

Fermentasi Kelapa Parut Bebas Protein dengan *Aspergillus niger* untuk Menghasilkan Lipase

[Fermentation of Protein-Free Grated Coconut with *Aspergillus niger* to Produce of Lipase]

Rifka Aulia^{1*}, Syaiful Bahri¹, Meryany Ananda²

¹Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako, Jl. Soekarno Hatta Km.9, Kampus Bumi Tadulako Tondo Palu

²Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako, Jl. Soekarno Hatta Km.9, Kampus Bumi Tadulako Tondo Palu

*Corresponding author: rifka_aulia@ymail.com

ABSTRACT. The research about the fermentation of protein-free grated coconut with *Aspergillus niger* to produce of crude lipase enzyme has been carried out. This study aims to determine the effect of water content on fermentation medium and the incubation time which results lipase enzyme extract with the highest activity. This study used a Completely Randomized Design (CRD) consisting of 2 factors, i.e. variations of water content in medium of 40%, 50%, 60%, and 70% and incubation times of 48, 96, 144, and 192 hours. The parameters observed were lipase enzyme activity produced in each treatment. The results showed that the highest medium water content was 70% with the lipase enzyme activity 4.33 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$ and the best incubation time was 96 hours with the lipase enzyme activity of 0.83 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{minute}$.

Keywords: Lipase enzyme, protein-free grated coconut, *Aspergillus niger*

ABSTRAK. Telah dilakukan penelitian tentang fermentasi kelapa parut bebas protein dengan *Aspergillus niger* untuk menghasilkan ekstrak kasar enzim lipase. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh kadar air medium fermentasi dan waktu inkubasi yang menghasilkan ekstrak enzim lipase dengan aktivitas tertinggi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 faktor, yaitu variasi kadar air medium 40%, 50%, 60%, dan 70% dan waktu inkubasi 48, 96, 144 dan 192 jam. Parameter yang diamati adalah aktivitas enzim lipase yang dihasilkan pada setiap perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar air medium tertinggi 70% dengan aktivitas enzim lipase 4,33 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ dan waktu inkubasi tertinggi 96 jam dengan aktivitas enzim lipase 0,83 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$.

Kata Kunci : Enzim lipase, kelapa parut bebas protein, *Aspergillus niger*

Riwayat artikel: Diterima 2 Juli 2019, Disetujui 12 April 2020

Cara sitasi: Aulia, R., Bahri, S., Ananda, M. (2020). Fermentasi Kelapa Parut Bebas Protein dengan *Aspergillus niger* untuk Menghasilkan Lipase. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 6(1): 45-52.

DOI: <https://doi.org/10.22487/kovalen.2020.v6.i1.13052>

LATAR BELAKANG

Kelapa merupakan salah satu jenis tumbuhan yang cukup tinggi kadar lipidnya, sehingga banyak dimanfaatkan untuk produksi minyak. Menurut Prihatini (2008), kandungan lemak kelapa tergantung pada umur kelapanya. Semakin tua kelapa, kandungan

lemaknya semakin tinggi. Produk dengan nilai ekonomis tinggi yang digunakan diberbagai proses industri pangan maupun nonpangan dapat dihasilkan melalui proses reaksi antara enzim dengan molekul substrat yang ditemukan pada hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme.

Tingginya kandungan lipid pada buah kelapa, sehingga dapat pula dimanfaatkan untuk menghasilkan enzim lipase. Substrat yang umum digunakan untuk memproduksi enzim lipase adalah substrat yang mengandung lemak, seperti santan kelapa (Mappiratu, 1997), bungkil inti sawit (Pasaribu *et al.*, 1998), dan kelapa parut (Indah *et al.*, 2017). Enzim lipase dapat diproduksi melalui reaksi-reaksi esterifikasi, alkoholisis, asidolisis dan aminolisis (Gandhi, 1997) serta hidrolisis triasilgliserol (TAG) menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan asam lemak bebas (Putranto *et al.*, 2006). Enzim lipase dapat dihasilkan dengan cara fermentasi menggunakan kapang *Aspergillus niger* (Prabaningtyas *et al.*, 2018). Jenis kapang ini selain dapat menghasilkan enzim lipase, juga dapat menghasilkan enzim lainnya, seperti selulase, protease, xilanase, dan mananase.

Produksi enzim lipase menggunakan *Aspergillus niger* penting karena kapang *Aspergillus niger* merupakan mikroorganisme yang mampu menghasilkan enzim lipase dengan aktivitas tinggi dan mudah didapatkan. Produksi enzim lipase sangat dipengaruhi oleh pH, suhu, kadar air, jenis substrat dan waktu fermentasi. Fermentasi kelapa parut dari *Aspergillus niger* untuk menghasilkan lipase dipengaruhi oleh komponen kimia yang terdapat dalam substrat. Untuk mengefektifkan produksi lipase, komponen yang terdapat dalam substrat dapat dikurangi dengan cara penambahan larutan NaOH (deproteinasi) (Purkan *et al.*, 2016) untuk membebaskan protein sehingga jumlah enzim lipase yang dihasilkan meningkat dan diperoleh enzim dengan aktivitas yang lebih tinggi.

Indah *et al.* (2017) telah memproduksi enzim lipase menggunakan *Aspergillus niger*

isolat kapang kopra memanfaatkan medium kelapa parut dan menghasilkan aktivitas enzim lipase tertinggi 1,70 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{menit}$ selama 48 jam fermentasi pada pH 7. August (2000) dalam produksi lipase menggunakan substrat minyak kelapa, memperoleh aktivitas enzim lipase 5,042 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{menit}$ selama 6 hari fermentasi pada pH 7. Perbedaan waktu fermentasi disebabkan oleh perbedaan kemampuan mikroorganisme dalam mendegradasi komponen-komponen nutrisi yang terdapat dalam substrat (August, 2000).

Dalam proses fermentasi menggunakan fasa padat, kadar air pada medium berpengaruh terhadap jumlah enzim lipase yang dihasilkan. Air berfungsi dalam metabolisme organisme, yaitu sebagai sumber oksigen dan hidrogen dalam biosintesis komponen sel dan sebagai transportasi nutrisi. Jumlah air yang dibutuhkan dalam fermentasi menggunakan fasa padat berbeda-beda tergantung jenis organisme dan substrat yang digunakan. Menurut Zaks & Klivanov (1984), jumlah air minimum yang dibutuhkan oleh enzim untuk dapat melakukan aktivitasnya adalah sekitar 50% dari jumlah air yang dibutuhkan untuk membentuk selapis (monolayer) molekul air yang menutup permukaan protein. Faktor kadar air dan waktu fermentasi menjadi variabel utama pada produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* menggunakan kelapa parut bebas protein dengan tujuan menghasilkan aktivitas lipase yang tinggi.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Bahan utama yang digunakan, yaitu kelapa parut, minyak kelapa merk *Sunco*, kultur murni *Aspergillus niger*, kentang, gula, media

PDA, PDB, indikator PP, buffer fosfat (pH 6 dan 7), selenium, H_2SO_4 (pa), urea, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot H_2O$, Na_2CO_3 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, aseton, etanol, $CaCl_2$, NaOH, dan akuades.

Peralatan yang digunakan, yaitu alat parut, oven, desikator, neraca analitik *Ohaus Corp. Pine Brook*, soxhlet, Labu kjehdahl, kompor destruksi *Gerhardt*, ayakan, mikropipet, botol semprot, *termoshaker Gerhardt*, pipet tetes, termometer, autoklaf *Hirayama*, jarum ose, klem dan statif, buret, serta bunsen.

Prosedur Penelitian

Pembuatan kelapa parut bebas protein

Kelapa parut yang telah dikeringkan ditambahkan larutan NaOH 5% pada perbandingan 1:10 (b/v). Kemudian disaring dan dicuci menggunakan akuades sampai pH netral. Lalu dikeringkan dengan oven pada suhu $105^\circ C$ selama 10 jam (Purkan *et al.*, 2016). Residu kelapa parut yang diperoleh diukur kadar protein (metode Kjehdahl) dan kadar lemak (metode sokletasi) sebelum dan sesudah dibebaskan protein.

Perbanyak Aspergillus murni pada media PDA

Alat-alat yang akan digunakan dalam perbanyak ini disterilkan terlebih dulu, dengan cara membungkus cawan petri menggunakan kertas kemudian disterilisasi selama 30 menit dengan suhu $121^\circ C$. Setelah disterilkan cawan petri diisi dengan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebanyak 1,17 ml. Setelah itu cawan petri dibiarkan agar medianya menjadi padat selama 3-4 jam. Setelah media menjadi padat, dilakukan proses inokulasi dengan menggunakan metode gores. Teknik dalam inokulasi yaitu mengambil *Aspergillus niger* murni dengan jarum ose dan dipindahkan ke dalam media padat (PDA).

secara zig-zag dari atas ke bawah. Kemudian diinkubasi selama 3-7 hari.

Perbanyak Aspergillus murni pada media produksi PDB

Kentang dikupas kemudian dipotong dadu, lalu dimasukkan di dalam air dan dipanaskan hingga lunak. Setelah itu disaring, kemudian diambil filtratnya 100 mL ditambahkan gula 2 g ke dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian suspensi jamur ditambahkan secara steril, kemudian dishaker selama 3-7 hari.

Penentuan jumlah sel Aspergillus niger menggunakan hemasitometer

Koloni *Aspergillus niger* diencer 10x, kemudian dipipet menggunakan mikropipet 1 μ L pada parit kaca pada alat hitung. Diletakkan alat hitung pada meja benda dan kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran lensa objektif lensa 40x. Dihitung jumlah spora secara kasar dengan menghitung 5 kotak sedang dan dirata-ratakan.

Produksi enzim lipase

Sejumlah 20 g kelapa parut kering bebas protein dimasukkan dalam erlenmeyer 500 mL kemudian ditambahkan buffer fosfat pH 7 yang berisi larutan nutrisi (urea 0,75 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2,5 g/L, KH_2PO_4 (0,75 g/L), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,125 g/L), dan $CaCl_2 \cdot H_2O$ (0,125 g/L)) dengan variasi rasio air medium 40%, 50%, 60%, dan 70% yang mengandung 1 mL kultur *Aspergillus niger*. Campuran diaduk hingga homogen dan diinkubasi pada suhu ruang pada waktu inkubasi 48, 96, 144 dan 192 jam. Lipase yang ada dalam medium diekstrak menggunakan 250 mL larutan $CaCl_2$ 0,01 M. Campuran dikocok selama 1 jam diatas shaker. Selanjutnya disaring dan filtratnya ditampung sebagai larutan enzim lipase (Indah *et al.*,

2017), kemudian ditentukan aktivitas enzim lipasenyanya.

Penentuan aktivitas enzim

Pada penentuan aktivitas enzim, digunakan minyak kelapa sebanyak 2 g, dimasukkan kedalam erlenmeyer bertutup 500 mL, kemudian ditambahkan 4 mL larutan buffer 0,01 M (pH 6,0), 1 mL larutan CaCl 1 M dan 1 mL filtrat (larutan enzim). Campuran selanjutnya diinkubasi pada inkubator bergoyang agitasi 300 rpm pada suhu ruang selama 1 jam. Setelah waktu inkubasi tercapai segera substrat enzim diinaktifkan dengan penambahan campuran aseton-etanol (1:1 v/v) sebanyak 10 mL. Lalu campuran dibuat homogen dengan pengocokan, kemudian ditambahkan 3 tetes indikator pp dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,05 M sampai campuran berwarna merah jambu. Untuk blanko dilakukan dengan cara yang sama tanpa sampel. Kemudian aktivitas lipase dihitung menggunakan Persamaan 1 (Indah *et al.*, 2017) :

$$\text{Aktivitas Lipase} = \frac{(A-B) \times N \text{ NaOH} \times 1000}{V \times t} \quad (1)$$

Keterangan :

Aktivitas lipase	=	$\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$
A	=	volume NaOH sampel (mL)
B	=	volume NaOH blanko (mL)
N NaOH	=	0,05 N
1000	=	nilai konversi dari mmol ke μmol
V	=	volume enzim (mL)
t	=	waktu inkubasi (menit)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kelapa Parut Bebas Protein

Kelapa parut yang sudah kering kemudian di bebaskan protein (deproteinasi) dengan penambahan NaOH 5%. Deproteinasi adalah proses memisahkan atau menghilangkan kandungan protein terlarut yang terdapat pada

suatu bahan. Pada prosesnya, protein akan bereaksi dengan ion Na^+ dari NaOH menjadi Na proteinat yang larut (Ashari, 2018).

Hasil analisis kadar protein sebelum dilakukan penambahan NaOH 5% adalah 6,94% dan setelah dibebaskan proteinnya 1,82%. Hasil yang diperoleh ini sudah dapat dikatakan bebas protein karena pada bahan masih terdapat senyawa kimia yang mengandung N seperti purina, pirimidina, vitamin-vitamin, asam amino besar, dan kreatina yang ikut teranalisis dan terukur sebagai nitrogen (Winarno, 2004). Senyawa-senyawa tersebut tidak dapat larut dalam NaOH sehingga ketika dilakukan uji Kjeldahl tetap terbaca nitrogennya.

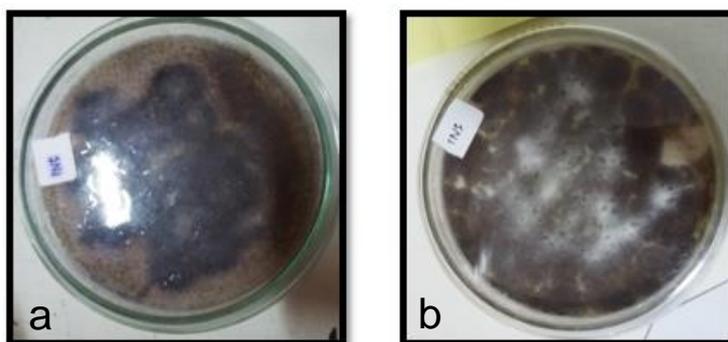
Hasil analisis kadar lemak kelapa parut awal menggunakan metode soklet yang diperoleh sebesar 19,96%, setelah dilakukan pembebasan protein kadar lemaknya naik menjadi 30,68%. Peningkatan kadar lemak pada kelapa parut diakibatkan oleh adanya sebagian komponen senyawa yang ikut terlarut di dalam NaOH selain senyawa protein sehingga komponen senyawa pada kelapa parut berkurang dan menyebabkan kadar lemak menjadi naik. Menurut Prihatini (2008), kandungan lemak pada kelapa berdasarkan perbedaan umur buah kelapa adalah 0,9% (muda), 15% (setengah tua) dan 34,7% (tua). Kadar lemak yang diperoleh lebih kecil dibandingkan dengan literatur. Kemungkinan kelapa yang digunakan adalah campuran antara kelapa setengah tua dan kelapa tua.

Hasil Fermentasi

Pada penelitian ini, produksi enzim menggunakan medium kelapa karena kelapa memiliki lemak yang tinggi. *Aspergillus niger* digunakan karena mampu menghasilkan enzim lipase dengan baik. Falony *et al.* (2006)

menyatakan produksi enzim lipase dengan menggunakan medium lemak sebagai substrat menghasilkan enzim lipase yang lebih spesifik dibandingkan dengan produksi tanpa menggunakan medium lemak.

Jumlah enzim lipase yang dihasilkan pada setiap proses fermentasi akan berbeda hasilnya, tergantung pada kandungan lemak yang terdapat pada media yang berfungsi sebagai substrat.



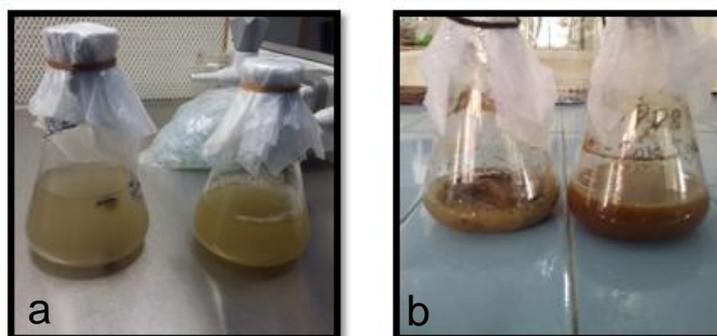
Gambar 1. Biakan *Aspergillus niger* pada media PDA hari ke-3 (a) dan ke-7 (b)

Miselium yang terbentuk kemudian dipindahkan ke media PDB untuk menghasilkan sel-sel *Aspergillus niger* yang lebih aktif. Proses pengaktifan sel-sel dilakukan dengan cara aerasi untuk menyuplai oksigen secara terus menerus. Inkubasi dilakukan

Jumlah Spora *Aspergillus niger*

Kultur *Aspergillus niger* diremajakan pada media padat PDA (media selektif untuk kapang). Hasil inkubasi selama 3-7 hari pada suhu 37°C, terbentuk miselium berwarna hijau kehitaman (Gambar 1). Pertumbuhan miselium pada hari ke-3 belum maksimal dan mencapai maksimal pada hari ke-7 yang ditandai dengan banyaknya isolat *Aspergillus niger* yang tumbuh memenuhi cawan petri.

selama 3-7 hari. Spora *Aspergillus niger* yang terbentuk sempurna pada hari ke-7 dihitung menggunakan alat Hemasitometer (Gambar 2). Hasil perhitungan spora, diperoleh jumlah spora $9,25 \times 10^9$ sel/mL.

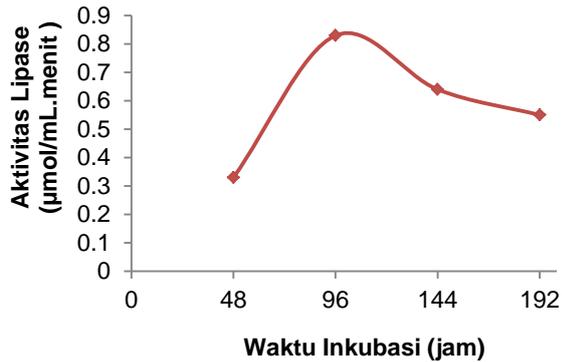


Gambar 2. Biakan *Aspergillus niger* pada media PDB hari ke-3 (a) dan ke-7 (b)

Aktivitas Lipase pada Variasi Waktu Inkubasi

Aktivitas enzim lipase dari kapang *Aspergillus niger* pada proses fermentasi

mencapai optimum pada waktu inkubasi 96 jam, yaitu $0,83 \mu\text{mol/mL}$.menit (Gambar 3).



Gambar 3. Aktivitas enzim lipase pada variasi waktu inkubasi

Pada waktu inkubasi 48-96 jam, jumlah nutrisi yang terdapat pada kelapa parut bebas protein mencukupi untuk pertumbuhan *Aspergillus niger* sehingga jumlah ekstrak enzim yang dihasilkan meningkat dan mengakibatkan aktivitas enzim lipase semakin tinggi. Pada waktu inkubasi 96-192 jam, jumlah nutrisi sudah mulai berkurang dan kemungkinan sebagian dari enzim mengalami kerusakan sehingga jumlah enzim yang terdapat dalam ekstrak semakin berkurang dan mengakibatkan aktivitas enzim lipase juga menurun.

Indah *et al.* (2017) memperoleh waktu inkubasi terbaik 48 jam pada produksi enzim lipase menggunakan medium kelapa parut, sedangkan Maryanty *et al.* (2010) memperoleh waktu inkubasi 72 jam dengan aktivitas crude enzim lipase 42,22 U/mL pada konsentrasi *Aspergillus niger* 50%. Utami *et al.*, (2017) memperoleh waktu terbaik 120 jam dengan aktivitas 38,67 U/g dalam produksi ekstrak kering ekstraseluler lipase dari *Aspergillus niger* dengan fase padat substrat dedak padi. Perbedaan hasil aktivitas enzim lipase yang dihasilkan pada variasi waktu inkubasi dan kadar air medium dikarenakan adanya perbedaan perlakuan dan lingkungan yang

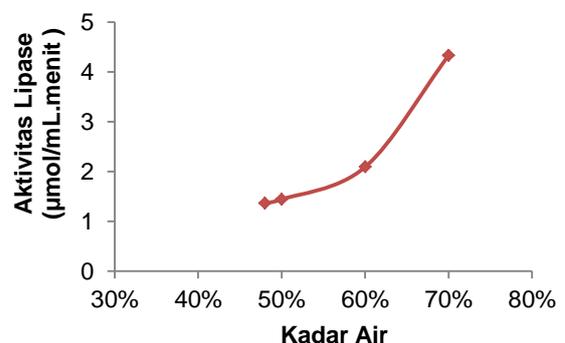
dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme.

Hasil uji statistik (oneway ANOVA) menghasilkan nilai signifikan 0,178 atau lebih besar dari nilai α 0,05. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu inkubasi berpengaruh tidak nyata terhadap aktivitas enzim lipase.

Aktivitas Lipase pada Variasi Kadar Air

Produksi enzim lipase dari kapang *Aspergillus niger* menggunakan fermentasi padat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain seperti kadar air medium, pH dan waktu inkubasi. Kadar air pada medium pada saat inkubasi dapat diatur dengan menggunakan larutan buffer. Buffer yang digunakan adalah buffer fosfat. Kapang umumnya lebih toleran terhadap suasana asam sampai netral, yaitu pada pH 3-7. *Aspergillus niger* mempunyai kisaran pH untuk tumbuh cukup luas yaitu 2,8-8,8. Menurut Indah *et al.* (2017), pH terbaik untuk produksi enzim lipase adalah pH 7. Pada penelitian ini digunakan buffer fosfat pH 7.

Hasil analisis yang diperoleh adalah aktivitas enzim lipase tertinggi diperoleh pada kadar air 70% dengan aktivitas enzim lipase 4,33 µmol/mL.minit (Gambar 4).



Gambar 4. Aktivitas enzim lipase pada variasi kadar air medium

Penggunaan kadar air lebih dari 70% tidak digunakan, karena dari beberapa hasil penelitian untuk beberapa jenis mikroba,

kondisi optimum hanya terjadi pada kisaran kadar air 40%-70% (Idiawati *et al.*, 2014). Hasil yang diperoleh berbeda dengan hasil yang diperoleh Indah *et al.* (2017), yaitu 45% dengan aktivitas enzim lipase tertinggi yaitu 1,70 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$ pada produksi enzim lipase dari *Aspergillus niger* menggunakan medium kelapa parut. Falony *et al.* (2006) memperoleh kadar air optimum 65% dengan aktivitas enzim 4,8 IU/mL untuk produksi lipase ekstraselular dari *Aspergillus niger* menggunakan kultur mineral dan dedak gandum.

Hasil analisis statistik dengan taraf kepercayaan 95% ($\text{sig} = 0,05$) didapatkan nilai signifikan 0,000. Hasil yang diperoleh menunjukkan kadar air medium memberi pengaruh nyata terhadap aktivitas enzim lipase. Dilanjutkan pada uji Duncan untuk menentukan kadar air medium terbaik. Kadar air medium 70% memiliki nilai aktivitas tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan kadar air lainnya.

KESIMPULAN

Waktu inkubasi 96 jam menghasilkan aktivitas enzim lipase tertinggi, yaitu 0,83 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Kadar air medium fermentasi terpilih, yaitu 70% dengan aktivitas enzim lipase 4,33 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{menit}$. Kadar air sangat berpengaruh terhadap aktivitas enzim lipase dari *Aspergillus niger*.

DAFTAR PUSTAKA

Ashari, N. (2018). Produksi Mananase Dari Substrat Ampas Kelapa Bebas Lemak dan Protein Dari *Aspergillus niger*. [Skripsi]. Jurusan Kimia Universitas Tadulako, Palu.

August, E. (2000). Kajian Lipase Amobil dari *Aspergillus niger* pada Pembuatan MAG Yang Bersifat Antibakteri dari Minyak

Kelapa. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Falony, G., Armas, J. C., Mendoza, J. C. D., & Hernández, J. L. M. (2006). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2): 235--240.

Gandhi, N. N. (1997). Applications of Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(6): 621–634. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0194-x>

Indah, I., Mappiratu, M., & Musafira, M. (2017). Produksi Enzim Lipase dari *Aspergillus niger* Isolat Kapang Kopra dengan Menggunakan Medium Kelapa Parut. *KOVALEN*, 3(3): 269–276. <https://doi.org/10.22487/j24775398.2017.v3.i3.9335>

Mappiratu. (1997). Isolasi Mikroba Penghasil Enzim Protease, Amilase dan Lipase Serta Pengujian Potensi Produksinya. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Pasaribu, S., Hamid, H., & Sinurat, A. (1998). *Fermentasi Bungkil Inti Sawit Secara Substrat Padat dengan Menggunakan Aspergillus niger*. Balai Penelitian Ternak, Bogor.

Prabaningtyas, R. K., Putri, D. N., Utami, T. S., & Hermansyah, H. (2018). Production of Immobilized Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Method Using Palm Kernel Cake, Soybean Meal, and Coir Pith as The Substrate. *Energy Procedia*, 153: 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2018.10.010>

Prihatini, R. (2008). Analisa Kecukupan Panas Pada Proses Pasteurisasi Santan. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Purkan, P., Purnama, H., & Sumarsih, S. (2016). Production of Cellulase Enzyme from *Aspergillus niger* using Rice Husk and Bagasse as Inducer. *Jurnal ILMU DASAR*, 16(2): 95. <https://doi.org/10.19184/jid.v16i2.2768>

Putranto, R. A., Santoso, D., Tri-Panji, Suharyanto, & Budiani, A. (2006). Karakterisasi Gen Penyandi Lipase dari

Kapang *Rhizopus oryzae* dan *Absidia corymbifera*. *E-Journal Menara Perkebunan*, 74(1).
<https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v74i1.118>

Utami, T. S., Hariyani, I., Alamsyah, G., & Hermansyah, H. (2017). Production of Dry Extract Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid State Fermentation Method to Catalyze Biodiesel Synthesis. *Energy Procedia*, 136: 41–46.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.10.275>

Winarno, F. (2004). *Kimia Pangan dan Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Zaks, A., & Klibanov, A. (1984). Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100 Degrees C. *Science*, 224(4654): 1249–1251.
<https://doi.org/10.1126/science.6729453>