Rajalakshmi, N. 2002. Use of the fungal lipase for enhancement of aroma in black tea. *Food Sci. Technol. Res.*, 8 (4): 328–332.
- Samad, M., Samad, Y.A., Salleh, A.B., Razak, C.N.A., Ampon, K., Yunus, W.M.Z.W. dan Basri, M. 1990. Lipase from a newly isolated thermophilic *Rhizopus rhizopodiformis*. *World J. of Microbiology and Biotechnology*, 6: 390–394.
- Saxena, K., Gosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Brandoo, S. dan Gulati, R. 1999. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. *Current Science*, 77 (1): 101–111.
- Sharma, R., Chisti, Y. dan Banerje, U.C. 2001. Review: Production, purification, characterization and application of lipases. *Biotechnology Advances*, 19: 627–662.

- Suharyanto. 2000. Potensi *Rhizopus microsporus* v Teigh UICC 519, 520 dan 521 dalam menghasilkan enzim proteolitik dan penentuan pH serta suhu optimum aktivitas proteolitik *Rh. microsporus* v Teigh UICC 520. Thesis Program Magister Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Univesitas Indonesia. Depok.
- Ward, O.P. 1985. Hydrolitic enzyme. Dalam Moo-Young. M. *Comprehensive biotechnology: the principle, application, and regulation of Biotechnology in industry, agricultural and medicine 3*. Pergamon Press. Oxford.
- Yoshida, F., Motai, H. dan Eichishima, E. 1968. Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. *Appl. Microbiology*, 16 (6): 845–847.
- Zhang, L.Y. dan Wei, D.Z. 2003. Effective inducers for lipase production by *Candida rugosa*. *Annals of microbiology*, 53 (4): 449–504.